



FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA MÉDICA Y BIOFÍSICA

**Identificación de Componentes Moleculares Sinápticos que
Contribuyen a la Vulnerabilidad de los Terminales Nerviosos
Motores en un Modelo Múrido de Atrofia Muscular Espinal**

TESIS DOCTORAL
ROCÍO TEJERO NAVARRO
SEVILLA, 2016



DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA MÉDICA Y BIOFÍSICA
FACULTAD DE MEDICINA. UNIVERSIDAD DE SEVILLA
Avda. Sánchez Pizjuán, 4. 41009. Sevilla

Dña. Lucía Tabares Domínguez, Catedrática de Fisiología del Departamento de Fisiología Médica y Biofísica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla.

CERTIFICA:

Que Dña. Rocío Tejero Navarro ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado "*Identificación de Componentes Moleculares Sinápticos que Contribuyen a la Vulnerabilidad de los Terminales Nerviosos Motores en un Modelo Múrido de Atrofia Muscular Espinal*", que presenta para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Fdo: Lucía Tabares Domínguez

Sevilla a 23 de septiembre de 2016

BECAS

- 2011-2015: Beca Personal Investigador en Formación (FPI) asociada al proyecto BFU2013-43763-P del Ministerio de Ciencia e Innovación. Facultad de Medicina. Universidad de Sevilla.
- 2014: Ministerio de Ciencia e Innovación. Programa de estancias cortas. Laboratorio Prof. Silvio O. Rizzoli. European Neuroscience Institute (ENI). Göttingen (Alemania). Proyecto "Papel del Citoesqueleto y de la Mitochondria en la Patogenia de la Atrofia Muscular Espinal" (61 días).
- 2015: Ministerio de Ciencia e Innovación. Programa de estancias cortas. Laboratorio Prof. Michael Sendtner. Institute for Clinical Neurobiology. Universidad de Wurzburg (Alemania). Proyecto: "Papel del Citoesqueleto y de la Mitochondria en la Patogenia de la Atrofia Muscular Espinal" (61 días).

CONTRATOS ASOCIADOS A PROYECTOS

- 2015-actualidad: contrato de investigador asociado al proyecto BFU2013-43763-P del Ministerio de Economía y Competitividad.

PUBLICACIONES

- **Tejero R**, Lopez-Manzaneda M, Arumugam S, Tabares L. Synaptotagmin-2, and -1, linked to neurotransmission impairment and vulnerability in Spinal Muscular Atrophy. Human Molecular Genetics. doi: 10.1093/hmg/ddw297. First published online: August 29, 2016.
- Wu YJ, **Tejero R**, Arancillo M, Vardar G, Korotkova T, Kintscher M, Schmitz D, Ponomarenko A, Tabares L, Rosenmund C. Syntaxin 1B is important for mouse postnatal survival and proper synaptic function at the mouse neuromuscular junctions. Journal of Neurophysiology.

Neurophysiol. 2015 Oct; 114(4):2404-17. doi: 10.1152/jn.00577.2015. Epub 2015 Jul 22.

- Bastian Ackermann, Sandra Kröber, Laura Torres-Benito, Anke Borgmann, Miriam Peters, Seyyed Mohsen Hosseini Barkooie, **Rocío Tejero**, Miriam Jakubik, Julia Schreml, Janine Milbradt, Thomas F. Wunderlich, Markus Riessland, Lucia Tabares and Brunhilde Wirth. Plastin 3 ameliorates spinal muscular atrophy via delayed axon pruning and improves neuromuscular junction functionality. Human Molecular Genetics, 2013 Apr 1;22(7):1328-47. doi: 10.1093/hmg/ddt540. Epub 2012 Dec 20.
- Cano R, Torres-Benito L, **Tejero R**, Biea AI, Ruiz R, Betz WJ and Tabares L. Structural and functional maturation of active zones in large synapses. Mol Neurobiol. 2013 Feb;47(1):209-19. doi: 10.1007/s12035-012-8347-9. Epub 2012 Sep 20
- Torres Benito, L., **Tejero, R.**, Ruiz, R., Tabares, L. Atrofia Muscular Espinal. FISIOLÓGIA. Boletín informativo de la SECF

CONTRIBUCIONES A CONGRESOS

Comunicaciones Orales

- Tejero R, Tabares L. Enhancement of Synaptic Transmission in a Mouse Model of Spinal Muscular Atrophy. 16th National Congress of the Spanish Society of Neuroscience. Granada, España. Septiembre 2015.
- Tejero R, Tabares L. Capability of SMN-deficient motor nerve terminals to increase neurotransmitter release in a mouse model of Spinal Muscular Atrophy. 19th SMA meeting. Kansas City, Missouri (EE.UU). Junio 2015.
- Ackermann B., Kröber S., Torres-Benito L., Borgmann A., Peters M., Hosseini Barkooie S.M., Tejero R., Jakubik M., Schreml J., Milbradt J.,

Wunderlich TF., Riessland M., Tabares L., Wirth B. Plastin 3 ameliorates spinal muscular atrophy via delayed axon pruning and improves neuromuscular junction functionality. European Human Genetics Conference 2013. París (Francia). Junio, 2013.

Poster

- Identifying potential factors that increase vulnerability in certain motor nerve terminals in Spinal Muscular Atrophy. 19th SMA meeting. Junio 2015. Kansas City, Missouri (EE.UU). Junio, 2015
- Tejero R, Ackermann B, Kröber S, Torres-Benito L, Borgmann A, Peters M, Hosseini Barkooie SM, Jakubik M, Schreml J, Milbradt J, Wunderlich TF, Riessland M, Tabares L, Wirth B. Plastin 3 ameliorates synaptic defects in Spinal Muscular Atrophy. Workshop "Membrane Traffic at the Synapse. The Cell Biology of Synaptic Plasticity". Baeza, España. Octubre, 2012
- Ackermann B., Kröber S., Torres-Benito L., Borgmann A., Peters M., Hosseini Barkooie S.M., Tejero R., Jakubik M., Schreml J., Milbradt J., Wunderlich TF., Riessland M., Tabares L., Wirth B. Plastin 3 ameliorates spinal muscular atrophy via delayed axon pruning and improves neuromuscular junction functionality. 24th Annual Meeting of the German Society of Human Genetics. Dresden, Alemania. Marzo, 2013
- Tabares L, Torres-Benito L, Tejero R, Ruiz R. SMN deficiency disrupts presynaptic organization. Motor Neurons and Diseases of Motor Neurons Symposium. Edimburgo, Escocia. Julio, 2012
- Tejero R, Torres-Benito L, Tabares L. Deficiency in Survival Motor Neuron protein alters the organization of actin filaments in motor nerve terminals. "First EUSynapse Alumni Meeting". Sevilla, España. Mayo, 2012

ÍNDICE

ABREVIATURAS	13
ABSTRACT	19
RESUMEN	23
INTRODUCCIÓN	27
Atrofia Muscular Espinal	29
1. Características clínicas de la enfermedad	29
2. El gen <i>SMN</i>	31
3. La proteína de Supervivencia de Motoneuronas	33
3.1 Estructura de la proteína <i>SMN</i>	33
3.2 Función	35
3.3 Localización	37
4. Susceptibilidad de las neuronas motoras en AME	38
5. Defectos en la neurotransmisión en AME	40
6. Genes Modificadores	43
6.1 <i>Plastina 3</i>	44
6.2 <i>ZPR1</i>	45
6.3 <i>Jun Quinasa 3</i>	45
7. Estrategias terapéuticas	46
7.1 Terapia génica	47
7.2 Terapia celular	50
7.3 Corrección del procesamiento del gen <i>SMN2</i>	51
7.3.1 Regulación del proceso de transcripción de <i>SMN2</i>	51
7.3.2 Corrección del proceso de corte y empalme	52
7.3.3 Reducción de la degradación de ARNm	54
OBJETIVOS	59
MATERIALES y MÉTODOS	63
1. Modelos animales	65
1.1 Modelo <i>SMNΔ7</i>	65
1.2 Modelo Taiwanés	66
2. Genotipado de las líneas experimentales	67
2.1 Protocolo de extracción de ADN	67
2.2 PCR y electroforesis	67
2.2.1 Modelo <i>SMNΔ7</i>	68
2.2.2 Modelo Taiwanés	69
3. Preparaciones neuromusculares	71

3.1 <i>Transversus abdominis</i> (TVA).....	71
3.2 <i>Obliquus internus abdominis</i> (OIA).....	72
3.3 Diafragma	73
4. Registro intracelular mediante microelectrodos de vidrio	75
4.1 Procedimiento y dispositivo experimental.....	75
4.2 Análisis de los registros electrofisiológicos.....	79
4.3 Modificadores de la neurotransmisión	81
5. Inmunofluorescencia.....	83
5.1 Protocolo	83
5.2 Anticuerpos	85
6. Adquisición y análisis de imágenes.....	85
6.1 Microscopia confocal y adquisición de imágenes	86
6.2 Análisis de imágenes	87
7. Análisis estadístico.....	88
RESULTADOS.....	93
I: Transmisión sináptica y Ca²⁺	95
1. Los canales de Ca ²⁺ dependientes de voltaje tipo P/Q y N median la neurotransmisión en los terminales SMN Δ 7	95
2. Disminución de la expresión de los canales de Ca ²⁺ tipo P/Q en AME	97
3. Ausencia de cambios significativos en la sensibilidad y cooperatividad a Ca ²⁺ en los terminales deficientes en SMN.....	99
4. El incremento de Ca ²⁺ extracelular no aumenta los sitios de liberación en los ratones SMN Δ 7.....	100
5. La acumulación de Ca ²⁺ durante la estimulación repetida compensa parcialmente el déficit de neurotransmisión	102
II. Alteración de la expresión de proteínas sinápticas en AME	107
1. Reducción de los niveles de SV2 en los terminales SMN Δ 7	107
2. La expresión de Syt1 y Syt2 se encuentra alterada en los terminales deficientes en SMN	109
3. Expresión diferencial de SV2B, Syt1 y Syt2 en función del grado de vulnerabilidad de los músculos en AME.....	111
4. Cambios en la expresión de SV2B, Syt1 y Syt2 durante el desarrollo postnatal.....	114
5. La expresión de sintaxina-1B y sinaptotagmina-7 no se encuentra alterada en los terminales SMN Δ 7	116
7. Las alteraciones en la expresión proteica no se deben únicamente a un retraso en la maduración	118
8. Validación de las alteraciones encontradas en el modelo SMN Δ 7 en el modelo Taiwanés	120
III. Regulación positiva de la actividad sináptica en AME	123
1. Roscovitina.....	123

1.1 R-roscovitina modula la neurotransmisión a través de los canales de Ca ²⁺ tipo P/Q	123
1.2 R-roscovitina reduce el número de terminales nerviosos silentes..	128
2. Éster de forbol	129
2.1 PDBu incrementa la liberación de NT aumentando el número de sitios activos de liberación.....	129
3. Nifedipina	137
3.1 Nifedipina aumenta la transmisión sináptica aumentando el número de sitios de liberación activos	137
DISCUSIÓN.....	141
El papel del Ca ²⁺ en la secreción en AME	144
SV2 y sinaptotagmina en AME	145
Regulación fisiológica de sinaptotagmina durante el desarrollo postnatal.	148
Posibles causas de las alteraciones sinápticas en AME	148
Regulación positiva de la neurotransmisión en AME	149
CONCLUSIONES.....	155
CONCLUSIONS	159
BIBLIOGRAFÍA.....	163
ANEXOS.....	187
ANEXO I.....	189
ANEXO II.....	204

ABREVIATURAS

ACh: acetilcolina

AME: Atrofia Muscular Espinal

ASO: oligonucleótido sinsentido

AZ: zonas activas (Active Zone)

BSA: albúmina de suero bovino (Bovine Serum Albumin)

BTX-Rho: bungarotoxina conjugada con rodamina

CCDV: canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje

Cdk5: Quinasa dependiente de ciclina 5 (Cyclin Dependent Kinase 5)

DcpS: enzima Scavenger mRNA-decapping

DMSO: dimetil sulfóxido

EDL: *Extensor digitorum longus*

ELA: Esclerosis Lateral Amiotrófica

EPP: potencial de placa evocado (Evoked Endplate Potential)

ESE: potenciadores exónicos del proceso de corte y empalme (Exonic Splicing Enhancer)

FPP: facilitación por pares de pulsos

HDAC: desacetilasas de histonas (Histone Deacetylases)

hnRNP: ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (Heterogeneous Nuclear Ribonucleoproteins)

iPSC: células madre pluripotenciales inducidas (*Induced Pluripotent Stem Cells*)

JNK3: gen Jun quinasa 3

JNK3: proteína Jun quinasa

LAL: *Levator auris longus*

m: contenido cuántico

mEPP: potencial de placa en miniatura (Miniature Endplate Potential)

n, N: n representa el número de terminales o fibras musculares. N representa el número de ratones

n: sitios de liberación de neurotransmisor

NAIP: proteína inhibitoria de apoptosis neuronal (Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein)

NF: neurofilamento

NMJ: unión neuromuscular (neuromuscular junction)
NT: neurotransmisor
OEA: *Obliquus externus abdominis*
OIA: *Obliquus internus abdominis*
P: día postnatal
PA: potencial de acción
PBA: fenilbutirato
PBS: tampón salino de fosfato
PBS-T: tampón salino de fosfato y Triton
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PFA: paraformaldehído
PGK: proteína fosfoglicerato quinasa (Phosphoglycerate Kinase)
PKC: proteína quinasa C (Protein Kinase C)
PLS3: proteína plastina 3
pr: probabilidad de liberación vesicular
PRL: prolactina
RA: *Rectus abdominis*
ROI: región de interés (Región of interest)
RRP: contingente de vesículas listas para ser liberadas (Readily Releasable Pool)
SAHA: ácido suberoilánilidohidroxámico
sem: error estándar de la media (Standard Error of the Mean)
SMA: Spinal Muscular Atrophy
SMN Δ 7: proteína SMN truncada en el exón 7
SMN: gen de Supervivencia de Motoneuronas humano
SMN: proteína de Supervivencia de Motoneuronas
SNC: sistema nervioso central
snRNA: molécula pequeña de ARN (Small Nuclear RNA)
snRNP: ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (Small Nuclear Ribonucleoproteins)
Stx1B: sintaxina-1B

SV: vesículas sinápticas (synaptic vesicle)

SV2: proteína de las vesículas sinápticas 2

Syt1: sinaptotagmina-1

Syt2: sinaptotagmina-2

Syt7: sinaptotagmina-7

TSA: tricostatina A

TVA: *Transversus abdominis*

Vm: potencial de la membrana plasmática

VPA: ácido valproico

ZPR1: gen Zinc Protein Finger 1

ZPR1: proteína Zinc Protein Finger 1

ABSTRACT

Spinal Muscular Atrophy (SMA), the most frequent genetic cause of infant mortality, is an autosomal recessive neurodegenerative motor neuron disease characterized by the loss of spinal cord α -motoneurons, muscle weakness and progressive paralysis of axial and proximal limb muscles. SMA is caused by the homozygous loss or mutation of the *Survival Motorneuron 1 (SMN1)* gene, which codes for the Survival Motor Neuron (SMN) protein. This protein is ubiquitously expressed, and it is important in the assembly of small nuclear ribonucleoproteins (snRNPs). In SMA mouse models, neurotransmitter release is greatly impaired. However, the molecular mechanisms of the synaptic dysfunction and the basis of the selective muscle vulnerability are unknown.

The aims of the present study were to get a deeper insight into the origin of the neurotransmitter release deficit at motor nerve terminals, and investigate the molecular basis of selective muscle vulnerability in SMA. To this end, we compared the molecular and functional properties of nerve terminals in muscles with different degree of vulnerability in the *SMN Δ 7* mouse model using electrophysiological techniques, immunostaining, confocal fluorescent microscopy, and quantitative imaging analysis.

The results show that the expression levels of synaptotagmin-2 (Syt2), and its interacting protein, synaptic vesicle protein 2 (SV2) B, were highly reduced in SMA terminals in comparison with controls, while other synaptic proteins, as syntaxin-1B (Stx1B) and synaptotagmin-7 (Syt7) were unaffected. We also found that synaptotagmin-1 (Syt1) undergoes a process of physiological downregulation during the postnatal development in nerve terminals of the most vulnerable muscles, but not in the least affected, what could be particularly critical when Syt2 is also pathologically decreased. Additionally, *SMN Δ 7* mice show a reduction in the density of P/Q-type voltage dependent Ca^{2+} channels in the neuromuscular junction. Consistently with the reduction of Ca^{2+} channels and the low content of Syt2, Syt1, and SV2B in most affected neuromuscular synapses, functional analysis of neurotransmission revealed a great reduction in evoked release, impaired short term plasticity, low release probability and inability to modulate normally the number of active release sites. Finally, despite the structural and functional alterations which characterize the motor nerve terminals

in SMA, they still retain the ability to upregulate, to certain extent, neurotransmission in the presence of modulators of synaptic release.

Together, we propose that the large reduction of Syt2 and SV2B are crucial factors of the functional synaptic deficit and that the physiological downregulation of Syt1 plays a determinant role in selective muscle vulnerability in SMA.

RESUMEN

La Atrofia Muscular Espinal (AME), la causa genética más frecuente de mortalidad infantil, es una enfermedad neurodegenerativa autosómica recesiva caracterizada por la pérdida de las motoneuronas α de la médula espinal, debilidad muscular y parálisis progresiva de los músculos axiales y proximales. La AME está causada por la pérdida o mutación en homocigosis del gen de Supervivencia de Motoneuronas 1 (*SMN1*), que codifica para la proteína de Supervivencia de Motoneuronas (SMN). Esta proteína se expresa ubicuamente y es importante en el ensamblaje de las ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (snRNP). En modelos de ratón de AME, la liberación de neurotransmisor está gravemente alterada. Sin embargo, los mecanismos moleculares de la disfunción sináptica y las bases de la vulnerabilidad muscular selectiva se desconocen.

Los objetivos del presente estudio fueron obtener una visión más profunda del origen del déficit de la liberación de neurotransmisor en los terminales nerviosos motores, e investigar las bases moleculares de la vulnerabilidad muscular selectiva en AME. Con este fin, se compararon las propiedades moleculares y funcionales de los terminales nerviosos en músculos con diferente grado de vulnerabilidad en el modelo de ratón *SMN Δ 7* usando técnicas electrofisiológicas, inmunomarcaje, microscopia de fluorescencia confocal y análisis cuantitativo de imágenes.

Los resultados muestran que los niveles de expresión de sinaptotagmina-2 (Syt2), y su proteína de interacción, la proteína de la vesícula sináptica 2 (SV2) B, estaban muy reducidos en los terminales AME en comparación con los controles, mientras que otras proteínas sinápticas, como sintaxina-1B (*Stx1B*) y sinaptotagmina-7 (Syt7), no se vieron afectados. También se encontró que sinaptotagmina-1 (Syt1) se somete a un proceso de regulación fisiológica a la baja durante el desarrollo postnatal en los terminales nerviosos de los músculos más vulnerables, pero no en los menos afectados, lo que podría ser particularmente crítico cuando Syt2 está también patológicamente disminuida. Además, los ratones *SMN Δ 7* muestran una reducción en la densidad de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo P/Q en la unión neuromuscular. En consonancia con la reducción de los canales de Ca^{2+} y el bajo contenido de Syt2, Syt1 y SV2B en las sinapsis neuromusculares más afectadas, el análisis

funcional de la neurotransmisión reveló una gran reducción en la liberación evocada, una alteración de la plasticidad a corto plazo, una baja probabilidad de liberación y la incapacidad para modular normalmente el número de sitios de liberación activos. Por último, a pesar de las alteraciones estructurales y funcionales que caracterizan a los terminales nerviosos motores en AME, todavía conservan la capacidad de regular positivamente, en cierta medida, la neurotransmisión en presencia de moduladores de la liberación sináptica.

Conjuntamente, proponemos que la gran reducción de Syt2 y SV2B es un factor clave en el déficit funcional sináptico y que la regulación fisiológica de Syt1 juega un papel determinante en la vulnerabilidad muscular selectiva en AME.

INTRODUCCIÓN

Atrofia Muscular Espinal

1. Características clínicas de la enfermedad

La Atrofia Muscular Espinal (AME) fue descrita clínicamente por primera vez en el año 1891 por el neurólogo austriaco Guido Werdnig tras estudiar a dos hermanos que presentaban atrofia y parálisis muscular en el tronco, cuello y músculos proximales de las extremidades inferiores desde los diez meses de edad. Dos años más tarde, el neurólogo alemán Johann Hoffmann confirmaba la descripción hecha previamente por Werdnig, momento a partir del cual se denominó enfermedad de Werdnig-Hoffmann (Werning, 1894, Hoffman, 1900).

Se trata de una enfermedad neurodegenerativa, monogénica, autosómica recesiva, caracterizada por la degeneración progresiva de las neuronas motoras del asta anterior de la médula espinal, que cursa con debilidad y parálisis muscular. Está causada por la pérdida o mutación en homocigosis del gen de Supervivencia de Motoneuronas 1, *SMN1* (Lefebvre et al., 1995). Este gen se localiza en el cromosoma 5, en la posición 5q13.

En la actualidad se sabe que se trata de la enfermedad genética que causa más mortalidad infantil y la segunda enfermedad autosómica recesiva más frecuente, tras la fibrosis quística, con una incidencia de 1:10.000 nacidos vivos y una frecuencia de portadores entre 1:40-1:60 (Pearn, 1980, Crawford and Pardo, 1996).

Clínicamente, la enfermedad se clasifica en cuatro tipos en función de la edad de aparición de los síntomas y la evolución (Munsat and Davies, 1992, Russman, 2007) (Tabla I):

AME tipo I o enfermedad de Werdnig-Hoffmann: es la forma más severa. Los síntomas aparecen en el período neonatal o durante los seis primeros meses de vida. Aparece debilidad muscular severa generalizada e hipotonía. Los pacientes no poseen la capacidad de mantener una postura sentada sin apoyo y presentan complicaciones respiratorias (insuficiencia respiratoria y neumonía), falleciendo, generalmente, por fallo respiratorio antes de los dos años de vida.

AME tipo II o enfermedad de Dubowitz: forma intermedia. Los síntomas aparecen entre los seis y los 18 meses de vida. Estos pacientes son capaces de sentarse sin necesidad de ayuda pero no pueden caminar de manera independiente. Sus extremidades inferiores son generalmente más débiles que las superiores. Su esperanza de vida es de cuatro años.

AME tipo III o enfermedad de Kugelberg-Welander: los síntomas aparecen a partir de los 18 meses de edad. Estos pacientes llegan a caminar sin necesidad de ayuda, al menos temporalmente, pero desarrollan debilidad muscular de forma progresiva en los músculos proximales. Al igual que en el tipo II, las extremidades inferiores son más débiles que las superiores. Generalmente estos pacientes alcanzan la edad adulta.

AME tipo IV o forma adulta: los síntomas aparecen en la edad adulta, y en general, son pacientes que no presentan problemas respiratorios o nutricionales, aunque presentan debilidad muscular leve o moderada en los músculos proximales.

Tabla I. Clasificación clínica de Atrofia Muscular Espinal. Modificado de (Butchbach, 2016)

Tipo	Edad de aparición	Capaz de sentarse	Capaz de ponerse de pie	Capaz de andar	Esperanza de vida	Nº. copiasSMN2
I	<6 meses	No	No	No	<2 años	1-2
II	6-18 meses	Si	No	No	4 años	3
III	>18 meses	Si	Si	Con ayuda	~40 años	3-4
IV	20-30 años	Si	Si	Si	Normal	>4

2. El gen *SMN*

El gen cuya alteración es responsable de la AME se encuentra localizado en el cromosoma cinco, concretamente en la región 5q11.2–13.3 de aproximadamente 750 kb (Brzustowicz et al., 1990, Gilliam et al., 1990, Melki et al., 1990). Esta región contiene una duplicación invertida de al menos cuatro genes, los cuales poseen una copia en posición telomérica y otra en posición centromérica (Fig. 1), y son los siguientes:

- Gen de Supervivencia de Motoneuronas (*SMN*): *SMN1*, o copia telomérica, y *SMN2*, o copia centromérica.
- Gen de la Proteína Inhibidora de Apoptosis Neuronal (*NAIP*; del inglés Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein).
- Gen *p44*, que codifica para una subunidad del factor de transcripción basal TFIIH (BTFp44t y BTFp44c).
- Gen *H4F5* (H4F5t y H4F5c), de función desconocida.

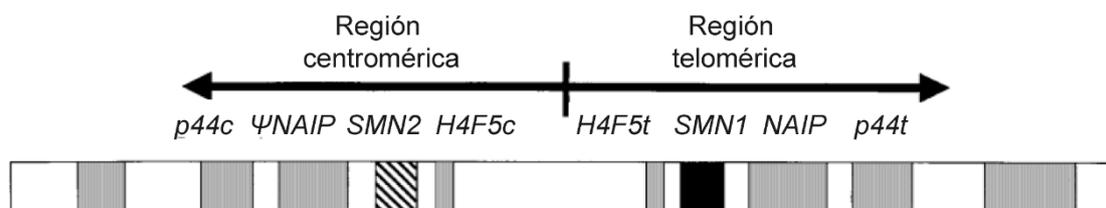


Figura 1. Representación esquemática de la región 5q11.2–13.3. Esta región contiene la duplicación de cuatro genes: *p44*, *NAIP*, *SMN* y *H4F5*. Imagen modificada de (Wirth, 2000).

La identificación de la delección o interrupción del gen *SMN1* en más de un 95% de los pacientes, así como la presencia de mutaciones deletéreas en el resto, permitió identificar a este gen como el responsable de la enfermedad (Lefebvre et al., 1995, Lefebvre et al., 1998).

El gen *SMN* se encuentra duplicado en humanos, diferenciándose el gen *SMN1* y *SMN2* (Rochette et al., 2001). Su secuencia génica es homóloga, con una identidad de un 99,9%, estando compuestos por nueve exones (denominados 1, 2a, 2b, 3-8), y ocho intrones (Burglen et al., 1996, Monani et al., 1999). A nivel genómico, ambos se diferencian en cinco pares de bases: (i) una transición g-a en el intrón 6; (ii) transición C-T en el exón 7; (iii y iv) dos transiciones a-g en el intrón 7; y v) transición G-A en el exón 8 (Fig. 2).

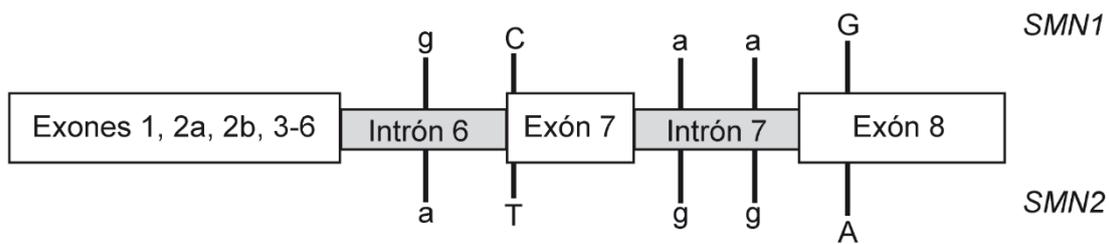


Figura 2. Localización de los nucleótidos por los que *SMN1* y *SMN2* se diferencian. Imagen modificada de (Wirth, 2000).

La única diferencia funcionalmente relevante es la transición citosina-timina (C-T) en el exón 7 que se encuentra en medio de la secuencia de un potenciador del proceso de corte y empalme exónico (ESE; del inglés exon-splicing enhancer), secuencia que regula la inclusión del exón 7 en los transcritos de *SMN* (Fig. 3). Mientras que en *SMN1* la C en esta posición promueve la inclusión del exón 7 en los transcritos, en *SMN2* la T interrumpe la secuencia de reconocimiento del ESE, lo que resulta en la exclusión del exón 7 en la mayoría de sus transcritos (~90%). Esto conduce a que, mientras que *SMN1* produce proteína de Supervivencia de Motoneuronas (SMN) completa, *SMN2* produce únicamente un 10% de la misma, siendo el 90% restante proteína truncada (proteína SMN Δ 7), proteína inestable y rápidamente degradada (Lorson et al., 1999, Monani et al., 1999, Burnett et al., 2009).

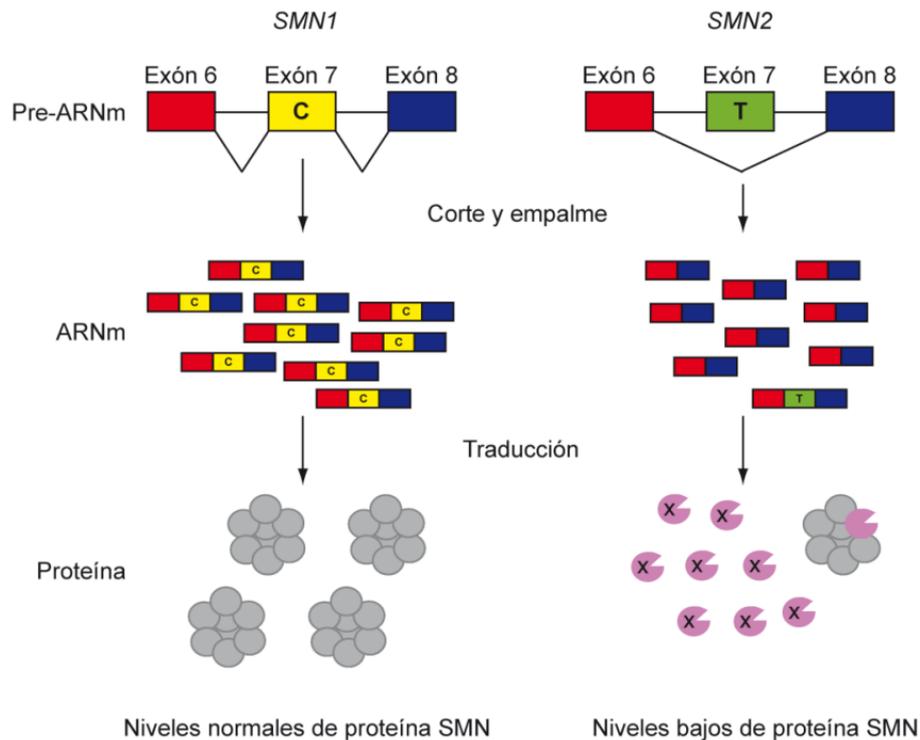


Figura 3. Efecto de la transición C-T en el exón 7 en el proceso de corte y empalme. La transición C-T hace que la mayoría de los transcritos producidos por *SMN2* carezcan del exón 7 dando lugar mayoritariamente a proteína SMN truncada. Imagen modificada de (Butchbach and Burghes, 2004).

El número de copias de *SMN2* varía en la población. En ausencia de *SMN1*, la severidad de la enfermedad correlaciona de manera inversa con el número de copias de *SMN2* (Lefebvre et al., 1997), y por tanto, con los niveles de proteína SMN. Aunque los pacientes de AME retienen alguna copia de *SMN2*, los bajos niveles de SMN completa producidos por *SMN2* son insuficientes para el correcto mantenimiento del sistema neuromuscular, lo que determina la aparición de neurodegeneración, parálisis muscular y, en un gran número de casos, la muerte.

3. La proteína de Supervivencia de Motoneuronas

3.1 Estructura de la proteína SMN

SMN es una proteína de 294 aa (38 KDa), compuesta por cuatro dominios funcionales (Fig. 4):

- Dominio K, rico en lisina, formado por los exones 2a y 2b, exones que están altamente conservados y que, respectivamente, se encuentran involucrados en la unión con gemina 2 y en su oligomerización (Young et al., 2000).
- Dominio Tudor, situado en el exón 3. Este dominio es importante para la unión con proteínas Sm (Buhler et al., 1999).
- Dominio rico en prolina (P), que participa en la unión con profilina y se localiza en el exón 5 y parte del exón 6.
- Dominio YG, rico en tirosina y glicina, situado en el exón 6, importante para la oligomerización (Talbot et al., 1997, Burghes and Beattie, 2009).

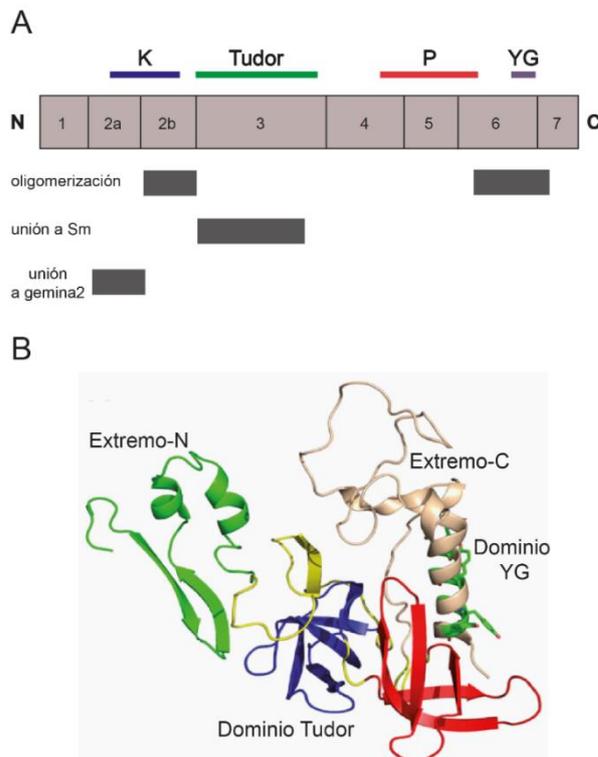


Figura 4. Diagrama de los dominios de la proteína SMN y su estructura 3D. **A.** SMN está formada por cuatro dominios funcionales necesarios para la oligomerización consigo misma, para su unión a proteínas Sm, a gemina 2 y a profilina. **B.** Modelo de la estructura tridimensional de SMN obtenida a partir de los datos obtenidos mediante cristalografía de difracción de rayos X. Imágenes modificadas de (Burghes and Beattie, 2009) (A) y de (Seng et al., 2015) (B).

Dado que la proteína truncada carece del exón 7 y este exón es importante para la oligomerización de SMN, se ha sugerido que la incapacidad para oligomerizar y la consecuente reducción de su interacción con otras proteínas podría ser la causa de su inestabilidad (Lorson et al., 1998).

3.2 Función

SMN es una proteína multifuncional, con un papel relevante en la supervivencia de distintos organismos, desde *Caenorhabditis elegans* a *Homo sapiens* (Schrank et al., 1997; Miguel-Aliaga et al., 1999, Chan et al., 2003; McWhorter et al., 2003; Briese et al., 2009). Aunque no todas las posibles funciones de SMN se conocen en su totalidad, la función mejor caracterizada es la de su participación en la biogénesis y el ensamblaje de las ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (snRNP; del inglés small nuclear ribonucleoproteins), proteínas cruciales en el procesamiento de ARNm. Cada snRNP se compone de una molécula pequeña de ARN nuclear (snRNA; del inglés small nuclear RNA), un anillo de siete proteínas Sm (proteínas de unión a ARN) y una serie de proteínas específicas. SMN participa en este proceso como parte de un complejo proteico (complejo SMN) formado por las geminas 2-8 y la proteína de interacción con ARN, UNR (UNRIP) (Pellizzoni et al., 2002, Grimmler et al., 2005). En el citoplasma, el complejo SMN interacciona con las proteínas Sm y se unen al snRNA a través de gemina 5 (Battle et al., 2006). A continuación, este complejo se une a esnurportina e importina para ser transportado al núcleo, donde las snRNP van a madurar para cumplir su función (Fig. 5) (Narayanan et al., 2002; Burghes and Beattie, 2009). SMN también participa en el procesamiento de ARNm en el espliceosoma (Fischer et al., 1997, Liu et al., 1997, Meister et al., 2001, Pellizzoni et al., 2002).

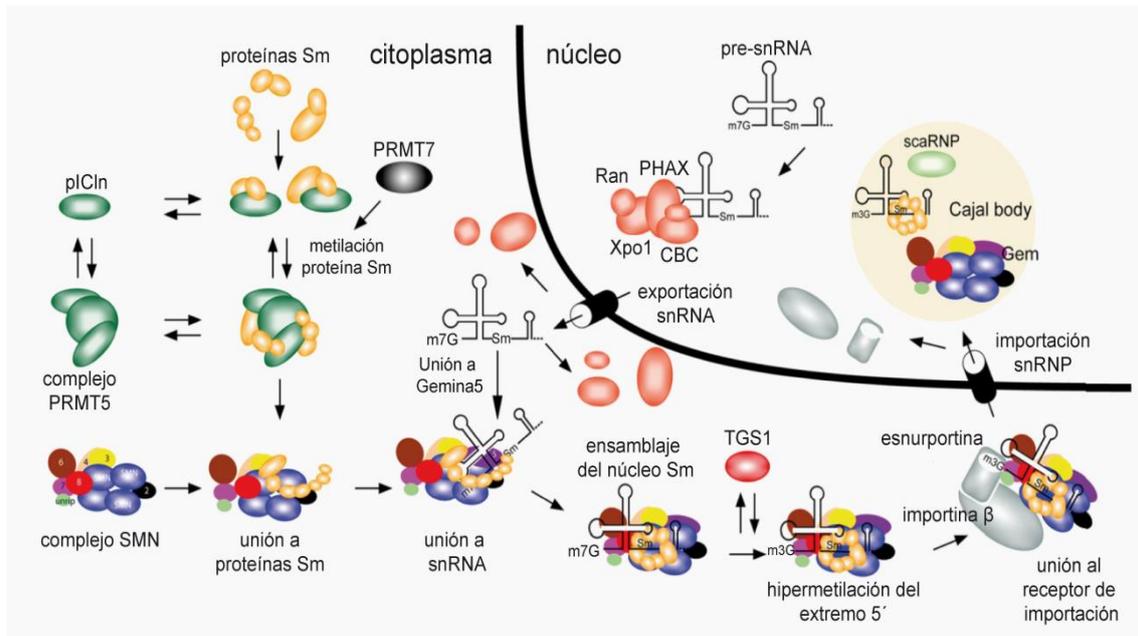


Figura 5. Función de SMN en el ensamblaje de snRNP. El complejo SMN interacciona con las proteínas Sm en el citoplasma. Todo este complejo se une a la molécula de snRNA (previamente sintetizado en el núcleo), forman una snRNP, que posteriormente será transportada al núcleo para su maduración. Imagen modificada de (Burghes and Beattie, 2009).

Así mismo, SMN parece estar involucrada en los procesos de transcripción y traducción. En el primero caso, mediante su interacción con el factor de transcripción E2, con la enzima ARN polimerasa II y con dp103 (helicasa de ARN), pudiendo estar involucrada en la regulación de la expresión de genes esenciales para el desarrollo neuronal (Strasswimmer et al., 1999, Campbell et al., 2000, Pellizzoni et al., 2001). En el segundo caso, SMN parece asociarse con polirribosomas y reprimir la traducción *in vitro* de proteína(s) relacionada(s) con el ciclo celular (Sanchez et al., 2013), lo que podría contribuir al desarrollo de la patología.

En los axones, SMN se ha encontrado asociada a ARNm y a proteínas de unión a ARN, como son las ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (hnRNP; del inglés heterogeneous nuclear ribonucleoproteins) R/Q, y las proteínas FMRP, KSRP, HuD y COPI (Akten et al., 2011, Fallini et al., 2011, Hubers et al., 2011, Peter et al., 2011). SMN pudiera regular el transporte y la estabilidad de las moléculas de ARNm a lo largo del axón, así como, la traducción local en los conos de crecimiento y sinapsis. Las motoneuronas

deficientes en SMN en cultivo procedentes de ratones del modelo SMN Δ 7 muestran una disminución en la localización del ARNm de β -actina en los axones y niveles bajos de actina en los conos de crecimiento (Rossol et al., 2003). Se especula que esto puede ser debido a que como hnRNP R/Q y KSRP son componentes del complejo ribonucleoproteico de β -actina, la ausencia de interacción con SMN en AME podría comprometer su transporte axonal. Además, se han encontrado bajos niveles de HuD en las proyecciones axonales de motoneuronas deficientes en SMN (Fallini et al., 2011, Peter et al., 2011). Por otro lado, un estudio más reciente muestra reducción de distintos ARNm relacionados con el crecimiento axónico y la formación de sinapsis en el compartimento axónico en neuronas deficientes en SMN (Saal et al., 2014).

SMN también se ha implicado en la regulación de la apoptosis celular (Kerr et al., 2000). Estudios realizados en tejidos fetales de pacientes de AME tipo I revelaron que durante el desarrollo embrionario las neuronas motoras inmaduras sufren un periodo apoptótico más prolongado que las células de individuos sanos (Simic et al., 2000, Soler-Botija et al., 2002). Además, la ausencia o deficiencia de SMN incrementa los niveles de proteínas proapoptóticas, como es Bax (Tsai et al., 2006a, Tsai et al., 2006b) y afecta a los niveles de proteínas relacionadas con la supervivencia celular, como son Bcl-2, Bcl-xL, β -sinucleína y p35 (Anderton et al., 2013). Así mismo, SMN parece participar en la formación de gránulos de estrés (Zou et al., 2011), poniendo de manifiesto que podría ser importante para la supervivencia celular.

3.3 Localización

SMN se expresa ubicuamente (Schmid and DiDonato, 2007). Se localiza tanto en el citoplasma como en el núcleo celular. Concretamente en el núcleo, en estructuras denominadas géminis de los cuerpos enrollados, o “gems” (del inglés Gemini of coiled bodies) (Liu and Dreyfuss, 1996). El número de gems correlaciona inversamente con la severidad de la enfermedad y se encuentra significativamente reducido en fibroblastos de pacientes de AME tipo I y en motoneuronas de ratones deficientes en SMN (Coover et al., 1997, Patrizi et al., 1999, Monani et al., 2000, Gogliotti et al., 2013).

En las neuronas, SMN se encuentra en las espinas dendríticas, los axones y los conos de crecimiento axónico (Francis et al., 1998, Pagliardini et al., 2000, Jablonka et al., 2001, Dombert et al., 2014). En la unión neuromuscular (NMJ; del inglés neuromuscular junction) está presente en los terminales presinápticos (Dombert et al., 2014).

4. Susceptibilidad de las neuronas motoras en AME

Aunque SMN se expresa ubicuamente, su actividad varía en función del tejido (Coover et al., 1997). Tras el desarrollo postnatal, SMN disminuye en todos los tejidos excepto en las motoneuronas espinales (Pagliardini et al., 2000). Se desconoce la causa por la que las motoneuronas inferiores requieren más SMN que otras células, así como, el mecanismo por el que la deficiencia en SMN produce la degeneración de las neuronas motoras. Se postulan dos hipótesis (Fig. 6):

1. SMN es esencial para el proceso de corte y empalme del ARNm de ciertos genes importantes en el circuito motor (Gabanella et al., 2007, Pellizzoni, 2007, Burghes and Beattie, 2009).
2. SMN es importante para el transporte axonal de ARNm y la expresión de proteínas en la sinapsis motora (McWhorter et al., 2003, Rossoll et al., 2003, Jablonka et al., 2007, Burghes and Beattie, 2009).

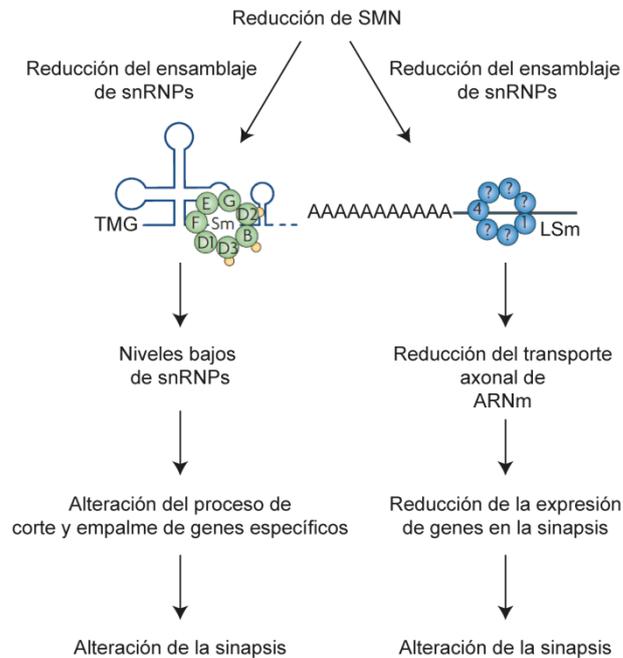


Figura 6. Mecanismos propuestos para explicar la vulnerabilidad de las sinapsis motoras en AME. La reducción en los niveles de SMN puede afectar a la expresión de genes de gran relevancia en el circuito motor o en la formación y/o mantenimiento de la sinapsis. Esto puede deberse a la alteración en el ensamblaje de snRNP o al defecto en el transporte axónico de ARNm. Imagen modificada de (Burghes and Beattie, 2009).

A pesar de ser las células más vulnerables, no todos los contingentes de motoneuronas se afectan en la misma medida, lo que puede definirse como heterogeneidad en el grado de vulnerabilidad. En AME se afectan las motoneuronas tipo α , pero no las tipo γ u otro tipo de neuronas colinérgicas (Powis and Gillingwater, 2016). Dentro de las motoneuronas α , se afectan más las inferiores que las superiores, y entre las inferiores, más la de ciertos músculos, por ejemplo, más los músculos axiales y proximales que los distales, aunque, por el momento, se desconoce con exactitud el mecanismo que determina que las neuronas motoras que inervan a un músculo en concreto sean resistentes o vulnerables a la degeneración en AME. Sin embargo, existen evidencias de que las motoneuronas más vulnerables presentan: (i) una disminución en los transcritos implicados en la unión de SMN a ARN; (ii) una reducción de los marcadores de reparación de ADN; y (iii) un incremento en las vías de apoptosis celular (Murray et al., 2015). Además, Thomson y colaboradores postulan que dado que las motoneuronas poseen niveles más bajos de inclusión del exón 7 de *SMN2* que las células del asta dorsal de la médula espinal (Ruggiu et al., 2012), puede ser que la eficiencia de este proceso varíe entre los distintos contingentes. Alternativamente, es posible que existan

niveles variables de factores neuroprotectores en las distintas motoneuronas (Thomson et al., 2012).

Por otro lado, no se ha podido establecer correlación entre la vulnerabilidad de las distintas motoneuronas y sus características morfológicas, como ocurre en la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), en la que son afectadas principalmente las neuronas motoras de mayor tamaño (Kanning et al., 2010, Thomson et al., 2012). En AME, se sugiere que los músculos más vulnerables poseen mayor grado de denervación de sus terminales motores (Ling et al., 2012). Sin embargo, existe una gran controversia respecto a esta cuestión.

5. Defectos en la neurotransmisión en AME

La característica principal de AME es la pérdida de neuronas motoras que se produce durante el transcurso de la enfermedad. Sin embargo, distintos estudios muestran que las neuronas motoras conservan la capacidad para alcanzar sus músculos dianas (Murray et al., 2008, Ling et al., 2012), y que la pérdida es precedida de alteraciones motoras y a nivel de la NMJ (Jablonka et al., 2000, Monani et al., 2000, Cifuentes-Diaz et al., 2002, Le et al., 2005, Kariya et al., 2008, Ling et al., 2012). Además, se produce un retraso y/o parada en la maduración postsináptica ante la deficiencia en SMN (Kong et al., 2009). Estos datos sugieren que la enfermedad no se debe a un defecto en la sinaptogénesis sino en el mantenimiento de la sinapsis.

Los estudios realizados en la NMJ de los modelos de AME de *Drosophila melanogaster* y de *Mus musculus*, modelo SMN Δ 7, muestran que la deficiencia en SMN afecta en gran medida a la neurotransmisión, modificando tanto la amplitud como la cinética de las respuestas postsinápticas (Chan et al., 2003; Kong et al., 2009; Ruiz et al., 2010). En el modelo SMN Δ 7, se produce una disminución significativa del contenido cuántico (número de cuantos liberados tras la llegada de un potencial de acción al terminal presináptico) y un incremento de la liberación asincrónica, datos que sugieren que existe una alteración en la homeostasis de Ca²⁺ (Fig. 7). Estas alteraciones son observadas en dos de los músculos más afectados, el *Transversus abdominis* (TVA) y el *Tibial anterior*

(TA), sin que se vea afectada, por ejemplo, la liberación en el músculo *Levator auris longus* (LAL) (Fig. 7), lo que hace evidente la vulnerabilidad heterogénea en AME (Kong et al., 2009, Ling et al., 2010, Ruiz et al., 2010). Sin embargo, se desconoce cuál es el origen de este déficit funcional, no pudiéndosele atribuir únicamente a las alteraciones estructurales observadas en la NMJ: (i) disminución del número de vesículas sinápticas (SV), zonas activas (AZ) y mitocondrias; (ii) alteración de las proteínas del citoesqueleto; (iii) retraso en la maduración de la NMJ y de los receptores de ACh; y (iv) reducción del tamaño del área postsináptica (Fig. 8) (Cifuentes-Diaz et al., 2002, Chan et al., 2003, Kariya et al., 2008, Murray et al., 2008, Kong et al., 2009, Torres-Benito et al., 2011, Torres-Benito et al., 2012a, Ackermann et al., 2013). Por tanto, actualmente, uno de los principales objetos de los estudios en AME son las bases moleculares de la disminución en la liberación sináptica en los terminales motores de los músculos más vulnerables.

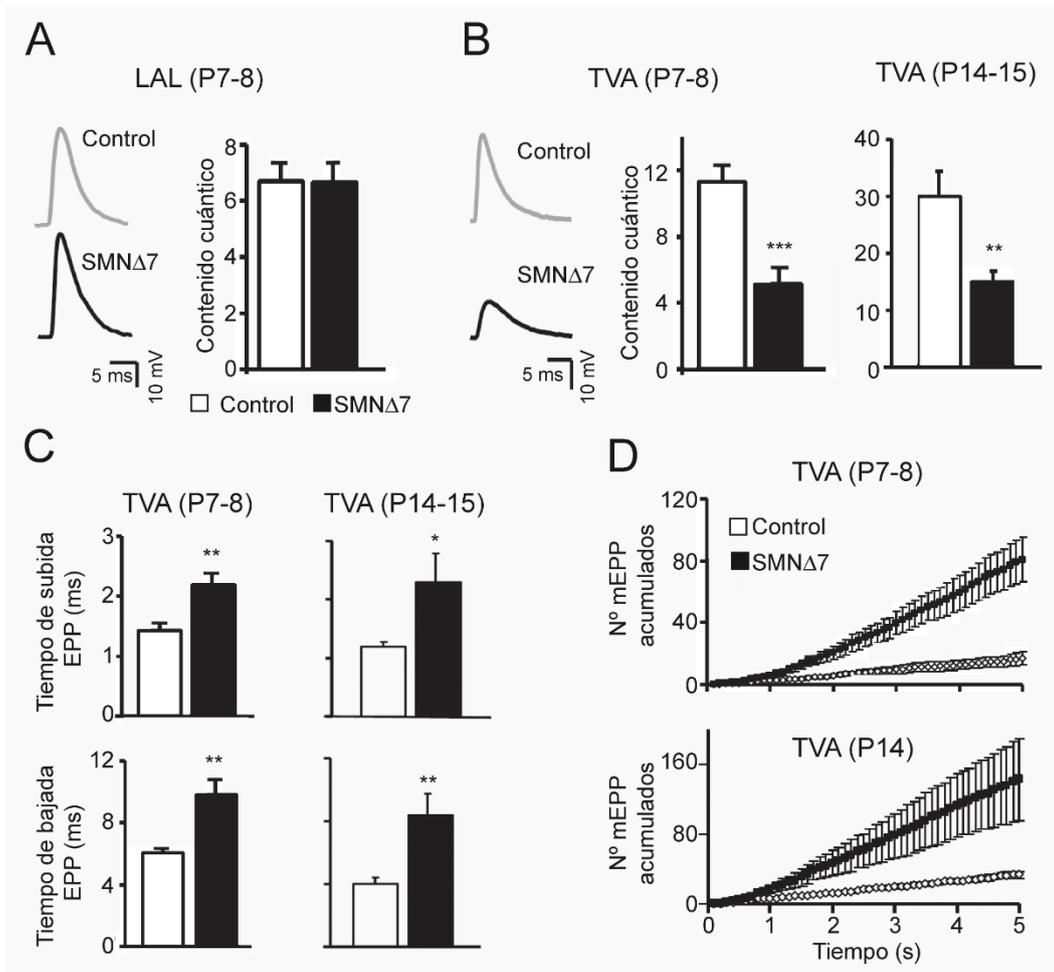


Figura 7. Déficit funcional en el músculo TVA de ratones deficientes en SMN. A. El contenido cuántico en el músculo LAL, considerado como resistente, no se encuentra afectado. **B.** Reducción del contenido cuántico en el TVA a P7-8 y P14-15. **C.** Alteración de la cinética de las respuestas evocadas en los terminales SMN Δ 7. **D.** Incremento de la liberación asincrónica. Imagen modificada de (Ruiz et al., 2010).

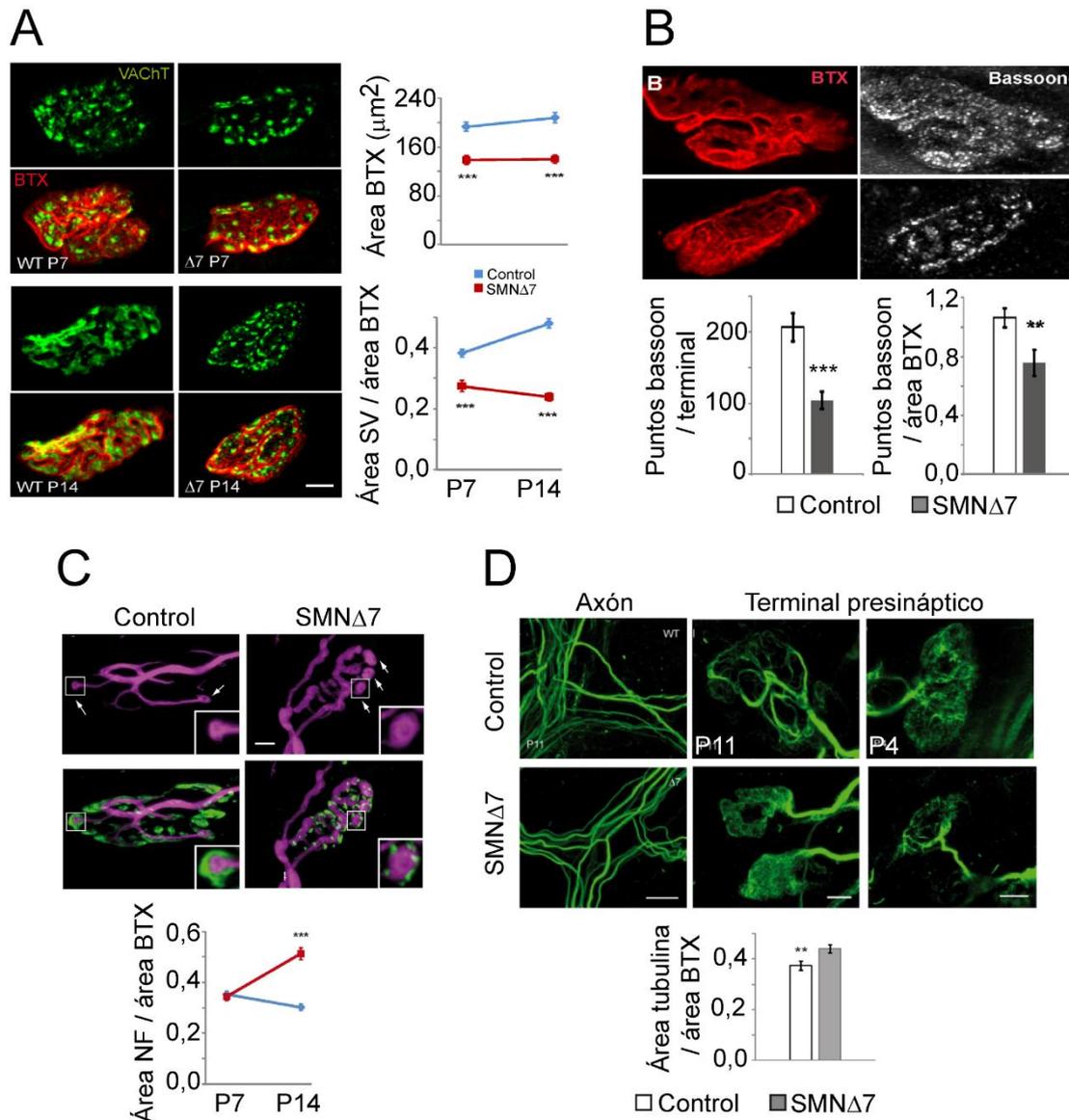


Figura 8. Alteraciones estructurales de los terminales SMN Δ 7. A-D. Los terminales motores de ratones SMN Δ 7 presentan defectos en la distribución y en el área ocupada por las SV (A) y las AZ (B), y una alteración en los componentes del citoesqueleto (C y D). Imagen modificada de (Torres-Benito et al., 2011).

6. Genes Modificadores

Aunque la severidad de AME se encuentra principalmente influenciada por el número de copias de *SMN2*, existen otros genes fuera del locus de *SMN* que parecen actuar como modificadores. A continuación, se exponen los principales genes identificados hasta el momento.

6.1 Plastina 3

Las plastinas son una familia de proteínas de unión a actina. En humanos existen dos isoformas: plastina-L y plastina-T, con un 83% de homología en su extremo C-terminal y con un sitio de unión a Ca^{2+} próximo al extremo N-terminal. Plastina T, también llamada plastina 3 (PLS3) o fimbrina T, es importante en la organización de los filamentos de actina, controlando su longitud y reciclaje (Giganti et al., 2005). Dado que actina participa de forma importante en el crecimiento axónico y en la transmisión sináptica (Cingolani and Goda, 2008) cualquier alteración en su dinámica puede comprometer su función.

La importancia de *PLS3* en la AME se descubrió a partir de un estudio en varias familias con hermanos discordantes. En ausencia de *SMN1*, y con el mismo número de copias de *SMN2* que en los hermanos afectados, se hallaron altos niveles de *PLS3* en las células de los asintomáticos (Oprea et al., 2008). Además, los niveles de actina filamentosa en linfoblastos de los individuos asintomáticos fueron significativamente más elevados, sugiriendo que *PLS3* podría tener un papel protector. Se demostró, así mismo, que en el modelo de pez cebra de AME los niveles de ARNm y de *pls3* son inferiores en los organismos mutantes (Hao et al., 2012) y que la sobreexpresión de *PLS3* humano recupera los defectos axónicos, motores y de la NMJ (Oprea et al., 2008, Boon et al., 2009).

El mecanismo de acción por el que *PLS3* cumple un papel de protección en individuos no sintomáticos de familias discordantes se desconoce. La sobreexpresión de *PLS3* incrementa el tamaño de las fibras musculares, rescata muchas de las alteraciones de la sinapsis neuromuscular y aumenta ligeramente la supervivencia en el modelo Taiwanés de AME (Ackermann et al., 2013). Sin embargo, estos resultados no han podido ser validados en otro de los modelos (*SMN Δ 7*), a pesar de encontrarse altos niveles de ARNm de *PLS3* en motoneuronas deficientes en *SMN* y un incremento de *PLS3* en la médula espinal (McGovern et al., 2015). Estos últimos autores postulan que *PLS3* podría tener una penetrancia parcial, pudiéndose deber los efectos observados a un efecto neuroprotector.

6.2 ZPR1

La proteína SMN Δ 7 posee defectos en la oligomerización consigo misma, con la proteína SMN completa y con otras proteínas de interacción, entre las que se encuentra ZPR1 (del inglés: Zinc Protein Finger 1). SMN y ZPR1 interactúan a través de su extremo C-terminal, (Gangwani et al., 2001, Gangwani et al., 2005). Esta interacción es necesaria para la correcta localización de SMN en los gems y su correcta función en el procesamiento de snRNP.

En modelos de ratón, la ausencia del gen *Zpr1* es embrionariamente letal y produce la activación de caspasas y muerte celular (Gangwani et al., 2005). La reducción de los niveles de *Zpr1* produce una pérdida progresiva de neuronas motoras (Doran et al., 2006), fenotipo muy similar al que se encuentra en AME.

El cruce del modelo SMN Δ 7 con ratones con una mutación en el gen *Zpr* (*Zpr*^{+/-}) produce un incremento de la severidad del fenotipo de AME y una disminución de la supervivencia, además de provocar defectos en la mielinización y degeneración de axones motores que aumenta la severidad de la enfermedad. Por el contrario, la sobreexpresión de ZPR1 en fibroblastos de pacientes de AME y en neuronas espinales de ratones deficientes en SMN aumenta los niveles de SMN y corrige los defectos axonales (Ahmad et al., 2012). Por otro lado, el estudio de este gen en familias discordantes de AME muestra que los pacientes asintomáticos presentan niveles de expresión de ZPR1 más altos que sus hermanos afectados (Helmken et al., 2003).

6.3 Jun Quinasa 3

El gen *JNK3* codifica a la proteína Jun quinasa 3, proteína que se expresa mayoritariamente en el SNC y pertenece a la familia de proteínas quinasas conocidas como c-Jun N-terminal. JNK3 une y fosforila a la proteína c-Jun (proteína que en combinación con c-Fos forma el factor de transcripción AP-1).

Un estudio realizado por Genabai y colaboradores (Genabai et al., 2015) demuestra que la cascada de señalización JNK se encuentra activada en la médula espinal de pacientes AME y en las neuronas motoras de ratones $SMN\Delta7$, lo que ha llevado a sugerir que JNK podría mediar la neurodegeneración y que su deficiencia podría ser un mecanismo de neuroprotección, ya que la delección de $JNK3$ *in vivo* produce una mejora del fenotipo (Fig. 9), sin que se modifiquen los niveles de SMN.

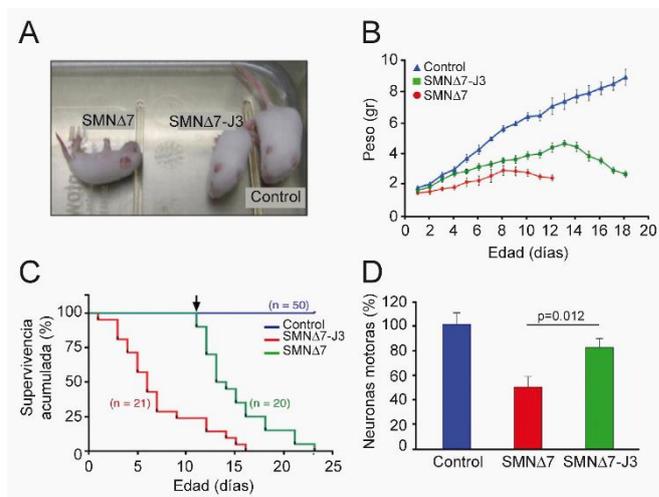


Figura 9. La delección de $JNK3$ rescata parcialmente el fenotipo de AME. A. Imagen de un ratón control, un mutante y un mutante $JNK^{-/-}$ a P10. **B y C.** Mejora del peso y la supervivencia de los ratones AME $JNK^{-/-}$. **D.** Reducción de la pérdida de motoneuronas espinales. Imagen modificada de (Genabai et al., 2015).

7. Estrategias terapéuticas

Actualmente AME es una enfermedad que no tiene cura y únicamente los cuidados paliativos sirven para mejorar la calidad de vida de los pacientes. Sin embargo, el incremento en el conocimiento de la causa y de la fisiopatología de la enfermedad que se ha producido durante los últimos años ha posibilitado el desarrollo de diversas estrategias terapéuticas. Dichas estrategias van encaminadas en las siguientes direcciones:

1. Reemplazar o corregir la ausencia del gen $SMN1$ mediante terapia génica.
2. Reemplazar las neuronas motoras degeneradas o apoyar las células restantes mediante la implantación de células madres neurales.
3. Corregir el procesamiento del gen $SMN2$ para aumentar los niveles de proteína SMN.

En el desarrollo de estas terapias es muy importante conocer la ventana temporal en la que se requieren altos niveles de SMN. La generación de un modelo de AME inducible por doxiciclina demostró que la inducción de SMN durante la fase embrionaria resulta en un importante rescate del fenotipo de AME, mientras que la inducción durante el periodo postnatal reduce su eficacia. Por ejemplo, la inducción temprana (E13,5) incrementa la supervivencia de los ratones deficientes en SMN a más de 200 días de edad mientras que la inducción en periodo posterior (P0-P2) sólo incrementa la supervivencia media a 86 días, aunque algunos animales sobrevivieron ~200 días (Le et al., 2011). Por tanto, las terapias desarrolladas deben tener en cuenta el requerimiento de SMN tanto temporal como espacial.

A continuación, se explican detalladamente cada una de las estrategias desarrolladas hasta el momento.

7.1 Terapia génica

En los últimos años se ha conseguido una mejora significativa de la supervivencia de los modelos de ratón de AME tras la expresión de *SMN* humano mediante vectores lentivirales (Azzouz et al., 2004), pero sobre todo con vectores adenoasociados (AAV8-SMN, scAAV8-SMN y scAAV9-SMN) (Foust et al., 2009, Bevan et al., 2010, Foust et al., 2010, Passini et al., 2010, Dominguez et al., 2011, Benkhelifa-Ziyyat et al., 2013). La infección de fibroblastos de pacientes AME tipo I con lentivirus incrementa los niveles de SMN y duplica el número de gems (Azzouz et al., 2004). Así mismo, la inyección del vector lentiviral-SMN en varios músculos que participan en la movilidad, la respiración y la alimentación en el modelo SMN Δ 7 a P2 conduce a un retraso en la aparición del fenotipo motor característico, incrementando ligeramente la esperanza de vida del animal (no tratados: $13 \pm 1,2$ días; tratados: $18 \pm 1,5$ días), los niveles de proteína SMN en las neuronas motoras, y el número de motoneuronas de la región espinal lumbar y del núcleo facial en la etapa final de la enfermedad (Fig. 10A).

En relación con los vectores adenoasociados, la inyección de AAV8-hSMN en el día de nacimiento (P0) en el SNC (ventrículos laterales cerebrales y en la región lumbar alta de la médula espinal) de ratones SMN Δ 7 incrementa los

niveles de SMN en la médula espinal, el tamaño de las fibras musculares, rescata algunas alteraciones de la NMJ (la acumulación de neurofilamentos (NF) y la alteración en la estructura de la placa motora), la función motora (coordinación, fuerza muscular y locomoción), y aumenta significativamente la supervivencia media de los ratones afectados (de ~15 días en los animales no tratados a ~50 días en los tratados). Esta supervivencia media alcanzó ~157 días cuando las inyecciones fueron realizadas con un vector complementario al adenoasociado (scAAV8-SMN) que produce una expresión más temprana del gen (Fig. 10B). La inyección de scAAV8-hSMN acentúa la mejora observada en la NMJ e incrementa el número de neuronas motoras que expresaban *SMN* humano (Passini et al., 2010). La ventaja de la utilización del vector scAAV9-hSMN frente al anterior es su capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica, permitiendo así que la administración, tanto sistémica como por vía intratecal, sea mínimamente invasiva. La inyección intravenosa de scAAV9-hSMN en el modelo *SMN Δ 7* aumenta los niveles de SMN en la médula espinal, cerebro y músculo, mejora la función motora, y corrige las alteraciones funcionales y estructurales de la NMJ de los ratones afectados, así como el peso y la supervivencia media (~250 días), siempre y cuando se inyecte a edades postnatales tempranas (P1) (Fig. 10C) (Foust et al., 2010).

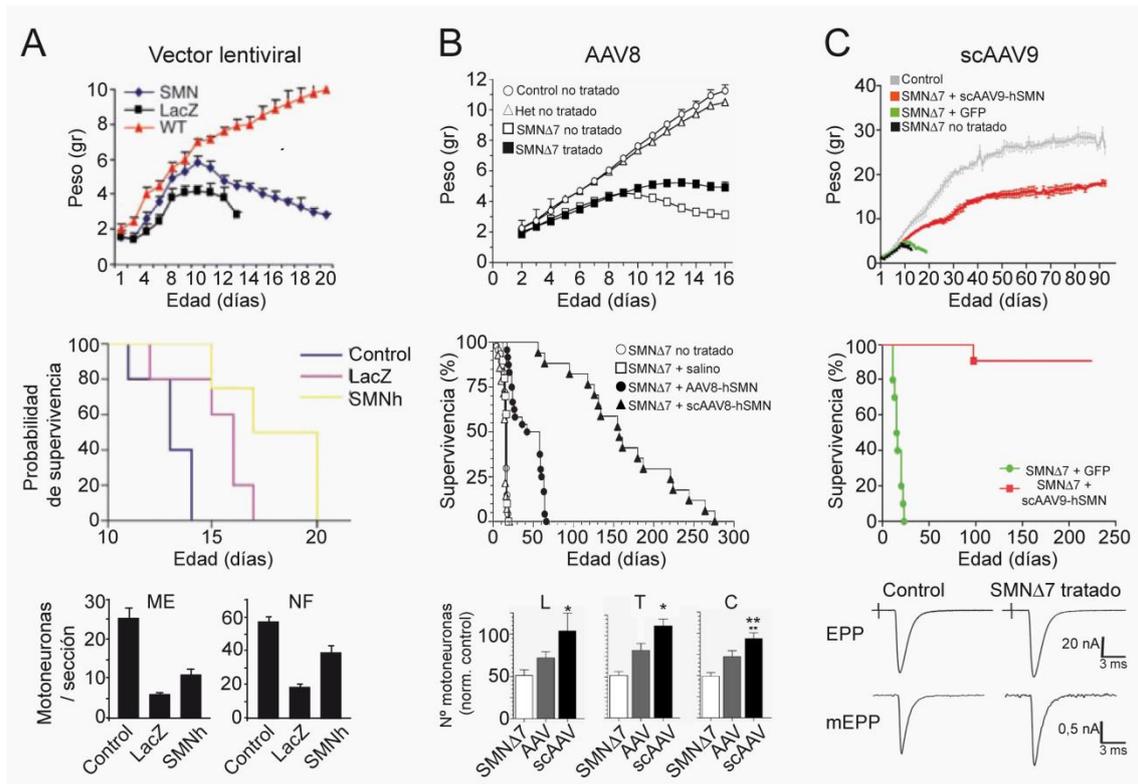


Figura 10. Recuperación del fenotipo de AME mediante la corrección de la ausencia de *SMN1* a través de terapia génica en el modelo de ratón. A. La incorporación de *SMN* silvestre mediante vectores lentivirales incrementa el peso y la supervivencia de los ratones afectados, aumentando el número de motoneuronas en la médula espinal (ME) y en el núcleo facial (NF). **B y C.** Los virus adenoasociados (AAC8, scAAV8 y scAAV9) aumentan el peso, la supervivencia y el número de neuronas motoras en ratones *SMNΔ7* en las regiones lumbar (L), torácica (T) y cervical (C). Además, la utilización de scAAV9 restaura los valores de liberación de secreción en los terminales motores en los ratones afectados (C). Imágenes tomadas de (Azzouz et al., 2004, Foust et al., 2010, Passini et al., 2010) (A, B y C, respectivamente).

Los ratones *SMNΔ7* presentan alteraciones funcionales cardíacas, caracterizadas por bradicardia y una disminución de la capacidad contráctil del corazón que, en parte, desaparecen tras la inyección de scAAV9-hSMN (Bevan et al., 2010). Posteriormente, se ha optimizado este virus adenoasociado mediante la expresión del gen *SMN1* humano bajo el control del promotor PGK (proteína fosfoglicerato quinasa), con incrementos de la supervivencia de los ratones de hasta 350 días tras la inyección intravenosa a P1 (Dominguez et al., 2011). Por otro lado, la inyección intramuscular de scAAV9-hSMN en los músculos gastronemio y tríceps a P0 incrementa la supervivencia media a ~165 días (Benkhelifa-Ziyyat et al., 2013).

7.2 Terapia celular

Esta estrategia se encuentra aún en una fase inicial de desarrollo pero pudiera ser eficaz para prevenir la degeneración de las motoneuronas en AME, ya sea por la liberación de factores neuroprotectores, la reducción de sustancias tóxicas del ambiente o por el reemplazo de otras células neurales y no neurales.

En el modelo SMN Δ 7, el trasplante intratecal de células madres neurales derivadas de la médula espinal demostró que estas células pueden migrar correctamente hacia el parénquima y diferenciarse a neuronas motoras, tanto *in vitro* como *in vivo*, aumentando así su número en el asta ventral de la médula espinal. Además, son capaces de incrementar la longitud del axón y el área del cono de crecimiento de las neuronas motoras co-cultivadas con células madres neurales. A nivel muscular, se incrementa el área del músculo, el número de miofibrillas y el tamaño de la NMJ. Estos efectos producen una mejora de la función motora, atenúan la pérdida de peso y aumentan la supervivencia de los ratones deficientes en SMN en un 39,26% (Fig. 11) (Corti et al., 2008). Más tarde, este mismo grupo demostró que células madres pluripotenciales derivadas de células madres embrionarias y células madre pluripotenciales inducidas (iPSC; del inglés induced pluripotent stem cells) tienen el mismo efecto terapéutico que las derivadas de la médula espinal (Corti et al., 2010, Corti et al., 2012).

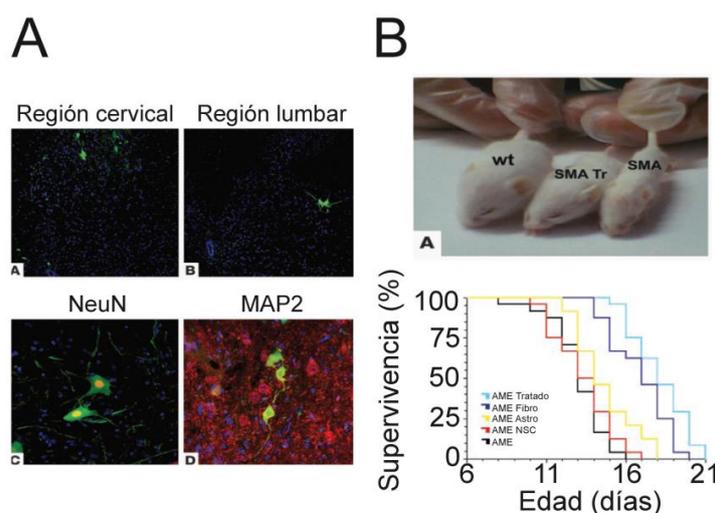


Figura 11. Efectos tras el trasplante celular. **A.** Las células trasplantadas son capaz de diferenciarse, *in vivo*, a neuronas motoras. Las neuronas son marcadas con el marcador neuronal NeuN y la proteína asociada a microtúbulos (MAP) 2. **B.** El fenotipo de AME es parcialmente rescatado tras el trasplante, con un incremento significativo de la supervivencia. Imagen modificada de (Corti et al., 2008).

Cabe destacar que junto con la utilización de células madres que provean de los factores de crecimiento necesarios a las neuronas motoras, pueden emplearse moléculas neuroprotectoras que mejoren la viabilidad celular. Por ejemplo, la olesoxima (TRO19622), mediante la prevención de la apertura del poro de transición mitocondrial ante situaciones de estrés oxidativo, es eficaz en el mantenimiento de las neuronas motoras en cultivo en ELA (Bordet et al., 2007).

7.3 Corrección del procesamiento del gen *SMN2*

Dado que todos los pacientes de AME conservan alguna copia de *SMN2*, este gen parece ser una diana óptima para el desarrollo de terapias. Esta estrategia tiene diferentes abordajes: (i) regular el proceso de transcripción; (ii) corregir el proceso de corte y empalme; y (iii) disminuir la degradación de ARNm. Todas tienen como fin último incrementar la cantidad de proteína SMN. A continuación se explica cada estrategia.

7.3.1 Regulación del proceso de transcripción de *SMN2*

Una amplia gama de moléculas utilizadas para este fin han sido probadas, entre las que se encuentran prolactina (PRL), hidroxurea, ácido valproico (VPA), tricostatina A (TSA), aclarubicina, butirato sódico, fenilbutirato (PBA) y ácido suberoilánilidohidroxámico (SAHA). Estas moléculas son inhibitoras de las desacetilasas de histonas (HDAC) (excepto la PRL). Las HDAC promueven la unión de las histonas con el ADN, lo que conduce a una condensación de la estructura del material genético, impidiendo su transcripción. Además, se consideran activadoras de la familia de proteínas Transductores de Señal y Activadores de la Transcripción (STAT), familia de proteínas que juegan un papel importante en los procesos de apoptosis, diferenciación y crecimiento celular, que conlleva la modificación de la expresión de diversos genes. Concretamente se ha demostrado que STAT5 es uno de los factores de transcripción implicados en la regulación del gen *SMN* (Ting et al., 2007).

La aplicación de TSA o PRL incrementa los niveles de ARNm y de proteína SMN completa tanto en líneas celulares derivadas de pacientes (Avila et al., 2007) como en el cerebro y en la médula espinal de ratones tipo AME (Farooq et al., 2011). Así mismo, en el modelo SMN Δ 7, TSA rescata la degeneración de las motoneuronas y la pérdida de entradas propioceptivas, corrige las alteraciones de la NMJ, mejora la función motora, aumenta el peso y la supervivencia de los ratones deficientes en SMN (Sumner et al., 2003, Avila et al., 2007, Ting et al., 2007, Riessland et al., 2010, Farooq et al., 2011, Mentis et al., 2011, Ling et al., 2012). Este abordaje tiene el inconveniente, sin embargo, de que se puede alterar la expresión de otros genes.

7.3.2 Corrección del proceso de corte y empalme

Este abordaje tiene como finalidad aumentar la inclusión del exón 7 del gen *SMN2*. Se utiliza para ello oligonucleótidos antisentido (ASO), pequeños fragmentos de ácido nucleico (13-25 nucleótidos), complementarios para una secuencia específica de un gen. Los oligonucleótidos diseñados permiten la unión de las proteínas potenciadoras del proceso de corte y empalme (proteínas SR) al exón 7 (Fig. 12A), o inhiben la unión de factores de represión (Fig. 12B) (Hua and Krainer, 2012, Porensky and Burghes, 2013).

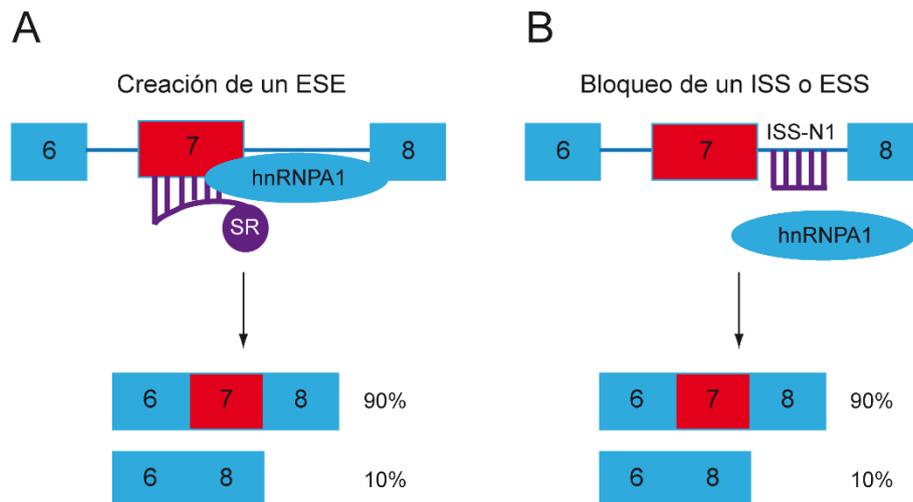


Figura 12. Inclusión del exón 7 del gen *SMN2* mediante ASO. El proceso de corte y empalme de *SMN2* es modificado a través de ASO que, o bien permiten la unión de las proteínas SR al exón 7 promoviendo así su inclusión (A), o bloquean la unión de hnRNPA1 al sitio ISS-N1 (silenciador del proceso de corte y empalme) (B). Imagen modificada de (Burghes and McGovern, 2010).

Las características a tener en cuenta cuando se diseñan los ASO son: (i) deben incrementar la inclusión del exón con alta eficiencia; (ii) tener una alta resistencia a la degradación celular; (iii) tener una alta especificidad por su diana; (iv) poseer una baja toxicidad; y (v) poseer un alto poder de penetración en las células diana (Porensky and Burghes, 2013).

Gran cantidad de los ASO utilizados actualmente están diseñados contra el silenciador del corte y empalme intrónico N1 (ISS-N1) (Sivanesan et al., 2013). Se trata de una secuencia de 15 nucleótidos localizado en el intrón 7 de *SMN2*. En células procedentes de pacientes AME tipo I se ha demostrado que, incluso a baja concentración, el ASO creado contra este silenciador aumenta los niveles de SMN (Singh et al., 2006). En el modelo Taiwanés, la inyección por vía intracerebroventricular (una única inyección a P1) combinada con la inyección por vía subcutánea, en P0 y P3, incrementa la supervivencia media de estos ratones a ~173 días, mientras que ambas inyecciones de manera independiente aumentan la supervivencia a ~16 días y ~108 días, respectivamente (Hua et al., 2011). Además, los niveles de inclusión del exón 7 y de proteína SMN completa en diversos tejidos se vieron significativamente aumentados tras la inyección

subcutánea de manera dosis-dependiente. Así mismo, el tratamiento con ASO es capaz de recuperar el número de neuronas motoras espinales, el tamaño del corazón y de las fibras musculares esqueléticas, la arborización de la NMJ y la función motora. Por otro lado, en el modelo $SMN\Delta 7$, la inyección por vía intracerebroventricular o por vía venosa de ASO a P0 produce efectos similares a los descritos en el modelo Taiwanés, con un incremento de la supervivencia de hasta ~100 días (Porensky et al., 2012).

7.3.3 Reducción de la degradación de ARNm

Para poder abordar esta estrategia, actualmente, se están utilizando compuestos análogos a las quinazolininas, que inhiben la acción de la enzima DcpS (del inglés: Scavenger mRNA-decapping enzyme) involucrada en la degradación del ARNm. Así mismo, estas moléculas producen un aumento de la transcripción de *SMN2*, aunque se desconoce su mecanismo de acción (Singh et al., 2008).

La administración oral temprana de distintos análogos de quinazolina, como son el D156844 o RG3039, en ratones de modelos de AME mejora la función motora e incrementa la supervivencia (Butchbach et al., 2010, Gogliotti et al., 2013, Van Meerbeke et al., 2013). A nivel celular, RG3039 incrementa significativamente tanto el número de células con gems como el número de gems por célula y recupera el retraso en la maduración de la NMJ (Gogliotti et al. 2013). La inyección intraperitoneal de RG3039 a P0 en ratones $SMN\Delta 7$ restaura los niveles de liberación de neurotransmisor en el músculo extensor largo de los dedos (EDL) a los niveles de los ratones controles, disminuye el porcentaje de sinapsis silentes y previene la denervación que caracteriza a algunos músculos (Van Meerbeke et al., 2013).

La Tabla II recoge las ventajas y desventajas que presentan la terapia génica, la terapia celular, la utilización de ASO y de moléculas destinadas a la corrección de la transcripción de *SMN2* que deberían ser tenidas en cuenta a la hora del desarrollo de ensayos clínicos.

Tabla II. Ventajas y desventajas de las estrategias terapéuticas de AME

Estrategia	Ventajas	Desventajas
Terapia génica	Unidosis	Gran cantidad de virus Necesita llegar al SNC
Terapia celular	Aumento del número de motoneuronas a partir de otro tipo de células	Se debe combinar con otras terapias para incrementar la mejora en el fenotipo
ASO	Producción directa y sencilla Seguridad y efectividad alta Acción específica <i>SMN2</i> es expresado bajo su promotor endógeno	Dosis repetidas Biodistribución y/o eficacia limitada en el SNC
Pequeñas moléculas	Administración oral Producción sencilla	Posibilidad de que presenten otras moléculas diana

Actualmente algunas de estas sustancias están siendo testadas en ensayos clínicos (Tabla III). En el caso de la terapia génica, el empleo de scAAV9-SMN en pacientes parece haber dado resultados satisfactorios en pacientes tipo I de entre cero y nueve meses de edad y ha finalizado la fase I del ensayo clínico. En cuanto a la terapia de neuroprotección, el empleo de olesoxima se encuentra en fase II. En dicho ensayo, la compañía francesa Trophos la ha utilizado en un grupo de pacientes con AME tipo II y tipo III. Olesoxima fue administrada vía oral durante dos años y se ha podido demostrar que los pacientes que recibieron el compuesto mantuvieron su función motora mejor que los individuos que recibieron la sustancia placebo.

En cuanto a las moléculas inhibidoras de las desacetilasas de histonas, únicamente VPA ha completado la fase III. Sin embargo, sólo en un tercio de los pacientes su administración ha aumentado los niveles de proteína SMN completa (Brichta et al., 2006).

Los ensayos dirigidos a corregir el proceso de corte y empalme del ARNm de *SMN2* son los que se encuentran en fases más avanzadas. Concretamente, un ensayo realizado por Biogen-IONIS en pacientes AME tipo I se encuentra en fase III. La administración por vía intratecal del ASO Nusinersen aplicado en tres

dosis en un mes y con repetición a los cuatro meses ha conseguido mejoras en la función motora de estos pacientes (pueden sostener la cabeza y mover los miembros), reflejando que hay resultados esperanzadores para los pacientes que presentan la enfermedad en edades muy tempranas.

Por otro lado, un cribado de pequeñas moléculas ha revelado la capacidad de alguna de ellas de aumentar el corte y empalme correcto del ARNm de *SMN2*. Dos de estos compuestos desarrollados por la farmacéutica Roche y Novartis (RG7800 y LMI070, respectivamente) están en fase clínica. Recientemente, la fase I con RG7800 ha finalizado. Todas las dosis estudiadas son seguras y tolerables y existe un efecto sobre el proceso de corte y empalme dosis dependiente. Por otro lado, LMI070, se encuentra en fase I. Por último, el empleo de análogos de quinazolininas, concretamente el compuesto RG3039 de la farmacéutica Repligen, ha finalizado la fase I con buena tolerancia a todas las dosis administradas y con una inhibición del 90% de la enzima DcpS.

Todos estos avances, junto con el producido en el conocimiento de las bases moleculares y fisiopatología de esta enfermedad, hacen vislumbrar un horizonte de mejora de la calidad y esperanza de vida de los pacientes con AME.

OBJETIVOS

Objetivo General

Este proyecto tiene dos objetivos generales principales. Por un lado, investigar en modelos de AME los mecanismos moleculares potencialmente responsables del déficit funcional en la unión neuromuscular y, por otro, determinar las bases moleculares de la vulnerabilidad muscular en la Atrofia Muscular Espinal (AME). Para ello utilizaremos técnicas electrofisiológicas, de inmunomarcaje fluorescente, microscopia confocal y análisis cuantitativo de imágenes.

Objetivos Específicos

1. Investigar si en la disminución de la liberación de neurotransmisor en los terminales motores AME están involucrados los canales de Ca^{2+} dependiente de voltaje, bien por un cambio en el tipo de canal que media la transmisión y/o por una disminución de su densidad. Determinaremos la distinta participación de los canales de Ca^{2+} tipo P/Q y N sobre la amplitud de los potenciales postsinápticos, así como, la expresión y distribución de los canales en los terminales controles y mutantes.
2. Determinar si la disminución de la liberación de neurotransmisor en los terminales motores AME se debe a una alteración en la dependencia a Ca^{2+} del aparato secretor. Para ello se registrarán los potenciales evocados a distintas concentraciones de Ca^{2+} extracelular en respuesta a un estímulo único y un tren de estímulos. Así mismo, determinaremos si existe una alteración en los terminales mutantes en la modulación por Ca^{2+} de la probabilidad de liberación vesicular y/o del número de sitios de liberación activos.
3. Investigar si la expresión de proteínas presinápticas en los terminales motores AME está alterada y si ello se relaciona con el déficit funcional. Determinaremos la expresión y distribución de SV2A, SV2B, SV2C, Syt1, Syt2, Syt7 y Stx1B en los terminales controles y mutantes mediante inmunomarcaje con anticuerpos específicos. Las proteínas potencialmente afectadas serán estudiadas a distintas edades para determinar el curso temporal de la alteración.

- 4.** Investigar si la expresión de proteínas presinápticas en los terminales motores se relaciona con la distinta vulnerabilidad muscular en AME. Determinaremos la expresión y distribución de distintas proteínas presinápticas en los terminales controles y mutantes mediante inmunomarcaje con anticuerpos específicos en músculos con distinto grado de afectación.

- 5.** Validar los posibles cambios en la expresión de proteínas presinápticas en dos modelos distintos de AME. Para ello utilizaremos el modelo SMN Δ 7 y el modelo Taiwanés, que presentan un fenotipo morfológico y motor similar.

- 6.** Determinar si los terminales motores AME poseen la capacidad de modular la liberación sináptica mediante potenciadores de la neurotransmisión. Para ello utilizaremos tres drogas: roscovitina (inhibidor de Cdk5 y modificador de los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje), PDBu (un éster de forbol activador de PKC/Munc13) y nifedipina (antagonista de los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje tipo L). Así mismo, determinaremos el mecanismo de acción de estas drogas sobre la probabilidad de liberación vesicular y el número de sitios de liberación activos.

MATERIALES y MÉTODOS

1. Modelos animales

Para la realización de este trabajo fueron utilizados dos modelos de ratón: modelo SMN Δ 7 y Taiwanés. Todos los experimentos fueron realizados de acuerdo con la Directiva del Consejo Europeo de Cuidado de Animales de Laboratorio. Los animales de experimentación se mantuvieron en condiciones estándares (12:12 horas de luz-oscuridad y alimentación *ab libitum*) en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla.

1.1 Modelo SMN Δ 7

Este modelo fue desarrollado por Le y colaboradores (Le et al., 2005) y fue cedido a nuestro laboratorio por el Dr. Arthur Burghes (Department of Molecular Genetics, College of Biological Sciences, The Ohio State University, Columbus, OH). El modelo se caracteriza por presentar una interrupción en el exón dos del gen *Smn* mudo y expresar dos transgenes humanos en homocigosis: *SMN2* y *SMN Δ 7* (dos y seis copias, respectivamente). El transgen *SMN Δ 7* produce únicamente proteína SMN trunca, SMN Δ 7, que puede oligomerizar con la proteína SMN completa aumentando así los niveles de proteína funcional, lo que conduce a un incremento de la supervivencia de los ratones deficientes en SMN hasta un máximo de dos semanas. La colonia se mantuvo mediante el cruce de parejas con genotipo *Smn*^{+/-}; *SMN2*^{+/+}; *SMN Δ 7*^{+/+}, con fondo genético FVB/N, obteniéndose animales controles (*Smn*^{+/+}; *SMN2*^{+/+}; *SMN Δ 7*^{+/+}), heterocigotos (*Smn*^{+/-}; *SMN2*^{+/+}; *SMN Δ 7*^{+/+}) y mutantes (*Smn*^{-/-}; *SMN2*^{+/+}; *SMN Δ 7*^{+/+}). Para los experimentos fueron utilizados animales controles y mutantes hermanos de camada de tres días de edad (P3) (Fig. 13A) y animales con una edad comprendida entre los nueve y once días postnatales (P9-11) (Fig. 13B).



Figura 13. Aspecto de animales controles y mutantes utilizados en los experimentos. A. Imagen de un animal control (derecha) y un animal mutante (izquierda) a P3. **B.** Imagen de un animal control (derecha) y un animal mutante (izquierda) a P9.

1.2 Modelo Taiwanés

Este modelo fue desarrollado por Hsieh-Li y colaboradores (Hsieh-Li et al., 2000) y fue adquirido directamente a los laboratorios Jackson (número de stock: 005058). Presenta una mutación en el exón 7 del gen *Smn* y contiene un solo transgen humano, *SMN2*. Los animales muestran diferente severidad fenotípica en función del número de copias de *SMN2*. Los animales de experimentación fueron obtenidos por cruces de progenitores *Smn*^{+/-}; *SMN2*^{0/0} y *Smn*^{-/-}; *SMN2*^{+/+}, obteniéndose ~50% de la progenie con genotipo *Smn*^{+/-}; *SMN2*^{+/0} (controles) y ~50% con genotipo *Smn*^{-/-}; *SMN2*^{+/0} (mutantes). La supervivencia media de estos ratones fue de seis días y la máxima de 10 días. Sin embargo, los ratones con cuatro copias de *SMN2* son viables y fértiles, aunque desarrollan necrosis en la cola y en las orejas. Para los experimentos fueron utilizados animales controles y mutantes hermanos de camada de siete días de edad postnatal (P7) (Fig. 14).

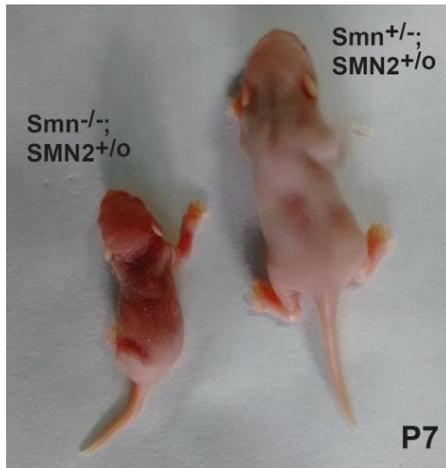


Figura 14. Aspecto de animales heterocigotos (controles) y mutantes del modelo Taiwanés utilizados en los experimentos. Hermanos de camada, heterocigoto (derecha) y mutante (izquierda) a P7.

2. Genotipado de las líneas experimentales

El genotipado de los animales de experimentación se llevó a cabo mediante PCR, a partir de biopsias digitales y caudales de las que se extrajo el material genético.

2.1 Protocolo de extracción de ADN

Las muestras se centrifugaron a 14000 rpm durante un minuto. A continuación, se añadió 50 μ l de una solución de lisis alcalina (25 mM NaOH; 0,2 mM EDTA) y se sometió a las muestras a un choque térmico a 65° durante 30 minutos y a 98° durante 18 minutos para permitir la rotura y disgregación del tejido. Las muestras se incubaron en hielo durante un minuto para evitar la evaporación y la alcalinidad se neutralizó con 50 μ l de una solución neutralizante (40 mM Tris ajustado a pH 4 con HCl). Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 14000 rpm durante un minuto para separar el sobrenadante del precipitado y se recogió 50 μ l del sobrenadante donde se encontraba el material genético.

2.2 PCR y electroforesis

Una vez extraído el ADN, se procedió a realizar la amplificación del gen de interés por PCR en un termociclador (Biometra T1 thermocycler, Göttingen, Alemania). A continuación, se detalla el protocolo para cada línea animal de experimentación.

2.2.1 Modelo SMN Δ 7

En este modelo, normalmente los transgenes *SMN2* y *SMN Δ 7* no se genotiparon ya que se encuentran en homocigosis. El gen *Smn* se genotipó como se detalla a continuación:

Secuencia cebadores:

NeoB: 5' GCA GCT GTG CTC GAC GTT GTC 3'

A2R: 5' CCT TAA AGG AAG CCA CAG CTT TAT C 3'

A2F: 5' GCT CTT GGC AAC CCT ACT GTC 3'

Composición de la mezcla de reacción:

16,8 μ l de H₂O MiliQ

5 μ l de Tampón 5X (Bioline; 21105)

1 μ l de cada cebador (30 μ M)*

0,2 μ l ADN polimerasa MyTaq (Bioline; 21105)

2 μ l ADN

*Los cebadores A2F y A2R amplifican la banda silvestre (500 pb) y los cebadores NeoB y A2R la banda mutante (1100 pb).

Programa termociclador

- 1) 95°C 5'
- 2) 95°C 15''
- 3) 62°C 15''
- 4) 65°C 30'' (ciclo 2-4 repetidos 35 veces)
- 5) 65°C 5'

6) 4°C Infinito

Una vez finalizada la PCR, se reveló el resultado de la amplificación del ADN por electroforesis en gel de agarosa (1%). En la Figura 15 se observa un ejemplo del patrón de bandas resultante de la electroforesis para una muestra de un animal de cada genotipo.

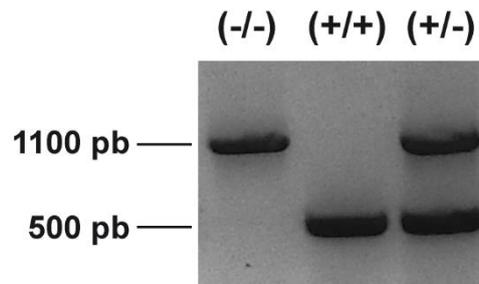


Figura 15. Resultado del genotipado de los animales de experimentación mediante PCR. El procedimiento se llevó a cabo a partir de ADN extraído de biopsias digitales y/o caudales procedentes de animales controles (+/+), heterocigotos (+/-) y mutantes (-/-). Las bandas de 500 y 1100 pb corresponden a la banda silvestre y mutante, respectivamente.

2.2.2 Modelo Taiwanés

En este modelo, el transgen *SMN2* no fue genotipado rutinariamente ya que todos los animales de experimentación eran hemicigotos. El gen *Smn* se genotipó siguiendo las siguientes pautas:

Secuencia cebadores:

oIMR3468: 5' AGC CTG AAG AAC GAG ATC AGC 3'

oIMR7893: 5' GCG TTG ATG GCA TTT CAC TA 3'

oIMR7894: 5' TGC TCG TGG AAG TCA GTG AG 3'

Composición de la mezcla de reacción:

10,8 µl de H₂O MiliQ

4 µl de MgCl₂ (25 mM)

2,5 µl de Tampón 10X (Biotools; 10043)

2 µl de cada cebador (10 µM)*

0,5 µl dNTPs (25 mM; Invitrogen)

0,2 µl Taq polimerasa (Biotools; 10043)

1 µl ADN

*Los cebadores 3468 y 7893 amplifican la banda silvestre (180 pb) y los cebadores 3468 y 7894 la banda mutante (160 pb).

Programa termociclador

1) 95°C 3'

2) 94°C 30''

3) 59°C 90''

4) 72°C 1' (ciclo 2-4 repetidos 35 veces)

5) 72°C 2'

6) 4°C Infinito

El resultado de la amplificación se obtuvo por electroforesis en gel de agarosa (3%). En la Figura 16 se muestra un ejemplo del patrón de bandas resultante de la electroforesis para una muestra de un animal de cada genotipo.

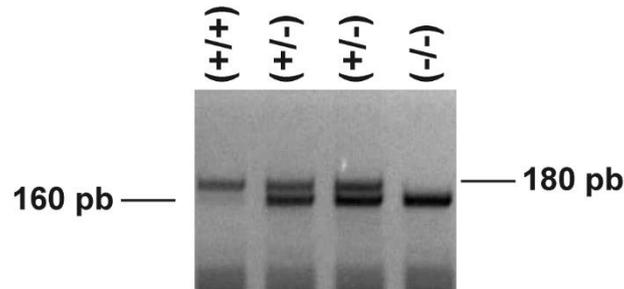


Figura 16. Resultado del genotipado de los animales de experimentación de la línea Taiwanés. Patrón de bandas para el gen *Smn* a partir de biopsias de animales controles (+/+), heterocigotos (+/-) y mutantes (-/-). Las bandas de 180 y 160 pb corresponden a la banda silvestre y mutante, respectivamente.

3. Preparaciones neuromusculares

Los experimentos realizados se llevaron a cabo en los músculos *Transversus abdominis* (TVA), *Obliquus internus abdominis* (OIA) y diafragma. A continuación se explica detalladamente sus disecciones.

3.1 *Transversus abdominis* (TVA)

Se trata de un músculo esquelético con fibras principalmente de tipo lento que se localiza en la capa interna de la pared abdominal, extendiéndose desde la columna vertebral hasta la línea alba (Fig. 17A). Su principal función es contribuir a la estabilidad de la columna vertebral y se considera un músculo constrictor del abdomen. Recibe inervación de los nervios espinales torácicos (T8-T12), iliohipogástrico (rama superior del primer nervio lumbar (L1)) e ilioinguinal (rama del primer nervio lumbar).

Para su disección los animales fueron decapitados y posteriormente desangrados. A continuación, el animal se colocó en decúbito dorsal y se retiró la piel abdominal. Se diseccionó toda la pared muscular abdominal y, el bloque muscular junto con la caja torácica se colocó en una placa de Petri (Ø 55 mm) con la base cubierta de un elastómero de silicona (Sylgar), fijándose en la misma con alfileres de 0,2 mm (Fig. 17B, a), para, posteriormente, proceder a la disección de los músculos superficiales que cubren al TVA, eliminando así el

músculo *Rectus abdominis* (RA) y el *Obliquus externus abdominis* (OEA), quedando expuesto el TVA, cuya región inferior está cubierta por el *Obliquus internus abdominis* (OIA) (Fig. 17A y B). Además, se eliminó el tejido conectivo y adiposo que lo cubre y rodea.

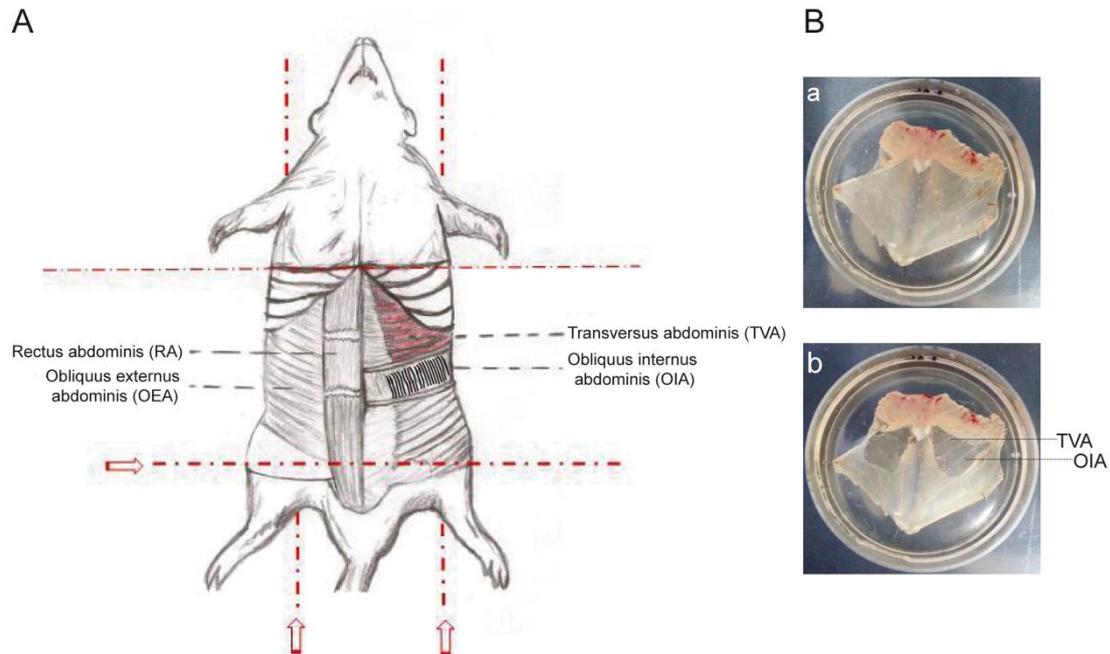


Figura 17. Esquema anatómico y representación de la disección de los músculos abdominales. **A.** Representación esquemática de la localización del músculo abdominal transverso (TVA) y del oblicuo interno (OIA). **B.** Imágenes que ilustran los pasos seguidos para la disección de dichos músculos. Tras la retirada de la piel abdominal mediante escisión de la línea media, se colocó todo el bloque muscular junto con la caja torácica en una placa de Petri (a) en la que se eliminaron los músculos superficiales que cubren al TVA (b).

3.2 *Obliquus internus abdominis* (OIA)

Se trata de un músculo situado en la parte anterolateral del abdomen (Fig. 17A). Se inserta por su parte inferior en el ligamento inguinal y mediante aponeurosis en las apófisis espinosas de la última lumbar y primera sacra. Por su parte superior se inserta en el borde inferior de los cuatro últimos cartílagos costales y, mediante la aponeurosis anterior, en la línea alba. Se encarga de la flexión y rotación del tórax de forma unilateral y de la flexión del tronco, elevación de la pelvis, del aumento de la presión abdominal y de la espiración de forma bilateral.

Se encuentra inervado por los cuatro últimos nervios intercostales (T8-T12) y el nervio abdominogenital. Su disección se llevó a cabo junto con la del TVA, como se ha descrito anteriormente (Fig. 17).

3.3 Diafragma

Se trata de un músculo plano en forma de cúpula que separa la cavidad torácica de la abdominal. Se inserta en la cara posterior del apéndice xifoides del esternón y en las tres primeras vértebras lumbares. Es cóncavo en la zona superior (límite inferior de la cavidad torácica) y convexo en la región inferior (techo de la cavidad abdominal), y su parte media es aponeurótica, alrededor de la que se encuentran las bandas musculares, llamándose a cada región que se extiende desde la línea media a la región intercostal hemidiafragma (Fig. 18A). Es un músculo de tipo mixto. Un 80% de sus fibras son resistentes a la fatiga (55% de tipo I y 25% de tipo IIa). Recibe inervación del nervio frénico, que contiene axones de los nervios espinales cervicales (C3-C5). Es un músculo esencial para el organismo debido a su participación en la respiración.

Para su disección los animales fueron decapitados, desangrados y colocados en posición decúbito dorsal. Se retiró toda la pared muscular abdominal y se retiraron los órganos internos del animal. A continuación, el diafragma se extrajo del animal junto con las costillas y el esternón y se colocó en una placa de Petri (Ø 55 mm) con la base cubierta de un elastómero de silicona (Sylgar), fijándose en la misma con alfileres de 0,2 mm. Finalmente, se limpió la porción tendinosa que divide a los dos hemidiafragmas (Fig. 18).

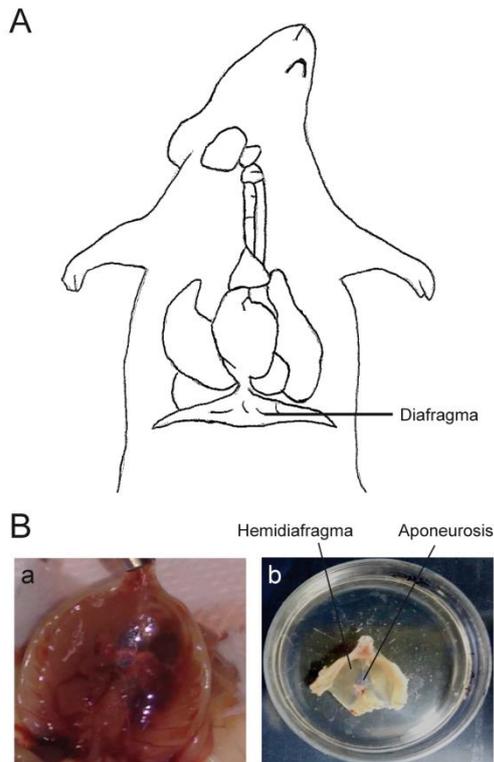


Figura 18. Representación anatómica del diafragma y su disección. A. Localización del diafragma en el organismo. **B.** Disección del diafragma en el ratón. Tras la retirada de la piel abdominal, encontramos al diafragma flanqueado por el cartílago costal (a). A continuación, se diseccionó el diafragma junto con las costillas para, finalmente, fijarlo en una placa de Petri (b).

Las preparaciones musculares se mantuvieron en todo momento bañadas por una solución cuya composición fue la siguiente (en mM): 135 NaCl, 12 NaHCO₃, 5 KCl, 1 MgCl₂, 20 Glucosa, y de 1 o 2 CaCl₂ (experimentos electrofisiológicos e inmunofluorescencia, respectivamente), con una osmolaridad comprendida entre 290-310 mOs/Kg. Esta solución se mantuvo continuamente gaseada con carbógeno (5% CO₂, 95% O₂), para mantener el pH en torno al pH fisiológico (~7,35). La disección se llevó a cabo bajo un microscopio estereoscópico (Nikon SMZ 1500; Fig.19).

Para los registros electrofisiológicos del TVA, tras la disección y limpieza del músculo, se identificó y limpió la rama intercostal que lo inerva usando tijeras pequeñas (F.S.T 15000-10). Tras ello, el músculo se fijó en una cámara de registro de metacrilato con un volumen de tres ml, con base de Sylgar, con un sistema de intercambio de solución.



Figura 19. Microscopio estereoscópico Nikon SMZ 1500. Imagen tomada de <http://www.origio.com>

4. Registro intracelular mediante microelectrodos de vidrio

4.1 Procedimiento y dispositivo experimental

Estos experimentos se realizaron en el músculo TVA de ratones controles y mutantes SMN Δ 7 con edad comprendida entre los nueve y 11 días postnatales (P9-11). El dispositivo experimental utilizado (Fig. 20) se compuso de:

- Electrodo de succión para la estimulación del nervio (Fig. 21A)
- Estimulador de pulsos aislado (Modelo 2100, AM-Systems) (Fig. 21B)
- Amplificador de registro intracelular (TEC-05X, Npi electronic GmbH) (Fig. 21C)
- Microscopio de transmisión directa (BX50WI, Olympus)
- Micromanipulador (Narishige, MHW-3)
- Interfase (PowerLab 4SP) (Fig. 21D)
- Ordenador
- Programa para la adquisición y monitorización de las señales (Chart5, ADInstruments)
- Sistema de intercambio de solución

- Cámara de registro
- Mesa antivibratoria (Newport)
- Jaula de Faraday

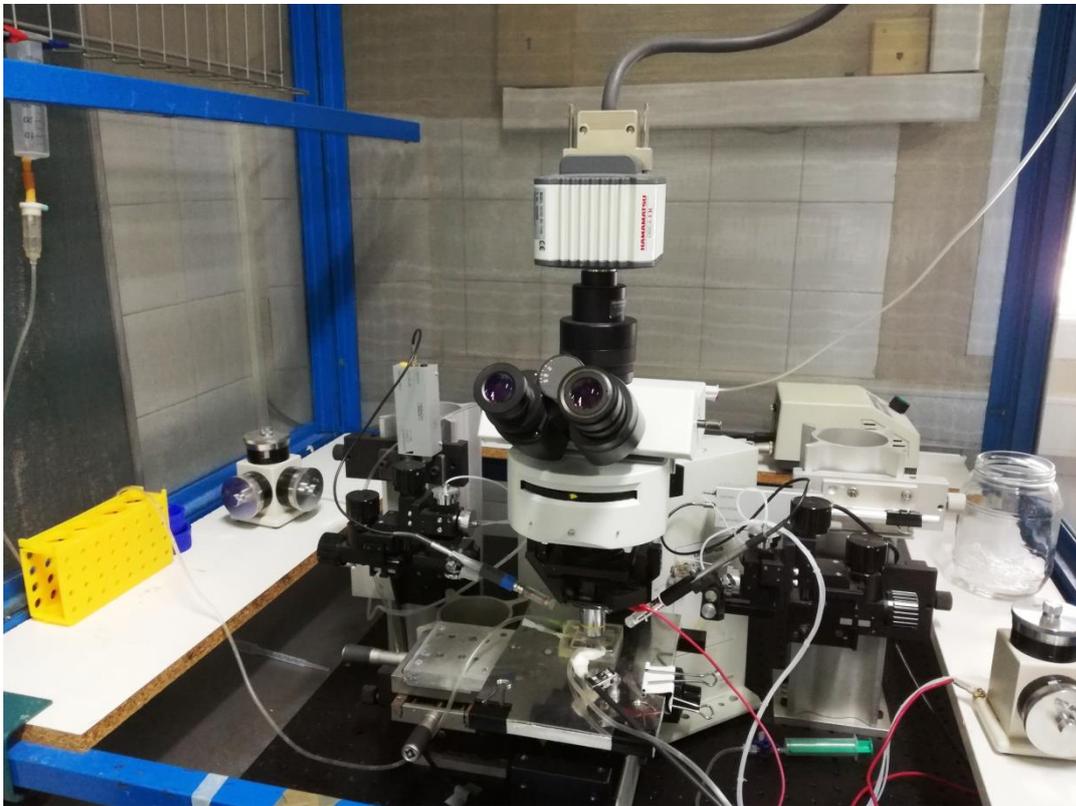


Figura 20. Dispositivo experimental utilizado para el registro intracelular mediante microelectrodos de vidrio.

Para realizar el registro electrofisiológico de los potenciales de placa en miniatura o espontáneos (mEPP; del inglés miniature endplate potential) y evocados (EPP; del inglés endplate potential) de las diferentes fibras musculares, el nervio intercostal del músculo TVA se estimuló mediante un electrodo de succión, compuesto por un tubo de polietileno conteniendo un hilo de plata clorurado (Ag-AgCl), que actuó como cátodo, y cuyo exterior quedó recubierto con otro hilo conductor, que actuó como ánodo (Fig. 21A). El electrodo de succión se conectó al estimulador de pulsos aislado (Fig. 21B) y a un sistema de succión compuesto por un tubo de polietileno y una jeringa con solución extracelular y una llave de tres pasos para mantener la presión negativa. La estimulación se llevó a cabo mediante pulsos cuadrados de 0,2 ms de duración,

con voltaje comprendido entre 1,5-40 V, a frecuencia de 0,5 o 20 Hz, en función del experimento a realizar.

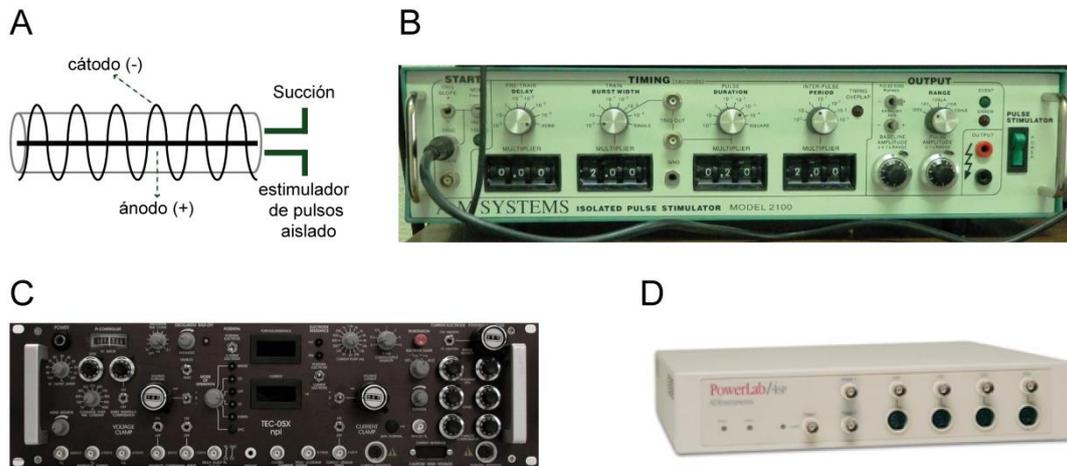


Figura 21. Componentes del dispositivo experimental. A y B. Electrodo de succión utilizado en la estimulación del nervio que se encuentra conectado al estimulador de pulsos aislado (B) (AM-Systems. Modelo 2100) y a un sistema de succión. **C.** Amplificador de registro intracelular (TEC-05X, Npi electronic GmbH). Imagen tomada de <http://www.npielectronic.de>. **D.** Interfase PowerLab 4SP. Imagen tomada de AD Instruments.

El electrodo intracelular se fabricó a partir de capilares de vidrio con un estirador horizontal (P-97, Sutter Instrument; Fig. 22) con los siguientes parámetros: calor: 540; velocidad: 80; fuerza de estirado: 200; tiempo: 200. La resistencia de los microelectrodos fue de 10-30 M Ω una vez llenados con una solución conductora de KCl 3 M. En su interior se introdujo un hilo de plata clorado conectado al amplificador de registro. Para la penetración de las fibras musculares se utilizó un micromanipulador (Narishige, MHW-3). El dispositivo también disponía de un electrodo conectado a tierra que se colocó en la solución de la cámara de registro.



Fig. 22. Estirador de vidrio horizontal utilizado en el registro intracelular. Modelo P-97. Imagen modificada de www.sutter.com

La contracción muscular fue inhibida con μ -conotoxina GIIIB (2-4 μ M, Alomone Laboratories), bloqueante específico de los canales de sodio voltaje dependientes del músculo ($\text{Na}_v 1.4$). Los datos fueron adquiridos con el programa Chart5 (ADInstruments). Todos los registros se llevaron a cabo a temperatura ambiente (22-23°C). En la Figura 23 se muestra un ejemplo de los EPP y mEPP registrados a 0,5 (Fig. 23A) y 20 Hz (Fig. 23B).

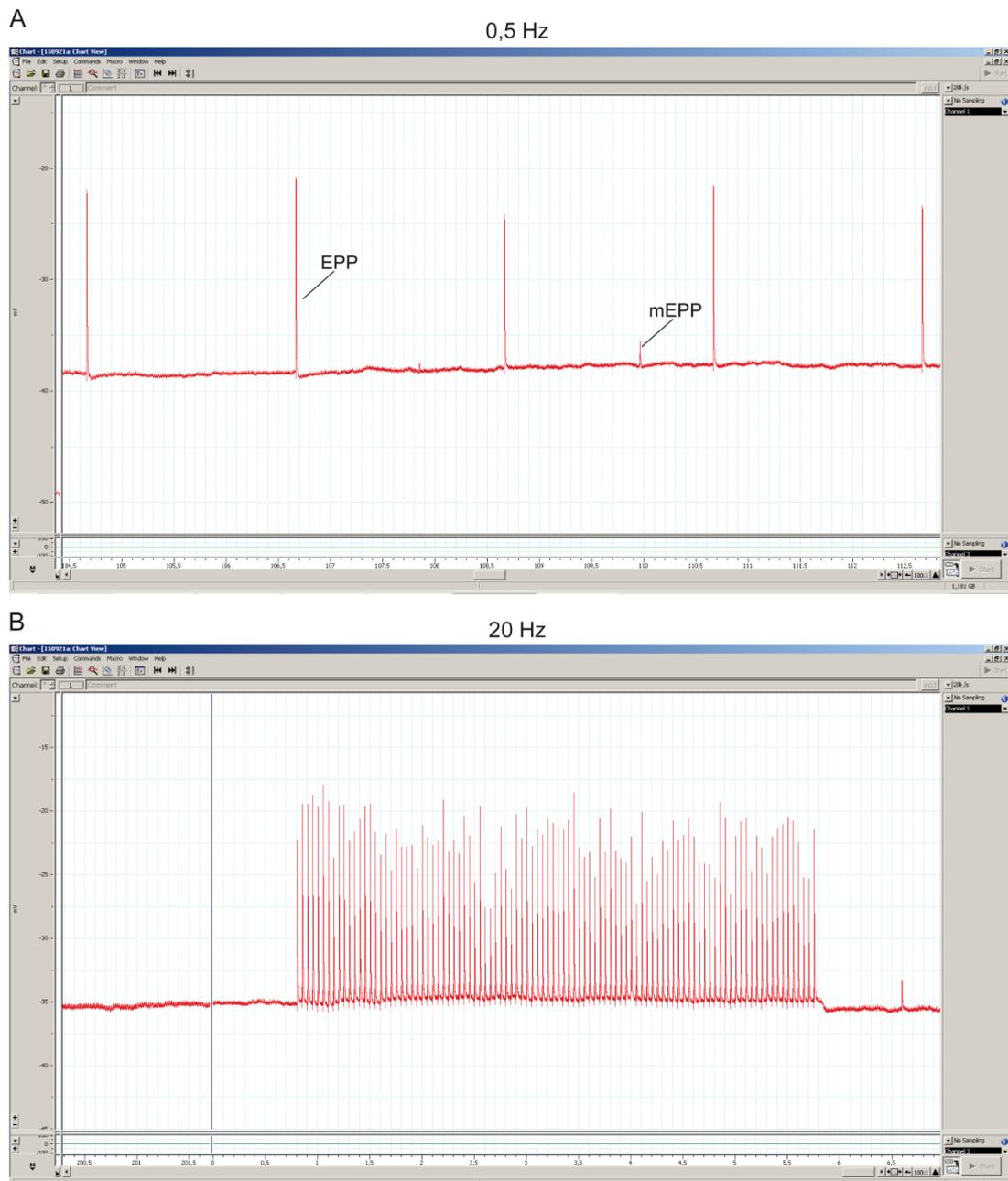


Figura 23. Registro de los potenciales de placa espontáneos (mEPP) y evocados (EPP) a las distintas frecuencias estudiadas (0,5 y 20 Hz). A y B. Potenciales de placa evocados (EPP) y espontáneos (mEPP) registrados en una fibra muscular a 0,5 Hz y 20 Hz, respectivamente.

4.2 Análisis de los registros electrofisiológicos

Con el programa Chart5 se analizó la amplitud y cinética de los EPP y mEPP registrados en los distintos experimentos. La amplitud de los EPP y los mEPP se normalizó a un potencial de membrana de reposo de -70 mV (potencial de membrana teórico), siguiendo la siguiente fórmula:

$$f = \frac{(70 - 5)}{-V_m - E_r} \quad (1)$$

donde f es el factor de normalización, V_m el potencial de membrana registrado y E_r es el potencial de reversión de la corriente a través de los receptores de ACh (en nuestro caso, se consideró E_r con un valor de -5 mV).

A continuación, la amplitud de los EPP fue corregida por la sumación no lineal (Boyd and Martin, 1955, Kretschmannova and Zemkova, 2004):

$$EPP_{cnl} = \frac{\text{amplitud EPP}}{1 - \frac{\text{amplitud EPP}}{(-V_m) - E_r}} \quad (2)$$

donde EPP_{cnl} es la amplitud del potencial postsináptico corregido.

Finalmente, se obtuvo la amplitud de los potenciales evocados doblemente corregidos:

$$EPP_{cnl\&70} = f * EPP_{cnl} \quad (3)$$

Una vez normalizadas las amplitudes de los EPP y mEPP se calculó el contenido cuántico (m ; número de cuantos que se liberan tras la llegada de un potencial de acción al terminal presináptico) por dos métodos (Del Castillo and Katz, 1954):

1. Método directo:

$$m = \frac{\text{amplitud media EPP (mV)}}{\text{amplitud media mEPP (mV)}} \quad (4)$$

2. Método indirecto:

$$m = \ln \frac{\text{número de estímulos}}{\text{número de fallos}} \quad (5)$$

El método indirecto se utilizó para la cuantificación del contenido cuántico en los experimentos con bajo Ca^{2+} ($< 0,75 \text{ mM Ca}^{2+}$) y en los experimentos en presencia de los antagonistas de los canales de Ca^{2+} , dada la alta aparición de fallos durante los protocolos de registro.

El contenido cuántico depende de dos parámetros: (i) p_r : probabilidad de liberación de las vesículas sinápticas; y (ii) n : número de sitios de liberación activos. Su relación viene dada por la siguiente ecuación (Del Castillo and Katz, 1954):

$$m = n * p_r \quad (6)$$

Para obtener los valores de p_r y n por análisis binomial (Wang et al., 2010, Ruiz and Tabares, 2014) se midió la amplitud de los EPP y de los mEPP durante 100 estímulos a ambas frecuencias estudiadas (0,5 y 20 Hz). A continuación, se calculó el contenido cuántico medio por el método directo para esos 100 estímulos (amplitud del EPP / amplitud media de mEPP) y se calculó la varianza de m ($\text{Var}(m)$). Una vez calculados el contenido cuántico y su varianza se aplicaron las siguientes ecuaciones para obtener los valores de p_r y n :

$$p_r = \frac{m - \text{Var}(m)}{m} \quad (7)$$

$$n = \frac{m}{p_r} \quad (8)$$

4.3 Modificadores de la neurotransmisión

En los experimentos realizados en este trabajo se utilizaron diversos compuestos que modifican la liberación sináptica (Tabla IV), tanto bloqueantes específicos de los canales de Ca^{2+} tipo P/Q ($\text{Cav}2.1$) y tipo N ($\text{Cav}2.2$), como potenciadores de la liberación sináptica.

Tabla IV. Listado de los compuestos químicos utilizados en los registros electrofisiológicos

Compuesto	Concentración	Referencia/ Casa Comercial	Función	Reconstituyente
ω-agatoxina IVA	200 nM	RTA500/ Alomone	Antagonista de los canales de Ca ²⁺ tipo P/Q	Solución externa
ω-conotoxina GVIA	1 μM	C-300/ Alomone	Antagonista de los canales de Ca ²⁺ tipo N	Solución externa
Nifedipina	50 μM	N-120/ Alomone	Antagonista de los canales de Ca ²⁺ tipo L	DMSO (<0,005%)
PDBu	1 μM	524390/ Calbiochem	Agonista de Munc13 y/o PKC	DMSO (<0,005%)
R-roscovitina	100 μM	557360/ Calbiochem	Bloqueante de Cdk5	DMSO (0,1%)
S-roscovitina	10-100 μM	557362/ Calbiochem	Bloqueante de Cdk5	DMSO (0,1%)

En todos los experimentos, salvo que se indique lo contrario, la preparación neuromuscular se incubó durante ~20 minutos con el compuesto antes del registro electrofisiológico.

5. Inmunofluorescencia

Mediante inmunofluorescencia se estudió la expresión y distribución de diversas proteínas que juegan un papel importante en el proceso de la transmisión sináptica en la NMJ (Fig. 24).

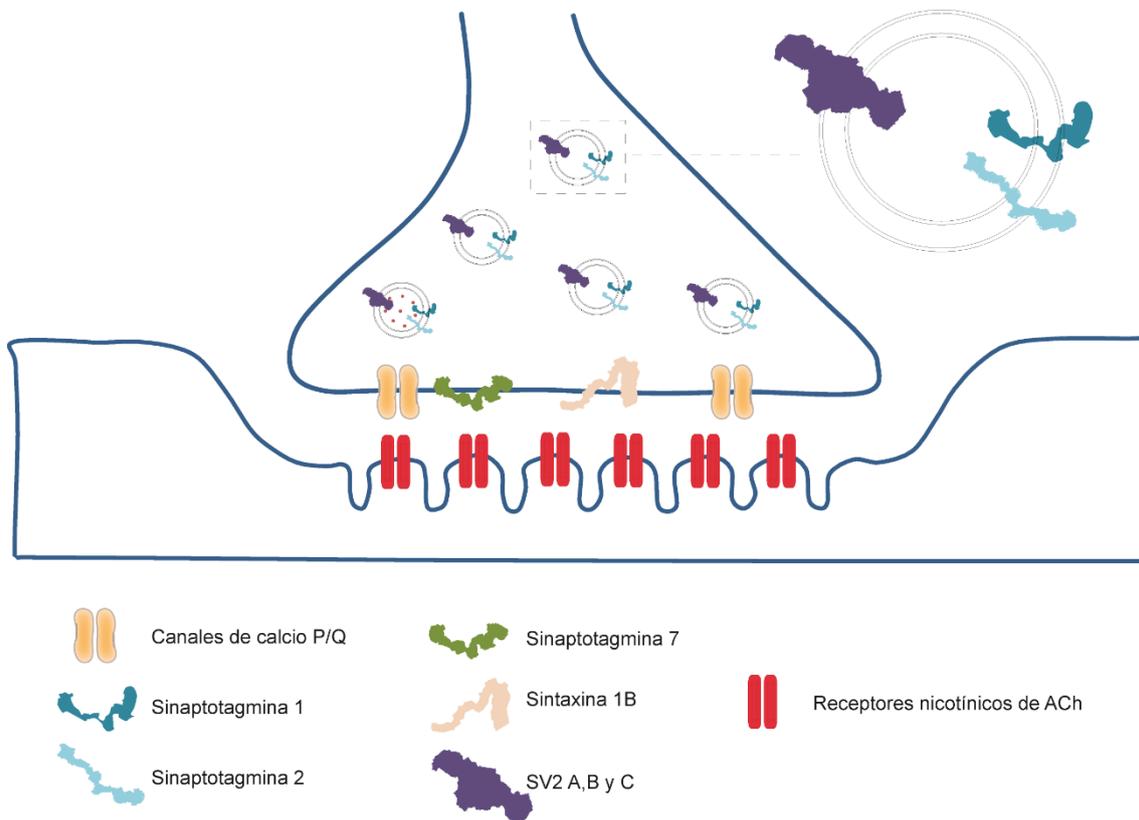


Figura 24. Dibujo esquemático de la localización en la NMJ de las proteínas estudiadas. A la derecha de la sinapsis neuromuscular aparece una magnificación de una vesícula sináptica con las proteínas sinaptotagmina 1 y 2 y SV2 (se representan conjuntamente sus distintas isoformas).

5.1 Protocolo

1. La preparación neuromuscular (TVA, OIA o diafragma, según el experimento realizado) procedente de ratones controles y mutantes, se diseccionó en solución externa (2 mM Ca^{2+} extracelular) como se ha descrito en el Apartado 3 de esta sección.
2. La muestra se mantuvo durante 30' en solución externa burbujeada con carbógeno y 10' en solución externa sin Ca^{2+} para evitar la exocitosis masiva de vesículas tras la fijación con paraformaldehído (PFA).

3. La preparación se fijó con PFA (4%) durante 90' a 4°C.
4. La preparación se lavó tres veces con PBS y se conservó durante toda la noche a 4°C en PBS.
5. El músculo se incubó con glicina 0,1 M en PBS durante 30'. La glicina se une a grupos aldehídos derivados del PFA evitando así la aparición de autofluorescencia derivada de la formación de grupos de aldehídos con proteínas.
6. La preparación se permeabilizó durante 90' con Triton 1% en PBS (PBS-T) en los que se renovó la solución seis veces (2x5'; 2x10'; 2x30').
7. La preparación se incubó durante tres horas con 5% BSA (del inglés Bovine Serum Albumine) en PBS-T, para bloquear las uniones inespecíficas de los anticuerpos.
8. La muestra se incubó con el anticuerpo primario diluido en PBS-T + 2,5% de BSA durante 30' a temperatura ambiente, y, posteriormente, a 4°C durante toda la noche.
9. La preparación se mantuvo 30' a temperatura ambiente para posteriormente lavar el anticuerpo primario ocho veces con Triton al 0,05% en PBS. Los tiempos de lavado dependieron del anticuerpo primario utilizado (desde 50' a 150').
10. La muestra se incubó durante una hora con el anticuerpo secundario correspondiente y bungarotoxina-rodamina (BTX-Rho; Sigma-Aldrich; T0195) (para teñir el área postsináptica ya que la bungarotoxina se une a los receptores nicotínicos de ACh) en PBS-T 0,05% + 5% BSA. A partir de este momento las preparaciones se cubrieron con papel de aluminio para evitar el apagamiento de los fluoróforos por exposición a la luz.
11. La preparación se lavó durante 90' (1x30'; 6x10') con PBS-T 0,05%.
12. Finalmente, el músculo se montó bajo un microscopio estereoscópico (Nikon SMZ1500) en un portaobjetos. Se añadió ~15 µl de medio de montaje Slowfade

(Invitrogen; S36936) para cubrir el músculo y se selló la preparación con un cubreobjetos.

5.2 Anticuerpos

En la Tabla V se resumen los anticuerpos utilizados en este trabajo:

Tabla V. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados

Anticuerpo primario	Concentración	Especie	Ref./Casa Comercial	Anticuerpo secundario
SV2A	1:200	Conejo	119002/SYSY	Alexa 647 (cabra anti-conejo)
SV2B	1:200	Conejo	119102/SYSY	Alexa 647 (cabra anti-conejo)
SV2C	1:500	Conejo	119203/SYSY	Alexa 647 (cabra anti-conejo)
Syt1	1:250	Ratón	105011/SYSY	CF 488 (cabra anti-ratón)
Syt2	1:200	Conejo	105123/SYSY	Alexa 647 (cabra anti-conejo)
P/Q-CCDV	1:500	Conejo	152203/SYSY	Alexa 647 (cabra anti-conejo)
Syt7	1:500	Conejo	105173/SYSY	Alexa 647 (cabra anti-conejo)
Stx1B	1:1000	Conejo	110403/SYSY	Alexa 647 (cabra anti-conejo)
Anticuerpo secundario	Concentración		Ref./Casa Comercial	
Alexa 647 (cabra anti-conejo)	1:500		A21236 / Invitrogen	
CF-488 (cabra anti-ratón)	1:500		BT-20014/ Biotium	

6. Adquisición y análisis de imágenes

6.1 Microscopia confocal y adquisición de imágenes

Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio láser confocal multiespectral motorizado Olympus FV1000 (Fig. 25).



Figura 25. Microscopio confocal Olympus FV-1000 utilizado para la adquisición de imágenes. A la izquierda de la imagen se pueden observar los láser de los que se compone el microscopio (láser de argón y rojo en la parte superior, y láser verde en la parte inferior).

La Figura 26 muestra los componentes del microscopio confocal. Su funcionamiento se basa en que la luz emitida por el sistema láser (fuente de excitación) pasa a través de un diafragma o “pinhole”, es reflejada mediante un espejo dicróico y es enfocada en un punto de la muestra a través de la lente de un objetivo (Fig. 26, línea verde). La señal emitida por el punto iluminado vuelve por el mismo camino óptico, pasa por el espejo dicróico y es enfocada en un fotomultiplicador, pasando previamente por otro diafragma o “pinhole” que sirve para eliminar las señales procedentes de regiones externas al plano focal (Fig. 26, línea roja).

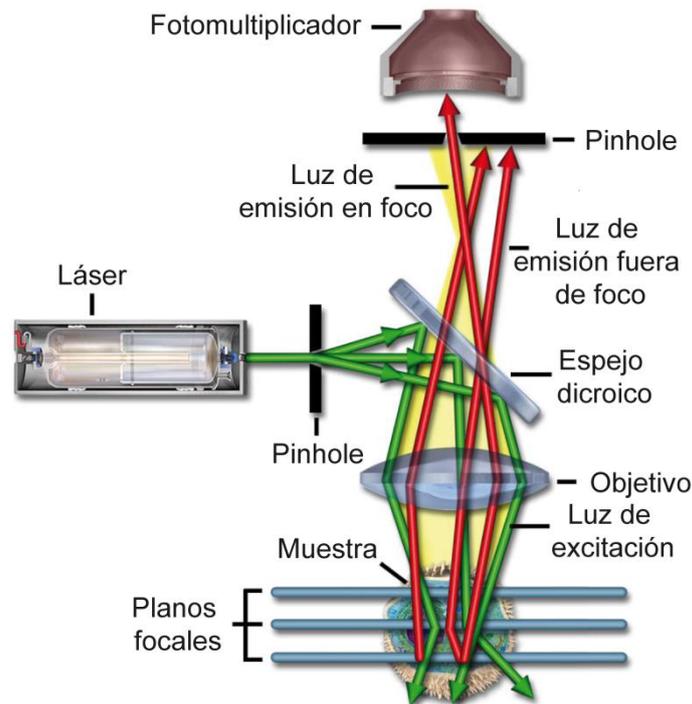


Figura 26. Esquema de los componentes del microscopio confocal. Imagen modificada de (Claxton et al., 2005).

El microscopio confocal utilizado en nuestros experimentos está equipado con tres líneas láser de excitación: (i) Láser de argón con excitación a 458, 488 y 515 nm; (ii) láser de helio-neón verde con excitación a 561 nm; (iii) láser de helio-neón rojo, con excitación a 633 nm. Se utilizó un objetivo de inmersión en aceite de 60X con una apertura numérica de 1,42. Las imágenes fueron adquiridas de forma secuencial para los diferentes láser utilizados en secciones ópticas de 0,5 μm y una apertura confocal de ~ 115 . Las imágenes fueron adquiridas con el programa FV10-ASW 1.7 Viewer (Olympus), utilizando para cada proteína de estudio los mismos parámetros de adquisición (intensidad del láser, voltaje (hv), ganancia y umbral de fondo (offset)), en los terminales nerviosos motores controles y mutantes.

6.2 Análisis de imágenes

Las imágenes fueron analizadas siguiendo rutinas del programa ImageJ v1.48. Para determinar la expresión y distribución de las distintas proteínas sinápticas

estudiadas se analizó la superficie ocupada por la señal fluorescente correspondiente. El procedimiento para su análisis siguió los siguientes pasos:

1- Área postsináptica. En primer lugar se delimitó la región de interés, ROI (del inglés region of interest), con la proyección máxima de las imágenes correspondientes al marcaje de BTX-Rho. A continuación, la imagen se convirtió de 16 bits (RGB) a 8 bits (escala de grises) y se estableció el umbral de intensidad de forma semiautomática. Finalmente, se midió el área total de los píxel por encima del umbral.

2- Áreas proteínas presinápticas. Se obtuvo la proyección máxima de las imágenes y se transformó a 8-bits. Se midió el área correspondiente a la proteína de interés ajustando el umbral de intensidad de fluorescencia de forma semiautomática. Utilizando el mismo ROI y umbral de intensidad se obtuvo el fondo de la imagen para su posterior substracción.

7. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa informático SPSS v.22. Se siguió el siguiente procedimiento:

1. Estudio de la normalidad de la variable

Se emplearon dos test de normalidad según el tamaño muestral:

1. Test de Shapiro- Wilk: se utilizó en aquellos casos en los que el tamaño muestral (n) de la variable en estudio es ≤ 50 .

2. Test de Kolmogorov-Smirnov: se utilizó cuando el tamaño muestral tiene un valor superior (> 50).

La obtención de un valor de significación (p) mayor a 0,05 significó que la variable seguía una distribución normal. En caso contrario, se rechazó la condición de normalidad.

2. Estudio de la homogeneidad de varianzas

Este estudio se aplicó en el caso de las variables que seguían una distribución normal. Se utilizó el test de Levene para estudiar la homogeneidad de varianzas, que se aceptó cuando el test resultó en un valor de $p > 0,05$.

3. Estudio de las diferencias entre los grupos experimentales para variables cuantitativas

- En el caso de que se cumpliera la normalidad, las variables se analizaron mediante la prueba t de Student, asumiendo varianzas iguales o desiguales en función del resultado del test de Levene.

- Las variables que no seguían una distribución normal se analizaron por el test no paramétrico U de Mann-Whitney.

- En los experimentos en los que había más de dos grupos experimentales las diferencias estadísticas fueron analizadas utilizando el test de análisis de la varianza (ANOVA) para aquellas variables que seguían una distribución normal y el test de Kruskal-Wallis para aquellas que no cumplieran la condición de normalidad. A continuación, se explica el procedimiento detalladamente:

- ANOVA de un factor: las muestras a las que se aplicó dicho test además de seguir una distribución normal debían de presentar homogeneidad de varianzas. Un valor de $p < 0,05$ significó que existían diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales. Para conocer entre qué grupos existían dichas diferencias se empleó posteriormente un test de comparaciones múltiples: el test de Bonferroni ó el test de Tamhane si presentaban homogeneidad de varianzas o no, respectivamente.

- Test de Kruskal-Wallis: es el test no paramétrico equivalente al ANOVA. En este caso para identificar entre qué grupos experimentales existían diferencias significativas se utilizó el test no paramétrico U de Mann-Whitney aplicándole la llamada corrección de Bonferroni. Dicha corrección se basa en la

consideración de significación estadística en aquellos casos en los que p tenga un valor inferior a la razón entre α (0,05) y el nº de posibles comparaciones dos a dos.

Excepto en el caso de la aplicación de la corrección de Bonferroni, en todos los casos la significación estadística siguió el siguiente patrón: * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$. Se compararon los grupos experimentales dos a dos (ratones controles versus ratones mutantes o ratones controles o mutantes en ausencia o presencia de los modulares de la neurotransmisión).

Todos los datos son representados como la media \pm error estándar de la media, siendo n el número de fibras musculares o terminales nerviosos motores y N el número de ratones en los que se llevó a cabo el experimento.

4. Estudio de las diferencias entre los grupos experimentales para variables cualitativas

En el caso de las variables cualitativas el procedimiento seguido para el estudio de las diferencias entre grupos experimentales se llevó a cabo tal y como se describe a continuación:

1. Cálculo de la desviación estándar mediante la siguiente ecuación:

$$SdDev = \sqrt{p(1 - p)} \quad (9)$$

donde p es el cociente entre la característica que estamos estudiando y el total de la muestra.

2. Cálculo del error estándar mediante la fórmula:

$$sem = \sqrt{\frac{p(1 - p)}{N}} \quad (10)$$

donde N es el tamaño muestral.

3. Análisis estadístico: para comprobar si dos muestras pertenecen o no a la misma población se estimó el valor z, dado por la ecuación:

$$z = \frac{p_1 - p_2}{\sqrt{\left[\frac{p_1(1 - p_1)}{n_1}\right] + [p_2(1 - p_2)/n_2]}} \quad (11)$$

siendo p_1 y p_2 el cociente entre el número de veces que se presenta la condición deseada y el tamaño total de la muestra, y n_1 y n_2 el tamaño de la muestra en cada condición experimental. Finalmente, se comprobó en las tablas estadísticas el valor de z para obtener el valor de significación estadística (p), el cual dependerá de los grados de libertad (v), calculados de la siguiente forma: $n_1 + n_2 - 2$.

RESULTADOS

I: Transmisión sináptica y Ca^{2+}

La deficiencia en SMN en AME produce un déficit funcional en los terminales nerviosos motores. Para determinar si la Ca^{2+} -dependencia de la liberación sináptica y los parámetros responsables de la misma (probabilidad de liberación (p_r) y número de sitios de liberación (n)) están alterados en la sinapsis neuromuscular se realizó el estudio electrofisiológico en el músculo *Transversus abdominis* (TVA) de ratones controles y mutantes del modelo $\text{SMN}\Delta 7$ en una edad postnatal comprendida entre los nueve y 11 días de edad.

1. Los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo P/Q y N median la neurotransmisión en los terminales $\text{SMN}\Delta 7$

La liberación de neurotransmisor (NT) se produce por el incremento de Ca^{2+} en el terminal nervioso tras la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, en respuesta a la despolarización producida por la llegada de un potencial de acción (PA). Durante las dos primeras semanas de vida postnatal, en la NMJ de rata y ratón, se produce un cambio paulatino en el tipo de canal de Ca^{2+} que media la secreción, siendo los canales tipo N ($\text{Ca}_v2.2$) reemplazados por los tipo P/Q ($\text{Ca}_v2.1$) (Rosato Siri and Uchitel, 1999). En este trabajo hemos investigado si la disminución de la liberación sináptica que se produce en los terminales motores en el modelo $\text{SMN}\Delta 7$ (Kong et al., 2009; Ruiz et al., 2010) podría deberse a: (i) un retraso en la expresión de los canales P/Q y, por tanto, en un acoplamiento más débil entre la entrada de Ca^{2+} y la liberación, dado que los canales de Ca^{2+} tipo N se sitúan a mayor distancia de los sitios de liberación que los canales tipo P/Q (Wang et al., 2008); y/o (ii) una disminución en la densidad de canales de Ca^{2+} en los terminales presinápticos (Fig. 27).

En primer lugar, exploramos el/los tipo/s de canal/es que regulan la liberación de NT en las fibras del músculo TVA de ratones controles y AME mediante el uso de bloqueantes específicos de los canales de Ca^{2+} tipo P/Q y N, ω -agatoxina IVA (200 nM) y ω -conotoxina GVIA (1 μM), respectivamente.

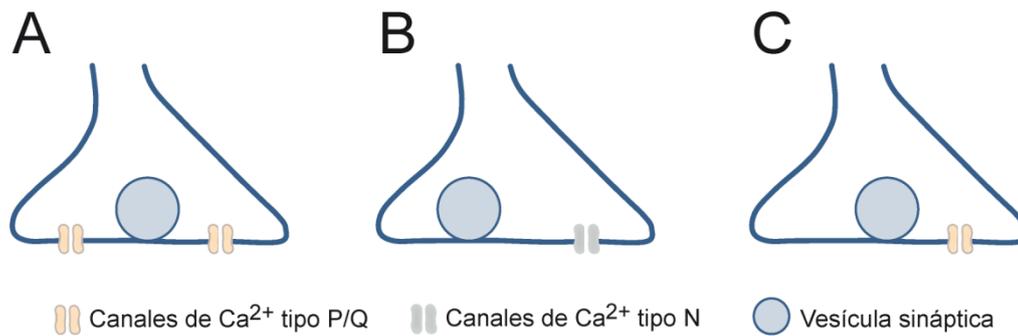


Figura 27. Representación esquemática de la relación entre los canales de Ca^{2+} y el sitio de liberación en un terminal motor. **A.** En sinapsis maduras, los canales de Ca^{2+} de las zonas activas son de tipo P/Q. **B.** En sinapsis inmaduras, son los canales tipo N los encargados de regular la exocitosis. **C.** Una alteración en la liberación sináptica puede deberse a una reducción en la densidad de canales.

En presencia de ω -agatoxina IVA, ni la amplitud ni la frecuencia de los mEPP se modificó en ningún caso. Sin embargo, la amplitud de los EPP disminuyó significativamente, tanto en los controles como en los mutantes (Fig. 28A), lo que resultó en una reducción del contenido cuántico del ~98% en los terminales controles y del ~86% en los terminales SMN Δ 7 (Fig. 28B; Tabla I del Anexo I).

En presencia de ω -conotoxina GVIA, bloqueante de los canales de Ca^{2+} tipo N, la liberación espontánea no se vio modificada, pero la amplitud de los EPP se redujo en ambos genotipos. En este caso, el contenido cuántico se inhibió en ~63% en los controles y ~72% en los ratones SMN Δ 7 (Fig. 28B; Tabla I del Anexo I).

Estos resultados indican que la neurotransmisión se encuentra mediada de forma similar en los terminales controles y deficientes en SMN por los canales de Ca^{2+} tipo P/Q y N, por lo que la reducción en la liberación de NT que se produce en AME no se debe a una alteración en el tipo de canal que la regula.

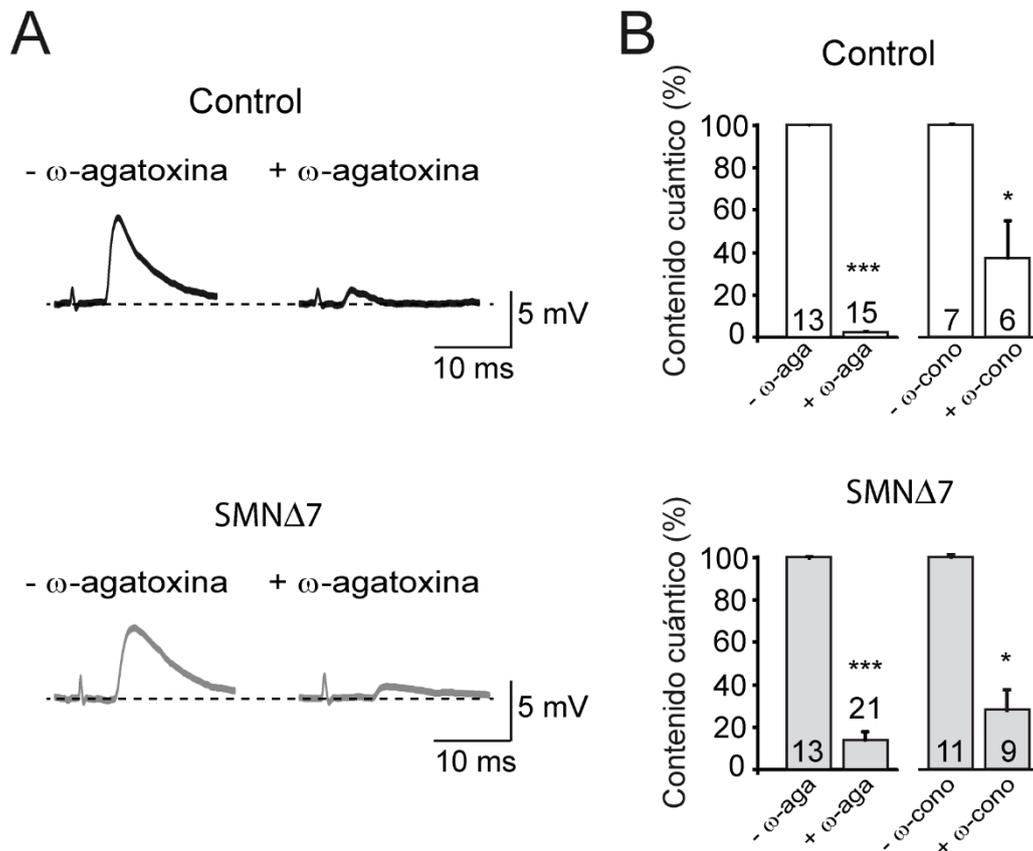


Figura 28. Los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo P/Q y tipo N median la transmisión sináptica en SMN Δ 7. A. Registros representativos de EPP registrados en fibras controles y SMN Δ 7 en ausencia y en presencia de ω -agatoxina (200 nM). **B.** Porcentaje de reducción del contenido cuántico mediante el bloqueo de los canales de Ca^{2+} tipo P/Q por ω -agatoxina y el de los canales tipo N por ω -conotoxina, tanto en los ratones controles como en los mutantes. Los números en las barras indican las fibras musculares registradas. N = 2-4 ratones por genotipo. Test t de Student. *: $p \leq 0,05$; ***: $p \leq 0,0005$.

2. Disminución de la expresión de los canales de Ca^{2+} tipo P/Q en AME

A continuación, estudiamos si la expresión y distribución de los canales de Ca^{2+} tipo P/Q se encontraba alterada en los terminales motores del TVA mediante inmunofluorescencia.

En los terminales controles, la señal correspondiente a los canales de Ca^{2+} fue más extensa que en los terminales mutantes donde presentó un aspecto más punteado (Fig. 29A). En los histogramas de distribución de áreas (Fig. 29B) puede observarse cómo las de los terminales mutantes están desplazadas a la

izquierda en comparación con los controles. Tras la normalización de la señal al tamaño de la placa motora, el promedio de la reducción en los mutantes fue del ~36% (Fig. 29C, Tabla II del Anexo I), muy similar a la reducción en la señal de las AZ en el terminal previamente descrita (Torres-Benito et al., 2011).

Estos datos sugieren que la reducción en la secreción de NT en la NMJ del modelo SMN Δ 7 se debe, en parte, a una disminución en la densidad de los canales de Ca²⁺ tipo P/Q.

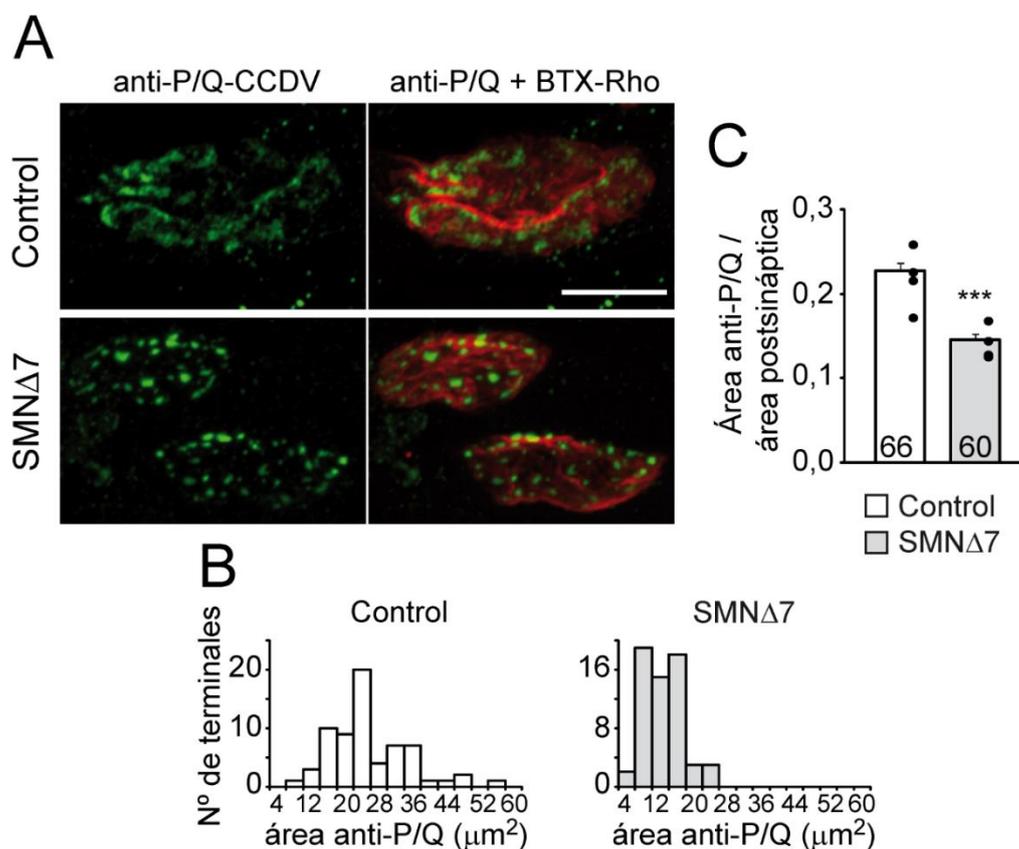


Figura 29. Los canales de Ca²⁺ tipo P/Q están reducidos en los terminales deficientes en SMN. **A.** Imágenes representativas de la expresión y distribución de los canales de Ca²⁺ tipo P/Q tras el marcaje con un anticuerpo anti- P/Q (verde) en controles (paneles superiores) y SMN Δ 7 (paneles inferiores). Los receptores nicotínicos fueron teñidos con BTX-Rho (rojo). Barra de calibración: 10 μm . **B.** Histogramas de distribución del área ocupada por los canales en cada terminal. **C.** Razón media entre la señal correspondiente al marcaje de los canales P/Q y el área teñida con BTX (área postsináptica). Los números en las barras indican los terminales analizados y los puntos muestran el valor medio en cada uno de los ratones de experimentación. N = 4 ratones por genotipo. Test U de Mann-Whitney. ***: $p \leq 0,0005$.

3. Ausencia de cambios significativos en la sensibilidad y cooperatividad a Ca^{2+} en los terminales deficientes en SMN

Dada la reducción en la señal correspondiente al marcaje de los canales de Ca^{2+} observada, seguidamente estudiamos la dependencia de Ca^{2+} de la transmisión sináptica. Para ello se registraron los EPP y mEPP de fibras del músculo TVA de ratones controles y mutantes a distintas concentraciones de Ca^{2+} extracelular (0,2-3 mM) durante estimulación a baja frecuencia (0,5 Hz).

En ambos genotipos, la amplitud de los EPP se incrementó significativamente cuando se aumentó el Ca^{2+} desde una concentración de 1 a 3 mM (2,7 y 1,6 veces, en ratones controles y mutantes, respectivamente) (Fig. 30A y B). Sin embargo, la liberación espontánea no se vio afectada (Fig. 30C). En la Tabla III del Anexo I se recogen los valores de los distintos parámetros para todas las concentraciones de Ca^{2+} estudiadas.

La relación entre el contenido cuántico y la concentración de Ca^{2+} extracelular se muestra en la Figura 30D. Como se puede observar en la curva de ajuste (función de Hill), la liberación en los mutantes alcanzó un valor máximo ~2,5 veces menor que en los terminales controles (control: $21,1 \pm 1,7$ cuantos; SMN Δ 7: $8,3 \pm 1,3$ cuantos). Sin embargo, no se vieron significativamente alteradas ni la sensibilidad a Ca^{2+} (concentración de Ca^{2+} a la que se libera el 50% de la secreción máxima: control: $1,3 \pm 0,1$ mM; SMN Δ 7: $1,06 \pm 0,2$ mM) ni la cooperatividad aparente (número de iones de Ca^{2+} que son necesarios para la fusión de las vesículas con la membrana y la posterior liberación de NT: control: $2,9 \pm 0,9$; SMN Δ 7: $4,1 \pm 2,3$). Estos resultados no apoyan, por tanto, un cambio en el mecanismo de acoplamiento entre la entrada de Ca^{2+} y la secreción.

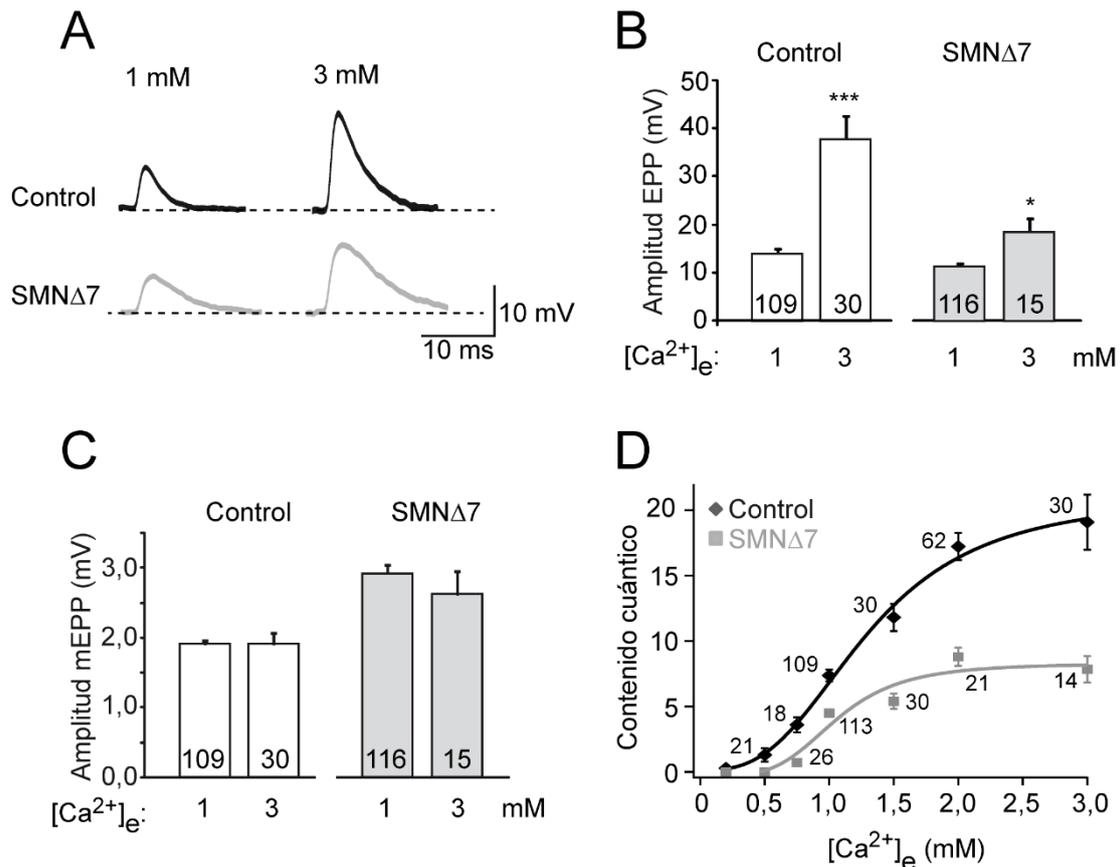


Figura 30. Ca²⁺ dependencia en los terminales controles y deficientes en SMN. A. Registros representativos de potenciales evocados en presencia de 1 y 3 mM de Ca²⁺ extracelular. **B y C.** Valores medios de la amplitud de los potenciales evocados (B) y espontáneos (C) a ambas concentraciones de Ca²⁺ en ambos genotipos. **D.** Contenido cuántico medio en función de la concentración de Ca²⁺ extracelular. Las líneas representan el ajuste de los datos a una función de Hill. Los números en las barras y en el gráfico D indican las fibras musculares registradas. N = 3-15 ratones por genotipo. Test no paramétrico U de Mann-Whitney. *: p < 0,5; ***: p ≤ 0,0005.

4. El incremento de Ca²⁺ extracelular no aumenta los sitios de liberación en los ratones SMNΔ7

La liberación sináptica, tanto en la NMJ de vertebrados como de invertebrados, puede ajustarse a un modelo estadístico binomial en el que el contenido cuántico viene determinado por el producto de dos parámetros: (i) probabilidad de liberación de las vesículas sinápticas (p_r); y (ii) número de sitios de liberación (n) (Bennett et al., 1975, Searl and Silinsky, 2003). Siguiendo este modelo, hemos

investigado cómo cambian los parámetros p_r y n en los terminales controles y SMN Δ 7 en función del Ca²⁺ extracelular.

En los terminales controles, el aumento de Ca²⁺ extracelular no produjo cambios significativos en el valor de p_r (~0,4) (Fig. 31A, símbolos oscuros; Tabla III del Anexo I). Este resultado era esperado ya que, normalmente, p_r alcanza un valor estable a concentraciones relativamente bajas de Ca²⁺ extracelular (~1 mM) (Searl and Silinsky, 2003). En cambio, n aumentó significativamente (~3,8 veces) al aumentar el Ca²⁺ extracelular desde 0,75 a 3 mM (Fig. 31B, símbolos oscuros). Sin embargo, en los terminales mutantes el mecanismo que regula el incremento del contenido cuántico es diferente. En este caso, el aumento de Ca²⁺ extracelular produjo un incremento significativo en el valor medio de p_r (~1,8 veces) entre 1 y 3 mM de Ca²⁺ extracelular (Fig. 31A, símbolos grises; Tabla III del Anexo I), sin modificar el valor de n (Fig. 31B, símbolos grises).

La comparación de los valores de p_r y n entre ratones controles y mutantes reveló que a 1 mM Ca²⁺ p_r es significativamente menor en los mutantes. Por el contrario, n sólo es significativamente mayor en los controles a concentraciones de Ca²⁺ \geq 2 mM (Fig. 31A y B; asteriscos).

Estos resultados sugieren que la limitación que existe en la liberación de NT en los terminales deficientes en SMN se debe a la incapacidad de estos terminales para incrementar n , equivalente al contingente de vesículas listas para ser liberadas (RRP; del inglés readily releasable pool), si aumenta la entrada de Ca²⁺ durante un potencial de acción.

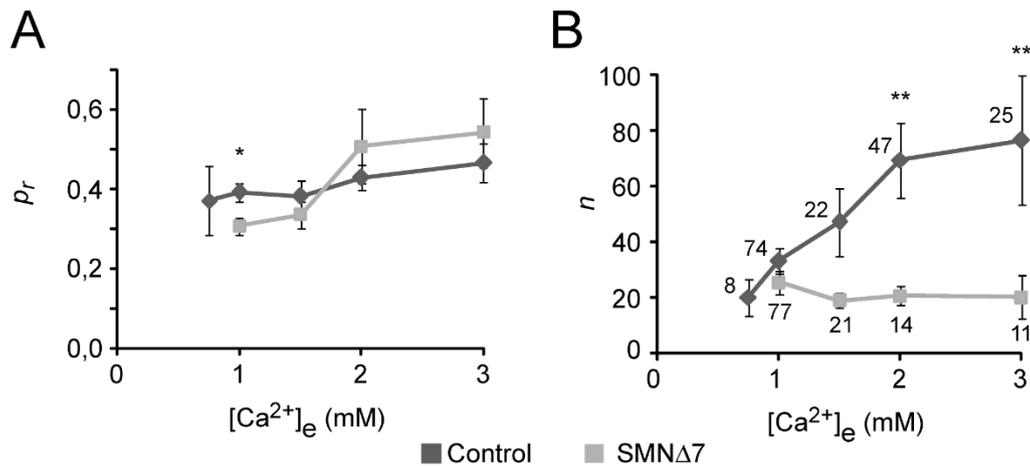


Figura 31. El incremento de Ca^{2+} extracelular no aumenta el número de sitios de liberación activos en los terminales SMN Δ 7. A. Probabilidad de liberación (p_r) media en las fibras registradas en los terminales controles (símbolos oscuros) y mutantes (símbolos claros). **B.** Número de sitios de liberación medio en los terminales controles y mutantes a las distintas concentraciones de Ca^{2+} extracelular estudiadas. Los números en el gráfico B indican el número de fibras registradas. N = 3-15 ratones por genotipo. Para el análisis estadístico de p_r se utilizó el test paramétrico ANOVA de un factor con test de Bonferroni para las comparaciones múltiples en los ratones controles y el test no paramétrico de Kruskal-Wallis para el resto. Los asteriscos indican las diferencias significativas entre genotipos (test U de Mann-Whitney). *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,005$.

5. La acumulación de Ca^{2+} durante la estimulación repetida compensa parcialmente el déficit de neurotransmisión

La limitación en la regulación del tamaño del RRP en los terminales SMN Δ 7 en respuesta a un PA, nos llevó a investigar este fenómeno a una frecuencia de estimulación en la que se produce un aumento de Ca^{2+} en el terminal. Para ello se realizaron los registros a una frecuencia de estimulación de 20 Hz, y una concentración extracelular fija de Ca^{2+} de 1 mM.

La amplitud de los EPP se incrementó progresivamente al inicio del tren en ambos genotipos, siendo proporcionalmente mayor el incremento en los mutantes dada la menor amplitud de la primera respuesta (Fig. 32A). Es de interés señalar que el análisis del contenido cuántico mostró que en ambos genotipos se alcanzó el mismo nivel de liberación tras las primeras respuestas (Fig. 32B).

Durante la estimulación a alta frecuencia se calculó la existencia de facilitación o depresión en función de la relación existente entre el segundo y primer estímulo (EPP_2 / EPP_1). Una relación > 1 (facilitación) sugiere una p_r inicial baja. En cambio, una relación < 1 (depresión) sugiere lo contrario. En nuestros experimentos, observamos una mayor facilitación en los terminales mutantes (Fig. 32C). También estudiamos la 'razón de liberación' expresada mediante el cociente entre la amplitud media de las últimas 50 respuestas y la primera respuesta. Los terminales mutantes presentaron una mayor razón de liberación (Fig. 32D), dada la menor depresión relativa existente durante el registro.

Estos resultados demuestran que la facilitación producida durante la estimulación repetida a alta frecuencia puede compensar el límite en la secreción de NT que existe en los terminales deficientes en SMN ante estímulos únicos.

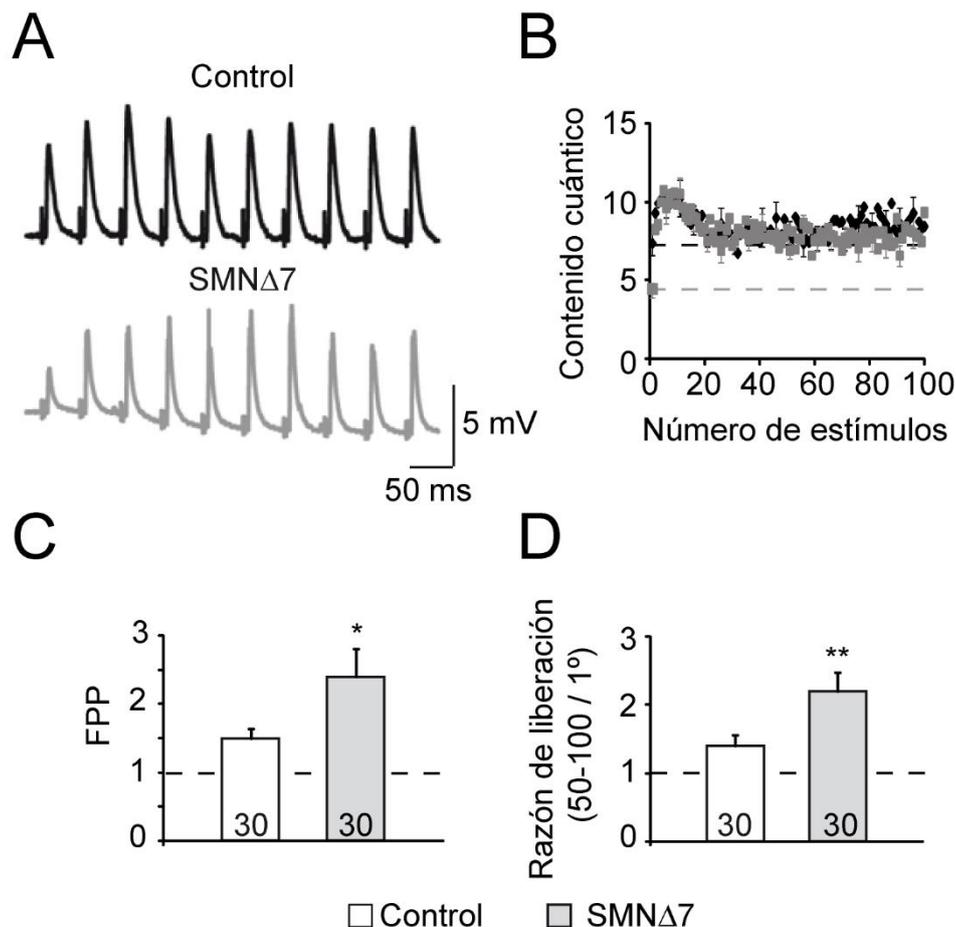


Figura 32. La estimulación a 20 Hz compensa la limitación en la secreción de los terminales SMN Δ 7. **A.** Registros representativos de las diez primeras respuestas en una fibra control y una fibra mutante. **B.** Contenido cuántico medio en los terminales controles y SMN Δ 7 durante el registro de 100 PA. Las líneas discontinuas indican los valores medios de la primera respuesta en cada genotipo. **C y D.** Facilitación por pares de pulsos (FPP) (C) y razón de liberación (D) en ambos genotipos. Los números en las barras muestran las fibras registradas. N = 7-9 ratones por genotipo. Test U de Mann-Whitney. *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,005$.

Dado que a baja frecuencia de estimulación los terminales mutantes pueden aumentar ligeramente su liberación al aumentar el Ca^{2+} extracelular hasta alcanzar un valor asintótico con 2 mM (Fig. 30D), realizamos los experimentos a 20 Hz con una concentración de Ca^{2+} extracelular de 2 mM. Al comienzo del tren de estímulos en ambos genotipos se produjo un aumento en la respuesta evocada, siendo mucho más pronunciado en los mutantes (Fig. 33A). Además, la facilitación por pares de pulsos (FPP) y la “razón de liberación” (Fig. 33C y D) fueron significativamente superiores en los ratones mutantes

comparado con los controles. Sin embargo, las respuestas en los mutantes no alcanzaron los valores controles (Fig. 33B).

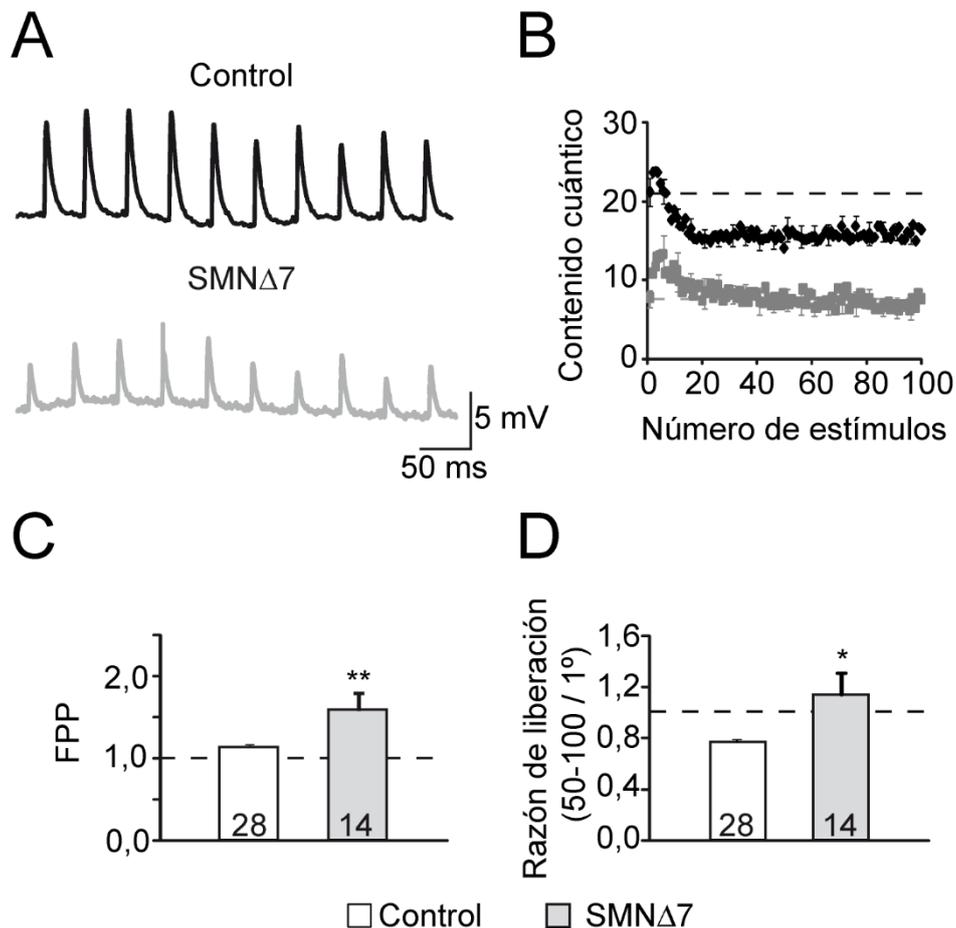


Figura 33. La estimulación a alta frecuencia y el aumento en el Ca^{2+} extracelular no modulan de manera conjunta la liberación sináptica de los terminales SMN Δ 7. **A.** Trazos representativos de las diez primeras respuestas evocadas en una fibra control y una fibra mutante. **B.** Contenido cuántico medio de las fibras controles y mutantes registradas durante un tren de estímulos. Las líneas discontinuas indican los valores medios de las primeras respuestas para cada genotipo. **C y D.** Facilitación por pares de pulsos (FPP) (C) y razón de liberación (D). Los números en las barras indican las fibras registradas. N = 5-7 ratones por genotipo. Test no paramétrico U de Mann-Whitney. *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,005$.

Los valores de liberación acumulada con 1 y 2 mM calcio, a 20 Hz, se muestran en la Figura 34A & B. En la Figura 34C y D se muestra la comparación entre el número total de cuantos liberados a ambas frecuencias y concentraciones de Ca^{2+} extracelular estudiadas. Como se puede observar, en los terminales controles el número total de cuantos liberado aumentó al aumentar

la concentración de Ca^{2+} en ambas frecuencias de estimulación (Fig. 34C; Tabla IV del Anexo I). Sin embargo, en los terminales mutantes sólo aumentó al aumentar la concentración de Ca^{2+} a baja frecuencia de (Fig. 34D; Tabla IV del Anexo I).

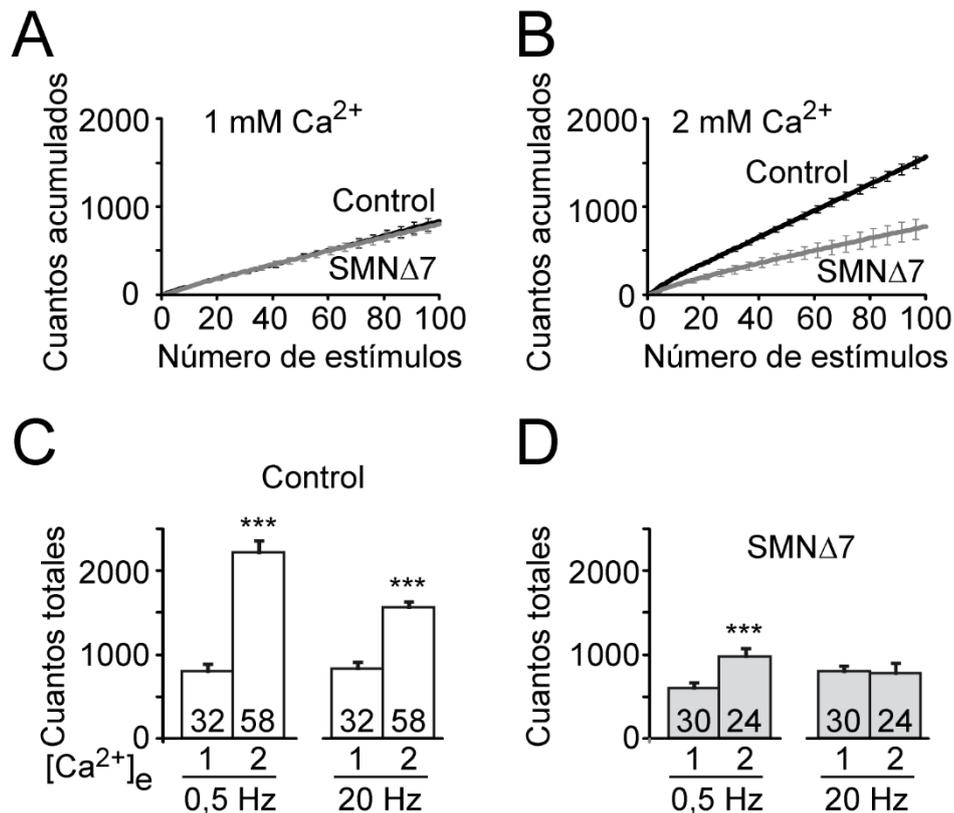


Figura 34. La secreción en los terminales deficientes en SMN no se modula eficazmente. A y B. Comparación del valor medio de la liberación acumulada durante 100 estímulos a 20 Hz en 1 y 2 mM de Ca^{2+} extracelular en ambos genotipos. **C y D.** Comparación del número total de cuantos liberados por los terminales controles y mutantes en función de la frecuencia y de la concentración de Ca^{2+} extracelular. Los números en las barras indican las fibras registradas. N = 3 – 9 ratones por genotipo. Test no paramétrico U Mann-Whitney. ***: $p \leq 0,0005$.

II. Alteración de la expresión de proteínas sinápticas en AME

Para investigar las posibles bases moleculares que subyacen a los defectos en la neurotransmisión en AME, estudiamos mediante inmunofluorescencia la expresión y distribución de diferentes proteínas sinápticas en los terminales nerviosos de músculos con distinto grado de afectación: TVA y OIA, como músculos más vulnerables, y diafragma, como músculo más resistente. Se utilizaron ratones controles y mutantes del modelo SMN Δ 7 a distintas edades (P3 y P9-11). Posteriormente, los resultados obtenidos se validaron para las proteínas más afectadas en el modelo Taiwanés (músculo TVA, P7).

1. Reducción de los niveles de SV2 en los terminales SMN Δ 7

Los mamíferos expresan tres isoformas de la proteína de las vesículas sinápticas 2 (SV2) (Bajjalieh et al., 1992, Bajjalieh et al., 1993, Bajjalieh et al., 1994, Janz and Sudhof, 1999). Cada isoforma (SV2A, SV2B y SV2C) está codificada por un gen distinto. SV2 posee una estructura formada por 12 dominios transmembrana altamente conservados (Bajjalieh et al., 1992). Aunque no se conoce con exactitud su función, numerosos estudios sugieren que SV2 facilita que las vesículas sean competentes para la exocitosis (Chang and Sudhof, 2009).

Las alteraciones en la liberación de NT descritas en el apartado anterior en los terminales SMN Δ 7, junto con el hecho de que en pez cebra se ha descrito que SV2 está disminuida en los terminales motores deficientes en Smn (Boon et al., 2009), nos llevó a explorar si la expresión y distribución de las diferentes isoformas de esta proteína en los ratones mutantes estaban alteradas.

En los animales controles, todas las isoformas se expresaron abundantemente en las NMJ del músculo TVA (Fig. 35; panel izquierdo). En cambio, en los mutantes SMN Δ 7, la expresión fue significativamente menor (Fig. 35; panel derecho).

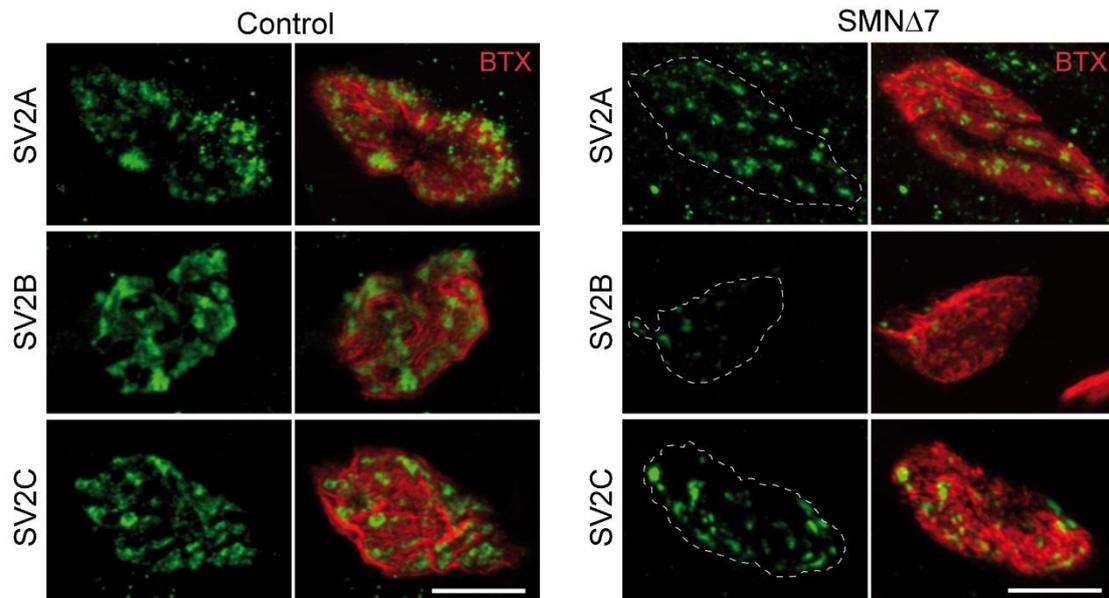


Figura 35. Expresión de las isoformas de SV2 en terminales controles y mutantes en el músculo TVA. Proyección confocal máxima de terminales motores controles y mutantes tras el marcaje con anticuerpos contra SV2A, B y C (verde). Los receptores de ACh fueron teñidos con BTX-Rho (rojo). P9-11. Barra de calibración: 10 μ m.

La reducción de la superficie total de la señal fluorescente para cada una de las isoformas de SV2 se puso de manifiesto, así mismo, por el desplazamiento a la izquierda de la distribución de las áreas correspondientes en los mutantes. Es más, en un pequeño porcentaje de terminales mutantes no se detectó señal para SV2A (8%) o SV2B (6%) (Fig. 36A). La normalización del área de cada proteína al tamaño de la placa motora reveló que la isoforma más disminuida fue SV2B, seguida de SV2C y SV2A (Fig. 36B; Tabla V del Anexo I).

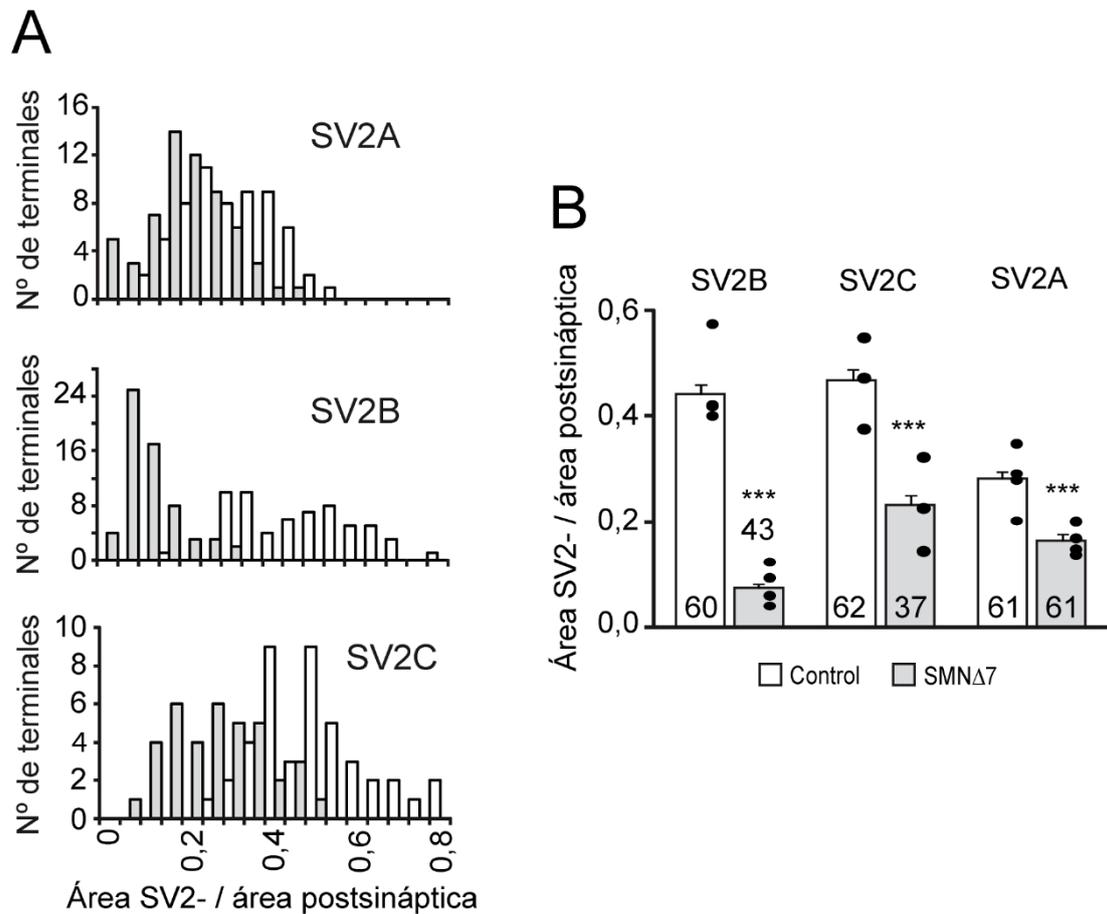


Figura 36. Disminución mayoritaria de SV2B en los terminales SMN Δ 7. A. Distribución de áreas de las señales para cada isoforma, normalizada a las áreas postsinápticas, en NMJ controles (blanco) y mutantes (gris). **B.** Valores promedios de las señales para cada isoforma. Los números en las barras indican los terminales analizados y los puntos la media por ratón. N = 3-4 ratones por genotipo. Test t de Student. *** $p \leq 0,0005$.

2. La expresión de Syt1 y Syt2 se encuentra alterada en los terminales deficientes en SMN

Distintos estudios muestran que SV2 regula la expresión, estabilidad y/o tráfico de sinaptotagmina (Schivell et al., 1996, Lazzell et al., 2004, Schivell et al., 2005, Yao et al., 2010). SV2 y sinaptotagmina interaccionan a través de la unión del extremo amino terminal de SV2 con el dominio de unión a Ca^{2+} , C2B, de sinaptotagmina. Por ello, investigamos si la expresión y distribución de dos de las principales isoformas de sinaptotagmina, sinaptotagmina-1 (Syt1) y -2 (Syt2), están alteradas en los terminales motores del TVA en los mutantes.

En los ratones controles, todos los terminales TVA presentaron señal para Syt2, mientras que la señal de Syt1 fue nula o muy baja (Fig. 37A, panel izquierdo). Por el contrario, en los mutantes las señales fluorescentes fueron similares para ambas isoformas (Fig. 37A, panel derecho). La comparación de área entre controles y mutantes reveló una reducción de Syt2 (60%) y un aumento de Syt1 (640%) en los mutantes (Fig. 37B; Tabla VI del Anexo I).

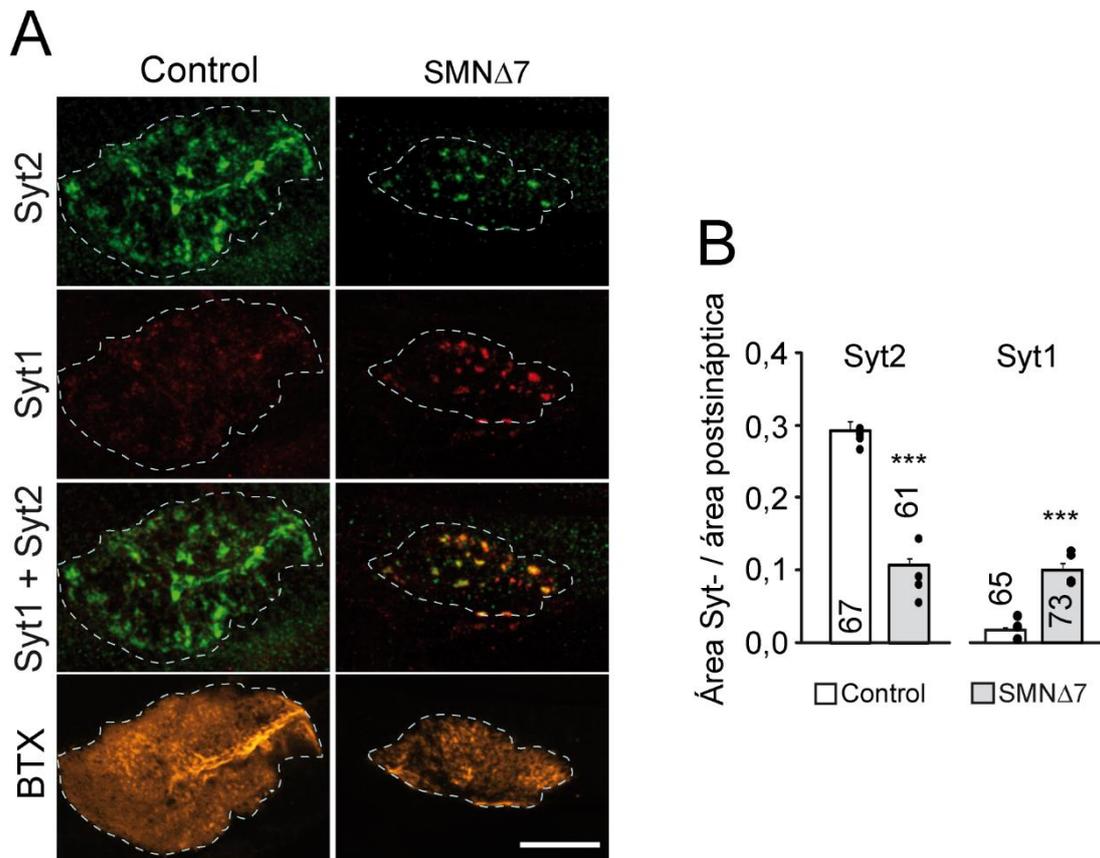


Figura 37. Syt2 está reducida en los terminales deficientes en SMN. A. Imágenes representativas de terminales motores controles y SMN Δ 7 en los que se puede ver la distribución de Syt2 (verde) y de Syt1 (rojo). Las líneas discontinuas delimitan el área postsináptica. Barra de calibración: 10 μ m. **B.** Razón media entre el área presináptica (señal de Syt1 o Syt2) y el área postsináptica. Los números en las barras muestran las sinapsis analizadas y los puntos la media de cada uno de los ratones de experimentación. N = 4-5 ratones por genotipo. Test no paramétrico U de Mann-Whitney. *** $p \leq 0,0005$.

3. Expresión diferencial de SV2B, Syt1 y Syt2 en función del grado de vulnerabilidad de los músculos en AME

En AME, los distintos grupos musculares no se afectan en la misma medida, aunque su causa se desconoce. Para comprobar si las alteraciones en las proteínas sinápticas antes descritas en el TVA se correlacionan con el grado de afectación muscular, estudiamos la expresión y distribución de SV2B, Syt1 y Syt2 en las NMJ del músculo OIA (músculo, junto con el TVA, altamente afectado en la enfermedad) y del diafragma (músculo considerado como resistente) (Kariya et al., 2008, Ling et al., 2012).

En el OIA, SV2B presentó un patrón y unos niveles de expresión similares a los observados en el TVA, es decir, una alta reducción (~70%) en los mutantes con respecto a los controles (Fig. 38C). En cambio, en el diafragma, la disminución fue menor (~28%) (Fig. 38A y C; Tabla VII del Anexo I), como lo refleja también el pequeño desplazamiento hacia la izquierda de la distribución en el histograma de áreas (Fig. 38B). Es de interés señalar que el nivel de SV2B en el diafragma de los mutantes fue aproximadamente dos veces superior que en el del TVA y OIA de estos ratones (véase Discusión).

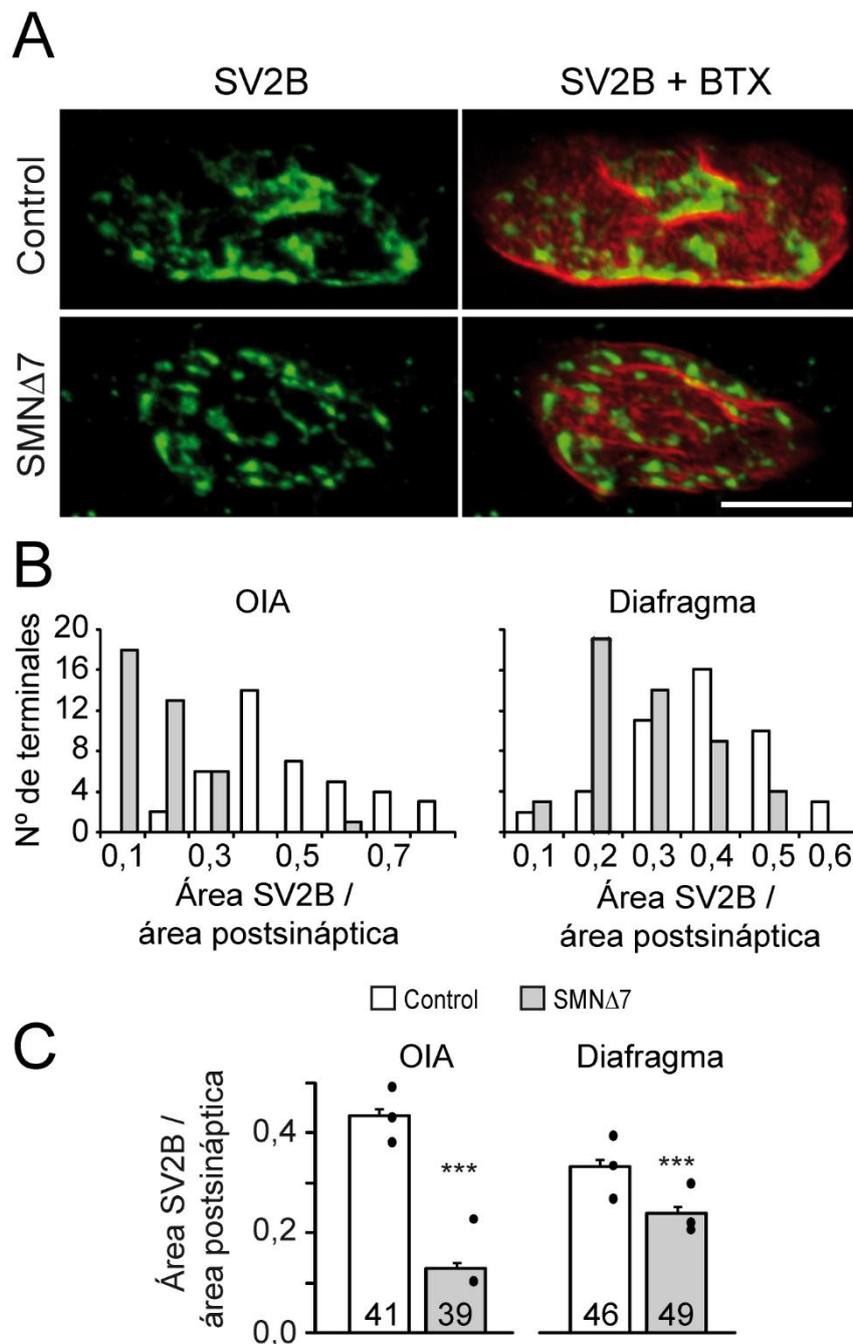


Figura 38. La expresión de SV2B en los terminales mutantes del diafragma está menos afectada que en el TVA y OIA. A. Ejemplos representativos del patrón de expresión y distribución de SV2B en los terminales controles y mutantes del diafragma. Barra de calibración: 10 μ m. **B.** Histograma de distribución del área presináptica con respecto a la postsináptica. **C.** Área ocupada por SV2B normalizada al área postsináptica en los genotipos y músculos especificados. Los números en las barras indican los terminales analizados y los puntos la media por ratón. N = 3 ratones por genotipo. Test t de Student. *** $p \leq 0,0005$.

En relación a Syt1 y Syt2, en el OIA se observó el mismo patrón de expresión que en el TVA (imágenes no mostradas), es decir, presencia de Syt1 solo en los terminales mutantes y de Syt2 en ambos genotipos. En cambio, ambas isoformas fueron evidentes en el diafragma de controles y mutantes, sugiriendo que en distintos músculos las proteínas sinápticas se regulan de forma diferente (Fig. 39A). Los valores medios de las señales de ambas proteínas en los dos genotipos se muestran en la Figura 39B y C y en las Tablas VIII y IX del Anexo I.

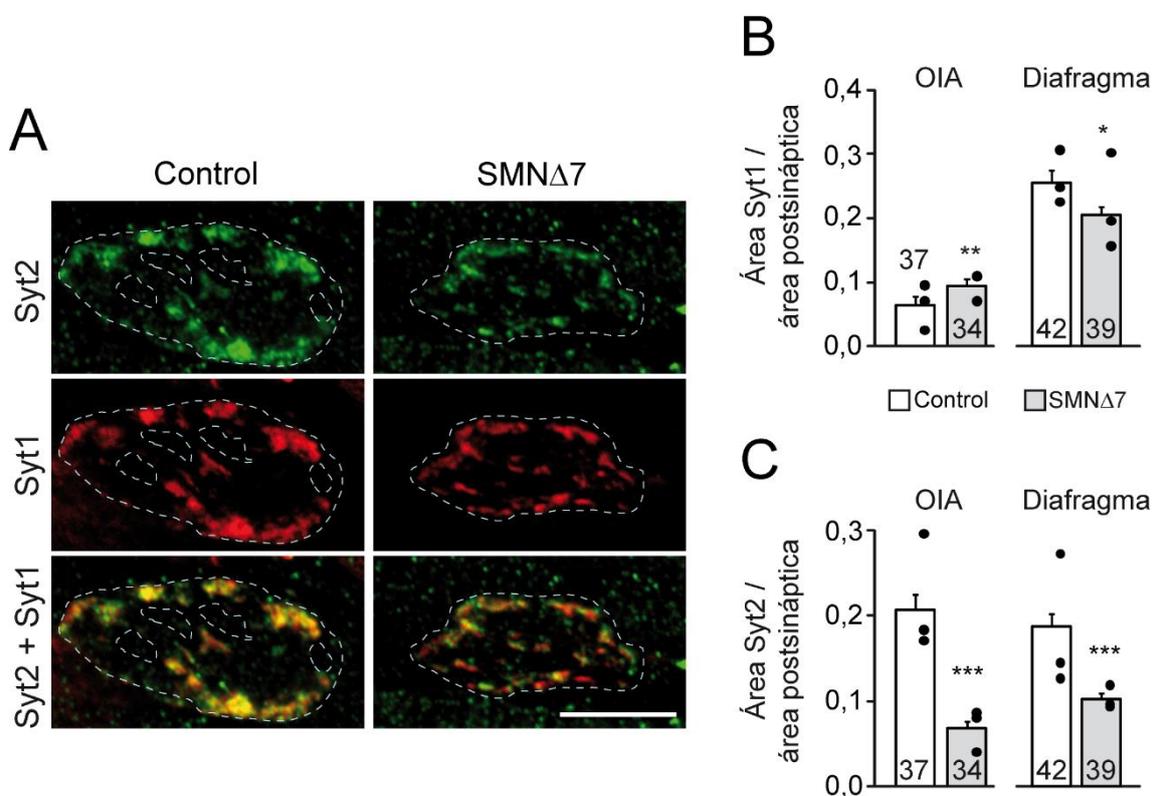


Figura 39. Niveles de expresión de Syt1 y Syt2 en el OIA y en el diafragma. A. Imágenes confocales representativas de la señal de Syt2 (verde) y Syt1 (rojo) en los terminales nerviosos motores controles y SMN Δ 7 del diafragma. Las líneas discontinuas delimitan el área postsináptica. Barra de calibración: 10 μ m. **B y C.** Razón media entre el área pre- y postsináptica (teñidas con anticuerpos contra Syt1 y Syt2 y con BTX-Rho, respectivamente) en el OIA y en el diafragma. Los números en las barras indican las sinapsis analizadas y los puntos la media por ratón. N = 3 ratones por genotipo. Test U de Mann-Whitney. *** $p \leq 0,0005$, * $p \leq 0,05$.

La Figura 40 resume los niveles de expresión de ambas isoformas (Syt1 y Syt2) en los tres músculos estudiados. En los terminales controles, los niveles totales en el diafragma fueron más elevados que en el TVA (~29%) y en el OIA (~38%). En mutantes, en todos los músculos, los niveles fueron significativamente menores que en los animales controles.

Conjuntamente, estos datos sugieren que la variabilidad en la expresión de estas proteínas sinápticas en los distintos músculos estudiados podría afectar a su vulnerabilidad en AME.

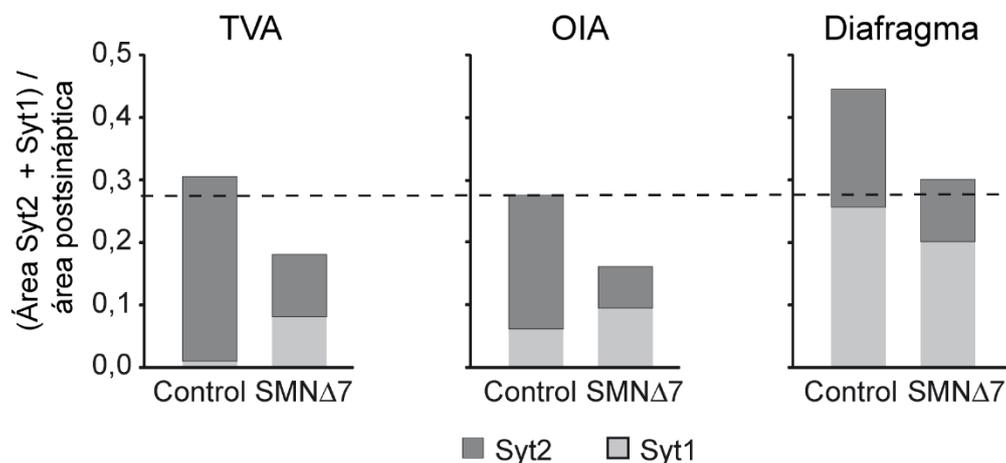


Figura 40. Expresión diferencial de Syt1 y Syt2 en función del músculo y su vulnerabilidad. Suma de la señal de Syt1 y Syt2 en los terminales nerviosos motores de los músculos estudiados. La línea discontinua representa el nivel más bajo de sinaptotagmina encontrado en los músculos de los ratones controles.

4. Cambios en la expresión de SV2B, Syt1 y Syt2 durante el desarrollo postnatal

Los resultados arriba descritos muestran alteraciones en la expresión de SV2B, Syt1 y Syt2 en un estadio relativamente avanzado de la enfermedad (P9-11). Dado que las alteraciones motoras de AME comienzan a aparecer en etapas más tempranas, P1, (Le et al., 2005), exploramos si existía una alteración en la expresión y distribución de las proteínas a P3. Como se muestra en la Figura 41, en el TVA, todas las proteínas estudiadas presentaron una expresión

significativamente menor en los terminales SMN Δ 7 que en los controles, siendo Syt2 la más reducida. En la parte derecha de la figura se comparan los promedios de las señales en ambos genotipos a P3 y P9-11. Obsérvese, que mientras la expresión de Syt1 y Syt2 siguió la misma tendencia en los terminales controles y mutantes (disminución de Syt1 y aumento de Syt2) con la edad, SV2B disminuyó significativamente en los mutantes pero no en los controles (Fig. 41A; Tabla X del Anexo I).

Estos resultados mostraron que en edades tempranas existen alteraciones en la expresión de diversas proteínas sinápticas que se acentúan durante el transcurso de la enfermedad.

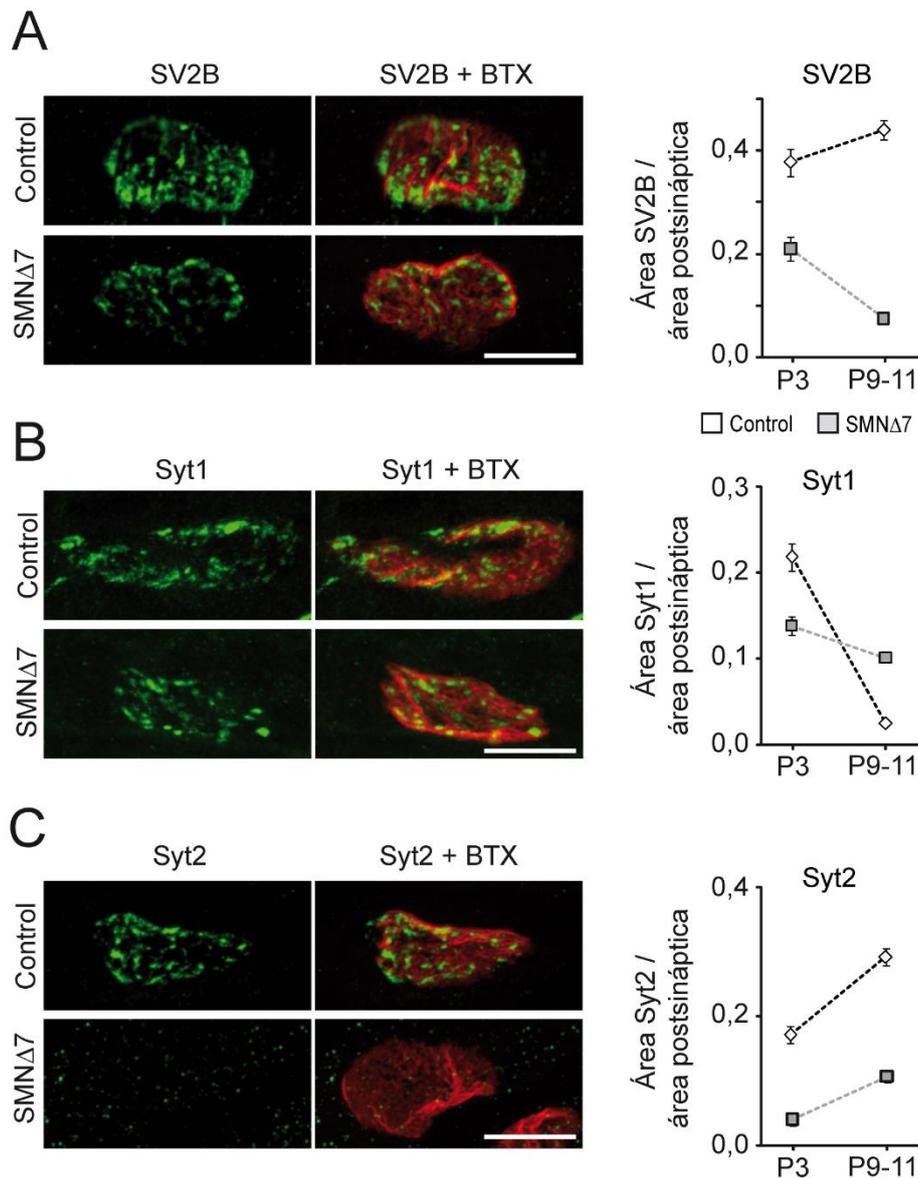


Figura 41. Defectos en la expresión de proteínas sinápticas en los terminales SMN Δ 7 en un estadio temprano de la enfermedad. A-C. Proyección máxima de imágenes confocales de terminales motores controles y mutantes teñidos con anticuerpos contra la proteína de interés (SV2B, Syt1 y Syt2, respectivamente) y BTX-Rho. Barra de calibración: 10 μ m. A la derecha de las imágenes se muestra la expresión a las dos edades analizadas. N = 3 ratones por genotipo.

5. La expresión de sintaxina-1B y sinaptotagmina-7 no se encuentra alterada en los terminales SMN Δ 7

La deficiencia en sintaxina-1B (Stx1B), proteína que forma parte del complejo SNARE, compromete la liberación sináptica a nivel de la NMJ (Wu et al., 2015), y produce un fenotipo motor similar al de AME. Dado este antecedente, y la

disminución encontrada en SV2 (A-C), and Syt (1 y 2), estudiamos si la señal correspondiente a Stx1B estaba alterada en los terminales presinápticos del músculo TVA.

En la Figura 42A se muestra un ejemplo de la expresión de Stx1B en los terminales y en los axones motores en los ratones controles y mutantes. En ambos genotipos, las señales de Stx1B fueron abundantes. El análisis reveló una reducción significativa de Sx1B (~20%) en los terminales deficientes en SMN con respecto a los controles. Sin embargo, esta diferencia desapareció cuando las señales se normalizaron al área postsináptica, lo que sugiere que la reducción era debida al menor tamaño de los terminales (Fig. 42B; Tabla XI del Anexo I).

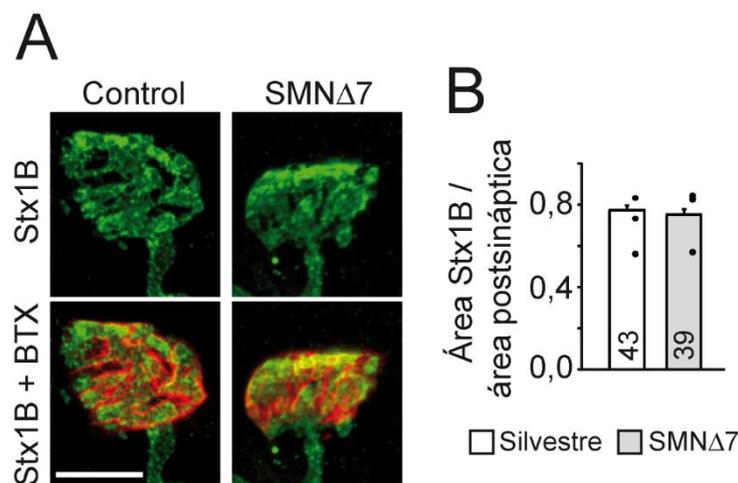


Figura 42. Stx1B se expresa sin alteraciones aparentes en los terminales nerviosos motores mutantes. A. Imágenes representativas de un terminal control (izquierda) y otro mutante (derecha) marcados con anticuerpos anti-Stx1B (verde) y BTX-Rho (receptores de ACh, rojo). Barra de calibración: 10 μ m. **B.** Valores medios del área de la señal de Stx1B por unidad de superficie postsináptica. Los números en las barras indican el número de NMJ analizadas y los puntos el valor medio por ratón. N = 3 ratones por genotipo. Test no paramétrico U de Mann Whitney.

Así mismo, estudiamos los niveles de expresión de una tercera sinaptotagmina, sinaptotagmina-7 (Syt7). La elección de esta proteína se basó en que Syt7 contribuye a la liberación asincrónica en la NMJ del pez cebra y en sinapsis centrales (Wen et al., 2010, Bacaj et al., 2013), y que los terminales

nerviosos del modelo SMN Δ 7 presentan alteraciones en la liberación asincrónica (Ruiz et al., 2010).

Los ensayos, sin embargo, mostraron que no existían diferencias significativas en las señales fluorescentes en los terminales nerviosos del TVA en controles y mutantes (Fig. 43; Tabla XII del Anexo I).

Estos resultados sugieren que ni Stx1B ni Syt7 estarían contribuyendo a la aparición de las alteraciones funcionales descritas en la NMJ en el modelo SMN Δ 7.

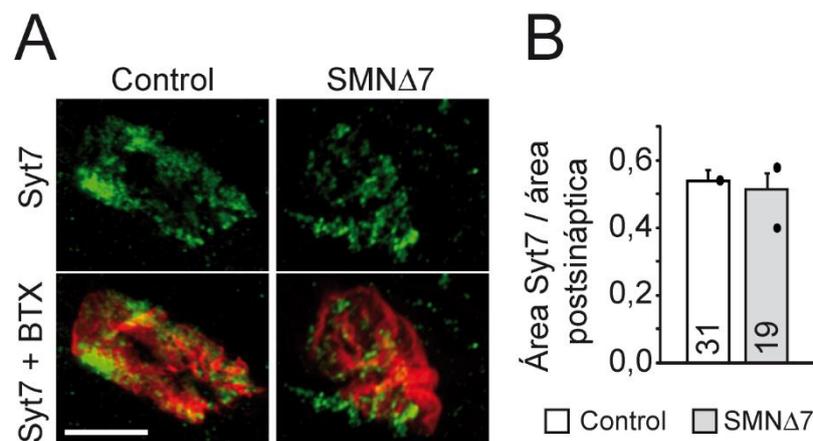


Figura 43. La expresión de Syt7 no se ve aparentemente alterada por la deficiencia de SMN. **A.** Terminales motores control (panel izquierdo) y mutante (panel derecho) marcados con un anticuerpo contra Syt7 (verde). Barra de calibración: 10 μ m. **B.** Normalización del área presináptica con respecto al postsináptico. Los números en las barras indican el número de NMJ analizadas y los puntos el valor medio en cada uno de los ratones de experimentación. N = 2 ratones por genotipo. Test paramétrico t de Student.

7. Las alteraciones en la expresión proteica no se deben únicamente a un retraso en la maduración

En el modelo SMN Δ 7 de AME, la NMJ sufre un retraso en el proceso de maduración (Kariya et al., 2008, Murray et al., 2008, Kong et al., 2009, Ruiz et al., 2010), por lo que para explorar si existía correlación entre este retraso y las alteraciones en las proteínas sinápticas, estudiamos el grado de maduración de las NMJ a P3 y a P9-11, en el músculo TVA.

El análisis del tamaño del área postsináptica mostró que a P3 no existían diferencias significativas entre ambos genotipos, pero si a P9-11 con una reducción en los mutantes (~24%) con respecto a los controles (Fig. 44; Tabla XIII del Anexo I).

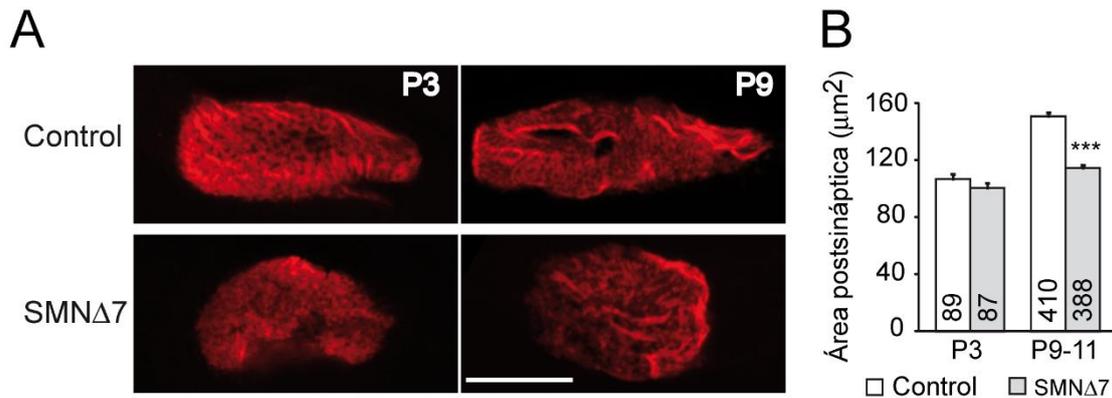


Figura 44. Cambios en el tamaño del área postsináptica durante el desarrollo postnatal. **A.** Ejemplos representativos de placas motoras en controles y mutantes, a P3 y P9-P11. Barra de calibración: 10 μm . **B.** Área postsináptica media en ambos genotipos y edades. Los números indican los terminales analizados (n). $N \geq 3$ ratones por genotipo. Test U de Mann Whitney. *** $p < 0,0005$.

Seguidamente estudiamos los cambios morfológicos que se producen en la estructura del terminal durante el desarrollo postnatal. Cuantificamos el número de terminales en los que los receptores de ACh se encuentran dispuestos de forma punteada (inmaduros), en pliegues (maduros) o en estructuras intermedias, así como el número de terminales sin perforaciones (inmaduros), y con pequeñas, medias y grandes perforaciones (maduros). Los resultados de este estudio mostraron que los terminales mutantes presentaron solo un ligero retraso en la maduración a P3 en comparación con los controles (Fig. 45). Así mismo, observamos que los terminales continuaron madurando, aunque más lentamente que los controles, entre la primera y segunda semana de vida.

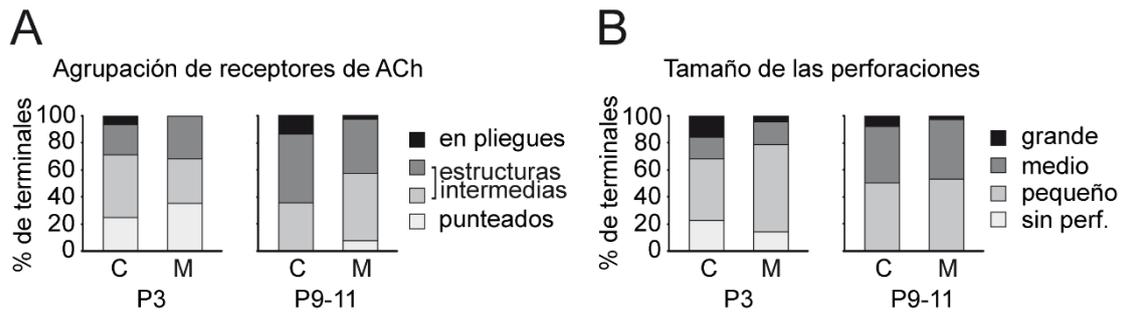


Figura 45. Pliegues y perforaciones en los terminales nerviosos motores durante el desarrollo en AME. A y B. Porcentaje de terminales con los receptores de ACh dispuestos con diferente patrón y con distinto tamaño de perforaciones en función de su grado de maduración. C: control; M: mutante.

8. Validación de las alteraciones encontradas en el modelo SMN Δ 7 en el modelo Taiwanés

A fin de validar los resultados obtenidos en el modelo SMN Δ 7 en relación a las proteínas sinápticas, estudiamos en el modelo Taiwanés de AME (Hsieh-Li et al., 2000) la expresión y distribución de SV2B, Syt1 y Syt2, en los terminales motores del músculo TVA, a P7 (Fig. 46 y 47).

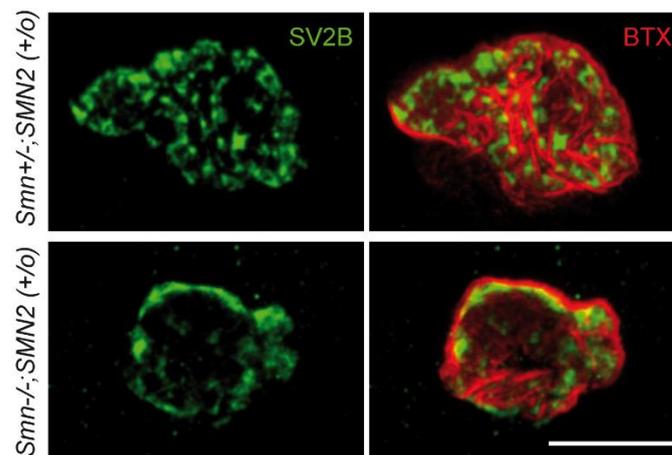


Figura 46. Expresión de SV2B en los terminales nerviosos del músculo TVA en el modelo Taiwanés. Los ratones heterocigotos y mutantes (panel superior e inferior, respectivamente) expresan SV2B en el terminal presináptico. Barra de calibración: 10 μ m.

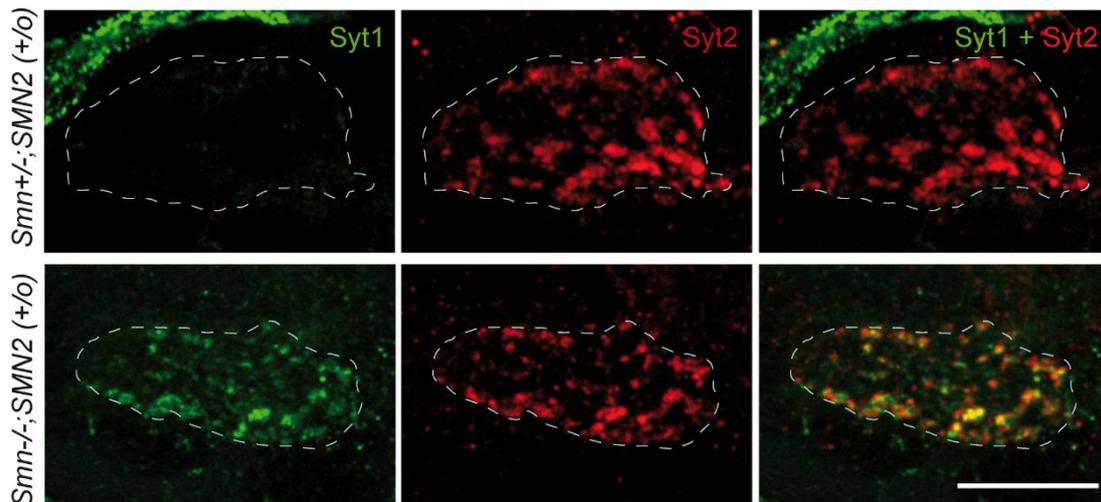


Figura 47. Expresión de las isoformas Syt1 y Syt2 en los terminales nerviosos del modelo Taiwanés. Los terminales procedentes de ratones heterocigotos expresan principalmente Syt2 (paneles superiores). En cambio, los ratones mutantes expresan ambas isoformas. Barra de calibración: 10 μ m.

En este modelo, como en el SMN Δ 7, el tamaño del área postsináptica fue ~20% menor en los mutantes que en los hermanos de camada controles (Fig. 48A; Tabla XIV del Anexo I). La normalización del área presináptica ocupada por la señal fluorescente de cada una de estas proteínas al área postsináptica reveló una disminución significativa de SV2B (~48%) y Syt2 (38%) y un incremento de Syt1 (205%) en los ratones AME en relación a los controles (Fig. 48B; Tabla XV del Anexo I).

Estos resultados muestran que los defectos observados en estas proteínas son comunes en ambos modelos y es por ello que podrían considerarse como potenciales marcadores moleculares en AME, si se confirmase en pacientes.

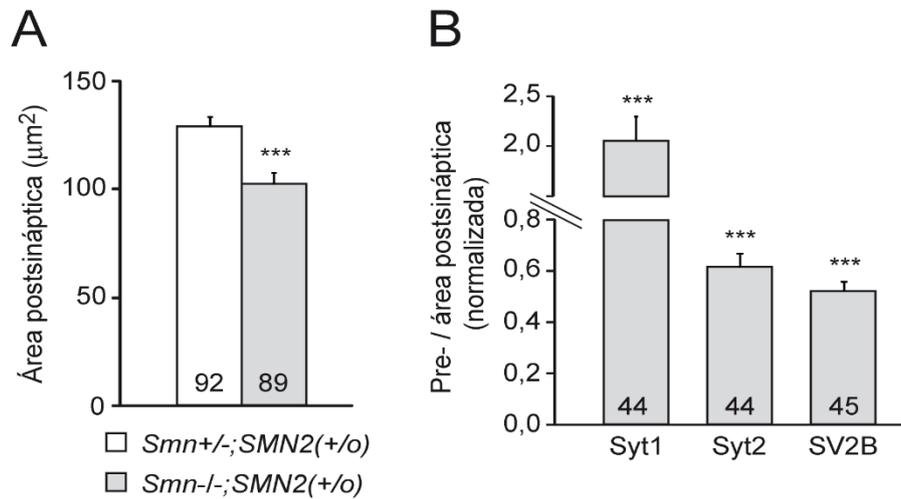


Figura 48. Deficiencia de SV2B y Syt2 en los ratones *Smn*^{-/-}; *SMN2*(^{+/0}). **A.** Área media postsináptica. **B.** Área de la señal correspondiente de cada proteína con respecto al área postsináptica en los terminales mutantes, normalizada a los valores control en cada caso. Los números en las barras indican el número de NMJ analizadas. N = 3 ratones por genotipo. Test t de Student para el análisis estadístico de SV2B y el área postsináptica, y U de Mann-Whitney para Syt1 y Syt2. *** p < 0,0005.

III. Regulación positiva de la actividad sináptica en AME

Los resultados descritos anteriormente demuestran que la deficiencia en SMN afecta al contenido de ciertas proteínas sinápticas y a la regulación de la exocitosis en la NMJ. En la presente sección investigamos hasta qué punto la neurotransmisión en los terminales motores de los ratones SMN Δ 7 puede modularse positivamente actuando sobre alguno de los componentes de la maquinaria de secreción afectados por la deficiencia en SMN: canales de Ca²⁺ y componentes implicados en la preparación de las vesículas para su posterior fusión con la membrana plasmática. Por ello empleamos distintas moléculas que se sabe actúan sobre los terminales presinápticos en condiciones normales. Las drogas utilizadas fueron tres: (1) roscovitina, inhibidor de Cdk5 y modificador de los canales de Ca²⁺, (2) PDBu, un éster de forbol que activa a la proteína quinasa C (PKC) y Munc13, y (3) nifedipina, inhibidor de los canales de Ca²⁺ tipo L. Para este estudio se registró la liberación evocada y espontánea en fibras del músculo TVA de ratones controles y SMN Δ 7, entre P9-11. Estos experimentos fueron realizados con una concentración de Ca²⁺ extracelular de 1 mM y a baja frecuencia de estimulación (0,5 Hz). En aquellos casos en los que se indique, algunos experimentos se realizaron a una mayor frecuencia de estimulación (dado que previamente hemos observado que aumenta el número de cuantos liberados) o concentración de Ca²⁺ extracelular (ya que parece existir una limitación en la liberación de NT cuando aumenta el flujo de Ca²⁺).

1. Roscovitina

1.1 R-roscovitina modula la neurotransmisión a través de los canales de Ca²⁺ tipo P/Q

La roscovitina (2-(1-etil-2-hidroxietolamino)-6-bencilamino-9 isopropilpurina) es una molécula inhibidora de la quinasa dependiente de ciclina 5 (Cdk5), de la que existen dos enantiómeros: R- y S-roscovitina. Distintos autores han mostrado que R-roscovitina incrementa la liberación de NT en la NMJ de rana adulta (Cho and Meriney, 2006) y en sinapsis centrales (Tomizawa et al., 2002, Yan et al., 2002, Kim and Ryan, 2010, 2013).

Experimentos previos realizados en nuestro laboratorio mostraron que la aplicación aguda de R-roscovitina (100 μ M) en preparaciones neuromusculares *ex vivo* incrementa significativamente la liberación de NT en la NMJ de ratones controles y SMN Δ 7 (Fig. 49A y B; Torres-Benito, 2012b, Balk et al., en preparación). En el presente trabajo hemos investigado el mecanismo de acción de esta droga sobre la neurotransmisión en la NMJ de ratones controles y AME, en función de las hipótesis propuestas actualmente por otros autores en otras sinapsis: (i) inhibición de Cdk5; (ii) inhibición del cierre (desactivación) de los canales de Ca²⁺.

Para ello comparamos el efecto de R- y S-roscovitina sobre la neurotransmisión. Ambos enantiómeros inhiben Cdk5 (Meijer et al., 1997), sin embargo, distintos estudios demuestran que S-roscovitina no ejerce ningún efecto sobre la cinética de los canales de Ca²⁺ en la NMJ y en sinapsis centrales de rana adulta (Cho and Meriney, 2006; Buraei et al, 2008). En nuestros experimentos, S-roscovitina fue aplicada a distintas concentraciones (10, 50 y 100 μ M) en preparaciones neuromusculares (TVA) de ratones controles. La liberación de NT disminuyó de forma dosis-dependiente (Fig. 49C y D; Tabla XVI del Anexo I), efecto parcialmente reversible al lavar la preparación con solución fisiológica. Por tanto, estos resultados indican que R- y S-roscovitina tienen efectos opuestos sobre la neurotransmisión en la NMJ de ratón, y apoyan la hipótesis de que R-roscovitina actúa a través de los CCDV.

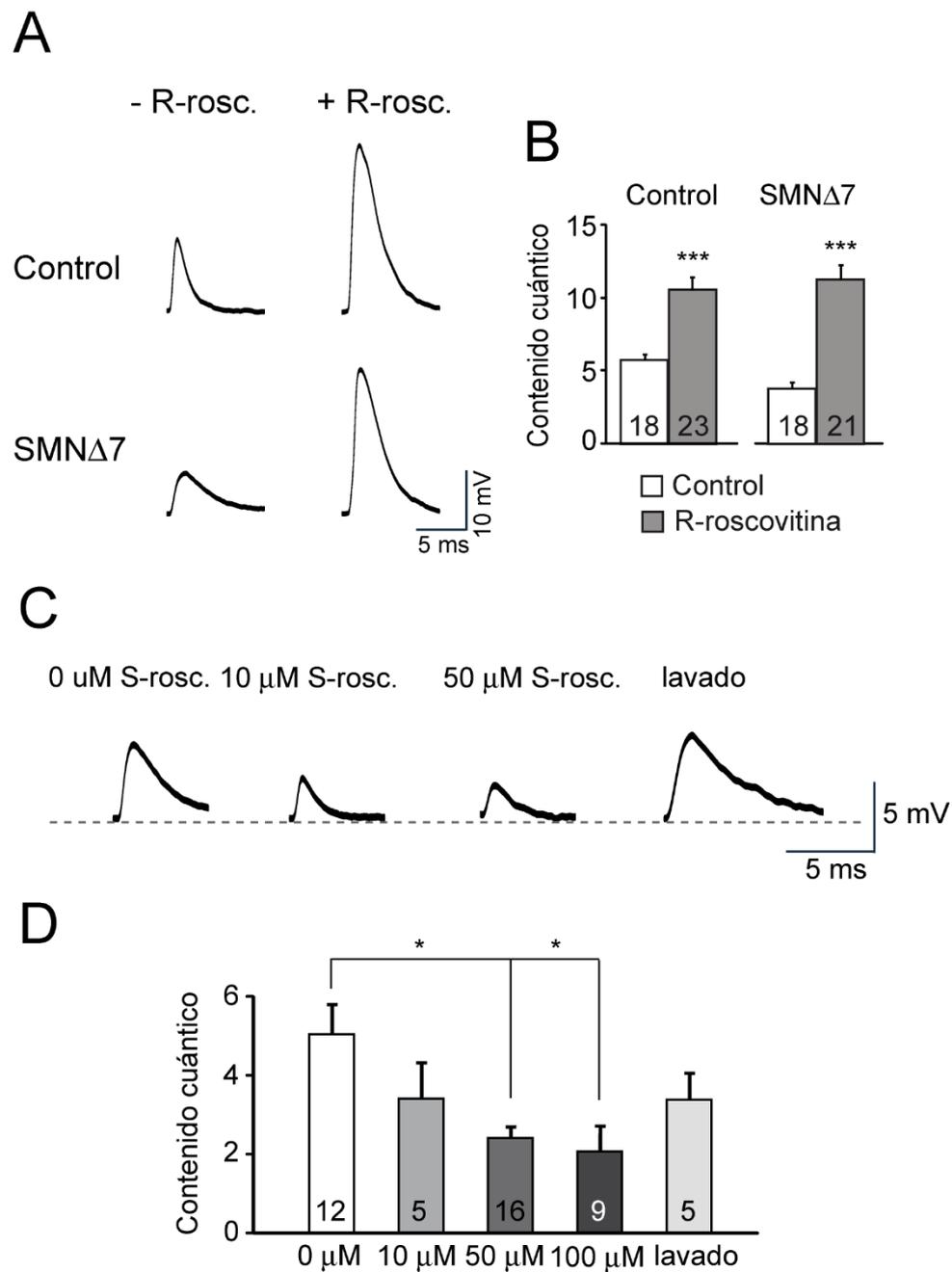


Figura 49. S-roscovitina inhibe la neurotransmisión de forma dosis-dependiente.

A. Ejemplos de EPP representativos en fibras controles y mutantes antes (-R-rosc.) y después (+R-rosc.) de su exposición a R-roscovitina (100 μ M). **B.** Contenido cuántico medio en ambos genotipos. Test U de Mann-Whitney. **C.** Registros representativos de las respuestas evocadas a distintas concentraciones de S-roscovitina. **D.** Valor medio del contenido cuántico en solución control (0 μ M S-rosc.) y en presencia de distintas concentraciones de S-roscovitina. Los números en las barras muestran las fibras registradas. N = 1-2 ratones. Test paramétrico de comparaciones múltiples ANOVA de un factor. *** $p \leq 0,0005$, * $p \leq 0,05$.

A continuación, exploramos si la acción potenciadora de la neurotransmisión de R-roscovitina estaba mediada por los canales de Ca^{2+} tipo P/Q, principales protagonistas de la neurotransmisión en esta etapa del desarrollo. La Figura 50A muestra que en presencia de ω -agatoxina (200 nM), bloqueante específico de los canales P/Q, R-roscovitina no aumentó la liberación de NT (Fig. 50A; Tabla XVII del Anexo I). Seguidamente, repetimos estos experimentos bloqueando los canales de Ca^{2+} con ω -agatoxina tras la exposición a R-roscovitina en ambos genotipos. R-roscovitina incrementó significativamente la amplitud de los EPP y el contenido cuántico tanto en los terminales controles (226 y 184%, respectivamente) como en los mutantes (377 y 297%) (Fig. 50B; Tabla XVIII del Anexo I). En ambos casos este efecto fue inhibido tras bloquear los canales de Ca^{2+} tipo P/Q (Fig. 50B; Tabla XVIII del Anexo I).

Conjuntamente, estos resultados sugieren que R-roscovitina potencia la neurotransmisión, tanto en animales controles como en mutantes, a través de los canales de Ca^{2+} tipo P/Q.

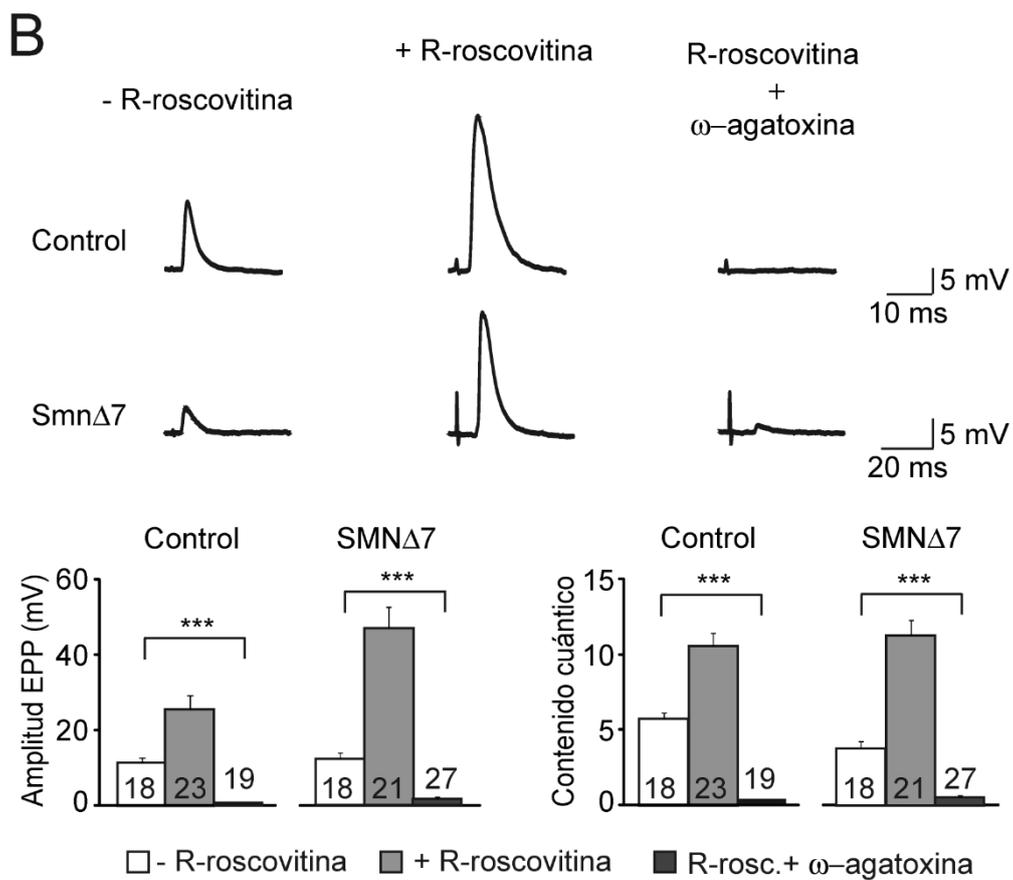
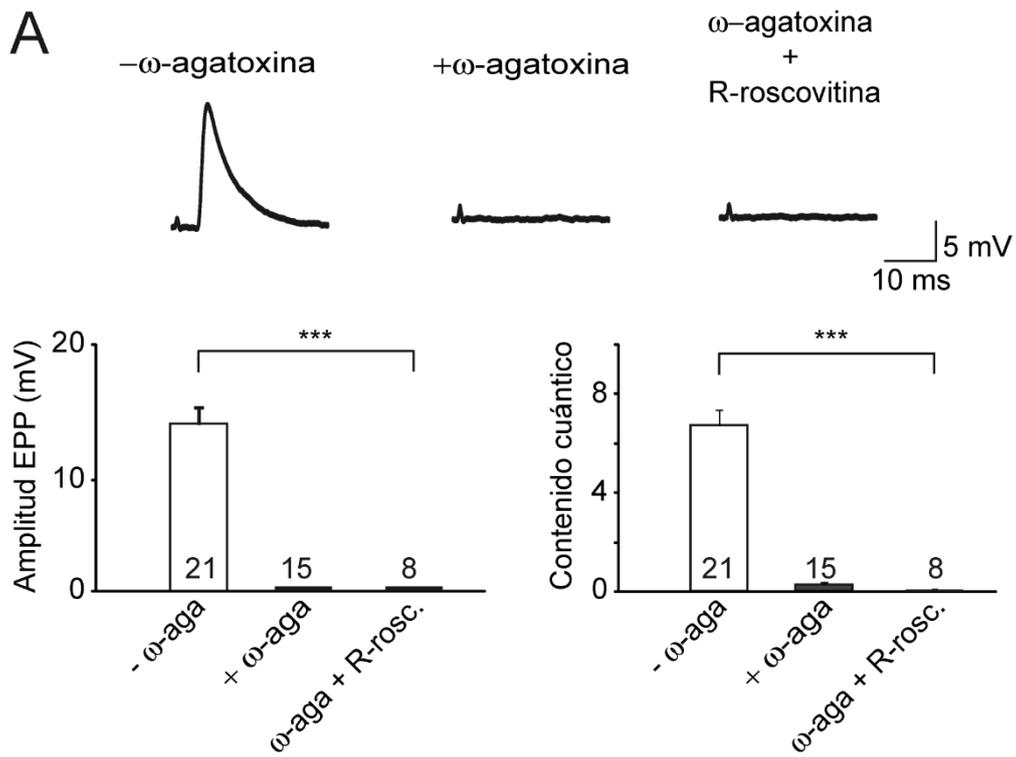


Figura 50. En presencia de ω -agatoxina, R-roscovitina no aumenta la liberación de neurotransmisor. **A.** Registros representativos de las respuestas evocadas (trazos), y amplitud media de EPP y contenido cuántico en las distintas condiciones de experimentación en las NMJ de ratones controles. **B.** Registros representativos de respuestas evocadas en las distintas condiciones estudiadas en animales controles (trazos superiores) y SMN Δ 7 (trazos inferiores). Amplitud media de los EPP y contenido cuántico en ambos genotipos en las diferentes condiciones de experimentación. Los números en las barras indican las fibras registradas. N = 2-3 ratones. Test no paramétrico de comparaciones múltiples, Kruskal-Wallis. *** $p \leq 0,0005$.

1.2 R-roscovitina reduce el número de terminales nerviosos silentes

La aplicación aguda de R-roscovitina en preparaciones neuromusculares *ex vivo* además de aumentar la liberación de NT, tanto en ratones controles como en mutantes, incrementó significativamente el porcentaje de fibras musculares que presentaron potenciales evocados dobles, indicativo de fibras poliinervadas, característica de las fibras musculares durante las dos primeras semanas de vida (Sanes and Lichtman, 1999; Ruiz et al., 2010).

En la Figura 51A se muestra un ejemplo representativo de un EPP único (trazo izquierdo) y de un EPP doble (trazo derecho). En una misma fibra, la frecuencia de aparición de eventos dobles se incrementó tras la aplicación de R-roscovitina (Fig. 51B). La Figura 51C muestra el porcentaje de fibras con EPP dobles con respecto al total de fibras registradas. En los animales controles, la proporción aumentó desde el 7 al 48%, mientras que en los mutantes pasó del 22% al 67% (Tabla XIX del Anexo I).

Estos datos sugieren que, al igual que en sinapsis centrales (Tomizawa et al., 2002, Kim and Ryan, 2010), roscovitina es capaz de activar terminales nerviosos silentes, tanto controles como deficientes en SMN.

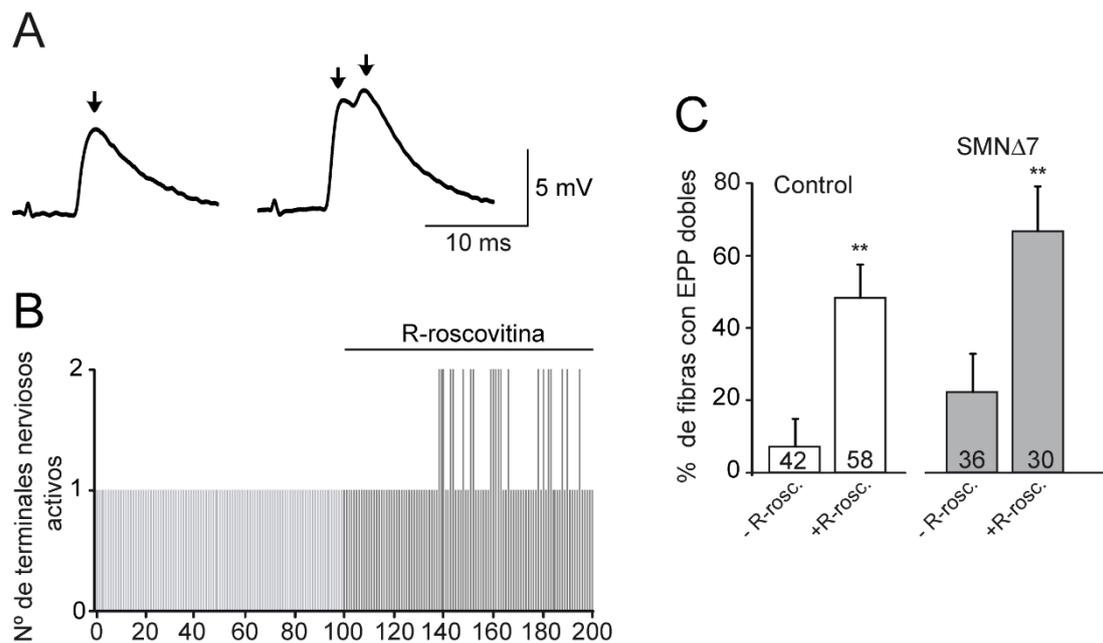


Figura 51. La aplicación aguda de R-roscovitina incrementa el número de terminales nerviosos activos. **A.** Ejemplo representativo de EPP de una misma fibra muscular antes y después de la aplicación de R-roscovitina. Las flechas negras señalan el pico del EPP. **B.** Número de terminales activos en una misma fibra muscular antes y después de la aplicación de R-roscovitina. **C.** Representación del porcentaje de fibras musculares con EPP dobles con respecto al total de fibras registradas. Los números en las barras muestran las fibras musculares registradas. N = 7-10 ratones por genotipo. ** $p \leq 0,005$.

2. Éster de forbol

2.1 PDBu incrementa la liberación de NT aumentando el número de sitios activos de liberación

La ausencia de regulación del número de sitios de liberación activos al aumentar el Ca^{2+} extracelular en los terminales SMN Δ 7 sugirió que podría ser debido a la reducción en el número total de vesículas descrita en estos terminales (Fig. 52b, (Kong et al., 2009, Ruiz et al., 2010, Torres-Benito et al., 2011, Torres-Benito et al., 2012) y/o a la reducción del número de vesículas en estado competente para su fusión con la membrana plasmática, de acuerdo con las deficiencias en SV2B y Syt2 encontradas (Fig. 52c; (Jorgensen et al., 1995, Chang and Sudhof, 2009, Young and Neher, 2009, Nowack et al., 2010).

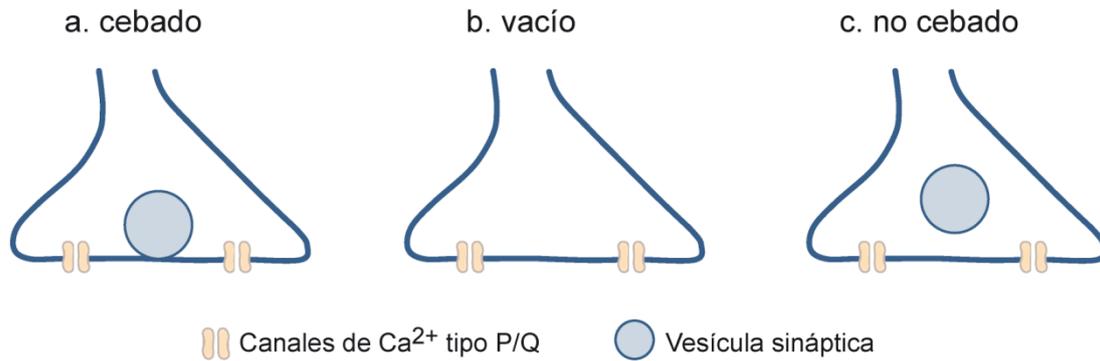


Figura 52. Representación esquemática hipotética de los estados de los sitios de liberación en terminales control y mutantes. En los terminales control (a), el aumento de Ca²⁺ en el terminal durante la estimulación eléctrica incrementa el número de sitios de liberación activos (cebados). Esto no ocurre en los terminales mutantes (b,c), debido a que no hay suficientes vesículas disponibles (b) o a un defecto en el proceso de cebado (docking/priming) (c).

Para investigar ambas posibilidades utilizamos un éster de forbol que estimula la liberación sináptica tanto en la NMJ de rana y ratón (Haimann et al., 1987, Searl and Silinsky, 2003, Ruiz et al., 2008) como en el SNC (Malenka et al., 1986, Nichols et al., 1987). Los ésteres de forbol son análogos de los diacilglicéridos (DAG) y actúan activando a PKC y Munc13. La activación de esta última rompe la unión de syntaxina y Munc18 promoviendo la formación del complejo SNARE (Betz et al., 1997, Betz et al., 1998, Brose et al., 2000, Richmond et al., 2001, Ma et al., 2011). Además, también se postula que la activación de Munc13 reduce la barrera de energía para la fusión de las vesículas con la membrana plasmática (Basu et al., 2007, Schotten et al., 2015). Por tanto, que el forbol fuese capaz de aumentar la liberación de NT incrementando el número de sitios activos de liberación en los mutantes, sería indicativo de que existían suficientes vesículas y de que existía un defecto en el cebado de las vesículas.

Los registros se realizaron en fibras del músculo TVA de ratones control y SMN Δ 7 en ausencia y en presencia de forbol 12, 13-dibutirato (PDBu; 1 μ M). A baja frecuencia de estimulación (0,5 Hz), el PDBu incrementó la amplitud de los EPP en ambos genotipos (control: ~227%; SMN Δ 7: 300%) (Fig. 53A y B; Tabla XX del Anexo I). La frecuencia de los mEPP incrementó significativamente, tanto en los terminales control (~923%) como en los mutantes (452%), sin que

se viera alterada su amplitud, lo que sugiere que se trata de un efecto presináptico (Fig. 53D y E; Tabla XX del Anexo I). El contenido cuántico aumentó tanto en los ratones controles (189%) como en los mutantes (153%) (Fig. 53C; Tabla XX del Anexo I).

Seguidamente, para determinar si el incremento en la liberación de NT puede atribuirse a un incremento en p_r y/o en n , ambos parámetros fueron estudiados por análisis binomial. El análisis mostró que PDBu incrementó la liberación sináptica a través de un aumento en n , tanto en los terminales controles (~300%) como en los mutantes (265%), es decir, PBU aumentó el tamaño del RRP (Fig. 53F y G; Tabla XX del Anexo I).

En conjunto, estos resultados sugieren que, al igual que ocurría con la aplicación de roscovitina, los terminales SMN Δ 7 conservan la capacidad para modular el número de cuantos liberados, y que el proceso de acercamiento de las vesículas a la membrana plasmática puede ser estimulado.

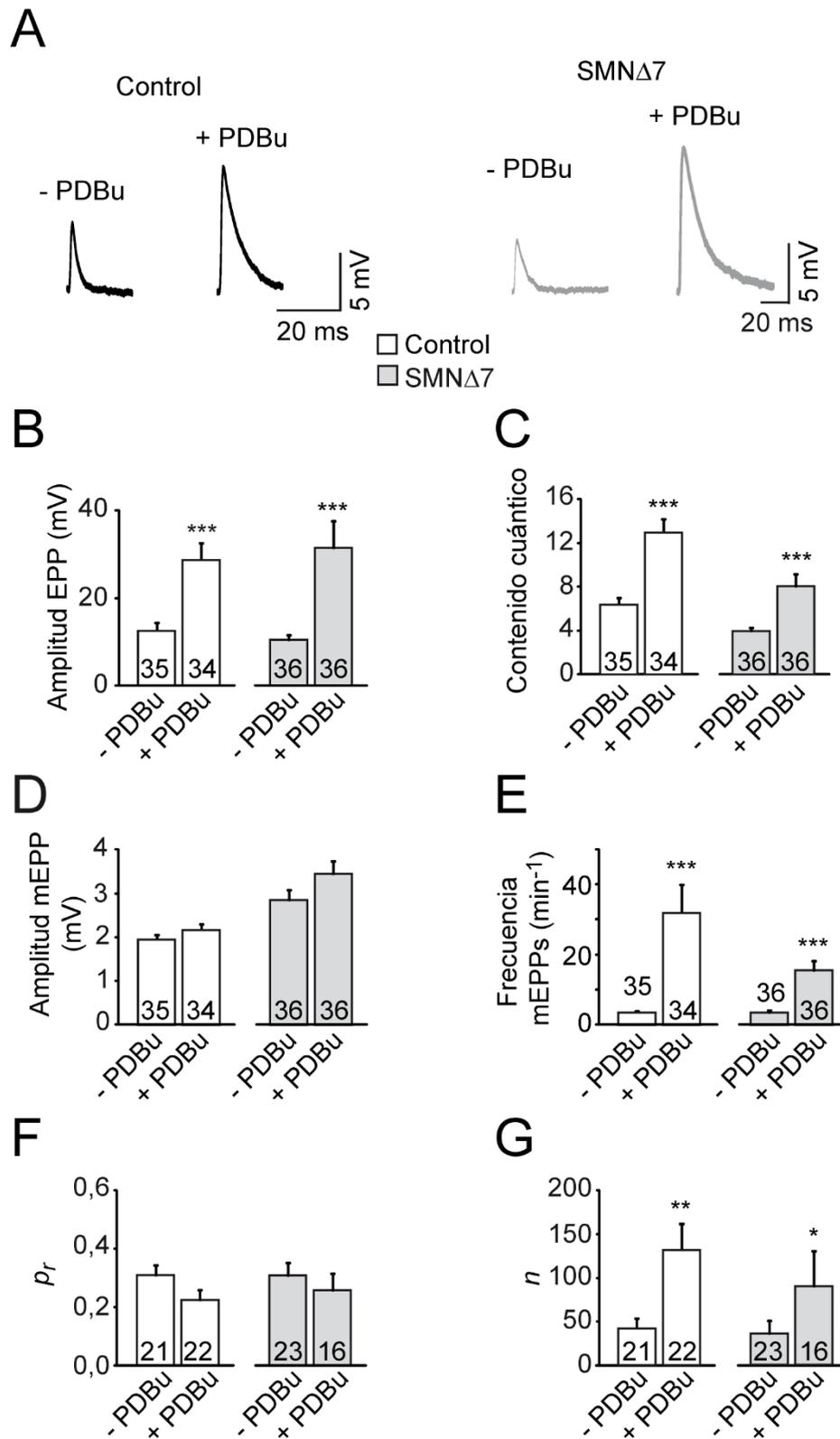


Figura 53. PDBu incrementa el contenido cuántico a través de un incremento en el número de sitios de liberación. A y B. Registros representativos de EPP y su amplitud media en solución control y en presencia de PDBu en ambos genotipos. **C.** Contenido cuántico medio en terminales controles y mutantes. **D y E.** Amplitud y frecuencia media de los mEPP en presencia y ausencia de PDBu en ambos genotipos. **F y G.** Probabilidad y número de sitios de liberación sin y con PDBu en ambos genotipos. Los números en las barras indican las sinapsis registradas. N = 5 ratones por genotipo. Test no paramétrico U de Mann-Whitney. *** $p < 0,0005$.

A continuación, exploramos el efecto de PDBu a una mayor frecuencia de estimulación (20 Hz). En la Figura 54A se observa la variación del contenido cuántico durante el tren de estímulos en solución control y tras la aplicación de PDBu. Durante el registro, se produjo un incremento de la amplitud del primer pulso, sin cambios aparentes durante el transcurso del tren entre la situación control y en presencia de PDBu en ambos genotipos. El análisis del número total de cuantos liberados reveló, como era de esperar, que no existían diferencias significativas entre ambas condiciones de experimentación (con y sin PDBu) ni en los terminales controles ni en los mutantes (Fig. 54B; Tabla XXI del Anexo I). Sin embargo, a baja frecuencia de estimulación sí se produjo un incremento significativo del mismo en presencia de PDBu (Fig. 54C; Tabla XXI del Anexo I).

Estos datos sugieren que la modulación que ejerce PDBu sobre la neurotransmisión se produce sólo a baja frecuencia de estimulación en los terminales SMN Δ 7. Puede que a una mayor frecuencia el sistema de liberación se sature, limitando la respuesta de los terminales ante la aplicación de este compuesto.

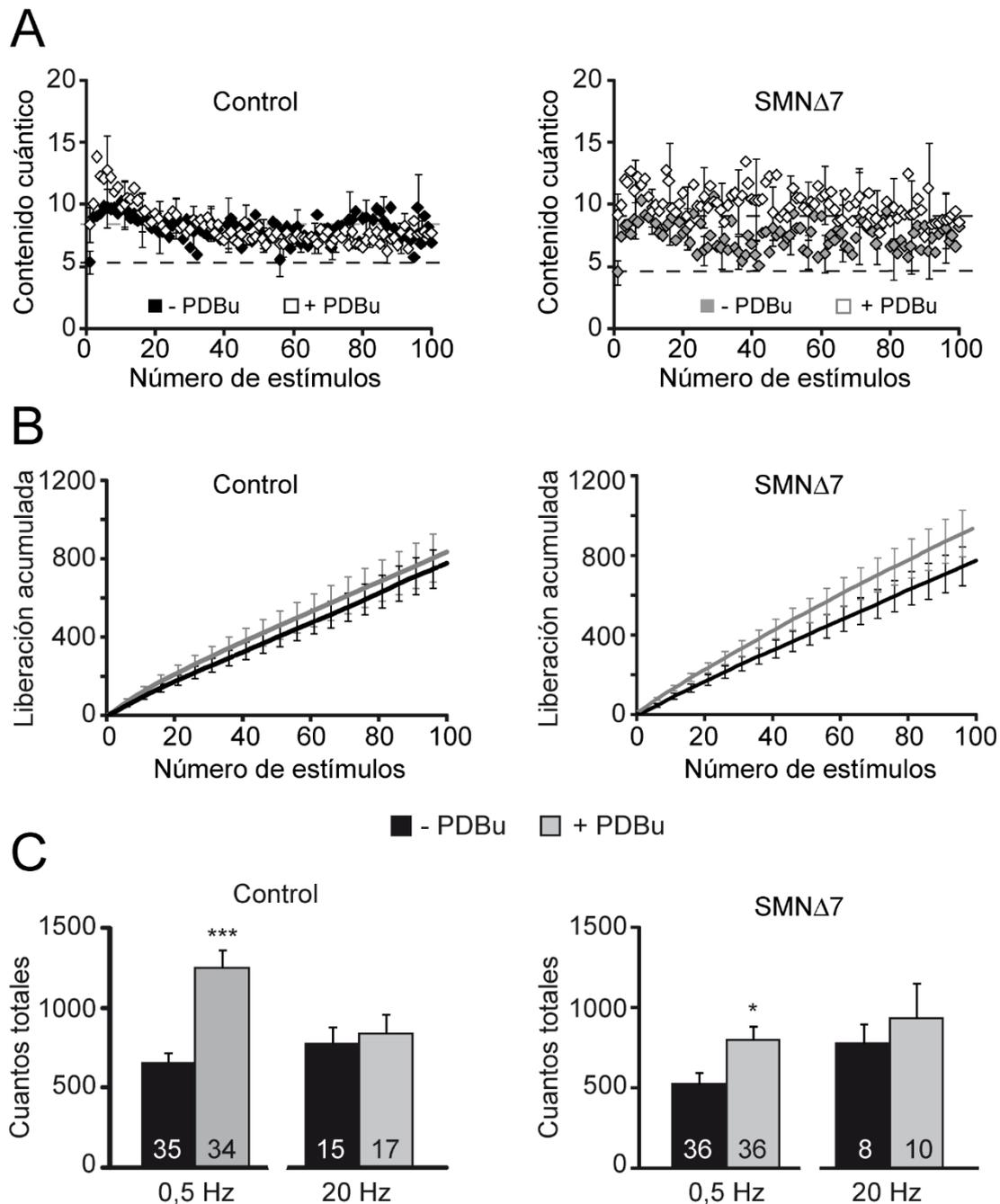


Figura 54. PDBu no aumenta el número total de vesículas liberadas a alta frecuencia de estimulación. A. Contenido cuántico medio durante el tren de estimulación en los terminales controles y mutantes. **B.** Número total de vesículas liberadas durante el registro a 20 Hz de estimulación. **C.** Comparación del número total de cuantos liberados a baja (0,5 Hz) y alta frecuencia (20 Hz) en ambos genotipos durante 100 estímulos. Los números en las barras indican las fibras registradas. N = 3-5 ratones por genotipo. Test U de Mann-Whitney. *** $p < 0,0005$; * $p < 0,05$.

Por último, exploramos el efecto de PDBu con una concentración de Ca^{2+} superior (2 mM). Se registraron de 5-10 fibras en solución control y el mismo número con PDBu (1 μM) a baja frecuencia de estimulación (0,5 Hz). El análisis

de las respuestas evocadas y espontáneas reveló que PDBu incrementaba significativamente el contenido cuántico y la frecuencia de mEPP en los terminales mutantes (Fig. 55A-E; Tabla XXII del Anexo I). Sin embargo, no produjo un aumento significativo del número de sitios de liberación (Fig. 55G; Tabla XXII del Anexo I), como si seguía ocurriendo en los terminales controles.

Estos resultados sugieren que con 2 mM de Ca^{2+} extracelular, con la que la corriente de Ca^{2+} es prácticamente máxima, la capacidad de las moléculas exógenas para modular la transmisión sináptica en los terminales deficientes en SMN es menor que a menores concentraciones.

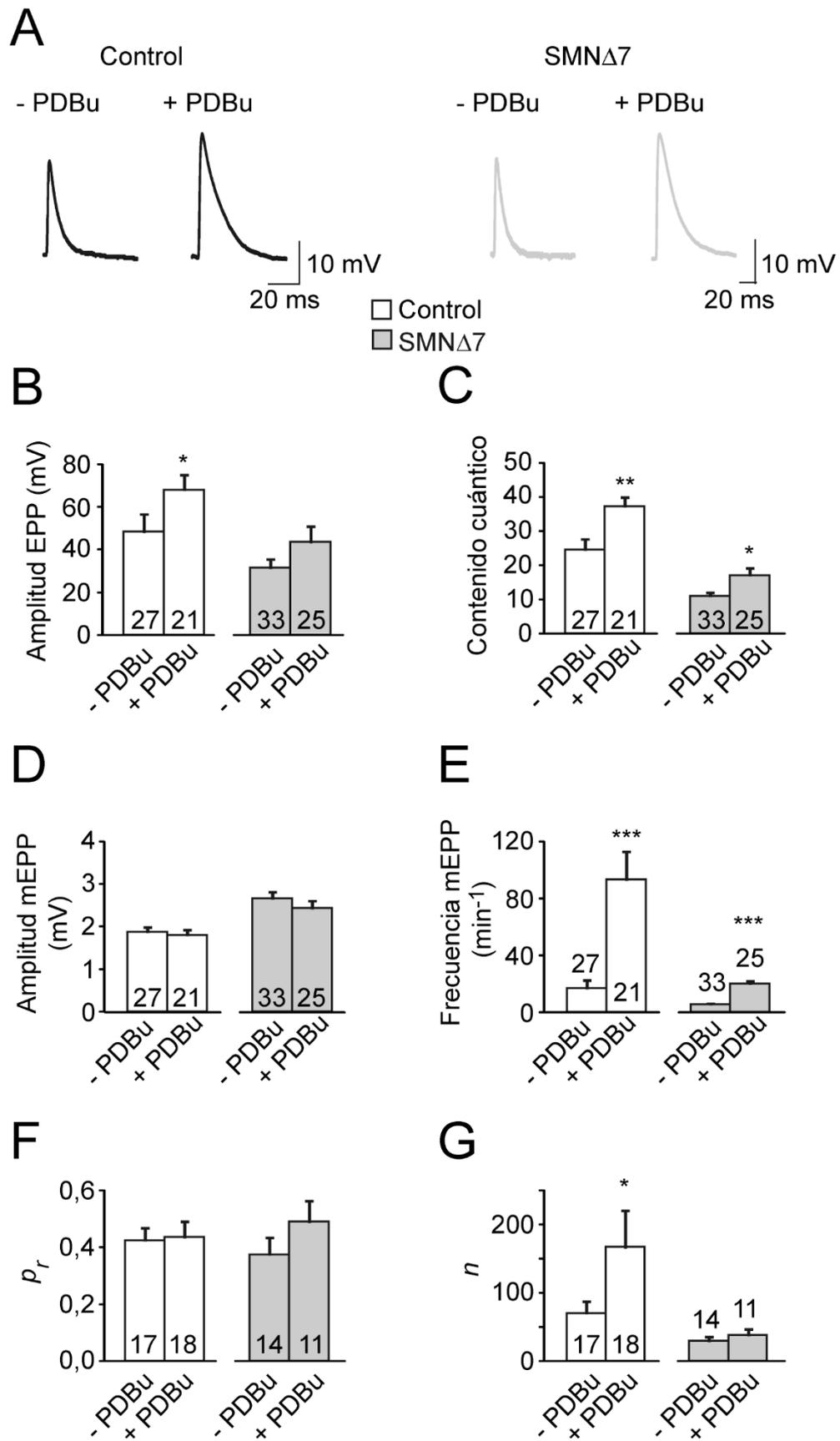


Figura 55. PDBu no es capaz de regular la transmisión sináptica en los terminales SMN Δ 7 en presencia de 2 mM Ca²⁺. **A.** Trazos representativos de EPP en ausencia y presencia de PDBu en ambos genotipos. **B.** Amplitud media de los EPP. **C.** Contenido cuántico medio en las fibras musculares registradas en cada condición. **D y E.** Amplitud y frecuencia de mEPP. **F y G.** Probabilidad y número de sitios de liberación en cada situación experimental en ambos genotipos. Los números en los barras indican las fibras registradas. N = 5 ratones por genotipo. Test no paramétrico U de Mann-Whitney. *** p < 0,0005; ** p < 0,005; * p < 0,05.

3. Nifedipina

3.1 Nifedipina aumenta la transmisión sináptica aumentando el número de sitios de liberación activos

La nifedipina es una dihidropiridina, antagonista de los canales de Ca²⁺ tipo L, que es capaz de aumentar la liberación de NT en sinapsis centrales y en la NMJ de ranas y de ratas recién nacidas o en la NMJ de ratones adultos en fase de regeneración (Sugiura and Ko, 1997, Rosato Siri and Uchitel, 1999, Hirasawa and Pittman, 2003, Piriz et al., 2003). En el presente trabajo hemos investigado si esta molécula podría regular la neurotransmisión en el modelo SMN Δ 7 de AME.

El análisis mostró que nifedipina (50 μ M) aumentó significativamente la amplitud de los potenciales evocados en respuesta a un potencial de acción en ambos genotipos, como se puede observar en los registros representativos de la Figura 56A, así como, por el desplazamiento a la derecha en la distribución de las amplitudes (Fig. 56B; Tabla XXIII). Por el contrario, la amplitud media de los mEPP no cambió significativamente en presencia de la droga, pero sí en su frecuencia (Fig. 56C y D; Tabla XXIII). Como cabía esperar, nifedipina aumentó el contenido cuántico en ambos genotipos (Fig. 56E; Tabla XXIII). El análisis de los parámetros binomiales (p_r y n) mostró, por un lado, un incremento significativo de p_r (~170%) en los terminales controles tras la aplicación de la droga y, por otro, un aumento de n en los mutantes (~300%) (Fig. 56F y G). Estos datos confirman que el RRP puede ser eficazmente aumentado farmacológicamente en los terminales mutantes.

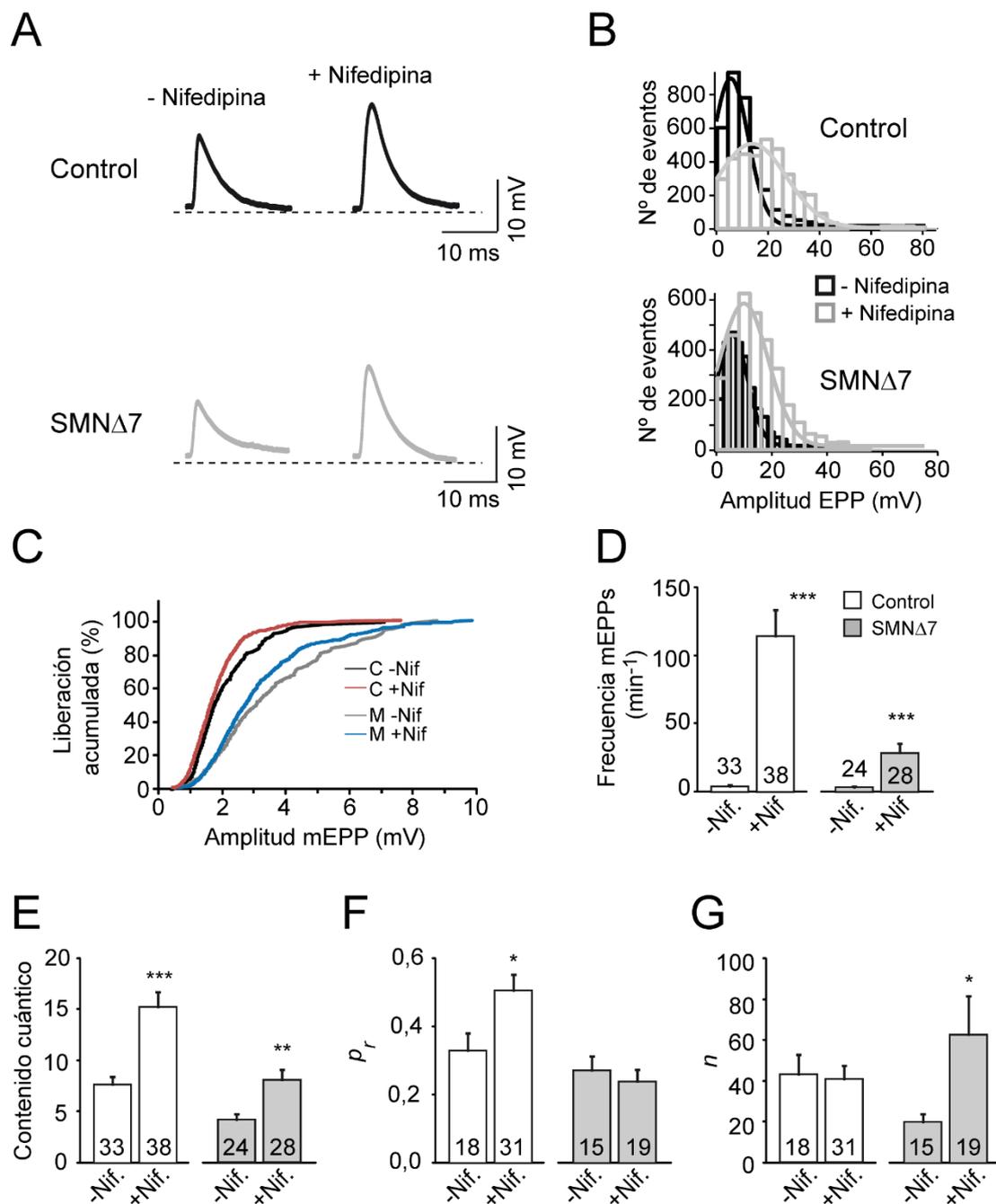


Figura 56. Incremento del contenido cuántico en presencia de nifedipina en el modelo SMN Δ 7. **A.** Registros representativos en ausencia y en presencia de nifedipina en ratones controles (parte superior) y mutantes (parte inferior). **B.** Histograma de frecuencia de la amplitud de los EPP en ambos genotipos. **C.** Distribución de la amplitud de los mEPP en las condiciones experimentales. C: control; M: mutante. **D.** Frecuencia de mEPP en ausencia y presencia de nifedipina. **E.** Contenido cuántico medio en ausencia y en presencia de nifedipina. **F y G.** Probabilidad y número de sitios de liberación en ambos genotipos. Los números en las barras indican las fibras registradas. N = 5 ratones por genotipo. Test t de Student (contenido cuántico) y test U de Mann Whitney. *** $p < 0,0005$; * $p < 0,05$.

El efecto de la nifedipina con estimulaciones repetidas a alta frecuencia (20 Hz) se exploró con trenes de pulsos de 100 estímulos. En los terminales controles, la droga produjo una gran facilitación durante la primera fase del tren (Fig. 57A) y, como resultado, un aumento significativo del número total de cuantos liberados (Fig. 57B). En los terminales mutantes, sin embargo, el efecto fue mucho menor. Por tanto, en los ratones mutantes nifedipina sólo aumentó el tamaño del RRP a baja frecuencia de estimulación (Fig. 57C; Tabla XXIV). Estos datos sugieren de nuevo que existe una posible limitación en la aplicación de estas moléculas dada la saturación de la maquinaria de secreción por la deficiencia en SMN.

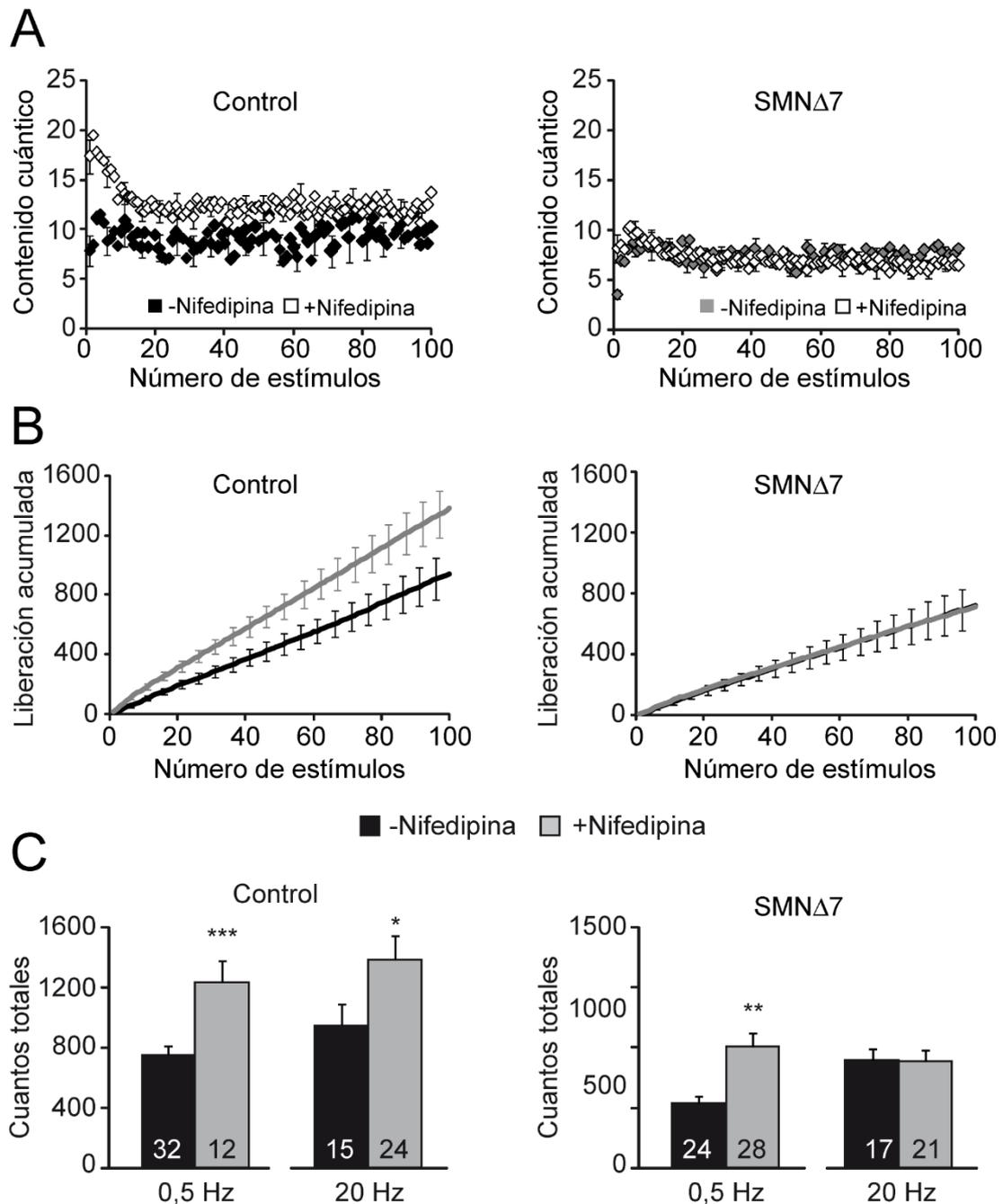


Figura 57. A 20 Hz de estimulación nifedipina no es capaz de regular el tamaño del RPP en los terminales SMN Δ 7. A. Contenido cuántico medio durante el registro intracelular de la liberación evocada y espontánea en terminales controles y mutantes. **B.** Liberación acumulada en solución control y en presencia de la droga en ambos genotipos. **C.** Comparación del número total de vesículas liberadas a 0,5 y 20 Hz. Los números en las barras indican las fibras musculares registradas. N = 4 ratones por genotipo. Test no paramétrico U de Mann-Whitney. *** p < 0,0005. ** p < 0,005; * p < 0,05.

DISCUSIÓN

Las enfermedades de motoneuronas, como la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) o la Atrofia Muscular Espinal (AME), se caracterizan por la degeneración neuronal y la parálisis muscular que se produce durante el transcurso de la enfermedad. No obstante, no todos los músculos se afectan en la misma medida. Las diferencias moleculares de los distintos contingentes de motoneuronas podrían contribuir a la vulnerabilidad selectiva en ambas enfermedades. Sin embargo, los componentes moleculares que determinan estas diferencias se desconocen.

En AME, la caracterización de diferentes modelos animales ha puesto de manifiesto una gran cantidad de alteraciones estructurales y funcionales a nivel de la NMJ, lo que ha supuesto un gran avance en el conocimiento de la fisiopatología de la enfermedad. Sin embargo, a pesar de estos progresos, por el momento se desconoce el origen de estas alteraciones y cuál/es es/son el/los mecanismo/s implicado/s en la neurodegeneración causada a raíz de los bajos niveles de SMN en AME. En este trabajo hemos investigado el origen de la disfunción sináptica y las bases moleculares de la distinta vulnerabilidad muscular que caracteriza a la enfermedad. Para ello hemos estudiado en el modelo SMN Δ 7 la expresión y distribución de varias proteínas sinápticas en los terminales motores de músculos afectados en distinto grado, estudio que hemos combinado con el análisis electrofisiológico de la alteración en la liberación de neurotransmisor. Los resultados de este trabajo demuestran que: (i) en todos los músculos estudiados existe una gran reducción de SV2B y Syt2 en los terminales motores de los ratones SMN Δ 7; (ii) en los terminales motores de los músculos más vulnerables en AME, Syt1 se regula fisiológicamente a la baja durante la maduración postnatal, lo que sumado a la disminución de Syt2 en los mutantes hace que los niveles totales de estas dos proteínas sea muy reducido, (iii) la densidad de canales de Ca²⁺ tipo P/Q en los terminales SMN Δ 7 está disminuida, sin que se vea alterado el tipo de canal que regula la neurotransmisión; y (iv) los terminales motores deficientes en SMN conservan la capacidad para regular la liberación a través de diferentes compuestos.

El papel del Ca^{2+} en la secreción en AME

Estudios estructurales y funcionales en diversos modelos animales de AME han descrito alteraciones a nivel de la NMJ (Cifuentes-Diaz et al., 2002, Kariya et al., 2008, Murray et al., 2008, Kong et al., 2009, Ruiz et al., 2010, Torres-Benito et al., 2011). Concretamente, en el modelo SMN Δ 7, la NMJ en uno de los músculos más afectados, el TVA, presenta alteraciones estructurales y funcionales tras la primera semana de vida. Estas alteraciones comprenden reducción del tamaño de la placa motora acompañada de signos de inmadurez, disminución de vesículas sinápticas, zonas activas y mitocondrias, alteración de la distribución de las vesículas y zonas activas, modificaciones del citoesqueleto en los terminales, disminución del contenido cuántico e incremento anormal de la liberación asincrónica (Kong et al., 2009, Ruiz et al., 2010, Torres-Benito et al., 2011).

En este trabajo hemos investigado el posible origen del déficit en la liberación de neurotransmisor. Nuestros resultados muestran que la disminución en la secreción evocada en los terminales SMN Δ 7 no se debe a una alteración en el tipo de canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje que regula la neurotransmisión (Fig. 28). Sin embargo, si existe una reducción en la densidad de los canales de Ca^{2+} tipo P/Q (Fig. 29); este hallazgo puede considerarse similar a la reducción de canales de Ca^{2+} tipo N en motoneuronas deficientes en SMN en cultivo primario (Jablonka et al., 2007). La reducción en los canales de Ca^{2+} tipo P/Q en el terminal motor presináptico coincide con la disminución previamente descrita en la expresión de bassoon (Torres-Benito et al., 2011), proteína de andamiaje de las zonas activas que co-localiza con los canales P/Q en la sinapsis (Davydova et al., 2014). En relación con las posibles consecuencias funcionales de la reducción de los canales de Ca^{2+} tipo P/Q, estudios realizados en ratones nulos para la subunidad $\alpha_1\text{A}$ muestran que la transmisión neuromuscular se encuentra comprometida, lo que afecta a la plasticidad sináptica, la fuerza muscular y la coordinación motora (Nudler et al., 2003, Urbano et al., 2003, Depetris et al., 2008, Urbano et al., 2008, Nanou et al., 2016). Por tanto, una reducción en la expresión de los canales de Ca^{2+} en la NMJ explicaría, al menos en parte, el fenotipo motor observado en los ratones SMN Δ 7 y el déficit en la

liberación de NT de los terminales motores más afectados, máxime cuando nuestros resultados muestran que no existe una sobreexpresión de otro tipo de canal de Ca^{2+} que compense la disminución de la densidad de los canales tipo P/Q, como si ocurre en el ratón nulo para los canales de Ca^{2+} tipo P/Q (Nudler et al., 2003, Urbano et al., 2003).

Así mismo, desde un punto de vista funcional, los resultados anteriores sugieren que las vesículas sinápticas en los ratones mutantes experimentarían una menor concentración de Ca^{2+} en los sitios de liberación, lo que podría afectar a la probabilidad de liberación (p_r) y/o a la regulación de los sitios activos (n). El análisis binomial mostró que p_r en los terminales mutantes, a bajo Ca^{2+} y en respuesta a un potencial de acción, fue menor que en los terminales controles (Fig. 31B). Sin embargo, al aumentar el Ca^{2+} extracelular p_r alcanzó valores normales, sugiriendo que la disminución de la secreción en Ca^{2+} fisiológico no se debe a este factor. Mucho más llamativo fue el hallazgo de la no regulación de n por Ca^{2+} extracelular en los terminales mutantes, al contrario que en los controles (Fig. 31C). Ello no puede explicarse por la disminución del número de vesículas en el terminal (véase resultados con PDBu, roscovitina y nifedipina), sino que sugiere una alteración en la regulación de los sitios activos a nivel de la maquinaria molecular.

SV2 y sinaptotagmina en AME

Una amplia variedad de proteínas sinápticas son necesarias para la correcta transmisión de la información, por lo que cualquier alteración en alguna de ellas podría comprometer la liberación y la eficacia sináptica. El estudio de la expresión y distribución de diversas proteínas sinápticas en la NMJ de ratones controles y AME en el presente trabajo reveló: (i) la disminución en el contenido total de sinaptotagmina (1 y 2) y (ii) la disminución de SV2 (en especial, SV2B), en los terminales $\text{SMN}\Delta 7$. Pero, ¿cuáles son las consecuencias funcionales de los bajos niveles de las isoformas de SV2 y sinaptotagmina 1 y 2?

Aunque la función de SV2 no se conoce con exactitud, parece estar involucrada en la regulación de la secreción en sinapsis centrales (Crowder et

al., 1999, Janz et al., 1999) y en células cromafines (Xu and Bajjalieh, 2001), particularmente en el proceso de cebado de las SV y en la regulación de la concentración de Ca^{2+} en el terminal presináptico (Janz et al., 1999, Chang and Sudhof, 2009, Wan et al., 2010). Estos datos, junto con la disminución de SV2 en los terminales motores en el modelo de pez cebra de AME (Boon et al., 2009), nos condujo a investigar la expresión y distribución de las distintas isoformas de esta proteína en la NMJ del modelo de ratón SMN Δ 7. Es de interés resaltar que aunque nuestros datos muestran reducción en las tres isoformas de SV2 en los terminales mutantes del músculo TVA, SV2B es la más afectada (Fig. 35 y 36), superando en gran medida la reducción previamente observada en el área ocupada por las vesículas sinápticas en este músculo (Torres-Benito et al., 2011). Por otro lado, el estudio de la expresión y distribución de SV2B en músculos con distinto grado de afectación (OIA y diafragma) reveló que existe una correlación entre el contenido de SV2B y el grado de susceptibilidad muscular a la enfermedad. Por ejemplo, en el diafragma (músculo considerado como resistente en AME), los niveles de SV2B en los terminales mutantes son significativamente mayores que los encontrados en los terminales del OIA y del TVA (músculos muy afectados en la enfermedad) (Fig. 38).

Además de sugerir que SV2 participa en el proceso de cebado de las vesículas, otros estudios muestran que SV2 está involucrada en la regulación de la estabilidad y/o tráfico de sinaptotagmina (Schivell et al., 1996, Lazzell et al., 2004, Schivell et al., 2005, Yao et al., 2010). Esto nos llevó a estudiar las isoformas mayoritarias de sinaptotagmina: Syt1 y Syt2. Su función más conocida es la de actuar como sensores de Ca^{2+} en la exocitosis (Stevens et al., 2003; Pang et al., 2006a; Xu et al., 2007), siendo Syt2 un sensor más rápido que Syt1 (Xu et al., 2007). Además, ambas isoformas parecen participar en el cebado, la fusión y la endocitosis de las SV durante el ciclo vesicular (Young and Neher, 2009).

Dada la importancia de Syt1 y Syt2 en la transmisión sináptica, estudiamos la expresión y distribución de ambas isoformas en los terminales motores deficientes en SMN. Nuestros datos revelan que los terminales mutantes, en todos los músculos estudiados, presentan una reducción

significativa en los niveles de expresión de Syt2 (Fig. 37 y 39). En relación a Syt1, el contenido de esta proteína en los terminales mutantes de los músculos más vulnerables (TVA y OIA) es más elevado que en los ratones controles. Ello podría deberse a un efecto compensatorio, acorde con el aumento del porcentaje de terminales que expresan Syt1 en el ratón nulo de Syt2 (de un 40 a un 90%) (Pang et al., 2006b). Sin embargo, el contenido total de sinaptotagmina en los terminales mutantes en el TVA y OIA es menor que el de los terminales controles. Además, los niveles totales de sinaptotagmina en los terminales mutantes parecen correlacionar con el grado de afectación muscular en AME (Fig. 40).

En línea con los resultados obtenidos en este trabajo, el fenotipo del ratón SMN Δ 7 (menor tamaño del animal (aunque al nacer son indistinguibles), menor peso, menor supervivencia, defectos motores y alteraciones en la NMJ (Lee et al., 2005, Kong et al., 2009; Ruiz et al., 2010, Torres-Benito., 2011)) es comparable, no sólo con el fenotipo de los ratones deficientes en la subunidad α 1A de los canales P/Q, sino también con el fenotipo funcional de los ratones nulos para Syt1 o Syt2 y SV2, en los que la neurotransmisión se encuentra muy alterada: disminución de la liberación evocada, reducción del tamaño del RRP y baja probabilidad de liberación (Geppert et al., 1994, Crowder et al., 1999, Janz et al., 1999, Xu and Bajjalieg, 2001, Pang et al., 2006a, Pang et al., 2006b, Kochubey et al., 2016). Por tanto, la reducción del contenido de Syt2 y de SV2B en los terminales motores deficientes en SMN más vulnerables podría explicar el déficit funcional que caracteriza a estos terminales. Respecto a Syt1, los resultados aquí presentados indican que Syt1 sería una proteína clave en la determinación de la vulnerabilidad en AME. Estos resultados, están en consonancia con datos preliminares obtenidos en pacientes de AME tipo I que muestran sobre-expresión de Syt1 en los contingentes de las motoneuronas más resistentes a la enfermedad (Lee et al., 2013) y con un aumento de la liberación asincrónica en los terminales deficientes en SMN (Ruiz et al., 2010). Además, la reproducción de estos resultados en el TVA de ratones del modelo Taiwanés (Fig. 46-48) sugiere que Syt1, Syt2 y SV2B podrían ser marcadores moleculares de la enfermedad, siempre y cuando se encontrase este mismo patrón en pacientes.

Regulación fisiológica de sinaptotagmina durante el desarrollo postnatal

El estudio de la expresión y distribución de SV2B, Syt1 y Syt2 durante el desarrollo postnatal (entre P3 y P11) ha revelado que: (i) la disminución del contenido de SV2B, Syt1 y Syt2 no parece ser debida a cambios degenerativos de la sinapsis ya que las proteínas están reducidas a P3 (Fig. 41), antes de que aparezcan signos de degeneración, y (ii) el contenido de Syt1 y Syt2 en los terminales motores se regula fisiológicamente de forma inversa, al igual que en el cáliz de Held (Kochubey et al., 2016).

En relación a la regulación fisiológica de Syt1 y Syt2, aunque ocurre en todos los músculos estudiados, la velocidad a la que se produce varía entre los grupos musculares. Mientras que en el TVA y OIA se produce en el intervalo comprendido entre P3 y P11 (Fig. 41), en el diafragma se produce en un período posterior, dado que todos los terminales analizados a P9-11, tanto controles como mutantes, todavía conservan expresión de Syt1. Un poco más tarde (P14-16) sólo en el 40% de los terminales se detecta Syt1 (Pang et al., 2006b), mientras que a P21 ya no se evidencia (Tejero, observación no publicada). Estos datos sugieren que en los terminales donde la regulación a la baja de Syt1 es más lenta, da tiempo a que se produzca la maduración de la NMJ y, por tanto, hace que la sinapsis sea menos sensible a la deficiencia en SMN.

Posibles causas de las alteraciones sinápticas en AME

El origen de las alteraciones observadas en las proteínas sinápticas se desconoce. La NMJ de los ratones SMN Δ 7 se caracteriza por un retraso en la maduración (Kong et al., 2009; Ruiz et al., 2010), lo que podría afectar al contenido de las proteínas sinápticas. Esta posibilidad es apoyada por la presencia de Syt1 a P9-11 en los terminales mutantes del TVA. Sin embargo, varios de nuestros resultados contradicen esta hipótesis: (i) el cambio del tipo de canal de Ca²⁺ que media la neurotransmisión no está retrasado (Fig. 28); (ii) los bajos niveles de Syt1 y Syt2 podrían explicarse por un retraso en la maduración pero no los de SV2B, ya que únicamente disminuye en los terminales deficientes en SMN (Fig. 41); (iii) no todas las proteínas sinápticas se ven alteradas por la

deficiencia en SMN (Fig. 42 y 43); (iv) en etapas tempranas del desarrollo, P3, los signos de inmadurez son muy poco evidentes (Fig. 44 y 45); y (v) en modelos menos severos de AME, por ejemplo en A2G, existe una alteración funcional sin defectos en la maduración de la NMJ (Ruiz et al., 2014). Por tanto, el problema existente en la maduración no sería la única causa de estas alteraciones, por lo que otras posibilidades deben ser tenidas en consideración. Entre ellas podrían encontrarse una alteración en la síntesis, en el transporte y/o en la estabilidad de las proteínas sinápticas alteradas o en la molécula de ARNm correspondiente. Distintos estudios muestran que las proteínas de unión a ARN, COPI y HuD, interaccionan con SMN, encontrándose bajos niveles de las mismas en los conos axónicos de neuronas deficientes en SMN (Fallini et al., 2011, Peter et al., 2011). Además, se postula que el transporte de proteínas y ARNm a lo largo del axón se ve afectado por la deficiencia en SMN (Dale et al., 2011). Por tanto, bajos niveles de SMN afectarían a su unión con las proteínas de unión a ARN y con el ARN correspondiente, afectando al transporte y a la correcta localización de las proteínas en la sinapsis.

Regulación positiva de la neurotransmisión en AME

La no regulación del número de los sitios de liberación activos (n) por el Ca^{2+} extracelular en los terminales $\text{SMN}\Delta 7$ en uno de los músculos más afectados en AME, el TVA, sugiere dos posibles hipótesis: (i) la existencia de una alteración a nivel molecular en el aparato secretor; y (ii) que no hayan más vesículas disponibles para liberar su contenido, tal y como sugiere la reducción en el número de vesículas en los sitios de liberación en estado de cebado o de fusión en los terminales AME (Kong et al., 2009, Martinez-Hernandez et al., 2013). Los datos presentados en esta memoria apoyan la primera hipótesis, ya que existe una alteración en la expresión de Syt1, Syt2 y SV2B en AME. Para validar la segunda hipótesis investigamos la posible regulación positiva de la liberación en los terminales deficientes en SMN estimulando diferentes vías del aparato secretor. En ello se basa el análisis funcional llevado a cabo en presencia de PDBu, nifedipina y roscovitina.

En relación al éster de fórbol, encontramos que PDBu incrementa la liberación de NT, tanto en los terminales controles como en los terminales SMN Δ 7, en consonancia con otros estudios que muestran que los ésteres de fórbol estimulan la liberación de NT, tanto en sinapsis centrales (Malenka et al., 1986, Nichols et al., 1987, Huang et al., 1988) como en la NMJ de rana y ratón (Haimann et al., 1987, Shapira et al., 1987, Caratsch et al., 1988, Huang et al., 1988, Sebastiao and Ribeiro, 1990, Redman et al., 1997, Searl and Silinsky, 2003, Virmani et al., 2005, Ruiz et al., 2008). El análisis binomial de los parámetros que determinan el contenido cuántico (pr y n) revela que el incremento en la secreción sináptica se produce a través de un aumento en el número de sitios de liberación activos (Fig. 53), es decir, se produce un aumento del tamaño del RRP, que puede ser también regulado por la acumulación de Ca^{2+} durante alta frecuencia de estimulación cuando la concentración de Ca^{2+} extracelular es inferior a la fisiológica (1 mM) (Fig. 32-34). Aunque tanto PDBu como la frecuencia de estimulación son capaces de modular la neurotransmisión en los terminales SMN Δ 7, nuestros datos indican que no poseen un efecto sinérgico ya que el incremento en la neurotransmisión en los mutantes en presencia de PDBu se restringe a una baja frecuencia de estimulación (0,5 Hz) y concentración de Ca^{2+} extracelular (1 mM) (Fig. 54 y 55). Por tanto, estos resultados rechazan la hipótesis de que los terminales mutantes no posean más vesículas listas para liberar su contenido.

Siguiendo esta línea de investigación y dado el papel crucial que juega la entrada de Ca^{2+} en el proceso de exocitosis, profundizamos en la identificación de moléculas agonistas de los diferentes canales. Ya que cualquier alteración en los canales puede resultar en cambios significativos en la magnitud de la secreción, estas moléculas agonistas pueden aportarnos nuevas herramientas para entender su papel en la exocitosis. En el presente proyecto aplicamos dos compuestos moduladores de los canales de Ca^{2+} : nifedipina y roscovitina. Ambos incrementan la secreción sináptica, tanto en los terminales controles como en los mutantes (Fig. 49 y 56).

La nifedipina es una dihidropiridina utilizada en clínica para el tratamiento de la hipertensión y angina de pecho. Aunque diferentes estudios muestran que incrementa tanto la liberación evocada como la espontánea en la NMJ de rata en etapas inmaduras del desarrollo (Sugiura and Ko, 1997, Piriz et al., 2003) y en el SNC (Hirasawa and Pittman, 2003), su mecanismo de acción se desconoce. Se postula que incrementa la liberación evocada a través de la inhibición de los canales de Ca^{2+} tipo L, ya que el flujo de Ca^{2+} a través de ellos promovería la liberación de un neuropéptido o neuromodulador desconocido que inhibiría a los canales de Ca^{2+} tipo P/Q y tipo N (Sugiura and Ko, 1997, Piriz et al., 2003). En nuestro trabajo nifedipina regula la liberación de NT a través de la regulación del tamaño del RRP en los mutantes (Fig. 56). En cuanto al estudio de su mecanismo de acción, resultados preliminares obtenidos en nuestro laboratorio tras la aplicación de verapamil (3 μM), antagonista de los canales tipo L también utilizado en clínica, apoya la hipótesis de un efecto independiente de los canales, ya que verapamil inhibe la neurotransmisión en nuestro modelo de estudio, aunque esta cuestión debe ser estudiada en mayor profundidad. Pero, a pesar de las limitaciones en el conocimiento del mecanismo de actuación de la nifedipina, recientemente, su aplicación en un modelo de ratón de Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) muestra efectos beneficiosos (Altamirano et al., 2013), lo que abre nuevas perspectivas hacia posibles dianas en el tratamiento de enfermedades neuromusculares, como es la AME.

En relación con roscovitina, en este trabajo hemos investigado su mecanismo de acción. Se trata de una molécula originariamente descrita como inhibidora de Cdk5 (Meijer et al., 1997) de la que existen dos enantiómeros: R- y S-roscovitina. Cdk5 es una quinasa involucrada en procesos de migración neuronal, neuritogénesis, exo- y endocitosis, y en la formación y mantenimiento de la NMJ (Nikolic et al., 1996, Ohshima et al., 1996, Chae et al., 1997, Fu et al., 2001, Li et al., 2001, Cheng and Ip, 2003, Tan et al., 2003, Tomizawa et al., 2003). R-roscovitina es capaz de regular la transmisión sináptica tanto en sinapsis centrales (Tomizawa et al., 2002, Yan et al., 2002, Kim and Ryan, 2010, 2013) como en la NMJ de rana adulta (Cho and Meriney, 2006), efecto que se produce mediante la modulación de la actividad y cinética de los CCDV tipo N (Buraei et al., 2005, Cho and Meriney, 2006, Buraei et al., 2007, Buraei and

Elmslie, 2008, Destefino et al., 2010) y P/Q (Yan et al., 2002). Sin embargo, su mecanismo de acción no se conoce con exactitud. Actualmente, se barajan dos hipótesis: (i) roscovitina incrementa la secreción mediante la inhibición de Cdk5 (Tomizawa et al., 2002); y (ii) roscovitina actúa de manera independiente a Cdk5, uniéndose a los canales de Ca^{2+} (Yan et al., 2002, Buraei et al., 2005, Cho and Meriney, 2006, Buraei et al., 2007, Buraei and Elmslie, 2008, DeStefino et al., 2010). La primera hipótesis se basa en que Cdk5 fosforila a los canales de Ca^{2+} en el sitio de interacción con otras proteínas presinápticas, conocido como sitio synprint del lazo citoplásmico LII-III de la subunidad $\alpha 1$ (Catterall, 1995, Sheng et al., 1996, Yokoyama et al., 2005, Szabo et al., 2006), impidiendo su unión con las proteínas del complejo SNARE y sinaptotagmina y, por tanto, la liberación de NT. La segunda hipótesis postula que el efecto de roscovitina sobre la actividad y cinética de los canales de Ca^{2+} es directo y que el sitio de interacción con los canales es extracelular ya que la droga no actúa si se aplica intracelularmente (Yan et al., 2002, Cho and Meriney, 2006). Tanto los resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio (Torres-Benito, 2012b), como en el presente trabajo, muestran que R-roscovitina es capaz de incrementar la liberación evocada en los terminales controles y en los deficientes en SMN del músculo TVA (Fig. 49A y B). Además, nuestros resultados sugieren que R-roscovitina actúa a través de los canales de Ca^{2+} , ya que la aplicación de su enantiómero S-roscovitina, inhibidor específico de Cdk5, produce sobre la liberación sináptica el efecto opuesto (Fig. 49C y D). Estos resultados van en la misma dirección que otros estudios donde se observa que S-roscovitina y olomoucina, ambos inhibidores específicos de Cdk5, no tienen efecto sobre la cinética de desactivación de los canales de Ca^{2+} (Tomizawa et al., 2002, Buraei et al., 2005, Cho and Meriney, 2006, Buraei et al., 2007, Buraei and Elmslie, 2008).

Aunque diferentes canales de Ca^{2+} se expresan en la NMJ de rata y ratón y participan en la liberación de NT, a la edad a la que los registros se han llevado a cabo en este trabajo (P9-11), los canales de Ca^{2+} tipo P/Q son los mayoritarios, tanto en los terminales controles como en los mutantes (Fig. 28). Esto plantea la cuestión de si el incremento en la neurotransmisión que se observa en la NMJ de nuestro modelo de estudio está mediada a través de un incremento en la actividad de los canales de Ca^{2+} tipo P/Q. Los experimentos con ω -agatoxina

IVA, bloqueante específico de los canales P/Q, claramente muestran que el efecto de R-roscovitina se produce a través de los canales de Ca^{2+} tipo P/Q, ya que su aplicación inhibe totalmente la neurotransmisión (Fig. 50). Estudios preliminares con ω -conotoxina GVIA, bloqueante específico de los canales tipo N, apoya el mecanismo de acción de R-roscovitina a través de los canales P/Q, ya que en presencia de ω -conotoxina R-roscovitina sigue ejerciendo efecto sobre la liberación de NT.

Además de su acción a través de los canales de Ca^{2+} tipo P/Q, hemos demostrado que R-roscovitina es capaz de disminuir el número de terminales motores silentes (Fig. 51). Durante el desarrollo postnatal temprano (dos primeras semanas de vida) la poli-inervación es una característica de las fibras musculares (Sanes and Lichtman, 1999). Posteriormente, se produce un cambio de poli- a mono-inervación. Durante este proceso, uno de los axones que inervan a la fibra muscular se vuelve menos activo antes de ser retirado. Aunque no se sabe con exactitud cómo está regulado este proceso, una posibilidad es por el apagado de canales de Ca^{2+} implicados en la liberación de NT (Miyazaki et al., 2004). Nuestros datos apoyan esta hipótesis ya que R-roscovitina incrementa la frecuencia de fibras con respuestas dobles, tanto en los terminales controles como en los mutantes. Además, este incremento en el número de sinapsis activas también se produce en sinapsis centrales (Tomizawa et al., 2002, Kim and Ryan, 2010). Todos estos resultados sugieren que la regulación de la actividad de los canales de Ca^{2+} involucrados en la liberación de NT es importante para establecer el número de entradas sinápticas funcionales en las redes neuronales.

Conjuntamente, los resultados obtenidos tras la aplicación de distintos moduladores de la neurotransmisión rechazan la hipótesis de que no existen más vesículas disponibles para liberar su contenido ante una estimulación. Sin embargo, hay que tener en consideración que los terminales SMN Δ 7 poseen un límite en la neurotransmisión que hace que las distintas vías de estimulación de la liberación se vean, en cierta medida, comprometidas.

En conclusión, los hallazgos descritos en este proyecto dejan entrever los mecanismos moleculares implicados en la disfunción sináptica en AME. Específicamente, la reducción en los canales de Ca^{2+} tipo P/Q y de las proteínas sinápticas SV2B y Syt2 explicaría en gran medida la disminución de la liberación evocada en AME. En este trabajo proponemos que la disminución de SV2B y Syt2 es de gran relevancia en aquellos músculos en los que se produce una regulación fisiológica de Syt1 a la baja, dando lugar a una gran vulnerabilidad de los mismos ante la deficiencia en SMN. Además, nuestros resultados muestran la capacidad de mejorar la función sináptica de los terminales deficientes en SMN mediante la regulación del tamaño del RRP y aumentando el número de terminales activos, lo que abre nuevas posibilidades para posibles estrategias terapéuticas.

CONCLUSIONES

1. Tanto en ratones controles como en SMN Δ 7, la neurotransmisión está regulada por los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje tipo P/Q (mayoritarios) y tipo N en los terminales motores del músculo TVA. Sin embargo, los canales de Ca²⁺ tipo P/Q están significativamente reducidos en los terminales AME.
2. En los terminales motores de los ratones SMN Δ 7 la sensibilidad a Ca²⁺ de la maquinaria secretora no está comprometida aunque la liberación de neurotransmisor es inferior a la de los controles e independiente de la concentración extracelular de Ca²⁺.
3. La reducción del contenido cuántico en las terminaciones motoras SMN Δ 7 se debe a la ausencia de modulación del número de sitios de liberación activos en función del Ca²⁺ extracelular. A bajo Ca²⁺, también la probabilidad de liberación vesicular es menor en los terminales mutantes.
4. La facilitación durante la estimulación a alta frecuencia compensa parcialmente el déficit secretor en los terminales motores SMN Δ 7.
5. En los músculos que presentan gran vulnerabilidad en AME (TVA y OIA), los terminales sufren una gran reducción en el contenido de SV2B y Syt2, mientras que otras proteínas, Stx1B y Syt7, no se encuentran alteradas.
6. Syt1 se regula fisiológicamente a la baja en los terminales motores durante el desarrollo postnatal. La velocidad de este proceso varía entre músculos, siendo más rápida en el TVA y OIA que en el diafragma. Por tanto, cuando los niveles de Syt2 y Syt1 son bajos las sinapsis se convierten en altamente vulnerables.
7. La alteración en las proteínas presinápticas (SV2B, Syt1 y Syt2) en los terminales SMN Δ 7 aparece durante la etapa temprana de desarrollo postnatal (P3). Esto sugiere que el retraso en la maduración que sufren estas sinapsis no es la única causa del déficit proteico en AME.

8. R-roscovitina aumenta la neurotransmisión a través de la modulación de los canales de Ca^{2+} tipo P/Q. Además, disminuye el número de sinapsis silentes, tanto en ratones controles como en mutantes.

9. La liberación de neurotransmisor en los terminales AME puede ser modulada positivamente mediante un incremento en el número de sitios de liberación activos tras la aplicación de un éster de forbol (PDBu) o nifedipina.

10. La alteración en la expresión de SV2B, Syt1 y Syt2 en AME podría ser un marcador molecular de la enfermedad.

11. En resumen concluimos que la pérdida o reducción de Syt2 y SV2 determina el déficit funcional en AME y que la expresión diferencial fisiológica de Syt1 contribuye en gran medida a la vulnerabilidad muscular.

CONCLUSIONS

1. In control and SMN Δ 7 mice, neurotransmission is regulated by P/Q- (majority) and N-type voltage dependent Ca²⁺ channels in the TVA motor nerve terminals. However, P/Q-type channels are significantly reduced in SMA terminals.
2. Ca²⁺ sensitivity of the secretory machinery is not compromised in SMN Δ 7 motornerve terminals, even though neurotransmitter release is less than in controls, and is independent of extracellular Ca²⁺ concentration.
3. Quantum content reduction in SMN Δ 7 motor nerve terminals is due to the absence of extracellular Ca²⁺ modulation of the active release site number. At low Ca²⁺, the probability of release is also lower in mutant terminals.
4. Facilitation during high frequency of stimulation partly compensates the secretory deficit in SMN Δ 7 motor nerve terminals.
5. In nerve terminals of highly affected SMA muscles (TVA and OIA), SV2B and Syt2 content is very low, while other proteins, such as Stx1B and Syt7, are unaffected.
6. Syt1 is physiologically downregulated in motor nerve terminals during postnatal development. The time course of this process varies among muscles, being faster in the TVA and OIA than in the diaphragm. Our data suggest that when Syt2 and Syt1 levels are low synapses become highly vulnerable.
7. Alteration in presynaptic proteins (SV2B, Syt1 and Syt2) in SMN Δ 7 terminals appears during early postnatal development (P3). This suggest that the maturation delay suffered by these synapses is not the only cause of the protein deficit in SMA.
8. R-roscovitine increases neurotransmission through P/Q-type Ca²⁺ channels modulation. Additionally, it reduces the number of silent synapses, in both control and mutants muscles.

9. Neurotransmitter release in SMA terminals can be positively modulated through an increase in the number of active release sites after application of phorbol ester (PDBu) or nifedipine.

10. The alteration in the expression of SV2B, Syt1 and Syt2 could be a molecular marker of the disease.

11. Altogether, we propose that loss/reduction of Syt2 and SV2 determines the functional motor deficit in SMA and that the physiological differential expression of Syt1 importantly contributes to muscle vulnerability.

BIBLIOGRAFÍA

- Ackermann B, Krober S, Torres-Benito L, Borgmann A, Peters M, Hosseini Barkooie SM, Tejero R, Jakubik M, Schreml J, Milbradt J, Wunderlich TF, Riessland M, Tabares L, Wirth B (2013) Plastin 3 ameliorates spinal muscular atrophy via delayed axon pruning and improves neuromuscular junction functionality. *Hum Mol Genet* 22:1328-1347.
- Ahmad S, Wang Y, Shaik GM, Burghes AH, Gangwani L (2012) The zinc finger protein ZPR1 is a potential modifier of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 21:2745-2758.
- Akten B, Kye MJ, Hao le T, Wertz MH, Singh S, Nie D, Huang J, Merianda TT, Twiss JL, Beattie CE, Steen JA, Sahin M (2011) Interaction of survival of motor neuron (SMN) and HuD proteins with mRNA cpg15 rescues motor neuron axonal deficits. *PNAS USA* 108:10337-10342.
- Altamirano F, Valladares D, Henriquez-Olguin C, Casas M, Lopez JR, Allen PD, Jaimovich E (2013) Nifedipine treatment reduces resting calcium concentration, oxidative and apoptotic gene expression, and improves muscle function in dystrophic mdx mice. *PLoS One* 8:e81222.
- Anderton RS, Meloni BP, Mastaglia FL, Boulos S (2013) Spinal muscular atrophy and the antiapoptotic role of survival of motor neuron (SMN) protein. *Mol Neurobiol* 47:821-832.
- Avila AM, Burnett BG, Taye AA, Gabanella F, Knight MA, Hartenstein P, Cizman Z, Di Prospero NA, Pellizzoni L, Fischbeck KH, Sumner CJ (2007) Trichostatin A increases SMN expression and survival in a mouse model of spinal muscular atrophy. *J Clin Invest* 117:659-671.
- Azzouz M, Le T, Ralph GS, Walmsley L, Monani UR, Lee DC, Wilkes F, Mitrophanous KA, Kingsman SM, Burghes AH, Mazarakis ND (2004) Lentivector-mediated SMN replacement in a mouse model of spinal muscular atrophy. *J Clin Invest* 114:1726-1731.
- Bacaj T, Wu D, Yang X, Morishita W, Zhou P, Xu W, Malenka RC, Sudhof TC (2013) Synaptotagmin-1 and synaptotagmin-7 trigger synchronous and asynchronous phases of neurotransmitter release. *Neuron* 80:947-959.
- Bajjalieh SM, Frantz GD, Weimann JM, McConnell SK, Scheller RH (1994) Differential expression of synaptic vesicle protein 2 (SV2) isoforms. *J Neurosci* 14:5223-5235.

- Bajjalieh SM, Peterson K, Linial M, Scheller RH (1993) Brain contains two forms of synaptic vesicle protein 2. PNAS USA 90:2150-2154.
- Bajjalieh SM, Peterson K, Shinghal R, Scheller RH (1992) SV2, a brain synaptic vesicle protein homologous to bacterial transporters. Science 257:1271-1273.
- Balk S, Tejero R, Dombert B, Surrey V, Blum R, Drexl H, Clausen J, Torres-Benito L, Tabares L, Sendtner M, Jablonka S, (en preparación) Calcium channel modulation compensates for morphological and functional abnormalities in motoneurons from a mouse model for spinal muscular atrophy (SMA).
- Basu J, Betz A, Brose N, Rosenmund C (2007) Munc13-1 C1 domain activation lowers the energy barrier for synaptic vesicle fusion. J Neurosci 27:1200-1210.
- Battle DJ, Lau CK, Wan L, Deng H, Lotti F, Dreyfuss G (2006) The Gemin5 protein of the SMN complex identifies snRNAs. Mol Cell 23:273-279.
- Benkhalifa-Ziyyat S, Besse A, Roda M, Duque S, Astord S, Carcenac R, Marais T, Barkats M (2013) Intramuscular scAAV9-SMN injection mediates widespread gene delivery to the spinal cord and decreases disease severity in SMA mice. Mol Ther 21:282-290.
- Bennett MR, Florin T, Hall R (1975) The effect of calcium ions on the binomial statistic parameters which control acetylcholine release at synapses in striated muscle. J Physiol 247:429-446.
- Betz A, Ashery U, Rickmann M, Augustin I, Neher E, Sudhof TC, Rettig J, Brose N (1998) Munc13-1 is a presynaptic phorbol ester receptor that enhances neurotransmitter release. Neuron 21:123-136.
- Betz A, Okamoto M, Benseler F, Brose N (1997) Direct interaction of the rat unc-13 homologue Munc13-1 with the N terminus of syntaxin. J Biol Chem 272:2520-2526.
- Bevan AK, Hutchinson KR, Foust KD, Braun L, McGovern VL, Schmelzer L, Ward JG, Petruska JC, Lucchesi PA, Burghes AH, Kaspar BK (2010) Early heart failure in the SMN Δ 7 model of spinal muscular atrophy and correction by postnatal scAAV9-SMN delivery. Hum Mol Genet 19:3895-3905.
- Boon KL, Xiao S, McWhorter ML, Donn T, Wolf-Saxon E, Bohnsack MT, Moens CB, Beattie CE (2009) Zebrafish survival motor neuron mutants exhibit

- presynaptic neuromuscular junction defects. *Hum Mol Genet* 18:3615-3625.
- Bordet T, Buisson B, Michaud M, Drouot C, Galea P, Delaage P, Akentieva NP, Evers AS, Covey DF, Ostuni MA, Lacapere JJ, Massaad C, Schumacher M, Steidl EM, Maux D, Delaage M, Henderson CE, Pruss RM (2007) Identification and characterization of cholest-4-en-3-one, oxime (TRO19622), a novel drug candidate for amyotrophic lateral sclerosis. *J Pharmacol Exp Ther* 322:709-720.
- Boyd IA, Martin AR (1955) The quantal composition of the mammalian end-plate potential. *J Physiol* 129:14-15P.
- Briese M, Esmaeili B, Fraboulet S, Burt EC, Christodoulou S, Towers PR, Davies KE, Sattelle DB (2009) Deletion of *smn-1*, the *Caenorhabditis elegans* ortholog of the spinal muscular atrophy gene, results in locomotor dysfunction and reduced lifespan. *Hum Mol Genet* 18:97-104.
- Brichta L, Holker I, Haug K, Klockgether T, Wirth B (2006) In vivo activation of SMN in spinal muscular atrophy carriers and patients treated with valproate. *Ann Neurol* 59:970-975.
- Brose N, Rosenmund C, Rettig J (2000) Regulation of transmitter release by Unc-13 and its homologues. *Curr Opin Neurobiol* 10:303-311.
- Brzustowicz LM, Lehner T, Castilla LH, Penchaszadeh GK, Wilhelmsen KC, Daniels R, Davies KE, Leppert M, Ziter F, Wood D, et al. (1990) Genetic mapping of chronic childhood-onset spinal muscular atrophy to chromosome 5q11.2-13.3. *Nature* 344:540-541.
- Buhler D, Raker V, Luhrmann R, Fischer U (1999) Essential role for the tudor domain of SMN in spliceosomal U snRNP assembly: implications for spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 8:2351-2357.
- Buraei Z, Anghelescu M, Elmslie KS (2005) Slowed N-type calcium channel (CaV2.2) deactivation by the cyclin-dependent kinase inhibitor roscovitine. *Biophys J* 89:1681-1691.
- Buraei Z, Elmslie KS (2008) The separation of antagonist from agonist effects of trisubstituted purines on CaV2.2 (N-type) channels. *J Neurochem* 105:1450-1461.

- Buraei Z, Schofield G, Elmslie KS (2007) Roscovitine differentially affects CaV2 and Kv channels by binding to the open state. *Neuropharmacol* 52:883-894.
- Burghes AH, Beattie CE (2009) Spinal muscular atrophy: why do low levels of survival motor neuron protein make motor neurons sick? *Nature reviews* 10:597-609.
- Burghes AH, McGovern VL (2010) Antisense oligonucleotides and spinal muscular atrophy: skipping along. *Genes & Dev.* 24:1574-1579.
- Burglen L, Lefebvre S, Clermont O, Bulet P, Viollet L, Cruaud C, Munnich A, Melki J (1996) Structure and organization of the human survival motor neurone (SMN) gene. *Genomics* 32:479-482.
- Burnett BG, Munoz E, Tandon A, Kwon DY, Sumner CJ, Fischbeck KH (2009) Regulation of SMN protein stability. *Mol Cell Biol* 29:1107-1115.
- Butchbach ME (2016) Copy Number Variations in the Survival Motor Neuron Genes: Implications for Spinal Muscular Atrophy and Other Neurodegenerative Diseases. *Front Mol Neurosci* 3:7.
- Butchbach ME, Singh J, Thorsteinsdottir M, Saieva L, Slominski E, Thurmond J, Andresson T, Zhang J, Edwards JD, Simard LR, Pellizzoni L, Jarecki J, Burghes AH, Gurney ME (2010) Effects of 2,4-diaminoquinazoline derivatives on SMN expression and phenotype in a mouse model for spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 19:454-467.
- Butchbach MER, Burghes AHM (2004) Perspectives on models of spinal muscular atrophy for drug discovery. *Drug Discov Today* 1:151-156.
- Campbell L, Hunter KM, Mohaghegh P, Tinsley JM, Brasch MA, Davies KE (2000) Direct interaction of Smn with dp103, a putative RNA helicase: a role for Smn in transcription regulation? *Hum Mol Genet* 9:1093-1100.
- Caratsch CG, Schumacher S, Grassi F, Eusebi F (1988) Influence of protein kinase C-stimulation by a phorbol ester on neurotransmitter release at frog end-plates. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol* 337:9-12.
- Catterall WA (1995) Structure and function of voltage-gated ion channels. *Annu Rev Biochem* 64:493-531.
- Cifuentes-Diaz C, Nicole S, Velasco ME, Borra-Cebrian C, Panozzo C, Frugier T, Millet G, Roblot N, Joshi V, Melki J (2002) Neurofilament accumulation

- at the motor endplate and lack of axonal sprouting in a spinal muscular atrophy mouse model. *Hum Mol Genet* 11:1439-1447.
- Cingolani LA, Goda Y (2008) Actin in action: the interplay between the actin cytoskeleton and synaptic efficacy. *Nat Rev Neurosci* 9:344-356.
- Claxton N, Fellers T, Davidson M (2005) *Laser Scanning Confocal Microscopy*.
- Coovert DD, Le TT, McAndrew PE, Strasswimmer J, Crawford TO, Mendell JR, Coulson SE, Androphy EJ, Prior TW, Burghes AH (1997) The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 6:1205-1214.
- Corti S, Nizzardo M, Nardini M, Donadoni C, Salani S, Ronchi D, Saladino F, Bordoni A, Fortunato F, Del Bo R, Papadimitriou D, Locatelli F, Menozzi G, Strazzer S, Bresolin N, Comi GP (2008) Neural stem cell transplantation can ameliorate the phenotype of a mouse model of spinal muscular atrophy. *J Clin Invest* 118:3316-3330.
- Corti S, Nizzardo M, Nardini M, Donadoni C, Salani S, Ronchi D, Simone C, Falcone M, Papadimitriou D, Locatelli F, Mezzina N, Gianni F, Bresolin N, Comi GP (2010) Embryonic stem cell-derived neural stem cells improve spinal muscular atrophy phenotype in mice. *Brain* 133:465-481.
- Corti S, Nizzardo M, Simone C, Falcone M, Nardini M, Ronchi D, Donadoni C, Salani S, Riboldi G, Magri F, Menozzi G, Bonaglia C, Rizzo F, Bresolin N, Comi GP (2012) Genetic correction of human induced pluripotent stem cells from patients with spinal muscular atrophy. *Sci Transl Med* 4:165ra162.
- Crawford TO, Pardo CA (1996) The neurobiology of childhood spinal muscular atrophy. *Neurobiol Dis* 3:97-110.
- Crowder KM, Gunther JM, Jones TA, Hale BD, Zhang HZ, Peterson MR, Scheller RH, Chavkin C, Bajjalieh SM (1999) Abnormal neurotransmission in mice lacking synaptic vesicle protein 2A (SV2A). *PNAS USA* 96:15268-15273.
- 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.
- Chan YB, Miguel-Aliaga I, Franks C, Thomas N, Trulzsch B, Sattelle DB, Davies KE, van den Heuvel M (2003) Neuromuscular defects in a *Drosophila* survival motor neuron gene mutant. *Hum Mol Genet* 12:1367-1376.

- Chang WP, Sudhof TC (2009) SV2 renders primed synaptic vesicles competent for Ca²⁺-induced exocytosis. *J Neurosci* 29:883-897.
- Cheng K, Ip NY (2003) Cdk5: a new player at synapses. *Neurosignals* 12:180-190.
- Cho S, Meriney SD (2006) The effects of presynaptic calcium channel modulation by roscovitine on transmitter release at the adult frog neuromuscular junction. *Eur J Neurosci* 23:3200-3208.
- Dale JM, Shen H, Barry DM, Garcia VB, Rose FF, Jr., Lorson CL, Garcia ML (2011) The spinal muscular atrophy mouse model, SMADelta7, displays altered axonal transport without global neurofilament alterations. *Acta Neuropathol* 122:331-341.
- Davydova D, Marini C, King C, Klueva J, Bischof F, Romorini S, Montenegro-Venegas C, Heine M, Schneider R, Schroder MS, Altroch WD, Henneberger C, Rusakov DA, Gundelfinger ED, Fejtova A (2014) Bassoon specifically controls presynaptic P/Q-type Ca(2+) channels via RIM-binding protein. *Neuron* 82:181-194.
- Del Castillo J, Katz B (1954) Quantal components of the end-plate potential. *J Physiol* 124:560-573.
- Depetris RS, Nudler SI, Uchitel OD, Urbano FJ (2008) Altered synaptic synchrony in motor nerve terminals lacking P/Q-calcium channels. *Synapse* 62:466-471.
- DeStefino NR, Pilato AA, Dittrich M, Cherry SV, Cho S, Stiles JR, Meriney SD (2010) (R)-roscovitine prolongs the mean open time of unitary N-type calcium channel currents. *Neuroscience* 167:838-849.
- Dombert B, Sivadasan R, Simon CM, Jablonka S, Sendtner M (2014) Presynaptic localization of Smn and hnRNP R in axon terminals of embryonic and postnatal mouse motoneurons. *PLoS One* 9:e110846.
- Dominguez E, Marais T, Chatauret N, Benkhelifa-Ziyyat S, Duque S, Ravassard P, Carcenac R, Astord S, Pereira de Moura A, Voit T, Barkats M (2011) Intravenous scAAV9 delivery of a codon-optimized SMN1 sequence rescues SMA mice. *Hum Mol Genet* 20:681-693.
- Doran B, Gherbesi N, Hendricks G, Flavell RA, Davis RJ, Gangwani L (2006) Deficiency of the zinc finger protein ZPR1 causes neurodegeneration. *PNAS USA* 103:7471-7475.

- Fallini C, Zhang H, Su Y, Silani V, Singer RH, Rossoll W, Bassell GJ (2011) The survival of motor neuron (SMN) protein interacts with the mRNA-binding protein HuD and regulates localization of poly(A) mRNA in primary motor neuron axons. *J Neurosci* 31:3914-3925.
- Farooq F, Molina FA, Hadwen J, MacKenzie D, Witherspoon L, Osmond M, Holcik M, MacKenzie A (2011) Prolactin increases SMN expression and survival in a mouse model of severe spinal muscular atrophy via the STAT5 pathway. *J Clin Invest* 121:3042-3050.
- Fischer U, Liu Q, Dreyfuss G (1997) The SMN-SIP1 complex has an essential role in spliceosomal snRNP biogenesis. *Cell* 90:1023-1029.
- Foust KD, Nurre E, Montgomery CL, Hernandez A, Chan CM, Kaspar BK (2009) Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes. *Nat Biotechnol* 27:59-65.
- Foust KD, Wang X, McGovern VL, Braun L, Bevan AK, Haidet AM, Le TT, Morales PR, Rich MM, Burghes AH, Kaspar BK (2010) Rescue of the spinal muscular atrophy phenotype in a mouse model by early postnatal delivery of SMN. *Nat Biotechnol* 28:271-274.
- Francis JW, Sandrock AW, Bhide PG, Vonsattel JP, Brown RH, Jr. (1998) Heterogeneity of subcellular localization and electrophoretic mobility of survival motor neuron (SMN) protein in mammalian neural cells and tissues. *PNAS USA* 95:6492-6497.
- Fu AK, Cheung J, Smith FD, Ip FC, Ip NY (2001) Overexpression of muscle specific kinase increases the transcription and aggregation of acetylcholine receptors in *Xenopus* embryos. *Brain Res Mol Brain Res* 96:21-29.
- Gabanella F, Butchbach ME, Saieva L, Carissimi C, Burghes AH, Pellizzoni L (2007) Ribonucleoprotein assembly defects correlate with spinal muscular atrophy severity and preferentially affect a subset of spliceosomal snRNPs. *PLoS One* 2:e921.
- Gangwani L, Flavell RA, Davis RJ (2005) ZPR1 is essential for survival and is required for localization of the survival motor neurons (SMN) protein to Cajal bodies. *Mol Cell Biol* 25:2744-2756.

- Gangwani L, Mikrut M, Theroux S, Sharma M, Davis RJ (2001) Spinal muscular atrophy disrupts the interaction of ZPR1 with the SMN protein. *Nat Cell Biol* 3:376-383.
- Genabai NK, Ahmad S, Zhang Z, Jiang X, Gabaldon CA, Gangwani L (2015) Genetic inhibition of JNK3 ameliorates spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*.
- Geppert M, Goda Y, Hammer RE, Li C, Rosahl TW, Stevens CF, Sudhof TC (1994) Synaptotagmin I: a major Ca²⁺ sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell* 79:717-727.
- Giganti A, Plastino J, Janji B, Van Troys M, Lentz D, Ampe C, Sykes C, Friederich E (2005) Actin-filament cross-linking protein T-plastin increases Arp2/3-mediated actin-based movement. *J Cell Sci* 118:1255-1265.
- Gilliam TC, Brzustowicz LM, Castilla LH, Lehner T, Penchaszadeh GK, Daniels RJ, Byth BC, Knowles J, Hislop JE, Shapira Y, et al. (1990) Genetic homogeneity between acute and chronic forms of spinal muscular atrophy. *Nature* 345:823-825.
- Gogliotti RG, Cardona H, Singh J, Bail S, Emery C, Kuntz N, Jorgensen M, Durens M, Xia B, Barlow C, Heier CR, Plasterer HL, Jacques V, Kiledjian M, Jarecki J, Rusche J, DiDonato CJ (2013) The DcpS inhibitor RG3039 improves survival, function and motor unit pathologies in two SMA mouse models. *Hum Mol Genet* 22:4084-4101.
- Grimmler M, Bauer L, Nousiainen M, Korner R, Meister G, Fischer U (2005) Phosphorylation regulates the activity of the SMN complex during assembly of spliceosomal U snRNPs. *EMBO Rep* 6:70-76.
- Haimann C, Meldolesi J, Ceccarelli B (1987) The phorbol ester, 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate, enhances the evoked quanta release of acetylcholine at the frog neuromuscular junction. *J Physiol* 408:27-31.
- Hao le T, Wolman M, Granato M, Beattie CE (2012) Survival motor neuron affects plastin 3 protein levels leading to motor defects. *J Neurosci* 32:5074-5084.
- Helmken C, Hofmann Y, Schoenen F, Oprea G, Raschke H, Rudnik-Schoneborn S, Zerres K, Wirth B (2003) Evidence for a modifying pathway in SMA discordant families: reduced SMN level decreases the amount of its interacting partners and Htra2-beta1. *Hum Genet* 114:11-21.

- Hirasawa M, Pittman QJ (2003) Nifedipine facilitates neurotransmitter release independently of calcium channels. *PNAS USA* 100:6139-6144.
- Hoffman J (1900) Ueber die hereditäre progressive spinale Muskel atrophie im Kindesalter. *München Med Wschr* 47:1649-1651.
- Hsieh-Li HM, Chang JG, Jong YJ, Wu MH, Wang NM, Tsai CH, Li H (2000) A mouse model for spinal muscular atrophy. *Nat Genet* 24:66-70.
- Hua Y, Krainer AR (2012) Antisense-mediated exon inclusion. *Methods Mol Biol* 867:307-323.
- Hua Y, Sahashi K, Rigo F, Hung G, Horev G, Bennett CF, Krainer AR (2011) Peripheral SMN restoration is essential for long-term rescue of a severe spinal muscular atrophy mouse model. *Nature* 478:123-126.
- Huang HY, Allgaier C, Hertting G, Jackisch R (1988) Phorbol ester-mediated enhancement of hippocampal noradrenaline release: which ion channels are involved? *Eur J Pharmacol* 153:175-184.
- Hubers L, Valderrama-Carvajal H, Laframboise J, Timbers J, Sanchez G, Cote J (2011) HuD interacts with survival motor neuron protein and can rescue spinal muscular atrophy-like neuronal defects. *Hum Mol Genet* 20:553-579.
- Jablonka S, Bandilla M, Wiese S, Buhler D, Wirth B, Sendtner M, Fischer U (2001) Co-regulation of survival of motor neuron (SMN) protein and its interactor SIP1 during development and in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 10:497-505.
- Jablonka S, Beck M, Lechner BD, Mayer C, Sendtner M (2007) Defective Ca²⁺ channel clustering in axon terminals disturbs excitability in motoneurons in spinal muscular atrophy. *J Cell Biol* 179:139-149.
- Jablonka S, Schrank B, Kralewski M, Rossoll W, Sendtner M (2000) Reduced survival motor neuron (Smn) gene dose in mice leads to motor neuron degeneration: an animal model for spinal muscular atrophy type III. *Hum Mol Genet* 9:341-346.
- Janz R, Goda Y, Geppert M, Missler M, Sudhof TC (1999) SV2A and SV2B function as redundant Ca²⁺ regulators in neurotransmitter release. *Neuron* 24:1003-1016.

- Janz R, Sudhof TC (1999) SV2C is a synaptic vesicle protein with an unusually restricted localization: anatomy of a synaptic vesicle protein family. *Neuroscience* 94:1279-1290.
- Jorgensen EM, Hartweg E, Schuske K, Nonet ML, Jin Y, Horvitz HR (1995) Defective recycling of synaptic vesicles in synaptotagmin mutants of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 378:196-199.
- Kanning KC, Kaplan A, Henderson CE (2010) Motor neuron diversity in development and disease. *Annu Rev Neurosci* 33:409-440.
- Kariya S, Park GH, Maeno-Hikichi Y, Leykekhman O, Lutz C, Arkovitz MS, Landmesser LT, Monani UR (2008) Reduced SMN protein impairs maturation of the neuromuscular junctions in mouse models of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 17:2552-2569.
- Kerr DA, Nery JP, Traystman RJ, Chau BN, Hardwick JM (2000) Survival motor neuron protein modulates neuron-specific apoptosis. *PNAS USA* 97:13312-13317.
- Kim SH, Ryan TA (2010) CDK5 serves as a major control point in neurotransmitter release. *Neuron* 67:797-809.
- Kim SH, Ryan TA (2013) Balance of calcineurin Aalpha and CDK5 activities sets release probability at nerve terminals. *J Neurosci* 33:8937-8950.
- Kochubey O, Babai N, Schneggenburger R (2016) A Synaptotagmin Isoform Switch during the Development of an Identified CNS Synapse. *Neuron* 90:984-999.
- Kong L, Wang X, Choe DW, Polley M, Burnett BG, Bosch-Marce M, Griffin JW, Rich MM, Sumner CJ (2009) Impaired synaptic vesicle release and immaturity of neuromuscular junctions in spinal muscular atrophy mice. *J Neurosci* 29:842-851.
- Kretschmannova K, Zemkova H (2004) Characterization of neuromuscular transmission in mice with progressive motoneuronopathy. *Physiol Res* 53:541-548.
- Lazzell DR, Belizaire R, Thakur P, Sherry DM, Janz R (2004) SV2B regulates synaptotagmin 1 by direct interaction. *J Biol Chem* 279:52124-52131.
- Le TT, McGovern VL, Alwine IE, Wang X, Massoni-Laporte A, Rich MM, Burghes AH (2011) Temporal requirement for high SMN expression in SMA mice. *Hum Mol Genet* 20:3578-3591.

- Le TT, Pham LT, Butchbach ME, Zhang HL, Monani UR, Coovert DD, Gavriliina TO, Xing L, Bassell GJ, Burghes AH (2005) SMN Δ 7, the major product of the centromeric survival motor neuron (SMN2) gene, extends survival in mice with spinal muscular atrophy and associates with full-length SMN. *Hum Mol Genet* 14:845-857.
- Lee, J.C., Papandrea, D., Chung, W.K., Pisapia, D.J., Goldman, J.E. and Henderson, C.E. (2013) Identifying potential therapeutic targets in SMA through profiling of motor pools that show selective resistance in human patients and mouse models. *17th Annual International Spinal Muscular Atrophy Research Group Meeting*, A30.
- Lefebvre S, Burglen L, Frezal J, Munnich A, Melki J (1998) The role of the SMN gene in proximal spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 7:1531-1536.
- Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Benichou B, Cruaud C, Millasseau P, Zeviani M, et al. (1995) Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 80:155-165.
- Lefebvre S, Burlet P, Liu Q, Bertrand S, Clermont O, Munnich A, Dreyfuss G, Melki J (1997) Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy. *Nat Genet* 16:265-269.
- Li BS, Sun MK, Zhang L, Takahashi S, Ma W, Vinade L, Kulkarni AB, Brady RO, Pant HC (2001) Regulation of NMDA receptors by cyclin-dependent kinase-5. *PNAS USA* 98:12742-12747.
- Ling KK, Gibbs RM, Feng Z, Ko CP (2012) Severe neuromuscular denervation of clinically relevant muscles in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 21:185-195.
- Ling KK, Lin MY, Zingg B, Feng Z, Ko CP (2010) Synaptic defects in the spinal and neuromuscular circuitry in a mouse model of spinal muscular atrophy. *PLoS One* 5:e15457.
- Liu Q, Fischer U, Wang F, Dreyfuss G (1997) The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN, and its associated protein SIP1 are in a complex with spliceosomal snRNP proteins. *Cell* 90:1013-1021.
- Lorson CL, Hahnen E, Androphy EJ, Wirth B (1999) A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *PNAS USA* 96:6307-6311.

- Lorson CL, Strasswimmer J, Yao JM, Baleja JD, Hahnen E, Wirth B, Le T, Burghes AH, Androphy EJ (1998) SMN oligomerization defect correlates with spinal muscular atrophy severity. *Nat Genet* 19:63-66.
- Ma C, Li W, Xu Y, Rizo J (2011) Munc13 mediates the transition from the closed syntaxin-Munc18 complex to the SNARE complex. *Nat Struct Mol Biol* 18:542-549
- Malenka RC, Madison DV, Nicoll RA (1986) Potentiation of synaptic transmission in the hippocampus by phorbol esters. *Nature* 321:175-177.
- Martinez-Hernandez R, Bernal S, Also-Rallo E, Alias L, Barcelo MJ, Hereu M, Esquerda JE, Tizzano EF (2013) Synaptic defects in type I spinal muscular atrophy in human development. *J Pathol* 229:49-61.
- McGovern VL, Massoni-Laporte A, Wang X, Le TT, Le HT, Beattie CE, Rich MM, Burghes AH (2015) Plastin 3 Expression Does Not Modify Spinal Muscular Atrophy Severity in the 7 SMA Mouse. *PLoS One* 10:e0132364.
- McWhorter ML, Monani UR, Burghes AH, Beattie CE (2003) Knockdown of the survival motor neuron (Smn) protein in zebrafish causes defects in motor axon outgrowth and pathfinding. *J Cell Biol* 162:919-931.
- Meijer L, Borgne A, Mulner O, Chong JP, Blow JJ, Inagaki N, Inagaki M, Delcros JG, Moulinoux JP (1997) Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *Eur J Biochem* 243:527-536.
- Meister G, Buhler D, Pillai R, Lottspeich F, Fischer U (2001) A multiprotein complex mediates the ATP-dependent assembly of spliceosomal U snRNPs. *Nat Cell Biol* 3:945-949.
- Melki J, Abdelhak S, Sheth P, Bachelot MF, Burlet P, Marcadet A, Aicardi J, Barois A, Carriere JP, Fardeau M, et al. (1990) Gene for chronic proximal spinal muscular atrophies maps to chromosome 5q. *Nature* 344:767-768.
- Mentis GZ, Blivis D, Liu W, Drobac E, Crowder ME, Kong L, Alvarez FJ, Sumner CJ, O'Donovan MJ (2011) Early functional impairment of sensory-motor connectivity in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Neuron* 69:453-467.
- Miguel-Aliaga I, Culetto E, Walker DS, Baylis HA, Sattelle DB, Davies KE (1999) The *Caenorhabditis elegans* orthologue of the human gene responsible

- for spinal muscular atrophy is a maternal product critical for germline maturation and embryonic viability. *Hum Mol Genet* 8:2133-2143.
- Miyazaki, T., K.Hashimoto, H.S.Shin, M.Kano, and M.Watanabe. 2004. P/Q-type Ca²⁺ channel alpha1A regulates synaptic competition on developing cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci* 24:1734-1743.
- Monani UR, Lorson CL, Parsons DW, Prior TW, Androphy EJ, Burghes AH, McPherson JD (1999) A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2. *Hum Mol Genet* 8:1177-1183.
- Monani UR, Sendtner M, Coover DD, Parsons DW, Andreassi C, Le TT, Jablonka S, Schrank B, Rossoll W, Prior TW, Morris GE, Burghes AH (2000) The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in *Smn*(^{-/-}) mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 9:333-339.
- Munsat TL, Davies KE (1992) International SMA consortium meeting. (26-28 June 1992, Bonn, Germany). *Neuromuscul Disord* 2:423-428.
- Murray LM, Beauvais A, Gibeault S, Courtney NL, Kothary R (2015) Transcriptional profiling of differentially vulnerable motor neurons at pre-symptomatic stage in the *Smn* (2b^{-/-}) mouse model of spinal muscular atrophy. *Acta Neuropathol Commun* 3:55.
- Murray LM, Comley LH, Thomson D, Parkinson N, Talbot K, Gillingwater TH (2008) Selective vulnerability of motor neurons and dissociation of pre- and post-synaptic pathology at the neuromuscular junction in mouse models of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 17:949-962.
- Nanou E, Yan J, Whitehead NP, Kim MJ, Froehner SC, Scheuer T, Catterall WA (2016) Altered short-term synaptic plasticity and reduced muscle strength in mice with impaired regulation of presynaptic CaV2.1 Ca²⁺ channels. *PNAS USA* 113:1068-1073.
- Narayanan U, Ospina JK, Frey MR, Hebert MD, Matera AG (2002) SMN, the spinal muscular atrophy protein, forms a pre-import snRNP complex with snurportin1 and importin beta. *Hum Mol Genet* 11:1785-1795.
- Nichols RA, Haycock JW, Wang JK, Greengard P (1987) Phorbol ester enhancement of neurotransmitter release from rat brain synaptosomes. *J Neurochem* 48:615-621.

- Nikolic M, Dudek H, Kwon YT, Ramos YF, Tsai LH (1996) The cdk5/p35 kinase is essential for neurite outgrowth during neuronal differentiation. *Genes Dev* 10:816-825.
- Nowack A, Yao J, Custer KL, Bajjalieh SM (2010) SV2 regulates neurotransmitter release via multiple mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol* 299:C960-967.
- Nudler S, Piriz J, Urbano FJ, Rosato-Siri MD, Renteria ES, Uchitel OD (2003) Ca²⁺ channels and synaptic transmission at the adult, neonatal, and P/Q-type deficient neuromuscular junction. *Ann NY Acad Sci* 998:11-17.
- Ohshima 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. *PNAS USA* 93:11173-11178.
- Oprea GE, Krober S, McWhorter ML, Rossoll W, Muller S, Krawczak M, Bassell GJ, Beattie CE, Wirth B (2008) Plastin 3 is a protective modifier of autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Science* 320:524-527.
- Pagliardini S, Giavazzi A, Setola V, Lizier C, Di Luca M, DeBiasi S, Battaglia G (2000) Subcellular localization and axonal transport of the survival motor neuron (SMN) protein in the developing rat spinal cord. *Hum Mol Genet* 9:47-56.
- Pang ZP, Melicoff E, Padgett D, Liu Y, Teich AF, Dickey BF, Lin W, Adachi R, Sudhof TC (2006a) Synaptotagmin-2 is essential for survival and contributes to Ca²⁺ triggering of neurotransmitter release in central and neuromuscular synapses. *J Neurosci* 26:13493-13504.
- Pang ZP, Sun J, Rizo J, Maximov A, Sudhof TC (2006b) Genetic analysis of synaptotagmin 2 in spontaneous and Ca²⁺-triggered neurotransmitter release. *EMBO* 25:2039-2050.
- Passini MA, Bu J, Roskelley EM, Richards AM, Sardi SP, O'Riordan CR, Klinger KW, Shihabuddin LS, Cheng SH (2010) CNS-targeted gene therapy improves survival and motor function in a mouse model of spinal muscular atrophy. *J Clin Invest* 120:1253-1264.
- Patrizi AL, Tiziano F, Zappata S, Donati MA, Neri G, Brahe C (1999) SMN protein analysis in fibroblast, amniocyte and CVS cultures from spinal muscular

- atrophy patients and its relevance for diagnosis. *Eur J Hum Genet* 7:301-309.
- Pearn J (1980) Classification of spinal muscular atrophies. *Lancet* 1:919-922.
- Pellizzoni L (2007) Chaperoning ribonucleoprotein biogenesis in health and disease. *EMBO Rep* 8:340-345.
- Pellizzoni L, Charroux B, Rappsilber J, Mann M, Dreyfuss G (2001) A functional interaction between the survival motor neuron complex and RNA polymerase II. *J Cell Biol* 152:75-85.
- Pellizzoni L, Yong J, Dreyfuss G (2002) Essential role for the SMN complex in the specificity of snRNP assembly. *Science* 298:1775-1779.
- Peter CJ, Evans M, Thayanithy V, Taniguchi-Ishigaki N, Bach I, Kolpak A, Bassell GJ, Rossoll W, Lorson CL, Bao ZZ, Androphy EJ (2011) The COPI vesicle complex binds and moves with survival motor neuron within axons. *Hum Mol Genet* 20:1701-1711.
- Piriz J, Rosato Siri MD, Pagani R, Uchitel OD (2003) Nifedipine-mediated mobilization of intracellular calcium stores increases spontaneous neurotransmitter release at neonatal rat motor nerve terminals. *J Pharmacol Exp Ther* 306:658-663.
- Porensky PN, Burghes AH (2013) Antisense oligonucleotides for the treatment of spinal muscular atrophy. *Hum Gene Ther* 24:489-498.
- Porensky PN, Mitrpant C, McGovern VL, Bevan AK, Foust KD, Kaspar BK, Wilton SD, Burghes AH (2012) A single administration of morpholino antisense oligomer rescues spinal muscular atrophy in mouse. *Hum Mol Genet* 21:1625-1638.
- Powis RA, Gillingwater TH (2016) Selective loss of alpha motor neurons with sparing of gamma motor neurons and spinal cord cholinergic neurons in a mouse model of spinal muscular atrophy. *J Anat* 228:443-451.
- Redman RS, Searl TJ, Hirsh JK, Silinsky EM (1997) Opposing effects of phorbol esters on transmitter release and calcium currents at frog motor nerve endings. *J Physiol* 501 (Pt 1):41-48.
- Richmond JE, Weimer RM, Jorgensen EM (2001) An open form of syntaxin bypasses the requirement for UNC-13 in vesicle priming. *Nature* 412:338-341.

- Riessland M, Ackermann B, Forster A, Jakubik M, Hauke J, Garbes L, Fritzsche I, Mende Y, Blumcke I, Hahnen E, Wirth B (2010) SAHA ameliorates the SMA phenotype in two mouse models for spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 19:1492-1506.
- Rochette CF, Gilbert N, Simard LR (2001) SMN gene duplication and the emergence of the SMN2 gene occurred in distinct hominids: SMN2 is unique to *Homo sapiens*. *Hum Genet* 108:255-266.
- Rosato Siri MD, Uchitel OD (1999) Calcium channels coupled to neurotransmitter release at neonatal rat neuromuscular junctions. *J Physiol* 514 (Pt 2):533-540.
- Rossoll W, Jablonka S, Andreassi C, Kroning AK, Karle K, Monani UR, Sendtner M (2003) Smn, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of beta-actin mRNA in growth cones of motoneurons. *J Cell Biol* 163:801-812.
- Ruggiu M, McGovern VL, Lotti F, Saieva L, Li DK, Kariya S, Monani UR, Burghes AH, Pellizzoni L (2012) A role for SMN exon 7 splicing in the selective vulnerability of motor neurons in spinal muscular atrophy. *Mol Cell Biol* 32:126-138.
- Ruiz R, Casanas JJ, Sudhof TC, Tabares L (2008) Cysteine string protein-alpha is essential for the high calcium sensitivity of exocytosis in a vertebrate synapse. *Eur J Neurosci* 27:3118-3131.
- Ruiz R, Casanas JJ, Torres-Benito L, Cano R, Tabares L (2010) Altered intracellular Ca²⁺ homeostasis in nerve terminals of severe spinal muscular atrophy mice. *J Neurosci* 30:849-857.
- Ruiz R, Tabares L (2014) Neurotransmitter release in motor nerve terminals of a mouse model of mild spinal muscular atrophy. *J Anat* 224:74-84.
- Russman BS (2007) Spinal muscular atrophy: clinical classification and disease heterogeneity. *J Child Neurol* 22:946-951.
- Saal L, Briese M, Kneitz S, Glinka M, Sendtner M (2014) Subcellular transcriptome alterations in a cell culture model of spinal muscular atrophy point to widespread defects in axonal growth and presynaptic differentiation. *Rna* 20:1789-1802.
- Sanchez G, Dury AY, Murray LM, Biondi O, Tadesse H, El Fatimy R, Kothary R, Charbonnier F, Khandjian EW, Cote J (2013) A novel function for the

- survival motoneuron protein as a translational regulator. *Hum Mol Genet* 22:668-684.
- Sanes JR, Lichtman JW (1999) Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu Rev Neurosci* 22:389-442.
- Schivell AE, Batchelor RH, Bajjalieh SM (1996) Isoform-specific, calcium-regulated interaction of the synaptic vesicle proteins SV2 and synaptotagmin. *J Biol Chem* 271:27770-27775.
- Schivell AE, Mochida S, Kensel-Hammes P, Custer KL, Bajjalieh SM (2005) SV2A and SV2C contain a unique synaptotagmin-binding site. *Mol Cell Neurosci* 29:56-64.
- Schmid A, DiDonato CJ (2007) Animal models of spinal muscular atrophy. *J Child Neurol* 22:1004-1012.
- Schotten S, Meijer M, Walter AM, Huson V, Mamer L, Kalogreades L, ter Veer M, Ruiten M, Brose N, Rosenmund C, Sorensen JB, Verhage M, Cornelisse LN (2015) Additive effects on the energy barrier for synaptic vesicle fusion cause supralinear effects on the vesicle fusion rate. *eLife* 4:e05531.
- Schrank B, Gotz R, Gunnensen JM, Ure JM, Toyka KV, Smith AG, Sendtner M (1997) Inactivation of the survival motor neuron gene, a candidate gene for human spinal muscular atrophy, leads to massive cell death in early mouse embryos. *PNAS USA* 94:9920-9925.
- Searl TJ, Silinsky EM (2003) Phorbol esters and adenosine affect the readily releasable neurotransmitter pool by different mechanisms at amphibian motor nerve endings. *J Physiol* 553:445-456.
- Sebastiao AM, Ribeiro JA (1990) Interactions between adenosine and phorbol esters or lithium at the frog neuromuscular junction. *Br J Pharmacol* 100:55-62.
- Seng CO, Magee C, Young PJ, Lorson CL, Allen JP (2015) The SMN structure reveals its crucial role in snRNP assembly. *Hum Mol Genet* 24:2138-2146.
- Shapira R, Silberberg SD, Ginsburg S, Rahamimoff R (1987) Activation of protein kinase C augments evoked transmitter release. *Nature* 325:58-60.
- Sheng ZH, Rettig J, Cook T, Catterall WA (1996) Calcium-dependent interaction of N-type calcium channels with the synaptic core complex. *Nature* 379:451-454.

- Simic G, Seso-Simic D, Lucassen PJ, Islam A, Krsnik Z, Cviko A, Jelasic D, Barisic N, Winblad B, Kostovic I, Kruslin B (2000) Ultrastructural analysis and TUNEL demonstrate motor neuron apoptosis in Werdnig-Hoffmann disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 59:398-407.
- Singh J, Salcius M, Liu SW, Staker BL, Mishra R, Thurmond J, Michaud G, Mattoon DR, Printen J, Christensen J, Bjornsson JM, Pollok BA, Kiledjian M, Stewart L, Jarecki J, Gurney ME (2008) DcpS as a therapeutic target for spinal muscular atrophy. *ACS Chem Biol* 3:711-722.
- Singh NK, Singh NN, Androphy EJ, Singh RN (2006) Splicing of a critical exon of human Survival Motor Neuron is regulated by a unique silencer element located in the last intron. *Mol Cell Biol* 26:1333-1346.
- Sivanesan S, Howell MD, Didonato CJ, Singh RN (2013) Antisense oligonucleotide mediated therapy of spinal muscular atrophy. *Transl Neurosci* 4.
- Soler-Botija C, Ferrer I, Gich I, Baiget M, Tizzano EF (2002) Neuronal death is enhanced and begins during foetal development in type I spinal muscular atrophy spinal cord. *Brain* 125:1624-1634.
- Strasswimmer J, Lorson CL, Breiding DE, Chen JJ, Le T, Burghes AH, Androphy EJ (1999) Identification of survival motor neuron as a transcriptional activator-binding protein. *Hum Mol Genet* 8:1219-1226.
- Sugiura Y, Ko CP (1997) Novel modulatory effect of L-type calcium channels at newly formed neuromuscular junctions. *J Neurosci* 17:1101-1111.
- Sumner CJ, Huynh TN, Markowitz JA, Perhac JS, Hill B, Coover DD, Schussler K, Chen X, Jarecki J, Burghes AH, Taylor JP, Fischbeck KH (2003) Valproic acid increases SMN levels in spinal muscular atrophy patient cells. *Ann Neurol* 54:647-654.
- Szabo Z, Obermair GJ, Cooper CB, Zamponi GW, Flucher BE (2006) Role of the synprint site in presynaptic targeting of the calcium channel CaV2.2 in hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 24:709-718.
- Talbot K, Ponting CP, Theodosiou AM, Rodrigues NR, Surtees R, Mountford R, Davies KE (1997) Missense mutation clustering in the survival motor neuron gene: a role for a conserved tyrosine and glycine rich region of the protein in RNA metabolism? *Hum Mol Genet* 6:497-500.

- Tan TC, Valova VA, Malladi CS, Graham ME, Berven LA, Jupp OJ, Hansra G, McClure SJ, Sarcevic B, Boadle RA, Larsen MR, Cousin MA, Robinson PJ (2003) Cdk5 is essential for synaptic vesicle endocytosis. *Nat Cell Biol* 5:701-710.
- Thomson SR, Nahon JE, Mutsaers CA, Thomson D, Hamilton G, Parson SH, Gillingwater TH (2012) Morphological characteristics of motor neurons do not determine their relative susceptibility to degeneration in a mouse model of severe spinal muscular atrophy. *PLoS one* 7:e52605.
- Ting CH, Lin CW, Wen SL, Hsieh-Li HM, Li H (2007) Stat5 constitutive activation rescues defects in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 16:499-514.
- Tomizawa K, Ohta J, Matsushita M, Moriwaki A, Li ST, Takei K, Matsui H (2002) Cdk5/p35 regulates neurotransmitter release through phosphorylation and downregulation of P/Q-type voltage-dependent calcium channel activity. *J Neurosci* 22:2590-2597.
- Tomizawa K, Sunada S, Lu YF, Oda Y, Kinuta M, Ohshima T, Saito T, Wei FY, Matsushita M, Li ST, Tsutsui K, Hisanaga S, Mikoshiba K, Takei K, Matsui H (2003) Cophosphorylation of amphiphysin I and dynamin I by Cdk5 regulates clathrin-mediated endocytosis of synaptic vesicles. *J Cell Biol* 163:813-824.
- Torres-Benito L (2012b) Función de la Proteína de Supervivencia de Motoneuronas (SMN) en la Maduración Funcional y Organización Sináptica en un Modelo Murino de Atrofia Muscular Espinal. En: Departamento de Fisiología Médica y Biofísica. Facultad de Medicina. Universidad de Sevilla.
- Torres-Benito L, Neher MF, Cano R, Ruiz R, Tabares L (2011) SMN requirement for synaptic vesicle, active zone and microtubule postnatal organization in motor nerve terminals. *PLoS One* 6:e26164.
- Torres-Benito L, Ruiz R, Tabares L (2012a) Synaptic defects in SMA animal models. *Dev Neurobiol*.
- Tsai MS, Chiu YT, Wang SH, Hsieh-Li HM, Li H (2006a) Abolishing Trp53-dependent apoptosis does not benefit spinal muscular atrophy model mice. *Eur J Hum Genet* 14:372-375.

- Tsai MS, Chiu YT, Wang SH, Hsieh-Li HM, Lian WC, Li H (2006b) Abolishing Bax-dependent apoptosis shows beneficial effects on spinal muscular atrophy model mice. *Mol Ther* 13:1149-1155.
- Urbano FJ, Pagani MR, Uchitel OD (2008) Calcium channels, neuromuscular synaptic transmission and neurological diseases. *J Neuroimmunol* 201-202:136-144.
- Urbano FJ, Piedras-Renteria ES, Jun K, Shin HS, Uchitel OD, Tsien RW (2003) Altered properties of quantal neurotransmitter release at endplates of mice lacking P/Q-type Ca²⁺ channels. *PNAS USA* 100:3491-3496.
- Van Meerbeke JP, Gibbs RM, Plasterer HL, Miao W, Feng Z, Lin MY, Rucki AA, Wee CD, Xia B, Sharma S, Jacques V, Li DK, Pellizzoni L, Rusche JR, Ko CP, Sumner CJ (2013) The DcpS inhibitor RG3039 improves motor function in SMA mice. *Hum Mol Genet* 22:4074-4083.
- Virmani T, Ertunc M, Sara Y, Mozhayeva M, Kavalali ET (2005) Phorbol esters target the activity-dependent recycling pool and spare spontaneous vesicle recycling. *J Neurosci* 25:10922-10929.
- Wan QF, Zhou ZY, Thakur P, Vila A, Sherry DM, Janz R, Heidelberger R (2010) SV2 acts via presynaptic calcium to regulate neurotransmitter release. *Neuron* 66:884-895.
- Wang MM, Janz R, Bellizaire R, Frishman LJ, Sherry DM (2003) Differential distribution and developmental expression of synaptic vesicle protein 2 isoforms in the mouse retina. *J Comp Neurol* 460:106-122.
- Wang, L.Y., Neher, E. and Taschenberger, H. (2008) Synaptic vesicles in mature calyx of Held synapses sense higher nanodomain calcium concentrations during action potential-evoked glutamate release. *J Neurosci*, 28, 14450-14458.
- Wang X, Pinter MJ, Rich MM (2010) Ca²⁺ dependence of the binomial parameters p and n at the mouse neuromuscular junction. *J Neurophysiol* 103:659-666.
- Wen H, Linhoff MW, McGinley MJ, Li GL, Corson GM, Mandel G, Brehm P (2010) Distinct roles for two synaptotagmin isoforms in synchronous and asynchronous transmitter release at zebrafish neuromuscular junction. *PNAS USA* 107:13906-13911.

- Werning G (1894) Die frL~hinfantile progressive spinale Amyotrophie. Arch Psychiat 26:706-744.
- Wirth B (2000) An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA). Hum Mutat 15:228-237.
- Wu YJ, Tejero R, Arancillo M, Vardar G, Korotkova T, Kintscher M, Schmitz D, Ponomarenko A, Tabares L, Rosenmund C (2015) Syntaxin 1B is important for mouse postnatal survival and proper synaptic function at the mouse neuromuscular junctions. J Neurophysiol jn 00577 02015.
- Xu J, Mashimo T, Sudhof TC (2007) Synaptotagmin-1, -2, and -9: Ca(2+) sensors for fast release that specify distinct presynaptic properties in subsets of neurons. Neuron 54:567-581.
- Xu T, Bajjalieh SM (2001) SV2 modulates the size of the readily releasable pool of secretory vesicles. Nat Cell Biol 3:691-698.
- Yan Z, Chi P, Bibb JA, Ryan TA, Greengard P (2002) Roscovitine: a novel regulator of P/Q-type calcium channels and transmitter release in central neurons. J Physiol 540:761-770.
- Yao J, Nowack A, Kensel-Hammes P, Gardner RG, Bajjalieh SM (2010) Cotrafficking of SV2 and synaptotagmin at the synapse. J Neurosci 30:5569-5578.
- Yokoyama CT, Myers SJ, Fu J, Mockus SM, Scheuer T, Catterall WA (2005) Mechanism of SNARE protein binding and regulation of Cav2 channels by phosphorylation of the synaptic protein interaction site. Mol Cell Neurosci 28:1-17.
- Young PJ, Man NT, Lorson CL, Le TT, Androphy EJ, Burghes AH, Morris GE (2000) The exon 2b region of the spinal muscular atrophy protein, SMN, is involved in self-association and SIP1 binding. Hum Mol Genet 9:2869-2877.
- Young SM, Jr., Neher E (2009) Synaptotagmin has an essential function in synaptic vesicle positioning for synchronous release in addition to its role as a calcium sensor. Neuron 63:482-496.
- Zou T, Yang X, Pan D, Huang J, Sahin M, Zhou J (2011) SMN deficiency reduces cellular ability to form stress granules, sensitizing cells to stress. Cell Mol Neurobiol 31:541-550.

ANEXOS

ANEXO I

Tabla I. Valores promedios ($\pm s. e. m.$) del contenido cuántico en ausencia y en presencia de bloqueantes de los canales de Ca^{2+} tipo P/Q y tipo N

Genotipo	Condición	Contenido cuántico	n, N	% reducción	p
Control	- ω -aga	7,47 \pm 0,9	13, 4	98***	< 0,0005
	+ ω -aga	0,18 \pm 0,1	15, 4		
	- ω -cono	6 \pm 1,04	7, 2	63*	0,03
	+ ω -cono	2,24 \pm 1,1	6,2		
SMNΔ7	- ω -aga	4,51 \pm 0,8	13, 4	86***	< 0,0005
	+ ω -aga	0,63 \pm 0,2	21, 4		
	- ω -cono	4,00 \pm 0,5	11, 2	72*	0,01
	+ ω -cono	2,88 \pm 0,7	9, 2		

Tabla II. Valores promedios ($\pm s. e. m.$) de las áreas correspondientes al marcaje de los canales de Ca^{2+} tipo P/Q (por unidad de superficie postsináptica) en las NMJ del músculo TVA de ratones controles y mutantes

Genotipo	Área P/Q / área postsináptica	n, N	% reducción	p
Control	0,23 \pm 0,01	66, 4	36 \pm 3***	< 0,0005
SMNΔ7	0,15 \pm 0,01	60, 4		

Tabla III. Valores promedios de la amplitud de EPP, mEPP, contenido cuántico y parámetros binomiales p_r y n en función de la concentración de Ca^{2+} extracelular en los ratones controles y mutantes

<u>Control</u>	Amplitud EPP (mV) $\bar{x} \pm \text{sem} (n, N)$	Amplitud mEPP (mV) $\bar{x} \pm \text{sem} (n, N)$	Contenido cuántico $\bar{x} \pm \text{sem} (n, N)$	p_r $\bar{x} \pm \text{sem} (n, N)$	n $\bar{x} \pm \text{sem} (n, N)$
[Ca²⁺]_e(mM)					
0,2	0,67 ± 0,41 (22, 4)	2,78 ± 0,21 (17, 4)	0,28 ± 0,17 (22, 4)		
0,5	2,30 ± 0,85 (14, 3)	2,49 ± 0,35 (14, 3)	1,29 ± 0,52 (14, 3)		
0,75	7,39 ± 1,15 (18, 2)	2,15 ± 0,15 (18, 2)	3,59 ± 0,58 (18, 2)	0,37 ± 0,09 (8, 2)	20,20 ± 6,61 (8, 2)
1	14,04 ± 1,05 (109, 19)	1,91 ± 0,06 (109, 19)	7,37 ± 0,45 (109, 19)	0,39 ± 0,02 (74, 19)	33,33 ± 4,63 (74, 19)
1,5	23,65 ± 2,00 (31, 4)	2,20 ± 0,14 (31, 4)	11,81 ± 1,04 (31, 4)	0,38 ± 0,04 (22, 4)	47,31 ± 12,20 (22, 4)
2	38,06 ± 2,86 (62, 8)	2,20 ± 0,09 (62, 8)	17,23 ± 1,03 (62, 8)	0,43 ± 0,03 (47, 8)	69,61 ± 13,50 (47, 8)
3	37,68 ± 4,94 (30, 5)	1,92 ± 0,15 (30, 5)	19,09 ± 2,11 (30, 5)	0,47 ± 0,05 (25, 5)	76,67 ± 23,27 (25, 5)

<u>SMNΔ7</u>	Amplitud EPP (mV) $\bar{x} \pm \text{sem} (n, N)$	Amplitud mEPP (mV) $\bar{x} \pm \text{sem} (n, N)$	Contenido cuántico $\bar{x} \pm \text{sem} (n, N)$	p_r $\bar{x} \pm \text{sem} (n, N)$	n $\bar{x} \pm \text{sem} (n, N)$
[Ca²⁺]_e(mM)					
0,75	0,06 ± 0,02 (34, 6)	2,36 ± 0,25 (13, 6)	0,71 ± 0,19 (26, 6)		
1	11,97 ± 0,58 (116, 19)	2,93 ± 0,11 (116, 19)	4,49 ± 0,23 (116, 19)	0,31 ± 0,02 (77, 19)	25,49 ± 3,97 (77, 19)
1,5	14,63 ± 1,61 (31, 6)	2,82 ± 0,16 (31, 6)	5,40 ± 0,59 (31, 6)	0,34 ± 0,03 (21, 6)	19,03 ± 2,58 (21, 6)
2	19,07 ± 2,03 (21, 4)	2,23 ± 0,18 (21, 4)	8,79 ± 0,70 (21, 4)	0,51 ± 0,07 (14, 4)	20,78 ± 3,42 (14, 4)
3	19,53 ± 3,03 (15, 3)	2,63 ± 0,32 (15, 3)	7,85 ± 1,01 (15, 3)	0,58 ± 0,09 (15, 3)	19,51 ± 7,31 (15, 3)

Tabla IV. Valores promedios del número total de cuantos liberados ($\pm s.e.m.$) en función de la frecuencia de estimulación y la concentración extracelular de Ca^{2+} en los ratones controles y mutantes tras 100 estímulos

Control		0,5 Hz			20 Hz		
		Cuantos totales	n, N	p	Cuantos totales	n, N	p
[Ca ²⁺] _e	1 mM	802 ± 93	32, 7	***	832 ± 75	60, 7	***
	2 mM	2226 ± 138	60, 7	<0,0005	1562 ± 69	60, 7	<0,0005
SMN Δ 7		0,5 Hz			20 Hz		
		Cuantos totales	n, N	p	Cuantos totales	n, N	p
[Ca ²⁺] _e	1 mM	599 ± 63	30, 9	***	799 ± 65	30, 9	0,394
	2 mM	975 ± 103	24, 5	<0,0005	779 ± 124	24, 5	

Tabla V. Valores promedios ($\pm s.e.m.$) de las áreas correspondientes al marcaje de las distintas isoformas de SV2 en las NMJ del músculo TVA en ratones controles y mutantes (P9-11)

Proteína	Genotipo	Área SV2- / área postsináptica	n, N	% reducción	P
SV2A	Control	0,28 ± 0,01	61, 4	42 ± 4***	< 0,0005
	SMN Δ 7	0,16 ± 0,01	61, 4		
SV2B	Control	0,44 ± 0,02	60, 4	83 ± 2***	< 0,0005
	SMN Δ 7	0,07 ± 0,01	62, 4		
SV2C	Control	0,47 ± 0,02	43, 3	51 ± 4***	< 0,0005
	SMN Δ 7	0,23 ± 0,02	37, 3		

Tabla VI. Valores promedios ($\pm s. e. m.$) de las áreas correspondientes al marcaje de Syt1 o Syt2 en la NMJ del músculo TVA en ratones controles y SMA (P9-11)

Proteína	Genotipo	Área Syt- / área postsináptica	n, N	% de cambio	p
Syt1	Control	0,02 \pm 0,004	65, 4	640 \pm 91***	< 0,0005
	SMN Δ 7	0,10 \pm 0,01	73, 4		
Syt2	Control	0,29 \pm 0,01	67, 5	-63 \pm 3***	< 0,0005
	SMN Δ 7	0,11 \pm 0,01	52, 5		

Tabla VII. Valores promedios ($\pm s. e. m.$) de las áreas correspondientes al marcaje de SV2B en las NMJ de los músculos OIA y diafragma en ratones controles y SMA (P9-11)

Músculo	Genotipo	Área SV2B / área postsináptica	n, N	% reducción	p
OIA	Control	0,43 \pm 0,02	41, 3	70 \pm 4***	< 0,0005
	SMN Δ 7	0,13 \pm 0,02	39, 3		
Diafragma	Control	0,33 \pm 0,02	46, 3	28 \pm 5***	< 0,0005
	SMN Δ 7	0,24 \pm 0,02	49, 3		

Tabla VIII. Valores promedios ($\pm s. e. m.$) de las áreas correspondientes al marcaje de Syt1 y Syt2 en las NMJ del diafragma en ratones controles y SMA (P9-11)

Proteína	Genotipo	Área Syt- / área postsináptica	n, N	% reducción	p
Syt1	Control	0,26 \pm 0,02	43, 3	20 \pm 6***	< 0,0005
	SMN Δ 7	0,20 \pm 0,01	39, 3		
Syt2	Control	0,19 \pm 0,02	43, 3	45 \pm 4***	< 0,0005
	SMN Δ 7	0,10 \pm 0,01	39, 3		

Tabla IX. Valores promedios ($\pm s. e. m.$) de las áreas correspondientes al marcaje de Syt1 y Syt2 en las NMJ del músculo OIA en ratones controles y SMA (P9-11)

Proteína	Genotipo	Área Syt- / área postsináptica	n, N	% de cambio	p
Syt1	Control	0,06 \pm 0,02	37, 3	49 \pm 17***	< 0,0005
	SMN Δ 7	0,09 \pm 0,01	34, 3		
Syt2	Control	0,21 \pm 0,02	37, 3	-67 \pm 4***	< 0,0005
	SMN Δ 7	0,07 \pm 0,01	34, 3		

Tabla X. Valores promedios ($\pm s. e. m.$) de las áreas correspondientes al marcaje de SV2B, Syt1 y Syt2 en las NMJ del músculo TVA en ratones controles y SMA (P3)

Proteína	Genotipo	Área pre- / área postsináptica	n, N	% reducción	p
SV2B	Control	0,38 \pm 0,02	48, 3	45 \pm 4***	< 0,0005
	SMN Δ 7	0,21 \pm 0,02	46, 3		
Syt1	Control	0,22 \pm 0,02	42, 3	37 \pm 4***	< 0,0005
	SMN Δ 7	0,14 \pm 0,01	41, 3		
Syt2	Control	0,17 \pm 0,01	43, 3	76 \pm 5***	< 0,0005
	SMN Δ 7	0,04 \pm 0,01	41, 3		

Tabla XI. Valores promedios ($\pm s. e. m.$) de las áreas correspondientes al marcaje de Stx1B en las NMJ del músculo TVA en ratones controles y SMA (P9-11)

Genotipo	Área Stx1B / área postsináptica	n, N	% reducción	p
Control	0,77 \pm 0,02	43, 3	3 \pm 4	0,72
SMN Δ 7	0,75 \pm 0,03	39, 3		

Tabla XII. Valores promedios ($\pm s. e. m.$) de las áreas correspondientes al marcaje de Syt7 en las NMJ del músculo TVA en ratones controles y SMA (P9-11)

Genotipo	Área Syt7 / área postsináptica	n, N	% reducción	p
Control	0,54 \pm 0,03	31, 2	5 \pm 9	0,21
SMN Δ 7	0,51 \pm 0,05	19, 2		

Tabla XIII. Cambios en el área postsináptica ($\bar{x} \pm s. e. m.$) de las NMJ en el músculo TVA durante las dos primeras semanas de vida

Edad	Genotipo	Área postsináptica (μm^2)	n, N	% reducción	p
P3	Control	94 \pm 3	89, 3	6 \pm 3	0,23
	SMN Δ 7	88 \pm 3	87, 3		
P9-11	Control	132 \pm 2	410, 20	24 \pm 1***	< 0,0005
	SMN Δ 7	100 \pm 2	388, 20		

Tabla XIV. Áreas postsinápticas ($\bar{x} \pm s. e. m.$) de las NMJ en el músculo TVA de ratones controles y SMA del modelo taiwanés (P7)

Genotipo	Área post. (μm^2)	n, N	% reducción	p
Heterocigoto	123 \pm 3	92, 3	20 \pm 3***	< 0,0005
Taiwanés	98 \pm 3	89, 3		

Tabla XV. Valores promedios ($\pm s. e. m.$) de las áreas correspondientes al marcaje de SV2B, Syt1 y Syt2 en las NMJ del músculo TVA en ratones controles y SMA del modelo taiwanés (P7)

Proteína	Genotipo	Pre- / área postsináptica	n, N	% de cambio	p
SV2B	Heterocigoto	0,36 \pm 0,01	45, 3	-48 \pm 3***	< 0,0005
	Taiwanés	0,19 \pm 0,01	45, 4		
Syt1	Heterocigoto	0,04 \pm 0,01	46, 3	205 \pm 25***	< 0,0005
	Taiwanés	0,07 \pm 0,01	45, 3		
Syt2	Heterocigoto	0,29 \pm 0,01	46, 3	-38 \pm 5***	< 0,0005
	Taiwanés	0,18 \pm 0,01	45, 3		

Tabla XVI. Valores promedios ($\pm s. e. m.$) de la amplitud de los EPP, mEPP y del contenido cuántico en ausencia y en presencia S-roscovitina (a distinta concentración) en los terminales motores del músculo TVA en ratones controles (P9-11)

[S-roscovitina]	Amplitud EPP (mV)	Amplitud mEPP (mV)	Contenido cuántico	n, N	p
0 μM	6,4 \pm 0,9	1,3 \pm 0,1	5,1 \pm 0,8	12, 2	0,006*
10 μM	3,8 \pm 1,1	1,1 \pm 0,2	3,4 \pm 0,9	5, 1	
50 μM	3,9 \pm 0,5	1,6 \pm 0,1	2,4 \pm 0,3	16, 2	
100 μM	2,9 \pm 0,9	1,7 \pm 0,2	2,1 \pm 0,7	9, 2	
lavado	7,79 \pm 2	2,3 \pm 0,4	3,4 \pm 0,1	5, 1	

Tabla XVII. Valores promedio ($\pm s. e. m.$) de la amplitud de los EPP, mEPP y del contenido cuántico en ausencia y en presencia de ω -agatoxina y R-roscovitina en las NMJ de ratones controles (P9-11)

	Amplitud EPP (mV)	Amplitud mEPP (mV)	Contenido cuántico	n, N	p
- ω -agatoxina	13,6 \pm 1,3	3,4 \pm 0,4	4,6 \pm 1	21, 3	<0,0005***
+ ω -agatoxina	0,1 \pm 0,05	1,25 \pm 0,2	0,25 \pm 0,1*	15, 3	
ω -aga + R-roscovitina	0,03 \pm 0,01	0,95 \pm 0,1	0,1 \pm 0,05*	8, 2	

Tabla XVIII. Valores promedios ($\pm s. e. m.$) de la amplitud de los EPP, mEPP y del contenido cuántico en ausencia y en presencia de ω -agatoxina y R-roscovitina en los terminales motores del músculo TVA en ratones controles y SMN Δ 7 (P9-11)

<u>Control</u>	Amplitud EPP (mV)	Amplitud mEPP (mV)	Contenido cuántico	n, N	p
- R-roscovitina	11,3 \pm 1,5	1,9 \pm 0,2	5,7 \pm 0,5	18, 3	<0,0005***
+ R-roscovitina	25,6 \pm 3,6	2,3 \pm 0,2	10,5 \pm 0,9	23, 3	
R-rosc. + ω -aga.	0,16 \pm 0,1	1,5 \pm 0,2	0,14 \pm 0,1	19, 3	
<u>SMNΔ7</u>	Amplitud EPP (mV)	Amplitud mEPP (mV)	Contenido cuántico	n, N	p
- R-roscovitina	12,5 \pm 1,4	3,5 \pm 0,3	3,8 \pm 0,5	18, 3	<0,0005***
+ R-roscovitina	47,2 \pm 5,6	4,3 \pm 0,5	11,3 \pm 1	21, 3	
R-rosc.+ ω -aga.	1,8 \pm 0,4	3,2 \pm 0,3	0,6 \pm 0,1	27, 3	

Tabla XIX. Proporción de respuestas evocadas dobles en ausencia y en presencia de R-roscovitina en el músculo TVA de ratones controles y mutantes (P9-11)

Genotipo	[R-roscovitina]	Fibras con EPP dobles	Total fibras registradas	Fibras con EPP dobles / total fibras	p
Control	0 μ M	4	42	0,07	<0,001**
	100 μ M	28	58	0,48	
SMN Δ 7	0 μ M	8	36	0,22	<0,001**
	100 μ M	20	30	0,67	

Tabla XX. Valores medios (\pm s.e.m) de la amplitud de EPP y mEPP, frecuencia de mEPP, contenido cuántico y parámetros binomiales (p_r y n) en los terminales controles y mutantes en ausencia y en presencia de PDBu, músculo TVA (P9-11)

Genotipo	Control		SMN Δ 7	
Condición	-PDBu	+PDBu	-PDBu	PDBu
EPP (mV)	11,1 \pm 1,1	26,5 \pm 2,8	9,8 \pm 1,2	30,4 \pm 6
n, N	31, 5	33, 5	29, 5	31, 5
p	< 0,0005***		< 0,0005***	
mEPP (mV)	1,76 \pm 0,1	2,12 \pm 0,1	2,68 \pm 0,2	3,25 \pm 0,3
n, N	31, 5	33, 5	29, 5	31, 5
p	0,38		0,56	
Frec. mEPP (min⁻¹)	3,5 \pm 0,5	31,9 \pm 8,5	3,7 \pm 0,6	14,1 \pm 2,5
n, N	31, 5	33, 5	29, 5	31, 5
p	< 0,0005***		< 0,0005***	
Contenido cuántico	6,4 \pm 0,6	12,6 \pm 1,2	3,85 \pm 0,4	8,2 \pm 1,03
n, N	31, 5	33, 5	29, 5	31, 5
p	< 0,0005***		< 0,0005***	
p_r	0,3 \pm 0,04	0,2 \pm 0,03	0,4 \pm 0,04	0,3 \pm 0,1
n, N	17, 5	21, 5	16, 5	11, 5
p	0,09		0,35	
n	42,7 \pm 14,3	121,8 \pm 30	23,4 \pm 14,5	79,4 \pm 45,3
n, N	17, 5	21, 5	16, 5	11, 5
p	0,004**		0,009*	

Tabla XXI. Número total de cuantos liberados (\pm s.e.m) en situación control y en presencia de PDBu en función de la frecuencia de estimulación en los ratones controles y SMN Δ 7

Control				
Frecuencia	0,5 Hz		20 Hz	
Condición	- PDBu	+ PDBu	- PDBu	+ PDBu
Cuantos totales	660 \pm 59	1248 \pm 114	777 \pm 103	834 \pm 126
n, N	35, 5	34, 5	15, 3	17, 3
p	< 0,0005***		0,85	
SMN Δ 7				
Frecuencia	0,5 Hz		20 Hz	
Condición	- PDBu	+ PDBu	- PDBu	+ PDBu
Cuantos totales	522 \pm 73	797 \pm 87	774 \pm 123	935 \pm 216
n, N	36, 5	36, 5	8, 3	10, 3
p	0,01**		0,53	

Tabla XXII. Valores medios (\pm s.e.m) de la amplitud de los EPP, mEPP, frecuencia de mEPP, contenido cuántico y p_r y n en los terminales control y mutantes en ausencia y en presencia de PDBu (músculo TVA, P9-11)

Genotipo	Control		SMN Δ 7	
Condición	-PDBu	+PDBu	-PDBu	+PDBu
EPP (mV)	46,2 \pm 4,4	68,7 \pm 5,3	32,3 \pm 3,6	49,4 \pm 8
n, N	63, 5	55, 5	39, 5	30, 5
p	< 0,0005***		0,17	
mEPP (mV)	1,99 \pm 0,1	2,14 \pm 0,1	2,64 \pm 0,1	2,57 \pm 0,1
n, N	63, 5	55, 5	29, 5	30, 5
p	0,39		0,89	
Frec. mEPP (min⁻¹)	10,8 \pm 2,5	68,9 \pm 10,2	5,9 \pm 0,6	20,6 \pm 1,9
n, N	63, 5	55, 5	39, 5	30, 5
p	< 0,0005***		< 0,0005***	
C. cuántico	22,3 \pm 1,6	32,1 \pm 1,9	11,46 \pm 0,9	18,1 \pm 2,2
n, N	63, 5	33, 5	39, 5	30, 5
p	< 0,0005***		0,02*	
p_r	0,5 \pm 0,03	0,6 \pm 0,04	0,41 \pm 0,06	0,46 \pm 0,1
n, N	50, 5	42, 5	16, 5	12, 5
p	0,31		0,79	
n	71,8 \pm 14,6	114,2 \pm 27,4	27,8 \pm 5,2	40,1 \pm 8,2
n, N	50, 5	42, 5	16, 5	12, 5
p	0,01*		0,26	

Tabla XXIII. Valores medios (\pm s.e.m) de la amplitud de EPP y mEPP, frecuencia de mEPP, contenido cuántico y p_r y n en los terminales controles y mutantes en ausencia y en presencia de nifedipina

Genotipo	Control		SMN Δ 7	
	-Nif.	+Nif.	-Nif.	+Nif.
EPP (mV)	13,6 \pm 1,6	21,8 \pm 2,2	9,7 \pm 1,02	17,6 \pm 2,1
n, N	33, 5	38, 5	24, 4	28, 4
p	0,003**		< 0,0005***	
mEPP (mV)	1,8 \pm 0,1	1,54 \pm 0,1	2,7 \pm 0,2	2,4 \pm 0,1
n, N	33, 5	38, 5	24, 4	28, 4
p	0,08		0,26	
Frec. mEPP (min⁻¹)	4,1 \pm 1,3	114,2 \pm 19,2	4,3 \pm 0,5	28,4 \pm 7,1
n, N	33, 5	38, 5	24, 4	28, 4
p	< 0,0005***		< 0,0005***	
C. cuántico	7,7 \pm 0,7	15,2 \pm 1,5	3,3 \pm 0,6	8,1 \pm 1
n, N	33, 5	38, 5	24, 4	28, 4
p	< 0,0005***		0,002**	
p_r	0,3 \pm 0,05	0,51 \pm 0,1	0,3 \pm 0,04	0,2 \pm 0,04
n, N	18, 5	31, 5	15, 4	19, 4
p	0,02*		0,63	
n	43,4 \pm 9,6	41,1 \pm 6,6	20,1 \pm 3,9	62,8 \pm 18,9
n, N	18, 5	31, 5	15, 4	19, 4
p	0,60		0,006*	

Tabla XXIV. Número total de cuantos liberados (\pm s.e.m) en situación control y en presencia de nifedipina en función de la frecuencia de estimulación en los ratones control (músculo TVA, P9-11)

Control				
Frecuencia	0,5 Hz		20 Hz	
Condición	Control	Nifedipina	Control	Nifedipina
Cuantos totales	747 \pm 65	1229 \pm 89	944 \pm 145	1383 \pm 160
n, N	33, 5	28, 5	12, 3	24, 3
p	< 0,0005***		0,05*	
SMNΔ7				
Frecuencia	0,5 Hz		20 Hz	
Condición	Control	Nifedipina	Control	Nifedipina
Cuantos totales	430 \pm 48	806 \pm 91	719 \pm 72	711 \pm 72
n, N	24, 4	28, 4	17, 4	21, 4
p	0,002**		0,86	

ANEXO II

A continuación, se detalla una lista de los productos (excepto los anticuerpos y moduladores ya especificados en el Apartado de Materiales y Métodos), de los aparatos y material quirúrgico utilizados para la realización de este trabajo.

Productos

Uso	Producto	Casa Comercial	Referencia
Extracción de ADN, PCR y electroforesis	EDTA	Fluka	3677
	NaOH	Sigma	S8045
	Tris	Roche	3573826001
	Cebadores	Sigma-Aldrich	
	MyTaq DNA polymerase	Bioline	21105
	Agarosa	Labotaq	E5000
	Taq Polimerasa	Biotools	10043
Solución Extracelular	NaCl	Sigma-Aldrich	S7653
	NaHCO ₃	Sigma-Aldrich	S8875
	KCl	Sigma-Aldrich	P5405
	MgCl ₂	Sigma-Aldrich	M2670
	CaCl ₂	Sigma-Aldrich	C3881
	Glucosa	Sigma-Aldrich	G7528
Electrofisiología	DMSO	Sigma-Aldrich	D5789
	μ-conotoxina GIIB	Alomone	C-270
	Elástomero de silicona	Dow Corning Corporation	184
Inmunofluorescencia	Albúmina de suero bovino (BSA)	Sigma-Aldrich	A7906
	Glicina	Sigma-Aldrich	G7126
	Paraformaldehído	Sigma-Aldrich	P6148
	Tampón fosfato salino (PBS)	Sigma-Aldrich	P4417
	Triton X-100	Sigma-Aldrich	T8787

Aparatos

Aparato	Modelo	Marca
Microscopio estereoscópico	SMZ 1500	Nikon
Microscopio de transmisión directa	BX50WI	Olympus
Microscopio confocal	FV1000	Olympus
Micromanipulador	MHW-3	Narishige
Estimulador generador de pulsos aislados	2100	A-M systems
Estirador de vidrio horizontal	P-97	Sutter Instrument Co.
Mesa Antivibratoria		Newport
pHmetro	Basic20	Crison
Osmómetro	5500 VPO	Wiescor
Termociclador		Biometra
Termomixer		Eppendorf
Agitador orbital		Biosan
Balanza	P5360 Delta Range	Mettler

Material quirúrgico

Material	Casa comercial	Referencia
Tijeras gruesas disección		FST 15000-12
Tijeras pequeñas disección		FST 15000-10
Pinzas gruesas (número 3)	Dumont Biology	
Pinzas finas (número 55)	Dumont Biology	
Pinzas superfinas (5SF)	Dumont Biology	FST-11252-00