



UNIVERSIDAD DE SEVILLA. FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA MÉDICA Y BIOFÍSICA

**FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA DE SUPERVIVENCIA DE
MOTONEURONAS (SMN) EN LA MADURACIÓN
FUNCIONAL Y ORGANIZACIÓN SINÁPTICA EN UN
MODELO MURINO DE ATROFIA MUSCULAR
ESPINAL**

TESIS DOCTORAL

Laura Torres Benito

Sevilla, 2012



DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA MÉDICA Y BIOFÍSICA
FACULTAD DE MEDICINA. UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Avda. Sánchez Pizjuán, 4. 41009. Sevilla

Dña. Lucía Tabares Domínguez, Catedrática y Profesora Titular, adscrita al Departamento de Fisiología Médica y Biofísica de la Universidad de Sevilla.

CERTIFICA:

Que Dña. Laura Torres Benito ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “Función de la Proteína de Supervivencia de Motoneuronas (SMN) en la Maduración Funcional y Organización Sináptica en un Modelo Murino de Atrofia Muscular Espinal”, que presenta para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Fdo. Lucía Tabares Domínguez

Sevilla a de Septiembre de 2012

A mi Familia

A todos aquellos que también son mi familia

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos:

- Defining targets for therapeutics in Spinal Muscular Atrophy (University of Seville - Genoma España) (2007-2010)
- Proyecto de Investigación de Excelencia. Junta de Andalucía (Convocatoria 2006) P06-CVI-02392.
- Proyecto de Investigación de Excelencia. Junta de Andalucía (Convocatoria 2009) P09-CVI-4862.
- Programa Nacional de Proyectos de Investigación Fundamental no Orientada. Papel del Citoesqueleto y de la Mitocondria en la Patogenia de la Atrofia Muscular Espinal. Ministerio de Ciencia e Innovación. BFU2010-21648.

ÍNDICE

PUBLICACIONES	1
RESUMEN	5
ABREVIATURAS	7
INTRODUCCIÓN	10
1. Fisiología de las motoneuronas	12
1.1. Las motoneuronas.	12
1.2. La unión neuromuscular.	15
1.3. Maduración de la NMJ.	17
1.3.1. Terminal postsináptico.	18
1.3.2. Terminal presináptico.	19
2. Enfermedades de las motoneuronas	21
2.1. Esclerosis lateral amiotrófica.	21
2.2. Atrofia muscular bulbar y espinal.	24
2.3. Atrofia muscular espinal con distrofia respiratoria.	26
2. Atrofia Muscular Espinal	28
2.1. Genética de la Atrofia Muscular Espinal	29
2.2. La proteína Smn	32
2.3. Modelos animales de AME	36
2.3.1. <i>Caenorhabditis elegans.</i>	36
2.3.2. <i>Drosophila melanogaster.</i>	38
2.3.3. <i>Xenopus laevis</i> y <i>Xenopus tropicalis.</i>	40
2.3.4. Pez Cebra (<i>Danio rerio</i>).	41
2.3.5. Ratón (<i>Mus musculus</i>).	42
2.4. Perspectivas terapéuticas	48

OBJETIVOS	54
MATERIALES Y MÉTODOS	58
1. Modelos animales	60
2. Preparaciones neuromusculares	61
2.1. Disección del músculo <i>Transversus abdominis</i> (TVA).	62
2.2. Disección del músculo <i>Levator auris longus</i> (LAL).	63
3. Inmunohistoquímica	64
3.1. Fijación del tejido y lavado.	64
3.2. Bloqueo y permeabilización del tejido.	64
3.3. Incubación con anticuerpo primario.	65
3.4. Incubación con anticuerpo secundario.	65
3.5. Montaje del tejido.	66
4. Adquisición y análisis de imágenes	67
4.1. Análisis del área postsináptica.	70
4.2. Análisis de las vesículas sinápticas.	70
4.3. Análisis del número y distribución de zonas activas (bassoon).	70
4.4. Análisis del área ocupada por las zonas activas (piccolo).	71
4.5. Análisis del área de otros elementos del terminal presináptico.	71
4.6. Análisis de F-actina presináptica.	71
5. Electrofisiología	72
5.1. Registro intracelular.	72
5.2. Análisis de datos.	78

RESULTADOS	80
1. Modelo SMNΔ7	82
1.1. Características generales.	82
1.1.1. Peso corporal.	83
1.1.2. Supervivencia.	84
1.2. Organización sináptica.	84
1.2.1. Terminal postsináptico.	85
1.2.2. Terminal presináptico.	87
A. Anomalías en la distribución de las vesículas sinápticas en los terminales SMNΔ7.	87
B. VACHT y SV2 colocalizan en los terminales presinápticos de AME.	91
C. Afectación selectiva de los terminales motores en el LAL.	92
D. Las zonas activas están reducidas y no homogéneamente distribuidas en los terminales motores de ratones SMNΔ7.	96
E. La acumulación de neurofilamentos en el terminal presináptico es posterior al defecto vesicular.	99
H. El área presináptica de los terminales motores SMNΔ7.	103
I. Inmadurez en la distribución de los microtúbulos en los terminales SMNΔ7.	106
J. La proteína MAP-1B podría estar implicada en el fenotipo de los microtúbulos en los terminales SMNΔ7.	109
1.3. Estudio funcional.	112
1.3.1. Amplitud y frecuencia de los potenciales espontáneos.	112
1.3.2. La cinética de los potenciales de placa evocados está enlentecida en los terminales SMNΔ7.	114
1.3.3. La amplitud de la respuesta evocada no está disminuida en los terminales motores de SMNΔ7 pero sí la liberación de neurotransmisor.	115
1.3.4. La respuesta a pulsos pareados no está alterada en los terminales SMNΔ7.	117

1.3.5. El tratamiento con R-roscovitina a baja concentración no afecta a la liberación de neurotransmisor.	118
1.3.6. La R-roscovitina a alta concentración aumenta la frecuencia de la liberación espontánea, la amplitud de los EPPs y el contenido cuántico en los terminales motores.	121
1.3.7. La R-roscovitina modifica la respuesta a pulsos pareados en los terminales del modelo SMN Δ 7.	123
1.3.9. El efecto de la R-roscovitina a alta concentración no se debe a un efecto subyacente del DMSO.	124
2. Modelo SMA-PLS3.....	125
1.1. Efecto de la PLS3 sobre el tamaño del terminal postsináptico.	125
1.2. La sobreexpresión de PLS3 aumenta las vesículas sinápticas.	126
1.3. Piccolo se encuentra disminuida en los terminales SMA incrementándose con la sobreexpresión de PLS3.	132
1.4. La actina se encuentra alterada en los terminales SMA.	135
DISCUSIÓN -----	140
Funciones de la proteína SMN.....	143
Calcio y transmisión sináptica. R-roscovitina.....	148
Genes modificadores. Plastina 3.....	152
CONCLUSIONES -----	156
BIBLIOGRAFÍA -----	162
ANEXOS -----	176

PUBLICACIONES

Publicaciones durante el período doctoral

Como primera autora

Torres- Benito L, Neher MF, Cano R, Ruiz R and Tabares L. (2011) SMN requirement for synaptic vesicle, active zone and microtubule postnatal organization in motor nerve terminals. PLoS One. 2011; 6(10):e26164.

Torres- Benito L, Ruiz R and Tabares L. (2012) Synaptic defects in SMA animal models. Developmental Neurobiology. 2012 Jan;72(1):126-33.

Torres-Benito L, Tejero R, Ruiz R y Tabares L. (2012). Atrofia Muscular Espinal. Fisiología. Boletín informativo de la SECF.

Otras publicaciones

Ruiz R, Casañas JJ, Torres-Benito L, Cano R, Tabares L. (2010) Altered intraterminal Ca^{2+} in motor synapses of severe Spinal Muscular Atrophy mice. The Journal of Neuroscience. 2010 Jan 20;30(3):849- 57.

Raquel Cano, Laura Torres-Benito, Rocío Tejero, Anca I. Biea, Rocío Ruiz, William J. Betz, and Lucía Tabares. Structural and Functional Maturation of Active Zones in Large Synapses. Accepted in *Molecular Neurobiology*.

Bastian Ackermann, Sandra Kröber, Laura Torres Benito, Anke Borgmann, Seyyed Mohsen Hosseini Barkoobe, Rocio Tejero, Mirjam Jakubik, Julia Schreml, Janine Milbradt, Thomas Wunderlich, Markus Riessland, Lucia Tabares, Brunhilde Wirth. Platin 3 ameliorates spinal muscular atrophy via delayed axonal pruning and improved neuromuscular junction functionality. Sended to *Neuron*.

Contribuciones a congresos

Presentaciones orales

Ruiz R, Casañas JJ, Torres-Benito L, Cano R, Tabares L. *Analysis of Synaptic Transmission in Severe and Mild SMA Mouse Models*. 13th Annual International Spinal Muscular Atrophy Research Group Meeting Cleveland, Ohio. 2009.

Torres-Benito L. y Tabares L. *Desarrollo de una nueva herramienta para estudiar la función presináptica*. VI Encuentros Atlánticos de Neurociencia, A Coruña 2009.

Yáñez-Muñoz, Rafael J; Peluffo, Hugo; Foster, Edmund; Ahmed, Sherif; Lago, Natalia; Yip, Ping; Hutson, Thomas; Moon, Lawrence; Wanisch, Klaus; Torres-Benito, Laura; Ruiz, Rocío; Casañas, Juan José; Tabares, Lucía; Caraballo, Victor; Lladó, Jerònia; Oliván, Sara; Osta, Rosario; McMahon, Stephen B. *Integration deficient lentiviral vectors (IDLVs) transduce spinal cord efficiently in vitro and in vivo*. 14th Annual International Spinal Muscular Atrophy Research Group Meeting. Santa Clara CA, 2010.

Laura Torres-Benito, Margret Neher, Rocio Ruiz, Raquel Cano, Lucia Tabares. *SMN es esencial para la organización del terminal motor presináptico en un modelo murino*

de AME. XIV Congreso Nacional Sociedad Española de NeuroCiencia (SENC). Salamanca, 28 – 30 Sept 2011.

Torres-Benito, L., Tejero, R., Ruiz, R., Tabares, L. SMN deficiency disrupts presynaptic organization. Anatomical Society and Sociedad Anatómica Española Joint Summer meeting. Royal College of Surgeons, Edinburgh, Scotland, UK, July 2012.

Posters

Torres-Benito L. y Tabares L. *Desarrollo de una nueva herramienta para estudiar la función presináptica*. VI Encuentros Atlánticos de Neurociencia, A Coruña 2009.

Torres-Benito L, Ruiz R, Tabares L. *Desarrollo de una nueva herramienta para el estudio de la función presináptica*. XIII Congreso Sociedad Española de Neurociencia (SENC). Tarragona, 2009.

Torres-Benito L, Ruiz R, Tabares L. *Synaptic expression of vAChT-pHluorin in septal neurons*. International Workshop Active Zones as Organizers of Neuronal Communication. Baeza 2009.

Ruiz R, Casañas JJ, Torres-Benito L, Cano R, Tabares L. *Altered intraterminal Ca²⁺ in motor synapses of severe Spinal Muscular Atrophy mice*. International Workshop Active Zones as Organizers of Neuronal Communication. Baeza 2009.

Casañas JJ, Ruiz R, Cano R, Torres-Benito L, Tabares L. *Maturation analysis of synaptic terminals in severe spinal muscular atrophy mice*. 14th Annual International Spinal Muscular Atrophy Research Group Meeting. Santa Clara CA, 2010.

Torres-Benito L, Ruiz R, Tabares L. *The acetylcholine transporter as a reporter of synaptic activity*. IV Spanish Portuguese Biophysical Congress. Zaragoza 2010.

Torres-Benito L, Ruiz R, Montes MA, Alvarez de Toledo G, Tabares L. *Synaptic vesicle expression of VACHT-pHluorin in septal neurons*. Seventh Cajal Winter Conference. Synaptic Mechanism. Benasque, Huesca (Spain). March 2011.

Torres-Benito L, Neher M, Ruiz R, Cano R, Tabares L. *Essential function of SMN in differentiation of the presynaptic mouse motor terminal*. 15th Annual International Spinal Muscular Atrophy Research Group Meeting. Lake Buena Vista, Florida. June 2011.

Laura Torres-Benito y Lucia Tabares. *Maturation and synaptic organization of the neuromuscular junction in a Spinal Muscular Atrophy mouse model*. First EUSynapse Alumni Meeting. Seville (Spain). 18-20 May 2012.

Rocío Tejero, Laura Torres-Benito, Lucia Tabares. *Deficiency in Survival Motor Neuron protein alters the organization of actin filaments in nerve terminals*. First EUSynapse Alumni Meeting. Seville (Spain). 18-20 May 2012.

RESUMEN

La Atrofia Muscular Espinal (AME) es una enfermedad autosómica recesiva caracterizada por debilidad muscular y deterioro de la transmisión sináptica y pérdida de motoneuronas inferiores. La proteína SMN (*Survival Motor Neuron*) está codificada por dos genes: *SMN1*, que produce la proteína completa (SMN-FL), y *SMN2*, que mayoritariamente produce una forma truncada de SMN (SMN Δ 7) y una pequeña cantidad de proteína completa. En ausencia de *SMN1*, la severidad de la enfermedad depende de la cantidad de proteína completa producida por *SMN2*, que depende, a su vez, del número de copias de este gen en cada individuo.

SMN se expresa ubicuamente en todos los tejidos, localizándose tanto en el citoplasma como en el núcleo celular. Su función mejor caracterizada es su participación en el ensamblaje de las ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (snRNPs), que forman parte del espliceosoma. Sin embargo, los bajos niveles de SMN afectan principalmente a las motoneuronas que inervan músculos proximales, por lo que el papel específico de SMN en las motoneuronas no se conoce.

Recientemente, se ha postulado sobre la existencia de genes modificadores de SMN, tales como el gen que codifica la plastina 3 (PLS3). Esta proteína se une a monómeros de actina y promueve la formación de filamentos de actina. Dado que la actina participa en funciones tan diversas e importantes como la axonogénesis o la transmisión sináptica, la PLS3 debe desempeñar un papel importante en la organización de este componente del citoesqueleto.

El objetivo del presente trabajo ha sido, por un lado, investigar las alteraciones estructurales en los terminales motores y la capacidad de los terminales motores de modular la liberación de neurotransmisor, y por otro, la capacidad de la Plastina-3 (PLS3) de rescatar la patología sináptica. Para ello, se ha realizado un estudio morfológico y funcional en el modelo murino de AME SMA Δ 7. Se ha explorado la madurez del terminal postsináptico, la organización de las vesículas sinápticas y las zonas activas de ratones controles y mutantes en el *Transversus abdominis* (TVA), uno de los músculos más afectados en la enfermedad. También hemos estudiado la distribución de vesículas sinápticas en el *Levator auris longus* (LAL), un músculo principalmente rápido con dos regiones estructurales y funcionales. Además, se han investigado diferentes elementos del citoesqueleto (neurofilamentos y microtúbulos), así como una proteína de unión relacionada con dicho citoesqueleto, MAP-1B. Estas observaciones han sido combinadas con registros electrofisiológicos para explorar la liberación de neurotransmisor, la cinética de los potenciales evocados y la eficacia sináptica en los terminales motores de SMA Δ 7.

Hemos demostrado que los bajos niveles de SMN causan inmadurez en los terminales presinápticos, que se manifiesta en una disminución de la cantidad de vesículas sinápticas y mantenimiento de la distribución inmadura de las mismas (agrupaciones) y disminución de las zonas activas. Además, mostramos que SMN es esencial para la completa maduración del citoesqueleto ya su déficit produce un incremento de estructuras inmaduras en los neurofilamentos, distribución reticular de la tubulina y disminución en el contenido de actina. A nivel funcional demostramos que a pesar que los terminales motores de los ratones mutantes la liberación de neurotransmisor está reducida (~35%), los terminales son capaces de aumentar la liberación de neurotransmisor en presencia de R-roscovitina. Hemos demostrado, así mismo, la capacidad de rescate de las alteraciones estructurales de los terminales motores de la sobreexpresión de plastina-3 (PLS3), evidenciada por el aumento en el contenido de vesículas sinápticas, de zonas activas y de F-actina en el terminal presináptico de ratones mutantes.

Estos datos sugieren que SMN es esencial para la maduración de los terminales motores nerviosos, y que la interrupción de la arquitectura presináptica y el déficit en la transmisión sináptica observada en estos ratones deficientes en SMN podría ser la causa de la degeneración de la sinapsis. Sin embargo, el mecanismo por el cual SMN regula la maduración sináptica permanece aún sin determinar.

ABREVIATURAS

ACh: acetilcolina.

AMBE: atrofia muscular bulbar y espinal.

AME: atrofia muscular espinal.

AMEDR: atrofia muscular espinal con dificultad respiratoria.

AR: receptor andrógeno (*Androgen Receptor*).

BSA: albúmina de suero bovino (*Bovine Serum Albumin*).

BTX: bungarotoxina.

BTX-Rho: bungarotoxina conjugada con rodamina.

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

DMSO: dimetil sulfóxido. Por sus propiedades para atravesar membranas lipídicas se usa para diluir agentes químicos.

ELA: esclerosis lateral amiotrófica.

EPP: potencial de placa evocado (*Evoked Endplate Potential*).

ESE: potenciadores exónicos del corte y empalme (*Exonic Splicing Enhancers*).

ESS: silenciadores exónicos del corte y empalme (*Exonic Splicing Silencers*).

FF: unidades motoras tipo rápidas fatigable (*Fast-twitch Fatigables*).

FR: unidades motoras tipo rápidas resistentes (*Fast-twitch Resistant*).

HET: heterocigoto, usado como control en el modelo murino taiwanés de AME.

KO: ratón noqueado (*knock out*); aunque este término hace referencia al proceso de anulación de la expresión de un gen específico, solemos usarlo para referirnos a los ratones en los que se ha llevado a cabo este proceso.

LAL: músculo elevador de la oreja (*Levator auris longus*).

MAP-1B: proteína asociada a microtúbulos 1B (*Microtubule Associated Protein*).

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

MO: morfolino, técnica en la que se usa ARN antisentido contra una proteína determinada.

NA: apertura numérica (*Numerical Aperture*).

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

NF: neurofilamento.

NMJ: union neuromuscular (*NeuroMuscular Junction*).

OCT: medio de inserción para muestras de tejidos congelados para asegurar la temperatura óptica de corte (*Optical Cutting Temperature*)

P7 –P14: día postnatal 7 ó 14.

PBS: tampón salino de fosfato.

PFA: paraformaldehído.

PLS3: proteína plastina 3.

QC: contenido cuántico (*Quantal Content*).

ROS: especies reactivas del oxígeno (*Reactive Oxygen Species*).

RRP: contingente de vesículas sinápticas listas para ser liberadas (*Readily Releaseable Pool*).

S: unidades motoras tipo lentas (*Slow-twitch*).

SMN: gen de supervivencia de motoneuronas humano (*Survival MotorNeuron*); **SMN:** proteína producida por dicho gen. Cuando se indica como *Smn* o *Smn*, se refiere al gen y la proteína en modelos animales.

SMN Δ 7: hace referencia a los ratones que son homocigotos para la anulación del gen SMN. También hace referencia al transgen a cuya secuencia le falta el exón 7.

snRNP: Ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (*Small Nuclear RiboNucleoProteins*).

SOD1: superóxido dismutasa 1.

SV: vesículas sinápticas.

SV2: proteína 2 de la vesícula sináptica.

TM: temperatura de fusión de los oligonucleótidos (*Temperature of Melting*).

TVA: músculo transverso abdominal (*Transversus abdominis*).

U.a.f.: unidades absolutas de fluorescencia.

UPR: respuesta de ubiquitinación de proteínas (*Upstream Protein Response*).

VACHT: transportador vesicular de la acetilcolina (*Vesicular Acetilcholine Transporter*).

Vm: Potencial de la membrana plasmática.

WT: tipo silvestre o control (*Wild Type*).

INTRODUCCIÓN

Fisiología de las motoneuronas

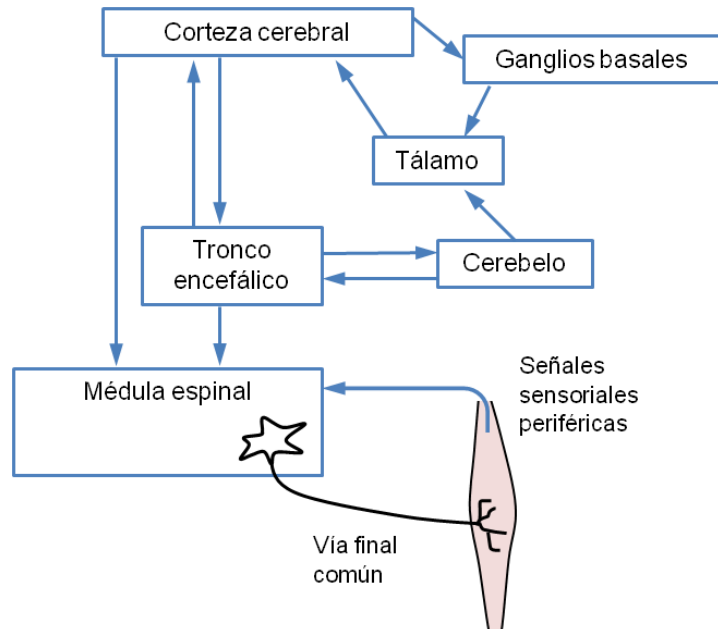
El tejido muscular es responsable tanto de la interacción del cuerpo con el medio exterior como de muchas de las funciones internas del organismo. Existen tres tipos diferentes de musculatura: la musculatura lisa, que controla el movimiento de los órganos internos, la musculatura cardíaca, responsable del funcionamiento del corazón y la musculatura esquelética, encargada de los movimientos voluntarios. Todas las actividades que se realizan, desde levantar una pieza pesada, correr, saltar, a maniobras más precisas como la manipulación de objetos pequeños o el movimiento de los ojos, están coordinados por el sistema motor. Estos movimientos son posibles gracias a la compleja interacción entre los músculos y el sistema nervioso que los controla.

Las motoneuronas

La manera por la cual el sistema nervioso controla el grado de contracción del músculo esquelético es, en último término, a través de las motoneuronas espinales y troncoencefálicas, por eso se les denomina vía final común (concepto introducido por Sherrington en 1906; (Sherrington, 1906). Las fibras aferentes que influirán en la vía final común proceden de tres lugares: receptores sensoriales, los núcleos del tronco del encéfalo y la corteza cerebral (Fig. 1). Las motoneuronas superiores tienen su soma en la corteza cerebral y van a hacer contactos sinápticos con neuronas de la médula espinal y el tronco del encéfalo. Los somas de las motoneuronas inferiores inervan los músculos esqueléticos y se encuentran en el asta anterior de la médula espinal organizadas en columnas y en grupos, para una mayor coordinación espacial de sus funciones. Inicialmente, durante el desarrollo, las motoneuronas de un mismo grupo se generan en abundancia, pero su número final está modulado por diferentes factores de supervivencia, por lo que cantidad inicial de motoneuronas disminuye (Oppenheim et al., 1989); (Pettmann and Henderson, 1998). Existen dos tipos de motoneuronas, (1) las motoneuronas γ , que inervan las fibras musculares intrafusales e intervienen en la elongación del músculo, y (2) las motoneuronas α , que inervan las fibras musculares extrafusales y son

responsables de la contracción voluntaria del músculo esquelético y del tono muscular.

Figura 1. El sistema nervioso central (SNC) ejerce su acción sobre la musculatura esquelética a través de la vía final común. Las motoneuronas de la vía final común integran las señales sensoriales periféricas y la información que llega desde la corteza cerebral y el tronco encefálico. Modificado de *Fisiología Médica*. R.A. Rhoades y G.A. Tanner (MASSON-Little, Brown. Barcelona, España)



Una motoneurona α , su axón y las fibras musculares que inerva constituyen una *unidad motora*, término introducido en 1925 por Liddell y Sherrington (Liddell and Sherrington, 1925). El número de fibras musculares que contiene cada unidad motora varía considerablemente y constituye la razón de inervación. Así, los músculos que realizan movimientos finos tienen una razón de inervación baja y los que realizan movimientos toscos presentan una razón alta. Las unidades motoras también difieren en las propiedades fisiológicas. Las propiedades de cada motoneurona están asociadas con las propiedades fisiológicas y bioquímicas de las fibras musculares (Tabla 1), siendo todas homogéneas en la misma unidad motora. Las unidades motoras se clasifican en tres tipos (Burke et al., 1973):

- Lentas (*slow-twitch*, tipo S), con fibras musculares tipo I que se contraen y relajan lentamente. Las fibras musculares tienen alto contenido en mioglobina y están muy vascularizadas, por tanto tienen un aspecto rojo. Poseen gran número de mitocondrias y utilizan el metabolismo oxidativo. Son más resistentes a la fatiga y están especializadas en contracciones mantenidas.

Estas fibras están inervadas por motoneuronas que disparan a baja frecuencia y tienen velocidad de conducción lenta.

- Rápidas fatigables (*fast-twitch*, tipo FF), con fibras musculares tipo IIb que se contraen y relajan rápidamente cuando se estimulan. Tienen bajo contenido en mioglobina y están poco vascularizadas, lo que les da un color pálido. Tienen pocas mitocondrias y dependen de la glucólisis y la glucogénesis para la obtención de energía. Se fatigan rápidamente y están preparadas para una actividad intensa y de corta duración. Estas fibras están inervadas por motoneuronas que disparan a alta frecuencia y que tienen velocidad de conducción rápida.
- Rápidas resistentes (tipo FR), con fibras musculares tipo IIa, presentan características intermedias entre los dos tipos anteriores.

Tabla 1. Propiedades contráctiles de las fibras musculares. Modificado de *Fisiología*. Berne y Levy (Elsevier Mosby, Madrid, España)

Tipo	Velocidad	Fuerza	Fatigabilidad	Unidad motora
I	Lenta	Débil	Resistente a la fatiga	S
IIb	Rápida	Fuerte	Fatigable	FF
IIa	Rápida	Intermedia	Resistente a la fatiga	FR

El sistema nervioso gradúa la fuerza de contracción por dos mecanismos fundamentalmente, a través del reclutamiento de unidades motoras, y mediante el aumento de la frecuencia de disparo de las motoneuronas. El reclutamiento de unidades motoras se basa en el principio del tamaño de Henneman (Henneman et al., 1965) por el que las neuronas con menor cuerpo celular tienen umbrales para la activación sináptica más bajos y son reclutadas por señales aferentes débiles. Al aumentar la intensidad de las entradas, se reclutan progresivamente motoneuronas mayores, con un umbral más alto, lo que hace que aumente la fuerza de contracción. El otro mecanismo para graduar la contracción muscular es el aumento de la tasa de disparo de las motoneuronas. Si la fibra muscular se activa por potenciales de acción sucesivos a intervalos menores que el tiempo que necesita el músculo para

relajarse de nuevo, la fuerza que genera cada pulso, se suma a la anterior, hasta alcanzar un máximo de fuerza. Por tanto, el tamaño de la unidad motora y la composición de fibras rápidas y lentas determinan la fuerza que va a realizar un músculo concreto.

La unión neuromuscular

Las fibras musculares del músculo esquelético están inervadas por fibras nerviosas mielinizadas procedentes de motoneuronas situadas en la médula espinal. La transferencia de señales entre la fibra nerviosa y la muscular se lleva a cabo en la unión neuromuscular (NMJ). La NMJ está compuesta por (1) las ramificaciones terminales de un axón nervioso, cubiertas por una o más células de Schwann, que constituye el elemento o terminal presináptico, (2) la membrana muscular que se encuentra inmediatamente bajo los terminales axónicos, que es el llamado elemento o terminal postsináptico y (3) el espacio que queda entre ellos de unos 20-30 nm de anchura, que se denomina hendidura sináptica (Fig. 2).

En el citoplasma del terminal nervioso se encuentran las vesículas sinápticas, que contienen el neurotransmisor acetilcolina (ACh) y toda la maquinaria necesaria para que se produzca la fusión de estas vesículas con la membrana plasmática. En la NMJ madura, la membrana de la fibra muscular se encuentra invaginada en el lugar donde se aproximan el terminal presináptico y el postsináptico. Además, en esta invaginación existen numerosos pliegues denominados hendiduras subneurales que aumentan el área de la membrana donde van a estar situados los receptores de ACh.

Un potencial de acción se propaga por el axón hasta llegar al terminal presináptico produciendo la entrada de calcio extracelular en el terminal a través de los canales de calcio dependientes de voltaje, esta entrada origina la fusión de las vesículas sinápticas con la membrana plasmática. La ACh liberada a la hendidura sináptica se une a los receptores nicotínicos del terminal postsináptico, lo que causa la apertura de estos canales iónicos, que son permeables tanto a iones sodio como a iones potasio. El flujo neto de iones

que se produce, debido al gradiente de concentración y al gradiente eléctrico, es una corriente transmembrana de Na^+ hacia el interior del terminal postsináptico (corriente de placa; Fig. 2). El resultado es una despolarización transitoria en la placa motora que se llama potencial de placa (EPP, del inglés *end plate potential*). La amplitud de la despolarización de la placa terminal varía con la cantidad de neurotransmisor liberado y con el número de receptores colinérgicos activados. El potencial de placa generado es normalmente suficientemente grande para provocar en la membrana la apertura de los canales de Na^+ dependientes de voltaje, lo que origina un potencial de acción (Fig. 2). Este potencial de acción desencadena la serie de eventos que finalmente causa la contracción de la fibra muscular.

La contracción muscular puede bloquearse mediante toxinas o fármacos como la tubocurarina. La D-tubocuranina es un alcaloide procedente de la planta *Chondrodendron tomentosum*, y es antagonista de los receptores nicotínicos. Bloquea la unión de la ACh a su receptor, impidiendo que el canal se abra y se produzca el potencial de placa y, por tanto, el potencial de acción. Otra molécula que impide la contracción muscular es la μ -conotoxina, péptido neurotóxico que procede de los caracoles marinos del género *Conus*. Su acción inhibitoria la realiza sobre los canales de Na^+ dependientes de voltaje del músculo, lo que impide que se produzca el potencial de acción muscular, sin que afecte la generación del potencial de acción en la fibra nerviosa. Sin embargo, al no impedir que la ACh se una a los receptores postsinápticos, permite que se produzca el potencial de placa que puede ser registrado electrofisiológicamente.

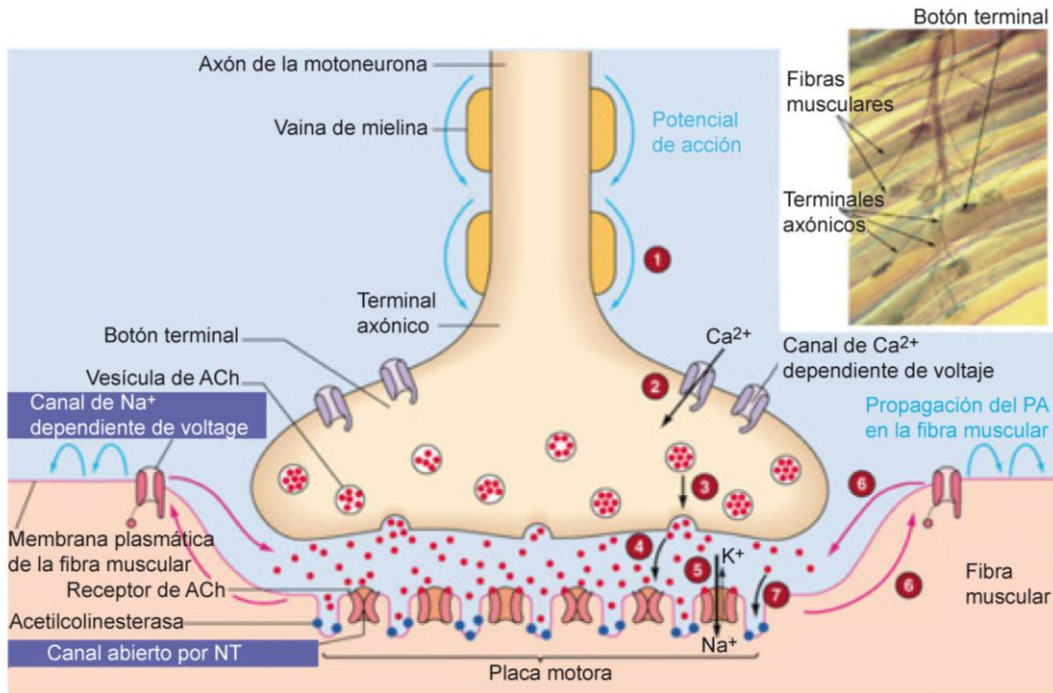


Figura 2. Esquema general de la NMJ. El terminal axónico contiene las vesículas sinápticas, las cuales liberan el neurotransmisor a la hendidura sináptica. Justo debajo, la membrana de la fibra muscular posee los receptores de ACh en la membrana de la placa motora, cuya apertura va a desencadenar un cambio de voltaje que producirá un potencial de placa por la entrada de Na^+ y, finalmente, un potencial de acción. Modificado de <http://www.colorado.edu/intphys/Class/IPHY3430-200/image/figure7m.jpg>.

Maduración de la NMJ

La maduración de la sinapsis motora es un proceso necesario debido al aumento en la demanda funcional en esta sinapsis, ya que las fibras musculares crecen, y los animales requieren respuestas rápidas sin sacrificar la precisión de su sistema motor. Los cambios durante la maduración se producen a diferentes niveles: a nivel postsináptico cambia la forma y la topografía de la membrana plasmática, la matriz extracelular y las características funcionales de los receptores de ACh, y a nivel presináptico los terminales son más eficaces, los axones motores se mielinizan y se produce la eliminación sináptica de ramas axonales.

Terminal postsináptico

En las últimas etapas del desarrollo embrionario en vertebrados el número de receptores de ACh en la membrana de la fibra muscular aumenta y se van concentrando en agregados en forma de placa (Sanes and Lichtman, 1999). En el momento del nacimiento, la consolidación es completa y los receptores de ACh forman una placa ovoide bien delimitada. Durante las dos primeras semanas de vida, se va perdiendo densidad de receptores en regiones determinadas de esta placa, lo que modela una serie de ramas que tienen apariencia de *pretzel* (Steinbach, 1981).

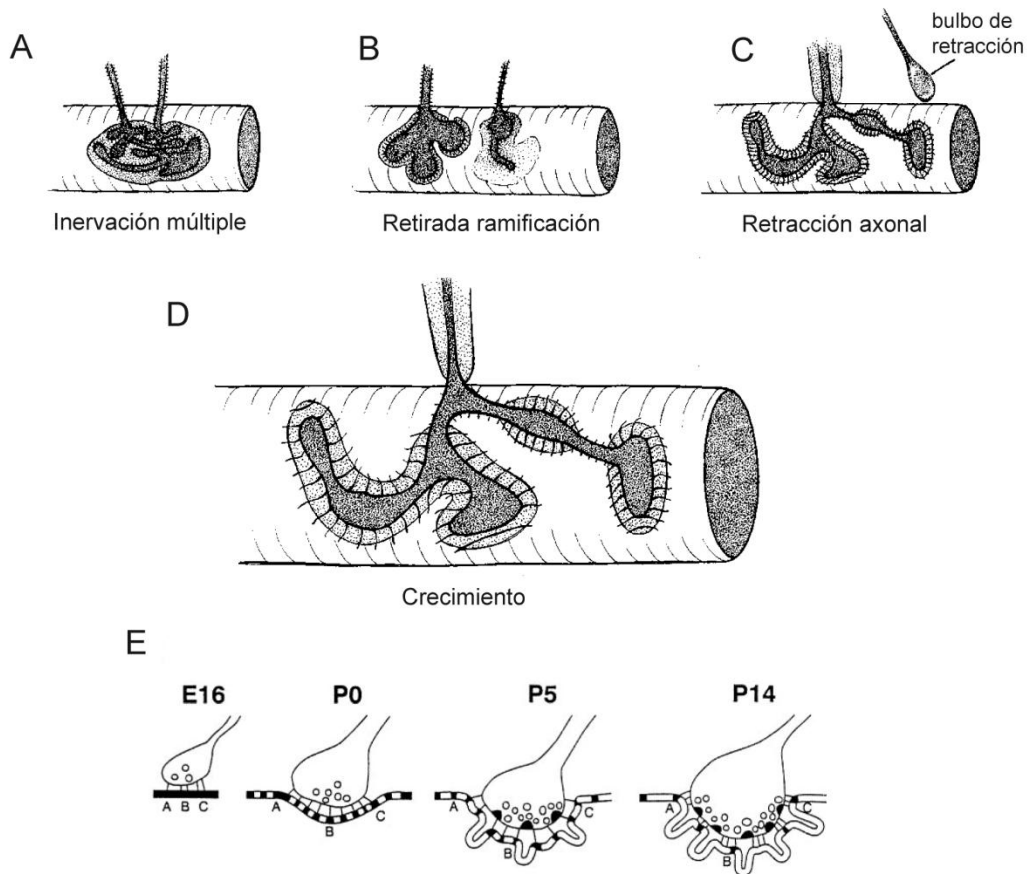


Figura 3. Maduración de la unión neuromuscular. **A.** Fibra muscular inervada por dos axones y terminal postsináptico con forma de placa ovoide. **B.** Eliminación de uno de los contactos sinápticos. **C.** Formación del bulbo de retracción axonal y mielinización del axón nervioso. **D.** Apariencia de la NMJ madura. **E.** Vista transversal de la NMJ donde se observan los cambios topográficos en el terminal postsináptico. Modificado de Sanes y Litchman, 1999.

A su vez, la superficie de la membrana postsináptica, que es relativamente plana en la sinapsis embrionaria, se hunde en el lugar de contacto con la fibra nerviosa. En esta depresión comienzan a formarse una serie de invaginaciones llamadas hendiduras subneurales o pliegues y que se encuentran justo bajo de las zonas activas del terminal nervioso (Fig. 3E). En la NMJ de rata, los pliegues tienen $\sim 0.1 \mu\text{m}$ de anchura, $\sim 1 \mu\text{m}$ de profundidad y están espaciados en intervalos de 1 a $3 \mu\text{m}$ (Sanes and Lichtman, 2001). Al mismo tiempo, los receptores de ACh se localizan principalmente en las crestas de los pliegues, mientras que los canales de Na^+ dependientes de voltaje se encuentran principalmente en las depresiones (Flucher and Daniels, 1989; Caldwell, 2000). Estos cambios aumentan el área de contacto entre el nervio y el músculo y aumenta la densidad de los receptores de ACh en los sitios de liberación del neurotransmisor. Los cambios en la forma del aparato postsináptico están acompañados de numerosas alteraciones de su arquitectura molecular. La más conocida es la sustitución de los receptores de ACh embrionarios que contienen una subunidad γ en su estructura por receptores que contienen una subunidad ϵ homóloga. La diferencia funcional entre ambos receptores radica en la cinética y la conductancia de las subunidades γ y ϵ (Villarroel and Sakmann, 1996).

La matriz extracelular juega un papel importante en este proceso. Moléculas de la lámina basal como la laminina que contienen las subunidades $\alpha 4$, $\alpha 5$ y $\beta 2$, el colágeno IV (cadenas $\alpha 1/2$ y $\alpha 3-6$) o el colágeno XIII, participan en la diferenciación de los terminales, la maduración y el mantenimiento de la NMJ (Fox et al., 2007; Nishimune et al., 2008; Latvanlehto et al., 2010).

Terminal presináptico

En vertebrados, la mayoría de las fibras musculares se encuentran inervadas por varios axones durante las primeras etapas del desarrollo postnatal. Durante este periodo se va a producir la eliminación sináptica, por la cual el terminal motor va a quedar finalmente inervado por un solo axón. Sólo las fibras que generan potenciales de acción en respuesta a la estimulación

nerviosa sufren eliminación sináptica, mientras que las fibras musculares tónicas retienen múltiples axones (Porter and Baker, 1996).

Anatómicamente, el proceso de eliminación ocurre como una pérdida de ramas axónicas, que separándose de la placa motora y formando un bulbo de retracción finalmente elimina el contacto con el terminal postsináptico (Fig. 3A, 3B y 3C). Existe una competición entre las fibras nerviosas que inervan una misma fibra muscular, de tal forma que la que sostenga una mayor actividad va a ser la que finalmente se mantenga en la NMJ; esta selección se conoce con el nombre de competición *Hebbian* (Sanes and Lichtman, 1999). Una de las cuestiones más importantes es la naturaleza de las señales que median esta competición, por lo que existen diferentes mecanismos para explicarla. Por una parte, los músculos liberan una cantidad limitada de factores de mantenimiento por los cuales los axones tendrían que competir. Se ha demostrado que muchos factores que producen las fibras musculares retrasan la retracción de los axones (factor inhibitorio de la leukina, BDNF, CNTF, FGF-2, IGF-1, GDNF, entre otros; (Sanes and Lichtman, 1999). Otro modelo postula que la localización precisa de ciertos factores o sustancias en la placa motora favorecen el establecimiento de un axón frente a otro. De hecho, los niveles de receptores de ACh, rapsina y utropina empiezan a descender en los sitios donde se pierde la sinapsis incluso antes de que se produzca la retirada del axón (Hesselmans et al., 1993); (Culican et al., 1998).

Enfermedades de las motoneuronas

En la mayoría de los individuos, el número de motoneuronas permanece más o menos constante hasta aproximadamente los 60 años, por lo que el perfil global de subtipos de motoneuronas permanece sin alteración durante años. No obstante, la degeneración de motoneuronas ocurre en varias enfermedades que afecta a pacientes desde neonatos hasta adultos. Entre estas enfermedades, la atrofia muscular bulbar y espinal (AMBE o enfermedad de Kennedy), la atrofia muscular espinal con dificultad respiratoria (AMEDR) y la atrofia muscular espinal (AME), son enfermedades genéticas producidas por la pérdida (AME) o mutación de un gen (AMEDR) o por la expansión de una repetición en tándem (AMBE). Por otro lado, que la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) puede tener tanto un origen genético como aparecer esporádicamente. Este trabajo se ha centrado en un modelo de AME, pero consideramos de interés describir y comparar las características de estas enfermedades neurodegenerativas con el fin de descubrir sucesos comunes entre ellas que ayuden a entender su fisiopatología.

Esclerosis lateral amiotrófica

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la pérdida de motoneuronas, tanto en la médula espinal y tronco del encéfalo, como en la corteza motora y por acumulación de agregados proteicos en los cuerpos celulares (Al-Chalabi et al., 2012). El desarrollo de la enfermedad produce una parálisis progresiva que lleva a la muerte por fallo respiratorio entre 3 a 5 años después de los primeros síntomas (Chio et al., 2009). La mayoría de los casos de ELA aparecen esporádicamente, mientras que sólo un ~10% son hereditarios (ELA familiar). La identificación de los genes mutados en las formas familiares de ELA ha proporcionado nuevas perspectivas para ahondar en los mecanismos de la enfermedad.

El gen que más frecuentemente se encuentra mutado en ELA familiar es el que codifica la superóxido dismutasa 1 (*SOD1*). *SOD1* es una enzima ubicua

que se expresa en motoneuronas (Pardo et al., 1995). Su principal función es catalizar la conversión de radicales superóxido a peróxido de hidrógeno, que es eliminado por otras enzimas. El mecanismo por el cual SOD1 ejerce su toxicidad es desconocido, pero se piensa que es una “ganancia de función tóxica” más que una pérdida de la actividad dismutasa de la proteína (Bruijn et al., 1998).

Modelos murinos con mutaciones en *SOD1* descritas en humanos (los mutantes más usados son G37R, G85R, G93A, G93R), han sido extensamente utilizados para el estudio de los procesos moleculares y celulares que ocurren tras la aparición de la enfermedad y durante su desarrollo. Los primeros signos observados en los ratones en modelos de ELA ocurren en el día postnatal 10 (P10), donde se ha descrito una disminución de la capacidad para darse la vuelta cuando son colocados sobre un lado (van Zundert et al., 2008). Entre P100-P125 se detectan signos de parálisis muscular, que finalmente desemboca en la parálisis completa de las extremidades traseras y delanteras. A nivel histológico y celular, muchas de las alteraciones encontradas en los ratones mutantes mimetizan las observadas en pacientes de ELA, como la microgliosis y la astrocitosis (Saxena et al., 2009; Fischer et al., 2004) y la acumulación de ubiquitina (Saxena et al., 2009). La pérdida de transportadores de glutamato específicos de astrocitos observada en el asta ventral de la médula espinal (Warita et al., 2002), produce excitotoxicidad debido al aumento de la estimulación de los receptores de glutamato en las motoneuronas, lo que podría contribuir a la degeneración de las motoneuronas en pacientes de ELA y modelos murinos *SOD1*. Por otro lado, estos mutantes *SOD1* han permitido la identificación de alteraciones presintomáticas como la fragmentación del aparato de Golgi (Mourelatos et al., 1996), la vacuolación mitocondrial (Gould et al., 2006) y acumulación mitocondrial en los conos de crecimiento (Song et al., 2012). Algunas de ellas, como la acumulación de neurofilamentos en el citoplasma y los axones proximales (Tu et al., 1996), el deterioro del transporte axonal (Zhang et al., 1997) y defectos en la ramificación de las neuritas (Song et al., 2012), son eventos comunes a los observados en AME.

Diferentes estudios morfológicos y electrofisiológicos han demostrado que las unidades motoras que se pierden en primer lugar son las de tipo FF,

seguidas por las FR y las tipo S (Frey et al., 2000; Pun et al., 2006; Hegedus et al., 2007). Se ha descrito una alteración en la estructura secundaria de la proteína SOD1 mutada, que produce proteína no plegada y genera agregados intracelulares tóxicos (Hermann et al., 2011). La respuesta celular a proteínas no plegadas, o respuesta UPR (*unfolded protein response*) se dispara por la acumulación excesiva de estos agregados en el retículo endoplásmico, para intentar restaurar la homeostasis de la célula; si el proceso no se lleva a cabo con éxito, la UPR desata la muerte celular mediante un programa de apoptosis o autofagia. Los cambios moleculares característicos de la UPR se han detectado tanto en modelos de ratones como en pacientes de ELA, como son la activación de factores de transcripción, la relocalización de señales moleculares y el corte de procaspasas (Atkin et al., 2008; Kieran et al., 2007).

En ELA, se han identificado inclusiones ubiquitinadas en los cuerpos celulares de motoneuronas que están muriendo. Uno de los principales componentes de estas inclusiones es la proteína TDP-43, involucrada en el procesamiento del ARN (Neumann et al., 2006). El estudio del gen que codifica TDP-43 (*TARDBP*) ha identificado mutaciones en un dominio rico en glicina del extremo C-terminal en familias con ELA (Al-Chalabi et al., 2012). La búsqueda de homólogos de TDP-43 identificó mutaciones en el dominio C-terminal de la proteína codificada por el gen *FUS* (Kwiatkowski et al., 2009), cuya función está involucrada en la regulación transcripcional. Ambas tienen una localización nuclear, pero se han identificado agregados citoplasmáticos en casos de ELA. Ya que tanto *FUS* como TDP-43 son proteínas de procesamiento de ARN, surge la hipótesis de que alteraciones en el procesamiento del ARN puede ser una causa de ELA, al igual que en AME donde la proteína que se encuentra mutada está implicada en la maduración del pre-ARNm.

Existen otros genes con mutaciones asociadas tanto a ELA esporádica como a familiar, algunos de los cuales se detallan a continuación en la Tabla 2:

Tabla 2. Genes que portan mutaciones asociadas a diferentes formas familiares y esporádicas de ALS. *AR*: autosómica recesiva; *AD*: autosómica dominante. Modificada de Al-Chalabi et al 2012.

Gen	Locus	Herencia	Año
SOD1	21q22.11	AR, AD, <i>de novo</i>	1993
ALS2	2q33.2	AR	2001
SETX	9q34.13	AD	2004
VAPB	20q13.33	AD	2004
ANG	14q11.1	AD	2006
TARDBP	1p36.22	AD, AR	2008
FUS	16p11.2	AD, AR, <i>de novo</i>	2009
VCP	9p13	AD	2010
SPG11	15q22.1	AR	2010
TAF15	17q11.1-q11.2	AD, AR	2011

Atrofia muscular bulbar y espinal

La atrofia muscular bulbar y espinal (AMBE) o enfermedad de Kennedy es un desorden neurodegenerativo de carácter recesivo y de aparición en adultos. La AMBE fue descrita por primera vez por Kennedy en 1966 (Kennedy et al., 1968), pero el término fue acuñado por Harding y colaboradores en 1982 (Harding et al., 1982). El defecto genético que la causa está localizado en la región cromosómica Xq11-12 (Fischbeck et al., 1986), en cuya secuencia existe una repetición en tándem CAG que está expandida en el exón 1 del gen del receptor de andrógenos (AR) (La Spada et al., 1991). Mientras que el número de copias más común está entre 18 a 25 repeticiones, la AMBE está causada por la expansión de la repetición en tándem CAG de 40 a 62 copias (Finsterer, 2010). Existe una correlación negativa entre el tamaño de la repetición CAG (poli-glutamina o poli-Q) y la aparición de las manifestaciones clínicas (Igarashi et al., 1992). Debido a que la mutación que causa la enfermedad está ligada al cromosoma X, BSMA es predominante en hombres,

siendo las mujeres portadoras de la mutación o presentado una afectación muy leve. Entre las enfermedades de motoneuronas hereditarias la BSMA tiene la menor prevalencia, con un número de afectados de 3'3 por 100.000 entre la población masculina (Guidetti et al., 2001).

Los pacientes presentan debilidad y pérdida de la musculatura facial bulbar y de las extremidades, alteraciones sensoriales y problemas endocrinológicos (Li et al., 2007). En la mayoría de los casos la debilidad afecta primero a las extremidades inferiores, seguida de las superiores, los músculos bulbares y, finalmente, los músculos faciales. Las alteraciones endocrinológicas incluyen ginecomastia, reducción de la fertilidad debido a atrofia testicular y azoospermia, entre otras (Finsterer, 2010). Estudios electrofisiológicos han demostrado que, tanto la velocidad de conducción en los nervios motores y sensoriales, como la amplitud del potencial de acción compuesto y del potencial de acción de nervios sensoriales están reducidos, lo que indica una degeneración axonal de los nervios motores y los sensoriales (Suzuki et al., 2008).

El receptor de andrógenos (AR) es un factor de transcripción hormonal nuclear de tipo 1, que media el crecimiento celular y la diferenciación en los tejidos sensibles a AR. Esta proteína reside en el citosol, cuando se une a su ligando sufre un cambio de conformación que expone una señal de localización nuclear y hace que se dirija al núcleo. Tras realizar su función, es degradada por proteosomas nucleares o exportada al citoplasma para su degradación (Montie et al., 2009). El mecanismo exacto por el cual la expansión poli-Q en el receptor de andrógeno causa AMBE permanece oculto, pero existen evidencias de que se debe a una ganancia de función tóxica. La expansión de la repetición en tándem CAG impide que la proteína se pliegue correctamente, formándose agregados en los núcleos de las motoneuronas (Montie et al., 2009). La localización nuclear de AR con poli-Q expandida aumenta el corte proteolítico de la proteína y formándose oligómeros de AR, lo que desencadena la desregulación transcripcional, la alteración del transporte axonal y, por último, la degeneración de las neuronas motoras y la raíz de los ganglios dorsales (Finsterer, 2010).

Por otro lado, en un modelo murino se ha determinado que la retención de proteína completa AR en el citoplasma disminuye las deficiencias motoras (Montie et al., 2009). En células y modelos animales, la expansión poli-Q causa disfunción mitocondrial a través de efectos indirectos en la transcripción de genes mitocondriales codificados en el núcleo (Ranganathan and Fischbeck, 2010). Otras fisiopatologías son la acumulación de neurofilamentos y sinaptofisina en los axones motores distales y en el músculo esquelético, además de que el transporte axonal retrógrado está afectado, por los bajos niveles de dinactina-1 (Katsuno et al., 2006). De hecho, se ha descrito una mutación puntual en el gen de la dinactina-1 y ha sido identificada como la causa de AMBE distal, (Puls et al., 2005).

Atrofia muscular espinal con dificultad respiratoria

La atrofia muscular espinal con dificultad respiratoria (AMEDR) es el segundo desorden genético autosómico recesivo que causa muerte infantil. Se caracteriza por la degeneración de motoneuronas inferiores asociada a una parálisis muscular progresiva. Además, los pacientes sufren desde edades tempranas (entre las 6 semanas y los 3 primeros meses de vida) una pérdida de la función respiratoria debido a un déficit en la fuerza de contracción diafragmática. En esta enfermedad, los músculos distales y los miembros superiores se ven más afectados que los inferiores y los proximales, al contrario que la AME clásica (Guenther et al., 2007; Kaindl et al., 2008). La AMEDR está causada por mutaciones en el gen *IGHMBP2*, que se encuentra mapeado en la región cromosómica 11q13.3 y codifica una proteína que es un miembro de la familia de genes que codifican proteínas ADN/ARN helicasas (Cox et al., 1998).

En el modelo de ratón llamado *nmd* (*neuromuscular degeneration*), existe una mutación espontánea en el gen *ighmbp2*, homólogo al gen humano. Estos ratones desarrollan debilidad muscular después de la segunda semana de vida, progresando hacia una atrofia muscular neurogénica severa de las extremidades (Cox et al., 1998; Maddatu et al., 2004; Grohmann et al., 2004). Los principales defectos incluyen una pérdida severa de fibras nerviosas y la

incapacidad de mantener una neurotransmisión neuromuscular normal (Ruiz et al., 2005).

Entender los mecanismos de acción y las funciones de las proteínas afectadas en estas enfermedades neurodegenerativas es fundamental para comprender los mecanismos por los cuales una mutación en una proteína que se expresa ubicuamente tiene un efecto selectivo sobre las motoneuronas.

Atrofia Muscular Espinal

A finales del siglo XIX, Guido Werdnig y Johann Hoffmann (Fig. 4) describieron una afección infantil caracterizada por una debilidad muscular progresiva que resultaba en una muerte temprana, que se denominó enfermedad de Werdnig-Hoffmann (Werdnig, 1894; Hoffmann, 1900). En términos histopatológicos, la enfermedad se caracterizó como una pérdida de células en el asta anterior de la médula espinal. Posteriormente, esta enfermedad se denominó Atrofia Muscular Espinal (AME), y se describió como un trastorno autosómico recesivo caracterizado por la degeneración de motoneuronas de la médula espinal, lo que conduce a la parálisis y la atrofia muscular (Pearn, 1978).

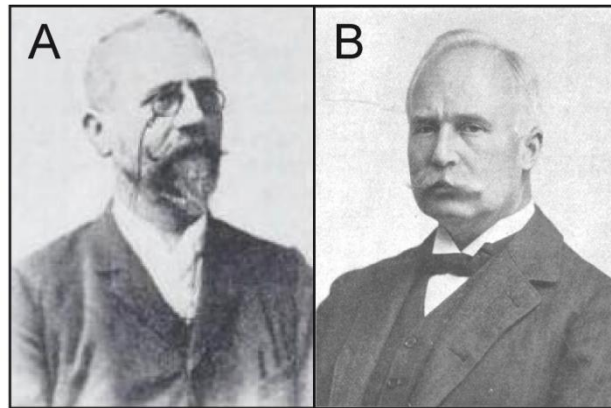


Figura 4. (A) Guido Werdnig (Universidad de Viena) y (B) Johann Hoffmann (Universidad de Heidelberg) describieron por primera vez la Atrofia Muscular Espinal a finales del siglo XIX.

Hoy en día, se reconoce que AME es una de las enfermedades autosómicas recesivas más frecuentes (1 de cada 40 personas es portador) con una incidencia de un caso en cada 6.000 – 10.000 nacidos vivos, siendo la causa genética de mortalidad infantil más común (Pearn, 1980; Crawford and Pardo, 1996). Se distinguen diferentes tipos clínicos de enfermedad por la edad de aparición de los síntomas y por su transcurso (Munsat et al., 1991):

- Tipo I, también llamada enfermedad de Werdnig-Hoffmann, es la forma más severa. Se manifiesta en los 6 primeros meses de vida. Los pacientes no son capaces de mantener la posición de la cabeza ni de sentarse sin ayuda y la ingesta está dificultada por problemas en la deglución. La rápida degeneración de las motoneuronas causa un déficit motor y muscular, especialmente del sistema respiratorio, siendo la complicación más frecuente y causa de

fallecimiento la neumonía. Los recién nacidos diagnosticados de AME tipo I, generalmente, no sobreviven más allá de los dos años de vida.

- Tipo II, o forma intermedia, también denominada como enfermedad de Dubowitz. En esta forma intermedia la aparición de la debilidad muscular suele manifestarse entre los 6 y 18 meses. Los niños no son capaces de estar de pie o andar y presentan debilidad en los músculos intercostales y el diafragmático.

- Tipo III, también llamada enfermedad de Kugelberg–Welander (Kugelberg and Welander, 1956). Esta forma juvenil se manifiesta normalmente después de los 18 meses de vida y los pacientes son capaces de andar sin ayuda durante algún tiempo, a pesar de que la mayoría pierde esta función. Los problemas respiratorios son menos importantes.

- Tipo IV, o forma adulta, frecuentemente se clasifica como una variante tardía del tipo III. Suele manifestarse en la edad adulta. El debilitamiento gradual de la musculatura afecta, principalmente, a los músculos proximales de las extremidades. Es rara la aparición de otro tipo de complicaciones y la esperanza de vida no está afectada.

Genética de la Atrofia Muscular Espinal

Anteriormente a 1995, ya se había mapeado el defecto genético de las diferentes formas de AME entre las regiones cromosómicas 5q11.2-q13.3 (Brzustowicz et al., 1990; Melki et al., 1990; Melki et al., 1993; Soares et al., 1993; Clermont et al., 1994; Wirth et al., 1994). Esta región contiene el gen que codifica la proteína inhibitoria de apoptosis neuronal (NAIP) y el gen homólogo XS2G3 que se encuentran deleccionados en el 50% de los casos de AME tipo I (Roy et al., 1995; Thompson et al., 1995). En 1995 se identificó y caracterizó un gen en la región 5q13, al que se llamó gen de *Supervivencia de Motoneuronas* (SMM), firme candidato a ser el responsable de AME (Fig. 5) (Lefebvre et al., 1995). La región donde se encuentra este gen está duplicada e invertida (500 kb) y contiene varios genes y elementos repetitivos, lo que la

hace propensa a reorganizaciones y deleciones (Fig. 5). El gen *SMN* telomérico (^T*BCD541*) se denominó *SMN1* y el centromérico (^C*BCD541*), *SMN2*. La organización genómica de ambos genes es idéntica lo que sugiere un evento de duplicación reciente. Los nueve exones de ambas copias se denominan exón 1, 2a, 2b y del 3 al 8.

No obstante, existen cinco diferencias entre *SMN1* y *SMN2*: una mutación sinónima en el exón 7 (codón 280; TTC, telomérico; TTT, centromérico), un cambio en la región no codificante del exón 8 (nucleótido 1155; TGG, telomérico; TGA, centromérico) y tres sustituciones de base única en los intrones 6 y 7 (Fig. 5). Diferentes análisis en la población control mostraron que el gen *SMN1* está presente en todos los individuos, mientras que el gen *SMN2* está presente en un 95'5%. Esto indica que la copia telomérica es el gen ancestral (*SMN1*). Este gen se expresa ampliamente y resulta en un ARNm transcrito de 1.7 kb. La comparación de la secuencia de este gen con otros no mostró ninguna homología, lo que sugería que este gen codificaba para una proteína desconocida. Se mostró que el gen centromérico (*SMN2*), por un corte y empalme (*splicing*) alternativo en el exón 7 resulta en un transcrito truncado al que le falta este exón (*SMNΔ7*) y por tanto da lugar a una proteína con extremo C-terminal diferente (Monani et al., 1999); (Lorson et al., 1999). Así, el gen *SMN1* codifica para una proteína completa, mientras que aproximadamente el 90% del producto del gen *SMN2* corresponde a una proteína truncada (Crawford and Pardo, 1996).

Más del 95% de los pacientes con Atrofia Muscular Espinal tienen una alteración en el gen *SMN1* en el cromosoma 5q, causada por una mutación, una deleción o una reorganización. Sin embargo, todos los pacientes con Atrofia Muscular Espinal retienen al menos una copia de *SMN2* (Lefebvre et al., 1995). Existe una correlación entre los niveles de proteína SMN y la severidad de AME (Lefebvre et al., 1997; Covert et al., 1997). En ausencia de *SMN1*, la severidad de la enfermedad depende del número de copias de *SMN2*, que es variable en la población (de 0 a 4 copias), ya que cada copia produce una pequeña parte (10%) de proteína funcional (Lefebvre et al., 1995; Velasco et al., 1996; McAndrew et al., 1997; Covert et al., 1997).

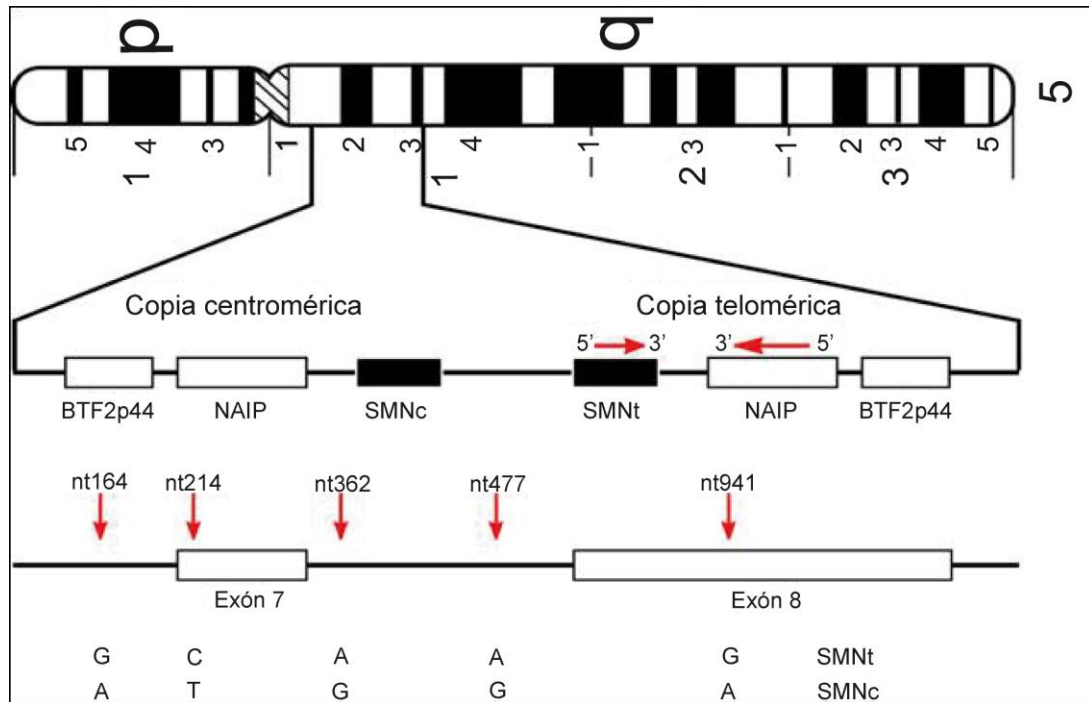


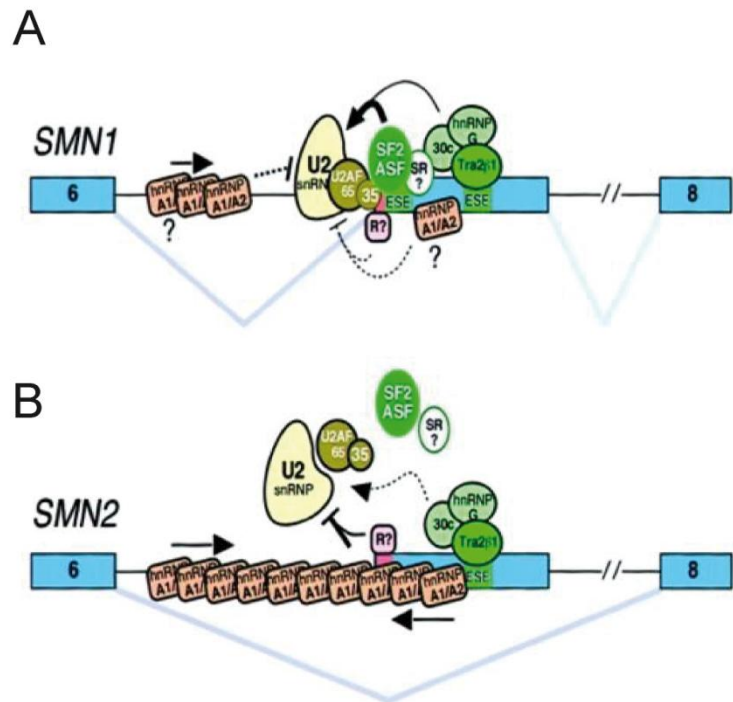
Figura 5. Ideograma del cromosoma 5 humano y organización genética de la región 5q13, donde se encuentra la duplicación de la región que contiene los genes *SMN1* y *SMN2*. Se muestran, así mismo, las sustituciones nucleotídicas en las secuencias de los genes *SMN1* y *SMN2* localizadas en los exones 7 y 8 y los intrones adyacentes. Modificado de Shafeghati et al 2004.

La producción de proteína truncada se debe a un corte y empalme alternativo del transcrito primario. Durante la maduración del ARNm actúan una serie de elementos reguladores que van a potenciar (ESEs, *exonic splicing enhancers*) o a silenciar (ESSs, *exonic splicing silencers*) el reconocimiento de los exones por la maquinaria de empalme. Estos elementos son reconocidos por proteínas SR (proteínas ricas en serinas y argininas), en el caso de los ESEs y por proteínas hnRNP (ribonucleares heterólogas), en el caso de los ESSs. Se ha demostrado que el cambio C → T (citosina por timina) en la posición 6 del exón 7, que hace que éste exón se pierda durante la maduración de ARNm de la proteína SMN producida por *SMN2*, se produce por la pérdida de un elemento potenciador (ESE). Por tanto, una proteína SR, llamada SF2/ASF, que normalmente reconoce el ESE de *SMN1*, no puede unirse a ésta región reguladora y produce frecuentemente el salto del exón 7 (Fig. 6) (Cartegni and Krainer, 2002; Kashima and Manley, 2003; Cartegni et al., 2006).

El potencial de *SMN2* para producir un porcentaje de proteína SMN funcional hace que las terapias encaminadas a aumentar la incorporación del exón 7 en el transcrito maduro de la proteína SMN sean de especial interés. Más adelante se expondrán diferentes terapias desarrolladas actualmente en relación a esta estrategia.

Figura 6. Modelos para el *splicing* de *SMN1* y *SMN2*.

A. El corte y empalme eficiente de *SMN1* está dirigido por la interacción de la proteína SF2/ASF con ESE, lo que hace que el exón 7 se mantenga en el transcrito maduro. **B.** La transición C→T hace que ESE desaparezca del exón 7, por lo que SF2/ASF no realiza su función atrayendo la maquinaria de empalme y este exón se pierde en el proceso de maduración. Modificado de Cartegni et al, 2005.



La proteína SMN

SMN es una proteína de 294 aminoácidos (38 kDa) que se expresa ubicuamente en todos los tejidos y que se localiza tanto en el citoplasma como en el núcleo de las células. En el nucleoplasma se encuentra en unas estructuras llamadas *gems*, estructuras gemelas a los cuerpos de Cajal (Liu and Dreyfuss, 1996). Se ha demostrado que el número de *gems* es menor en los pacientes de AME tipo I que en los de tipo II, en correlación con la cantidad de proteína SMN (Coovert et al., 1997).

La función mejor caracterizada de SMN es su participación en el ensamblaje de las ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (snRNP) en un complejo multiproteico en el espliceosoma (Fischer et al., 1997; Liu et al., 1997;

Pellizzoni et al., 2002; Meister et al., 2001). Además, existen evidencias del papel de SMN en la regulación traslacional de complejos RNPs a lo largo del axón para la traducción local de diversas proteínas (Piazzon et al., 2008). Así mismo, SMN parece intervenir en la respuesta al estrés mediante la formación de gránulos de estrés, por lo que podría jugar un papel importante en la supervivencia celular (Zou et al., 2011).

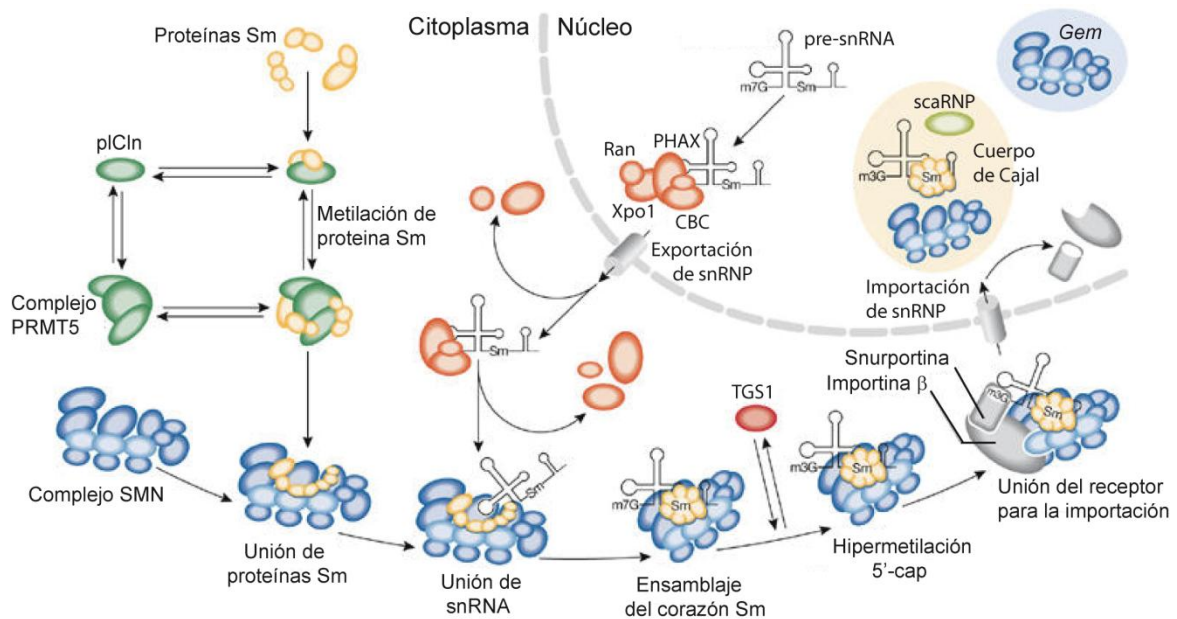


Figura 7. Modelo de la función de SMN en el ensamblaje de las snRNP y su papel en la maduración del pre-ARNm en el núcleo. Modificado de Pellizzoni, 2007.

La función de las snRNPs es reconocer y eliminar los intrones, para la maduración del transcrito primario, en el núcleo. La proteína SMN funciona ensamblando correctamente las proteínas que forman estos multicomplejos. Se sabe que la reacción de ensamblaje es dependiente de ATP (Pellizzoni et al., 2002). Las proteínas que forman las snRNPs en vertebrados son: las proteínas Sm, las geminas (GEMIN2 a GEMIN8) y la proteína de interacción UNR (UNRIP). En el citosol SMN interactúa consigo misma oligomerizando (Lorson et al., 1998; Pellizzoni et al., 1999) y con las distintas geminas (GEMINS2-8) formando el complejo multiproteico SMN. Este complejo, a su vez, interactúa con las proteínas Sm y todo es transportado al núcleo gracias

a la importina β y la esnurportina 1 (Narayanan et al., 2002). Una vez dentro del núcleo, en los cuerpos de Cajal, las snRNPs participan en la maduración de los pre-ARNm (Fig. 7).

La proteína SMN tiene varios dominios en su secuencia aminoacídica que son importantes para su función en la formación de los snRNPs y en la maduración del ARNm en el núcleo (Fig. 8). Cerca del extremo N-terminal, el dominio 2b es rico en lisinas y es muy importante tanto en la unión a SIP1 como a sí misma (Young et al., 2000). Se ha descrito la interacción de este exón con la proteína COPI, relacionada con el transporte (Peter et al., 2011). El exón 3 representa un dominio Tudor que se une a las proteínas Sm (Buhler et al., 1999), este dominio está muy conservado a lo largo de diferentes organismos. En el exón 5, y parte del 4 y del 6, existe una secuencia rica en prolinas, que podría ser importante en la unión con profilinas, proteínas de unión a la actina (Giesemann et al., 1999). En el extremo C-terminal, existe un dominio muy conservado llamado YG, que es importante para la oligomerización de SMN consigo misma (Talbot et al., 1997).

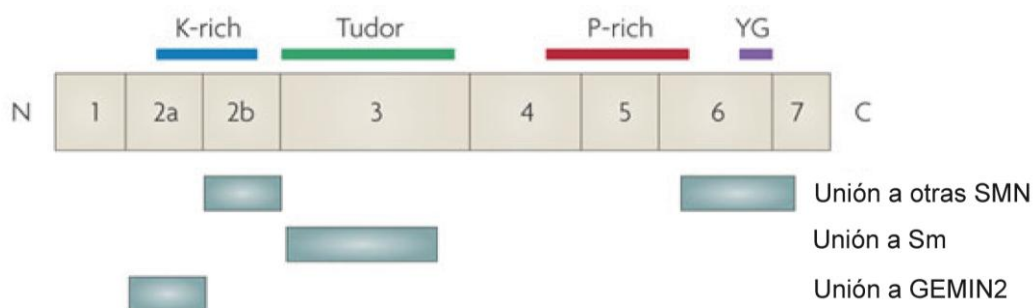


Figura 8. Esquema de los dominios estructurales de la proteína SMN. Modificado de Burghes and Beattie, 2009.

La pérdida del exón 7 en la proteína SMN, hace que ésta no sea capaz de oligomerizar consigo misma. Sin embargo, esta proteína truncada sí es capaz de unirse a la de proteína completa dando lugar a niveles bajos de

complejos SMN (Fig. 9). La proteína SMN trunca, al ser incapaz de oligomerizar, se degrada rápidamente (Burnett et al., 2009).

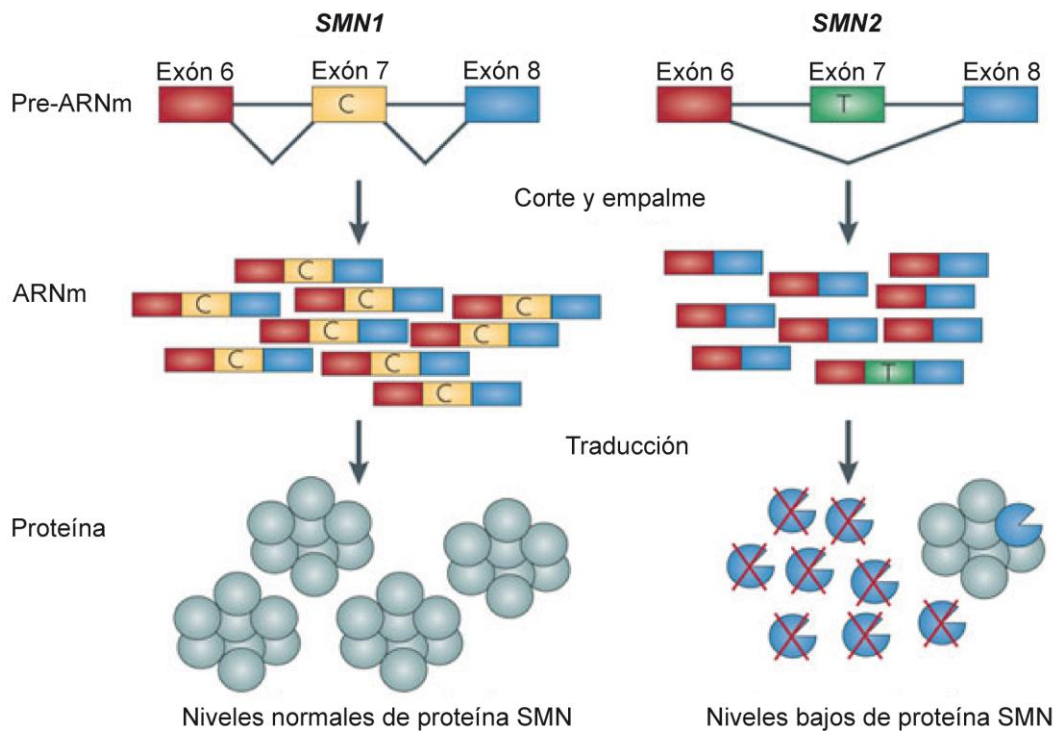


Figura 9. Esquema que representa la maduración del transcrito primario de *SMN1*, produciendo proteína SMN completa, y del transcrito primario de *SMN2*, que produce proteína trunca de rápida degradación. Modificado de Burghes and Beattie, 2009.

A pesar de que SMN es una proteína ubicua esencial para la vida que se expresa altamente durante el desarrollo prenatal, tras el nacimiento su nivel de expresión disminuye excepto en las motoneuronas espinales. No se conoce, sin embargo, a qué se debe esta diferencia en el nivel de expresión y qué hace que las motoneuronas, fundamentalmente las que inervan músculos axiales y proximales, sean especialmente vulnerables a la deficiencia de SMN. Así, comprendiendo cómo una mutación en un gen que se expresa ubicuamente causa una enfermedad neurológica podría darnos pistas sobre la pregunta como la deficiencia en SMN causa AME.

Existen dos hipótesis sobre los mecanismos por los que la deficiencia de SMN causa AME. La primera apunta a que la afectación de la función de las snRNP da lugar a que no se transcriban correctamente una serie de proteínas que son necesarias para las motoneuronas (Wan et al., 2005; Winkler et al., 2005; Gabanella et al., 2007; Pellizzoni, 2007; Zhang et al., 2008; Burghes and Beattie, 2009). La segunda, sugiere que SMN tiene un papel adicional y específico en las motoneuronas (Fan and Simard, 2002; McWhorter et al., 2003; Rossoll et al., 2003; Eggert et al., 2006; Carrel et al., 2006; Gabanella et al., 2007; Pellizzoni, 2007; Burghes and Beattie, 2009).

Modelos animales de AME

Se han generado modelos de AME tanto en invertebrados como en vertebrados. Los diversos modelos muestran que la pérdida de función de SMN conlleva importantes defectos, que van desde la letalidad embrionaria hasta la alteración del sistema motor. La severidad del fenotipo, al igual que en humanos, es inversamente proporcional al nivel de expresión de SMN. El estudio de los diferentes organismos modelo es de vital importancia para entender los mecanismos moleculares implicados en la fisiopatología de la AME en humanos y para el desarrollo de posibles terapias para la cura de esta enfermedad. A continuación se describen los principales modelos desarrollados hasta el momento actual.

Caenorhabditis elegans

C. elegans es un excelente modelo para estudios neurobiológicos, de desarrollo y de muerte celular, ya que su genoma está completamente secuenciado y es muy fácil el clonaje y el análisis genético.

En 1997, se describió la secuencia genómica homóloga al gen *SMN* humano en *C. elegans* (Talbot et al., 1997), al que se nombra como *smn-1*, existiendo en una sola copia. La proteína se expresa en los núcleos celulares

de los embriones de *C. elegans*, y en adultos la expresión es particularmente abundante en el sistema nervioso (ganglios de la cola, cordón nervioso y neuronas sensoriales de la cabeza) (Miguel-Aliaga et al., 1999). La disminución de la cantidad de proteína *smn-1* mediante la inyección de ARN de interferencia (ARNi), no produce un efecto evidente en los individuos inyectados. Sin embargo, el número de descendientes disminuye en la primera generación, sugiriendo una disminución en la viabilidad embrionaria; los individuos supervivientes presentan numerosos defectos como descoordinación motora, falta de tono muscular, anomalía vulvar, defectos en la piel y esterilidad (Miguel-Aliaga et al., 1999).

Por otro lado, la delección parcial de la proteína *smn-1* en homocigosis (línea *smn-1(ok355)*) (Briese et al., 2009), no produce letalidad embrionaria, debido a la transmisión maternal de la proteína, lo que permite el desarrollo larvario. El ARNi, sin embargo, produce la reducción de los niveles tanto maternales como de los transcritos cigóticos, de ahí la letalidad embrionaria que se mencionó anteriormente. Los mutantes *smn-1(ok355)* detienen su desarrollo en el último estadio larvario (Fig. 10), presentando defectos motores, en la gonadogénesis y en la diferenciación de la línea germinal. Además, muestran un color pálido por la pérdida de pigmentación intestinal y defectos en la peristalsis faríngea (Briese et al., 2009). Su vida media es de 6 días post-L1, en comparación con los controles que tienen una vida media de 19.9 días. La expresión de *smn-1*, bajo promotores musculares o pan-neuronales, mediante microinyección en las gónadas, demuestra que el rescate de estos fenotipos en las siguientes generaciones se produce mayoritariamente cuando la proteína se expresa en las neuronas (Briese et al., 2009).

Por tanto, los animales deficientes en *Smn* progresan en la embriogénesis pero se detienen en el último estado larvario, lo que indica que, en *C. elegans*, *smn-1* tiene funciones durante el desarrollo tardío.

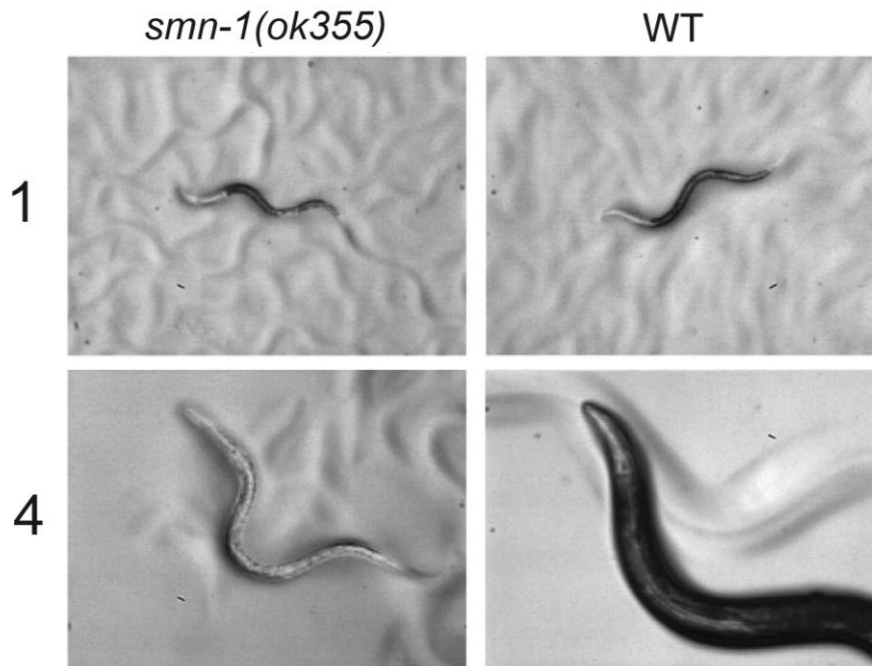


Figura 10. Comparación del desarrollo entre mutantes *smn-1(ok355)* y controles de *C. elegans*. La edad (expresada en días post-L1) se indica a la izquierda de los paneles. Modificado de Briese et al, 2009.

Drosophila melanogaster

El genoma de *Drosophila* contiene un solo gen homólogo al gen SMN humano (Miguel-Aliaga et al., 2000) que codifica una proteína (Smn) de 226 aminoácidos. El déficit de Smn en diferentes mutantes produce una serie de alteraciones relacionadas con las diferentes y/o posibles funciones de esta proteína.

Al igual que en *C. elegans*, en *Drosophila*, el déficit de Smn también produce letalidad larvaria, alteraciones en los últimos estadios de desarrollo y defectos motores (Chan et al., 2003). En los mutantes E33 (que tienen interrumpido el sitio de inicio de transcripción de *Smn*) los músculos de vuelo indirecto se encuentran totalmente desorganizados, observándose diferentes alteraciones como protuberancias y constricciones, ausencia de las estriaciones normales, degeneración de las fibras musculares, pérdida de filamentos de actina y desorganización y defectos en la arborización de las

ramas nerviosas motoras que inervan estos músculos (Fig. 11C, panel derecho) (Rajendra et al., 2007). Es más, se ha descrito desorganización en los botones sinápticos, observándose un aumento de los botones alargados (Fig. 11B, panel inferior), así como una reducción en el número de agrupaciones de receptores de glutamato en el terminal postsináptico. Además, la amplitud de las corrientes excitadoras postsinápticas (EPCs) registradas en larvas mutantes está significativamente reducida en comparación con animales control (Fig. 11A) (Chan et al., 2003). Tanto la expresión de transgenes conteniendo *Smn* de expresión dirigida al músculo o a las neuronas como la disminución selectiva de esta proteína en ambos tejidos mediante ARNi, ha demostrado que su expresión es necesaria en ambos tejidos, aunque parece ser más sensible a la pérdida de función en el músculo (Chan et al., 2003); (Rajendra et al., 2007); (Chang et al., 2008).

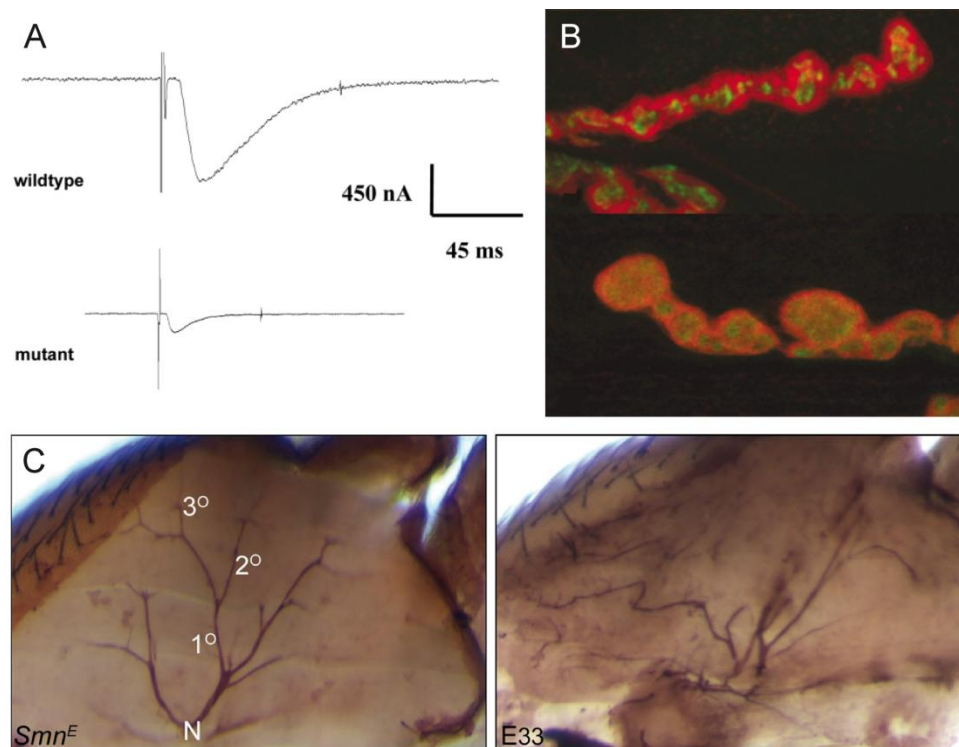


Figura 11. Características fenotípicas en modelo de AME de *Drosophila*. **A.** Registros característicos de las corrientes postsinápticas excitatorias (EPCs) registradas en larvas control y mutante. **B.** Botones sinápticos de *Drosophila* marcados con *anti-discs* y sinapsina. **C.** Inervación de los músculos longitudinales dorsales en los que se observan defectos en la arborización en los mutantes E33 en comparación con el control. Imágenes modificadas de Chang et al, 2003 y Rajendra et al, 2007.

La función de SMN en el ensamblaje de snRNPs se encuentra conservada en invertebrados. En *Drosophila*, se ha descrito una línea (*smn73Ao*) con una mutación puntual en la región codificante de *Smn* que resulta en una reducción en la oligomerización de la proteína Smn consigo misma y con la proteína completa (Chan et al., 2003). Además, mutaciones en *Smn* deterioran la función y la organización de los cuerpos U y P, estructuras situadas en el citoplasma que están implicadas en el procesamiento de los ARNm y donde se concentran las snRNPs (Lee et al., 2009). Este modelo ha permitido identificar modificadores genéticos de *Smn*, 17 activadores y 10 supresores, así como la interacción de Smn con el receptor BMP tipo II (Chang et al., 2008).

Pez Cebra (*Danio rerio*)

El pez cebra es un buen modelo para el análisis de enfermedades neuromusculares ya que tiene una organización neuromuscular relativamente simple y su sistema nervioso está muy bien caracterizado.

La utilización de oligonucleótidos morfolino (MOs) para Smn en el pez cebra, bloquea el ARNm y disminuye la cantidad de proteína en este organismo modelo, dando lugar a letalidad embrionaria, sugiriendo un papel esencial de Smn en el desarrollo (McWhorter et al., 2003). En los embriones inyectados con Smn MOs se observan axones truncados que no proyectan efectivamente hacia sus músculos diana y axones sobreramificados (Fig. 12). Estos defectos se mantienen durante el desarrollo y ocurren tanto en la zona dorsal como en la zona ventral sugiriendo que Smn tiene un papel fundamental en el desarrollo del sistema nervioso (McWhorter et al., 2003; Carrel et al., 2006; Oprea et al., 2008; Hao le et al., 2011). Al igual que en otros modelos, la inyección de ARNm de SMN humano rescata este fenotipo, (McWhorter et al., 2003; Carrel et al., 2006; Oprea et al., 2008; Hao le et al., 2011).

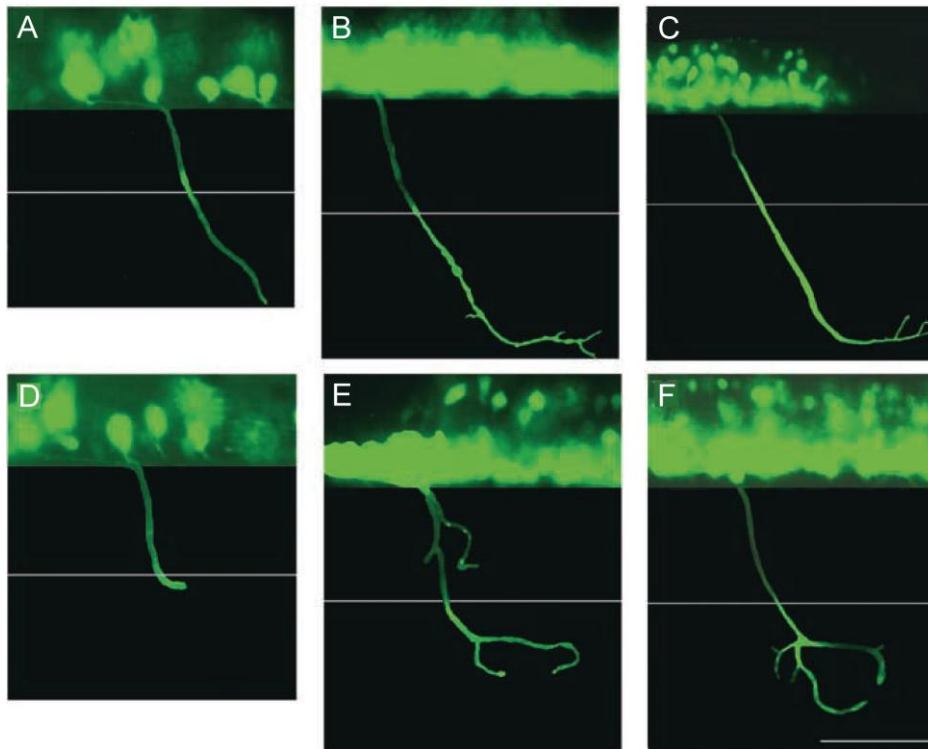


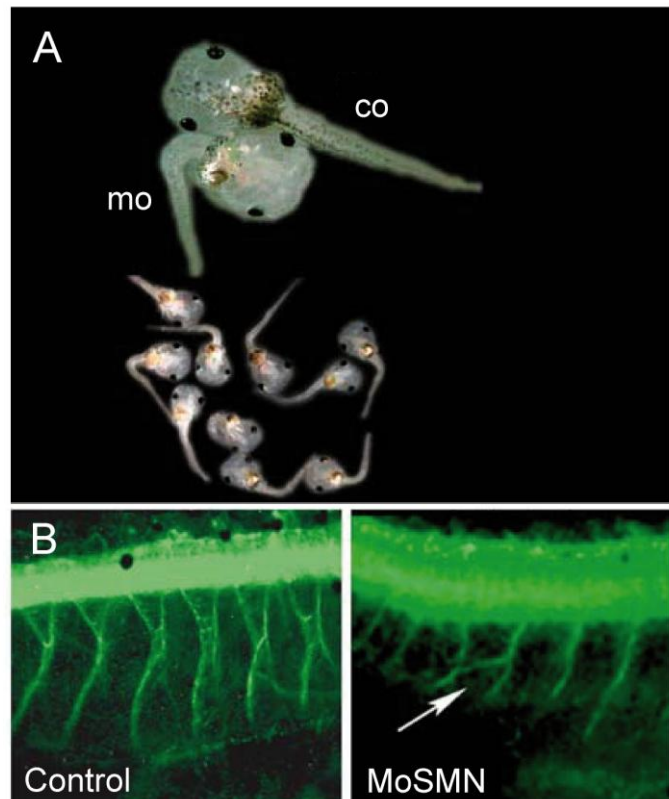
Figura 12. Seguimiento del crecimiento axónico durante 36, 50 y 74 h del desarrollo del embrión. Vista lateral de una motoneurona que expresa GFP en un embrión inyectado con MO control (A, B y C) y en un embrión inyectado con *SmnMO* (D, E y F), en el que se observa el fenotipo de axones truncados que precede a las ramificaciones. Modificado de McWorther et al, 2000.

Xenopus (*X. laevis* y *X. tropicalis*)

Como en los modelos descritos anteriormente, *Xenopus* también tiene un sólo gen homólogo al SMN humano. La supresión de proteína Smn, usando ARNi, produce en los embriones una parada en el desarrollo durante la gastrulación. Este fenotipo es similar al producido por una disminución de la GEMIN2, implicada, junto con Smn, en la formación de los complejos snRNPs. Por ello, se ha comprobado si los componentes de estos complejos snRNPs podrían rescatar este fenotipo. Efectivamente la inyección de partículas Sm en los embriones, previene la parada en el desarrollo embrionario en *Xenopus laevis* (Winkler et al., 2005).

Ya que en humanos existe una correlación entre la cantidad de proteína SMN y la severidad de AME, en *Xenopus tropicalis* se realizó un estudio inyectando diferentes dosis de morfolino SMN (MoSMN). Altas dosis produjeron letalidad embrionaria y bajas dosis dieron lugar a renacuajos con apariencia curva, defectos en el movimiento y parálisis (Fig. 13A) (Ymlahi-Ouazzani et al., 2010). Además, se observó una reducción en el crecimiento axonal y la formación de ramificaciones anormales, (Fig. 13B) (Ymlahi-Ouazzani et al., 2010).

Figura 13. Fenotipo de los embriones de *Xenopus* inyectados con MoSMN y controles. A. Los embriones inyectados con MoSMN presentan un fenotipo curvado. B. El marcaje con tubulina acetilada muestra que los axones están acortados en los embriones inyectados con MoSMN (flecha). Tomado de Ymlahi-Ouazzani et al, 2010.



Ratón (*Mus musculus*)

Los diferentes modelos murinos de AME, tanto *in vivo* como *in vitro*, han sido extensamente utilizados para el estudio de la fisiopatología de esta enfermedad.

A diferencia de humanos, y al igual que los modelos animales descritos anteriormente, en ratón sólo existe una copia del gen SMN, que se denomina *Smn*. En el primer intento de generar un modelo murino, se introdujo en la secuencia de *Smn* un casete (*LacZ:NeoB*) mediante un vector bacteriano, por lo que la secuencia quedó interrumpida. Se produjeron ratones heterocigotos para *Smn* (*Smn*^{+/-}). Al cruzar parentales con este genotipo, no se obtuvieron

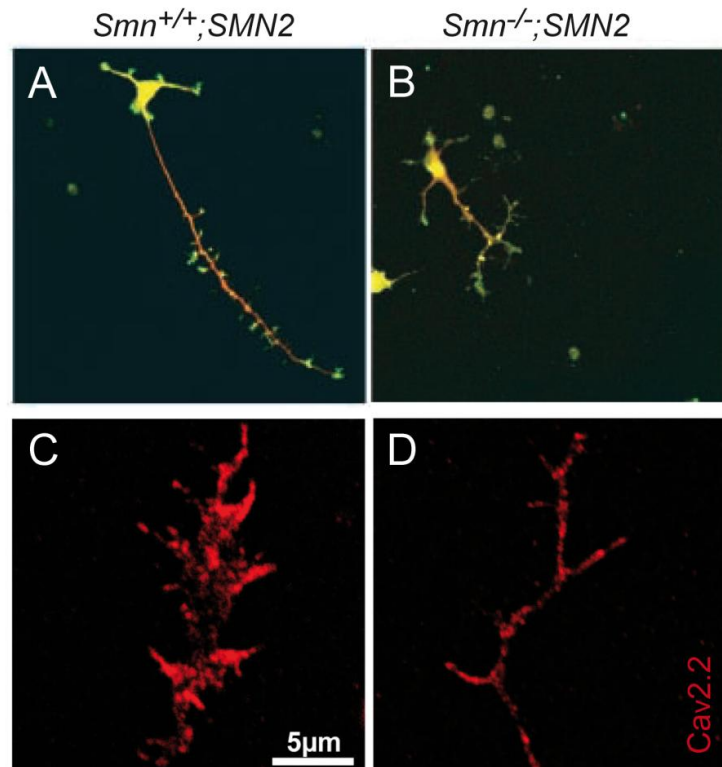
ratones $Smn^{-/-}$ en la progenie. Al analizar la causa se descubrió que los embriones homocigotos para la delección no se desarrollan (Schrank et al., 1997). La delección de *Smn* en homocigosis en el ratón produce letalidad embrionaria temprana y muerte celular masiva, por lo que *Smn* es necesaria para la supervivencia celular y el desarrollo embrionario.

Ya que la severidad de AME descrita en pacientes está relacionada con el número de copias del gen *SMN2* (Lefebvre et al., 1995; Velasco et al., 1996; McAndrew et al., 1997; Coovert et al., 1997) y que la delección del gen *SMN* en ratones produce letalidad embrionaria, se crearon dos modelos murinos de AME introduciendo el gen *SMN2* humano (Monani et al., 2000; Hsieh-Li et al., 2000). En ambos modelos, está descrito que efectivamente la severidad del fenotipo depende del número de copias de *SMN2*. Además, estos modelos reproducen características fenotípicas descritas en los pacientes de AME como degeneración de las motoneuronas en la médula espinal, ausencia o disminución de *gems*, problemas respiratorios y atrofia de los músculos esqueléticos (Monani et al., 2000; Hsieh-Li et al., 2000). Otros eventos son la aparición de necrosis en la cola y las patas, problemas para darse la vuelta cuando se les pone boca arriba y menor peso y tamaño que sus hermanos controles (Monani et al., 2000; Hsieh-Li et al., 2000). Estos modelos son de gran utilidad para estudiar la implicación de *SMN* en la enfermedad. Sin embargo, posteriormente se desarrollaron otros modelos menos severos. Uno de ellos expresa, además del gen *SMN2* humano, una isoforma de *SMN* a la que le falta el exón 7, llamada *SMN Δ 7* (Le et al., 2005). La expresión de *SMN Δ 7* aumenta la supervivencia máxima de los ratones hasta aproximadamente 14-16 días, lo que permite un estudio más completo de la aparición de los síntomas y el progreso de la enfermedad. Este modelo es el mejor caracterizado y el que más extensamente ha sido utilizado para el estudio de AME y para el avance de terapias.

Además, se han desarrollado otros modelos, más o menos severos, que portan diferentes transgenes en un intento por entender la función de *SMN* (Monani et al., 2003; Cifuentes-Díaz et al., 2002), así como diferentes modelos *in vitro*. El estudio en profundidad de éstos ha dado lugar a una gran variedad de fenotipos (Tabla 3).

Las motoneuronas en cultivo procedentes de médula espinal de embriones de ratón deficiente en *Smn* presentan una reducción de la elongación de los axones y en el tamaño del cono de crecimiento (Fig. 14A y 14B) (Rossoll et al., 2003; Zhang et al., 2003; Jablonka et al., 2007; Garcera et al., 2011), similar a lo descrito en los modelos de mosca, pez cebra y rana. Además, estas motoneuronas con déficit de SMN tienen defectos en el agrupamiento de canales de calcio (*Cav2.2*) en los conos de crecimiento y una menor frecuencia de los transientes locales de Ca^{2+} (Fig. 14C y 14D) (Jablonka et al., 2007).

Figura 14. Las motoneuronas en cultivo de médula espinal embrionaria procedentes de modelos murinos presentan una disminución en la longitud de los axones (B) y un defecto en el agrupamiento de canales de calcio voltaje dependiente (D), en relación con los controles (A y C, respectivamente). Imágenes modificadas de Rossoll et al, 2003 y de Jablonka et al, 2007.



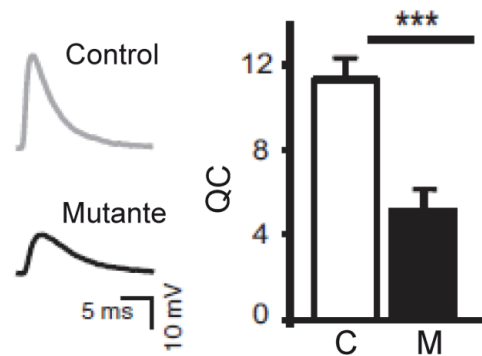
A pesar de los defectos en la axonogénesis observados en las motoneuronas *in vitro*, en las preparaciones neuromusculares agudas, procedentes del mismo modelo de AME, no se observa este defecto. Además, en los modelos murinos de AME, no se han encontrado defectos en la formación axonal en ninguna etapa del desarrollo (McGovern et al., 2008). En preparaciones *ex vivo*, el número de ramas axonales que inervan un sola fibra muscular no es diferente de los hermanos de camada controles (Kariya et al., 2008). Por otra parte, durante el desarrollo postnatal temprano de los ratones SMN Δ 7 las fibras musculares están multi-inervadas (Murray et al., 2008) y los distintos terminales nerviosos que contactan con una fibra muscular son

funcionales (Ruiz et al., 2010). Por lo tanto, la reducción de los niveles de Smn en el ratón no interfiere con la formación correcta de la sinapsis *in vivo*. Esto sugiere la existencia de mecanismos compensatorios durante la axonogénesis y sinaptogénesis, lo cual podría estar relacionado con el ambiente tan complejo en el que se desarrollan los axones motores en mamíferos.

Los registros electrofisiológicos de la actividad sináptica en la NMJ de diferentes modelos murinos de AME han mostrando diferentes defectos (Tabla 3). El hallazgo más relevante es la disminución en el número de vesículas fusionadas por potencial de acción (contenido cuántico, QC). En los ratones SMN Δ 7, el músculo más afectado funcionalmente es el *Transversus abdominis* (TVA; músculo proximal, mayormente de disparo lento) con una reducción del 50% en el contenido cuántico (Ruiz et al., 2010), seguido del *Tibiales anterior* (TA, músculo distal y rápido), con una reducción del 40% (Kong et al., 2009) y el *Extensor digitorum longus* (EDL) con un 25% de reducción del QC (Ling et al., 2010). Asimismo, el músculo *Levator auris longus* (LAL), un músculo uniformemente rápido muestra un gradiente especial de alteración, con su región caudal que degenera antes que la porción rostral (Murray et al., 2008); (Ruiz et al., 2010). La cantidad de neurotransmisor liberado por vesícula sináptica fusionada (tamaño cuántico) parece no estar alterado en los terminales motores AME, como muestran el tamaño similar de las corrientes de placa en miniatura en los terminales de ratones mutantes y controles (Kong et al., 2009). Por lo tanto, la reducción del contenido cuántico (Fig. 15) (Kong et al., 2009; Ling et al., 2010; Ruiz et al., 2010) podría ser debida a una reducción de la probabilidad de liberación y/o del número de vesículas listas para ser liberadas. Se ha mostrado que la probabilidad de liberación de las vesículas está disminuida en diferentes modelos de AME (Kong et al., 2009; Ling et al., 2010; Ruiz et al., 2010). Además, mediante microscopía electrónica, se ha descrito una disminución en el número total de vesículas ancladas en la membrana plasmática (Cifuentes-Diaz et al., 2002; Kong et al., 2009), mientras que la distribución de éstas vesículas es anormal en comparación con los controles, ya que en el modelo de AME se encuentra preferentemente localizadas en la periferia del terminal presináptico (Kariya et al., 2008). Por otro lado, conforme avanza el desarrollo de la enfermedad, se ha observado en

diversos músculos, mediante inmunocitoquímica y microscopia electrónica, que se produce una acumulación de neurofilamentos en el terminal presináptico (Cifuentes-Diaz et al., 2002; Kariya et al., 2008; Kong et al., 2009; Ling et al., 2010; Ruiz et al., 2010). Esta acumulación en las ramas intraterminales podría ser una de las causas de que las vesículas se encuentren disminuidas y distribuidas en la periferia del terminal. También se ha observado denervación de muchas fibras musculares en las últimas etapas del desarrollo de la enfermedad.

Figura 15. Trazos representativos de los potenciales de placa evocados (EPPs) en el TVA de ratones control y mutante SMN Δ 7 a P7. Nótese que la amplitud de los EPPs es menor en los mutantes, al igual que el contenido cuántico (QC). Modificado de Ruiz et al, 2010.



Estos datos son indicativos de una patología sináptica y sugieren que el terminal presináptico es especialmente vulnerable a la disminución de los niveles de proteína SMN.

Tabla 3. Alteraciones sinápticas morfológicas y funcionales descritas en modelos murinos de AME. Todos los datos se refieren al modelo murino SMN Δ 7 excepto: (+) modelo *Smn*^{f7}/*Smn* ^{Δ 7}, NSE-Cre⁺; (*) modelo *Smn*^{-/-};SMN2; (#) modelo SMN2^{+/+};SMN1A2G^{+/-};Smn^{-/-}.(1) Cifuentes-Diaz et al., 2002; (2) Kariya et al., 2008; (3) Kong et al., 2009; (4) Murray et al., 2008; (5) Ling et al., 2010; (6) Ruiz et al., 2010; (7) Laboratorio de L. Tabares, datos no publicados. mEPP: potencial de placa en miniatura; mEPC: corriente de placa en miniatura; RRP: contingente de vesículas listas para ser liberadas; P: edad postnatal (en días).

	TVA	TA	EDL	Gastrocnemius	LAL	Semitendinous	Diaphragm
Contenido cuántico	~↓ 50% (6)	~↓ 40% (3)	~↓ 25% (5)		No alterado (rostral) (6) ~↓ 50% (caudal) (6)	~↑ 20% (::) (2)	
mEPP	↑Frecuencia (P7) ↑Amplitud (P14) (6)	No alterados (mEPC) (3)	↓ Frecuencia ↑ Amplitud (5)		No alterados (P7) (6)	No alterados (::) (2)	
Probabilidad de liberación		↓ (3)	↓ (5)		↓ (6)		
Tamaño RRP			No alterados (5)				
Vesículas sinápticas		~↓ 56 % (total) (3) ~ ↓ 32 % (ancladas) (3) ↓ (+) (1)		↓ (+) (1)			No alterados (2) ↓ (+) (1)
Mitocondria presináptica		↓ densidad, pero morfología normal (3)					↓ en tamaño, pero número no alterado (2)
Neurofilamentos	Anormal (P15) (6)	Anormal (P14) (3) Anormal (+) (1)	Anormal (P14) (5) Anormal (+) (1)	Anormal (P5-14)(2) Anormal (+) (1)	Anormal (6)		
Área postsináptica	↓ (P6) (*) (4)	↓ (P5-13) (3) ↓ (+) (P30) (1)	↓ (+) (P30) (1)	↓ (P14) (2) ↓ (+) (P30) (1)	↓ (P14) ↓ (C2) (P7) (7)		

Perspectivas terapéuticas

Actualmente, la Atrofia Muscular Espinal es una enfermedad que no tiene cura y solo los cuidados paliativos sirven para mejorar la calidad de vida y la supervivencia de los pacientes. No obstante, se están ensayando numerosas estrategias terapéuticas en los diferentes modelos animales. Al ser una enfermedad monogénica, el abordaje va encaminado a aumentar los niveles de proteína SMN funcional en los pacientes. Esta estrategia puede llevarse a cabo principalmente mediante dos enfoques: (1) proporcionar una fuente de SMN exógeno a través de terapias génicas virales, inducción genética de SMN o reintroduciendo células sanas para compensar la pérdida de motoneuronas, y (2) modular el gen endógeno *SMN2* aumentando la inclusión del exón 7, incrementando la transcripción de *SMN2* o aumentando la estabilidad de la proteína SMN generada por *SMN2*.

Existen otras terapias que se centran en paliar los efectos fisiopatológicos. El uso de folistatina, inhibidor de la miostatina (que a su vez inhibe la proliferación muscular) incrementa la masa muscular, la función motora, el número de motoneuronas lumbares y aumenta la supervivencia un 20-30% (Sumner et al., 2009). El tratamiento con un inhibidor sintético de ROCK, la quinasa de RhoA, (Y-27632), va encaminado a mejorar la ruta de regulación de la dinámica de la actina. Los ratones del modelo *Smn*^{2B/-} a los que se les administra el inhibidor de ROCK aumentan su vida media (sobreviven hasta las 14-33 semanas) y presentan un mayor porcentaje de NMJ maduras comparadas con los ratones no tratados (Bowerman et al., 2010).

El estudio de los modelos murinos de AME ha revelado los cambios que ocurren en la progresión de la enfermedad temprana y tardía. Por eso mismo, la ventana temporal en la que se requieren altos niveles de SMN es muy importante a la hora de desarrollar terapias beneficiosas. En un modelo de AME inducible por doxiciclina, la inducción de la proteína SMN en los embriones (E13.5) ha mostrado la mayor supervivencia, alcanzando los ratones más de 200 días de edad, mientras que la administración neonatal (P0-P3) solo extiende la supervivencia hasta 86 días (Le et al., 2011). Por lo que se requiere

un aumento temprano de la cantidad de proteína SMN para la extensión máxima de la supervivencia en modelos murinos de AME.

Como se ha mencionado, el aumento de los niveles de SMN en las motoneuronas es crucial para la corrección de la enfermedad. Los primeros tratamientos para aumentar estos niveles en diferentes modelos de AME, sólo mejoran levemente la vida media de los organismos afectados. El trasplante de células madres neuronales demuestran que las células trasplantadas pueden migrar por el parénquima y generar nuevas motoneuronas, mejorando la integridad de la NMJ y la función motora (Corti et al., 2008). El sistema de transferencia genética con lentivirus para enviar el transgen SMN a las neuronas (lentivector-SMN), restaura los *gens* en fibroblastos derivados de pacientes de AME, produce un aumento del número de motoneuronas en la médula espinal y el tronco del encéfalo (Azzouz et al., 2004). Sin embargo estos ensayos terapéuticos solo aumentan la supervivencia de los animales de 15 a 18 días de media.

Por otro lado, se ha ensayado con éxito en el modelo murino de AME el aumento de la expresión de SMN mediante vectores virales de tipo adeno-asociado (scAAV8-SMN) (Passini et al., 2010). La inyección temprana (día de nacimiento, P0) en los ventrículos laterales cerebrales o en la parte lumbar alta de la médula espinal tiene un efecto beneficioso en los ratones SMN Δ 7. Entre ellos, aumenta la cantidad de proteína SMN (Fig. 16), incrementa el tamaño de las fibras musculares, mejora la arquitectura de la NMJ, restaura las funciones motoras y aumenta significativamente la supervivencia media, desde los 15 días en los ratones SMN Δ 7 no tratados a 157 días en los tratados con scAAV8-SMN. Otras terapias génicas virales usando SMN codificado por scAAV9, con capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica, en el modelo SMN Δ 7 han mostrado una transducción efectiva de un gran número de motoneuronas en la médula espinal a edades postnatales tempranas (P1- P5). La expresión de SMN en motoneuronas es capaz de rescatar la supervivencia de los ratones SMN Δ 7 (>250 días), a pesar de que se observa necrosis periférica secundaria en los ratones de mucha edad (Foust et al., 2010). Otros grupos que han optimizado el uso de vectores scAAV9-SMN muestran también un alto éxito en el rescate de la supervivencia media de los ratones SMN Δ 7, de 69 o más de

100 días, con una mejora en la ganancia de peso y las funciones motoras (Dominguez et al., 2011); (Valori et al., 2010).

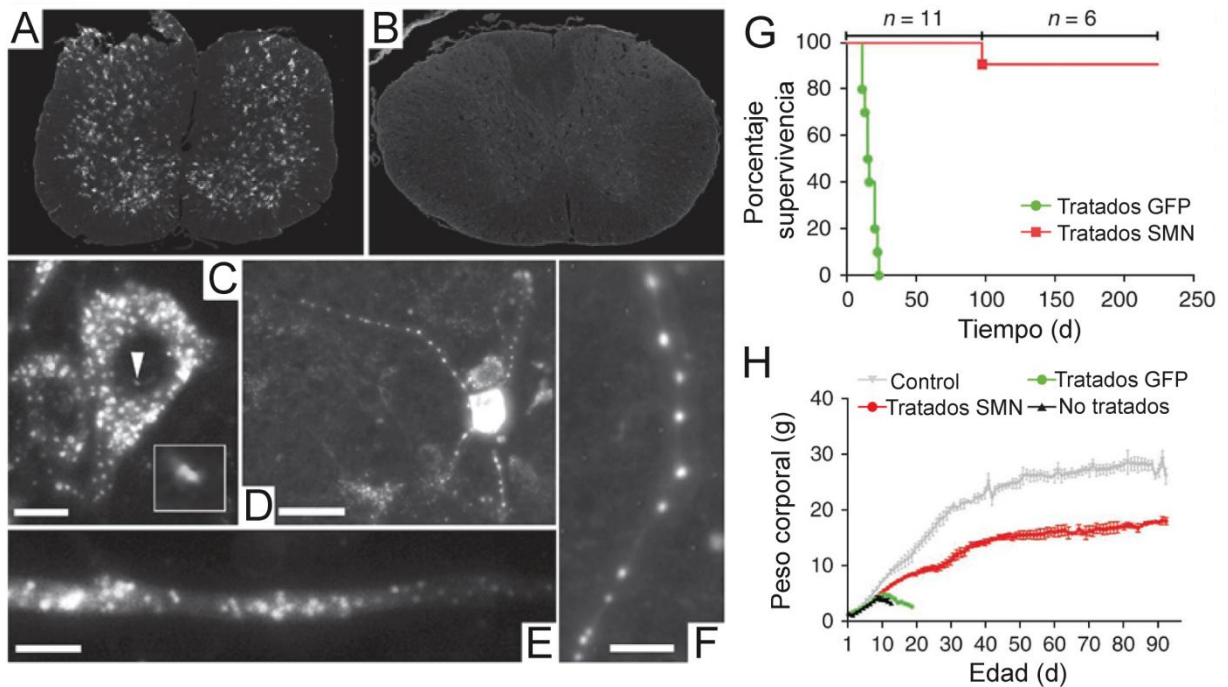


Figura 16. Efecto del tratamiento con AAV-hSMN. **A y B.** Se observa mediante inmunohistoquímica la expresión de SMN en la médula espinal de los ratones tratados (A) frente a los no tratados (B). **C- F.** La proteína se detecta tanto en el núcleo (C, flecha) como en el citoplasma, observándose en las dendritas y los axones (D-F). Extraído de Passini et al, 2010. **G.** Curva de supervivencia de ratones mutantes inyectados con scAAV9-SMN, en la que se observa que hay un gran aumento de la supervivencia en comparación con los inyectados sólo con GFP. **H.** En los ratones mutantes tratados con scAAV9-SMN se observa un aumento del peso corporal. Modificado de Foust et al, 2010.

En cuanto a la estrategia de aumentar la producción de proteína SMN completa incrementando la transcripción de *SMN2* a través de inhibidores de las desacetilasas de histonas, se han ensayado diferentes sustancias como la hidroxurea, el ácido valproico (VPA), la tricostatina A (TSA), el butirato sódico, el fenilbutirato (PBA) o el ácido suberoilánilido hidroxámico (SAHA) (Mattis et al., 2008; Sumner et al., 2003; Chang et al., 2001; Andreassi et al., 2004; Avila et al., 2007; Riessland et al., 2010). Estos compuestos aumentan la cantidad de ARNm y la proteína completa SMN en células derivadas de pacientes SMA, por un lado activando el promotor de *SMN2* y por otro promoviendo la inclusión del

exón 7 en el transcrito de SMN. La tricostatina A produce un leve aumento en la vida media de un modelo murino severo de AME (de 15 días a 19 días) así como un retraso en la pérdida de peso (Avila et al., 2007). El compuesto SAHA también alarga ligeramente la vida media de los ratones, además, aumenta la masa muscular, disminuye la pérdida de motoneuronas, aumenta el tamaño de la NMJ y mejora las habilidades motoras de estos ratones con bajos niveles de SMN (Riessland et al., 2010).

Sin ser un inhibidor de la acetilación de histonas, aunque también en relación con la transcripción, se ha ensayado el tratamiento con prolactina (PRL), la cual es un activador de la vía de STAT5, que es un miembro de la familia de transductores de señales y activadores de la transcripción (*Signal Transducers and Activator Transcription*). Los componentes de esta familia controlan diversas respuestas celulares, por lo que STAT5 hace que aumente los niveles de SMN. Los ratones SMN Δ 7 tratados con prolactina muestran una pérdida de peso más lenta, mejora considerablemente los problemas motores y amplía la supervivencia a 21 días de media, siendo de 15 días en los animales no tratados (Farooq et al., 2011). Los compuestos descritos no son capaces de prevenir la aparición de la enfermedad, pero pueden ayudar a aminorar los efectos de los bajos niveles de SMN en los pacientes con formas intermedias de AME y dejan abiertos diferentes campos para el abordaje y estudio de nuevas terapias.

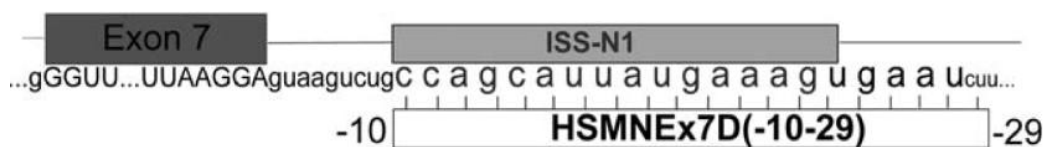
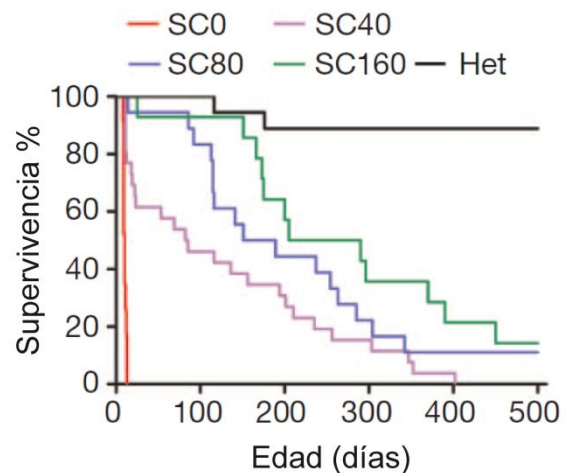


Figura 17. Esquema del exón y el intrón 7 de SMN2 con el silenciador ISS-N1 que es el sitio de unión de la secuencia antisentido HSMNEx7D. Extraído de Porensky et al, 2012.

Recientemente, se ha probado con bastante éxito en ratones modelo de AME el uso de oligonucleótidos antisentido (ASO), para alterar el *splicing* del gen *SMN2* y producir mayor cantidad de proteína completa (Hua et al., 2011;

Porensky et al., 2012). En estos dos trabajos, el ASO utilizado está dirigido contra un elemento silenciador del *splicing* intrónico (ISS-N1) situado tras el exón 7 en el gen *SMN2* (Fig. 17). Los ratones tratados tempranamente (P0) con ASO por vía subcutánea o intracerebroventricular (Hua et al., 2011) o por vía venosa (Porensky et al., 2012) presentan un aumento de la cantidad de transcrito y proteína SMN completa en varios tejidos. Además, se observa un aumento de la expectativa de vida media desde 10 días hasta >150-300 días, de forma dosis dependiente y con diferencias entre expresión en el SNC, en el periférico o en ambos (Fig. 18). Las diferencias observadas entre ambos modelos en cuanto a la eficacia de los tratamientos con ASO podrían deberse a que los modelos murinos de AME son diferentes (SMN Δ 7 en el caso del trabajo de Porensky et al. y el modelo desarrollado por Hsieh et al. en el trabajo de Hua et al.) ya que presentan una variabilidad tisular en cuanto a la expresión de *SMN2*. A pesar de estas diferencias entre modelos, actualmente, esta terapia es una de las de mayor interés en cuanto a su desarrollo para el tratamiento de pacientes de AME.

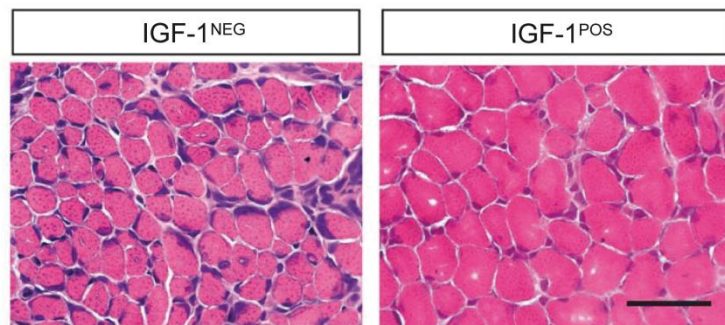
Figura 18. Supervivencia de los ratones modelo de AME tras la inyección subcutánea de ASO a diferentes dosis, comparados con los no tratados y los controles. Modificado de Hua et al, 2011.



Otro evento importante a considerar es que en los ratones mutantes no tratados con ASO los niveles de IGF-1 (factor de crecimiento insulínico 1) circulantes y tisulares son prácticamente nulos a pesar de que la cantidad de mensajero en el hígado (donde se produce el 75% del factor trófico) es normal (Hua et al., 2011). Los datos de estos autores sugieren, además, que es la disminución en la expresión de la proteína transportadora de IGF-1 (*Igfals*), producida por los bajos niveles de SMN, la responsable principal de la deficiencia en los tejidos de IGF-1 y, posiblemente, este déficit sea un elemento

importante en la patogenia de esta enfermedad. IGF-1 juega un papel importante en el desarrollo muscular, se ha postulado que tiene un efecto neurotrófico en las motoneuronas y además su sobreexpresión retrasa la aparición y progresión de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y aumenta la supervivencia en la atrofia muscular bulbar y espinal (AMBE) en ratones. La sobreexpresión de IGF-1 en el músculo (mIGF-1) en un ratón modelo de AME produce un aumento de la masa muscular (Fig. 19) y aumenta ligeramente la supervivencia media de 10 a 14 días (Bosch-Marce et al., 2011). Combinando esta sobreexpresión de mIGF-1 con inyecciones de tricostatina A, que produce un aumento en la cantidad de proteína SMN completa, se observa un aumento de la supervivencia media en estos animales (hasta 22 días). Sería interesante explorar la expresión de IGF-1 en las motoneuronas o en todos los tipos celulares.

Figura 19. En una sección del cuádriceps a P10 se observa que los ratones en los que se sobre-expresa mIGF-1 se rescata el fenotipo de degeneración de las fibras musculares. Barra de calibración: 50 μ m. Modificado de Bosch- Marcé et al, 2011.



La combinación del enfoque encaminado a aumentar la cantidad de proteína SMN completa a partir del gen SMN2, tanto en el SNC como en tejidos periféricos, y del aumento de factores tróficos, tales como el IGF-1, en diferentes tejidos presentan vías interesantes de investigación para el desarrollo de terapias adecuadas para el tratamiento de AME.

OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

1. Caracterizar la morfología y organización de diferentes elementos del terminal presináptico de un modelo murino de AME (SMN Δ 7) y describir si existen anomalías en dichos elementos en los ratones con bajos niveles de SMN en comparación con los controles.
2. Describir funcionalmente la actividad sináptica del TVA en los controles y mutantes SMN Δ 7 y comprobar si el uso de un compuesto que la modifica la cinética de los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje puede mejorar los defectos observados en la transmisión sináptica de los ratones SMN Δ 7.
3. Comprobar si la sobre-expresión de una proteína descrita como modificadora de SMN, la plastina 3 (PLS3), en un modelo murino de AME (taiwanés) es capaz de rescatar algunos de los fenotipos descritos en los ratones carentes de Smn.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Objetivo 1

- 1.1. Explorar las características generales del modelo de AME SMN Δ 7, como el peso y la supervivencia.
- 1.2. Explorar la distribución de los receptores de ACh en el terminal postsináptico a través del marcaje con la toxina bungarotoxina.
- 1.3. Describir la organización de diferentes elementos presinápticos como son las vesículas sinápticas, las zonas activas y componentes del citoesqueleto como son los neurofilamentos, los microtúbulos y la proteína MAP-1B, mediante marcaje inmunocitoquímico.

Objetivo 2

2.1. Registrar los potenciales de placa evocados en las fibras musculares de ratones control y ratones mutantes en el modelo SMN Δ 7, para estudiar su cinética y su amplitud.

2.2. Registrar la liberación espontánea en las fibras musculares para comparar la amplitud de éstos y la frecuencia de aparición en ratones control y mutantes en el modelo SMN Δ 7.

2.3. Calcular la cantidad de vesículas liberadas por el terminal presináptico ante la estimulación de las fibras nerviosas en los terminales controles y mutantes en el modelo SMN Δ 7.

2.4. Explorar si el tratamiento con R-roscovitina mejora la liberación sincrónica y la espontánea en los terminales controles y mutantes en el modelo SMN Δ 7.

Objetivo 3

3.1. Examinar la distribución de los receptores de ACh en los terminales postsinápticos del modelo desarrollado por Hsieh-Li sobreexpresando o no la proteína PLS3.

3.2. Estudiar la morfología de las vesículas sinápticas en el modelo murino de AME taiwanés y si la sobreexpresión de PLS3 afecta a esta organización.

3.3. Explorar la distribución de las zonas activas en el modelo de AME taiwanés y si la sobreexpresión de PLS3 mejora la disminución de proteínas de la zonas activas.

3.4. Cuantificar la cantidad de F-actina en el terminal presináptico, a través del marcaje con faloidina, y explorar si la sobreexpresión de PLS3 aumenta la cantidad de F-actina en el terminal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Modelos animales

Para los experimentos realizados en este trabajo hemos utilizado dos modelos murinos de AME, uno desarrollado por Le et al (Le et al., 2005) denominado “SMN Δ 7” y otro generado en el laboratorio de la Dra. Brunhilde Wirth (*Institut für Humangenetik, Uniklinik Köln, Alemania*) a partir del modelo desarrollado por Hsieh-Li et al (Hsieh-Li et al., 2000), conocido como modelo “taiwanés”.

La línea SMN Δ 7 fue amablemente cedida por el Dr. Arthur Burghes (*Department of Molecular Genetics, College of Biological Sciences, The Ohio State University, Columbus. OH*). Este modelo tiene interrumpido el gen *Smn* murino y expresa dos transgenes en homocigosis: dos copias de *SMN2* humano y seis copias de *SMN Δ 7* (secuencia codifica para la proteína sin el exón 7). El fenotipo de estos ratones mimetiza el descrito en pacientes tipo I-II de AME, con una degeneración progresiva de la musculatura axial y de los miembros inferiores y una pérdida de motoneuronas en la médula espinal. La supervivencia máxima de estos ratones es de 14-16 días. Los animales para experimentación (Tabla 4) se obtuvieron mediante el cruce de portadores (*Smn*^{+/-};*SMN2*^{+/+};*SMN Δ 7*^{+/+}) en un fondo genético FVB/N. La identificación de ratones controles (*Smn*^{+/+};*SMN2*^{+/+};*SMN Δ 7*^{+/+}) y mutantes (*Smn*^{-/-};*SMN2*^{+/+};*SMN Δ 7*^{+/+}) se realizó mediante PCR a partir de biopsias digitales. Las especificaciones de la PCR se muestran en el Anexo 1.

El modelo taiwanés tiene interrumpido el gen *Smn* y sólo contiene un transgen (*SMN2*) que se encuentra en una o dos copias en el tipo severo. Estos ratones también presentan signos de atrofia muscular y degeneración de motoneuronas y tienen una vida máxima de ~10 días (Hsieh-Li et al., 2000). El laboratorio de la Dra. Wirth cruzó este modelo con otro que sobreexpresa plastina 3 (*PLS3V5*) generado en su laboratorio. El modelo resultante, denominado SMA-PLS3, tiene un fondo genético 50% C57B16:50% FVB/N y presenta una supervivencia máxima de 20 días. El gen *PLS3* se ha descrito como un posible modificador genético de AME (Oprea et al., 2008) y la proteína que codifica está involucrada en la interconexión de los filamentos de actina confiriendo rigidez a los haces formados (Bretscher, 1981). Para estudiar la

organización sináptica en este modelo, en colaboración con el laboratorio de la Dr. Wirth, utilizamos músculos fijados de esta línea SMA-PLS3 (Tabla 4).

Tabla 4. Genotipos y denominaciones de los diferentes ratones utilizados

Modelo	Nombre	Genotipo
SMA Δ 7	Control	<i>Smn</i> ^{+/+} ; <i>SMN2</i> ^{+/+} ; <i>SMNΔ7</i> ^{+/+}
	SMN Δ 7	<i>Smn</i> ^{-/-} ; <i>SMN2</i> ^{+/+} ; <i>SMNΔ7</i> ^{+/+}
	HET	<i>Smn</i> ^{+/-} ; <i>SMN2</i>
SMA-PLS3	SMA	<i>Smn</i> ^{-/-} ; <i>SMN2</i>
	HET-PLS3	<i>Smn</i> ^{+/-} ; <i>SMN2</i> ; <i>PLS3V5</i>
	SMA-PLS3	<i>Smn</i> ^{-/-} ; <i>SMN2</i> ; <i>PLS3V5</i>

Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con la legislación vigente según las directrices del Consejo Europeo sobre el Cuidado de Animales de Laboratorio. Los ratones utilizados en los experimentos se mantuvieron en condiciones estándares (12:12 horas luz:oscuridad y alimentación *ab libitum*).

Preparaciones neuromusculares

Los estudios realizados en la NMJ se llevaron a cabo en dos músculos:

- *Transversus abdominis* (TVA). Músculo esquelético situado en la capa más profunda de la zona anterior de la pared abdominal. Sus fibras musculares son predominantemente de tipo lento y está especialmente afectado en el modelo SMN Δ 7 de AME (Murray et al, 2008; Ruiz et al, 2010).

- *Levator auris longus* (LAL). Músculo situado en la parte posterior del cuello y responsable del movimiento del pabellón auricular en roedores. Es un músculo plano y de tipo rápido. Está dividido en dos porciones morfológicas y funcionales, la región rostral y la región caudal y está menos afectado que el TVA (Ruiz et al., 2010).

Disección del músculo TVA

Los ratones SMNΔ7 y controles utilizados para experimentación se sacrificaron mediante la exposición a alta P_{CO_2} en una cámara cerrada. Posteriormente, se desangraron mediante sección de la carótida. Se colocó al animal en decúbito supino y se realizó una incisión transversal en la parte baja abdominal. Se separó, con fórceps y de forma bilateral, la piel de la musculatura del abdomen. Se extrajo el bloque muscular abdominal junto con la caja torácica y se traspasó a una placa de Petri (\varnothing 55 mm) con la base cubierta con un elastómero de silicona (Sylgar). La disección se llevó a cabo en una solución con la siguiente composición (mM): 110 NaCl, 5 KCl, 25 $NaHCO_3$, 2 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$ y 30 glucosa. Esta solución se gaseó continuamente con carbógeno (95% O_2 y 5% CO_2), para mantener el pH a 7'35. La solución se renovó frecuentemente durante la disección. La pared abdominal, junto con la parte caudal de la caja torácica, se fijó con alfileres de 0'2 mm. A partir de este momento se trabajó en un microscopio estereoscópico (SMZ 1500; Fig. 21), en el que se pudieron observar las distintas capas musculares. Al ser el TVA el músculo más profundo de esta zona (Fig. 20), se resecó el recto abdominal y el oblicuo externo, dejando al descubierto el TVA y la parte superior del oblicuo interno. El músculo se limpió de otros tejidos, tanto conjuntivo como adiposo.

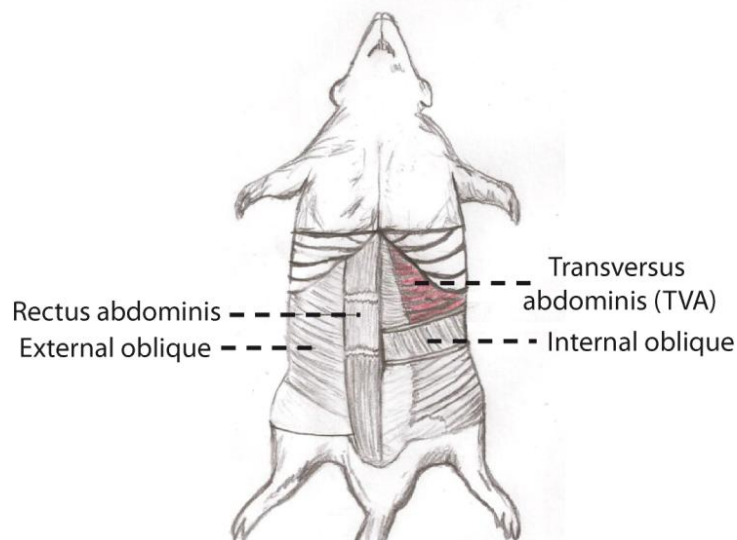


Figura 20. Esquema anatómico de la situación del músculo *Transversus abdominis*. Cortesía de Margret F. Neher.

Para los registros electrofisiológicos, se resecó la rama nerviosa intercostal T10 mediante tijeras pequeñas (FST 15000-10). Una vez finalizada la disección, se colocó el músculo bien estirado en una cámara de registro. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente.

Figura 21. Microscopio estereoscópico SMZ 1500, utilizado para las disecciones musculares.



Disección del músculo LAL

Los ratones SMNΔ7 y controles utilizados para la disección del LAL se sacrificaron de la misma manera que para la disección del TVA (exposición a alta P_{CO_2}). Se desangraron mediante sección cardíaca. Se fijó el animal en decúbito prono y se quitó el pelaje de la cabeza con una hoja de bisturí. A continuación se diseccionó todo el tejido muscular desde el pabellón auricular izquierdo hasta más allá de la línea media. Toda la musculatura se traspasó a una placa de Petri (\varnothing 55 mm) con la base cubierta con un elastómero de silicona. Se sujetó con alfileres de 0'2 mm, con los músculos superficiales en la base de la placa. A partir de este momento se trabajó bajo el microscopio estereoscópico. La disección se realizó en una solución idéntica a la utilizada para el TVA y gaseada con carbógeno. Igualmente, las disecciones se realizaron a temperatura ambiente. Se retiraron las diferentes capas musculares, hasta llegar a la musculatura más externa, ya que el LAL es el músculo más superficial (Fig. 22). Finalmente, se limpió el LAL de otros tejidos (adiposo y conjuntivo).

Este músculo se utilizó para tinciones inmunohistoquímicas, por lo que no En este caso no se resecó el nervio correspondiente (rama del nervio facial) ya que el músculo no se utilizó para electrofisiología.

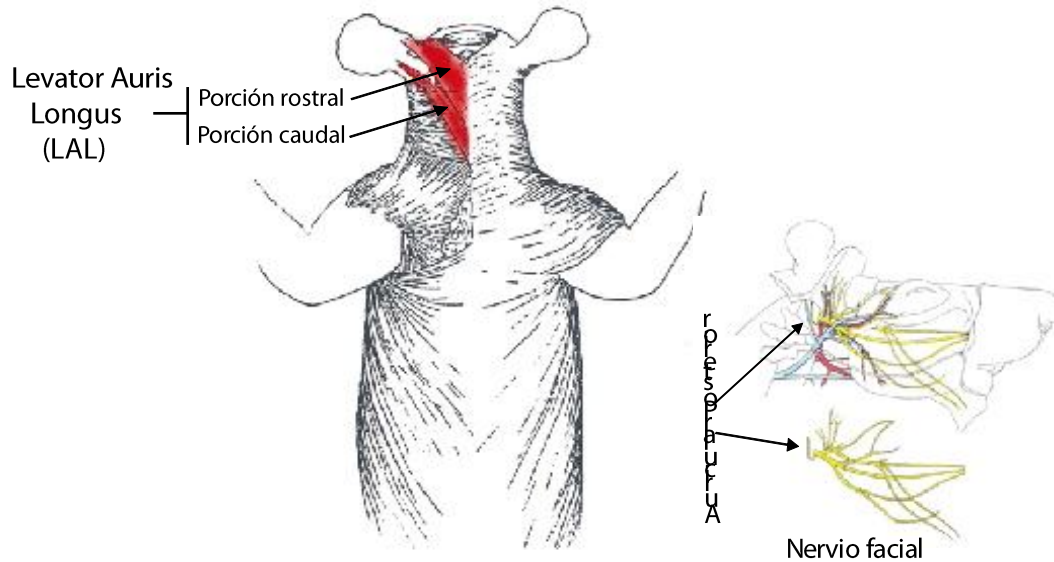


Figura 22. Esquema anatómico donde se muestra la localización, inervación y vascularización del músculo *Levator auris longus* en el ratón. Modificado de *Anatomy of the rat*, Eunice Chace Greene (Braintree Scientific, MA, EEUU).

Inmunohistoquímica

1. Fijación del tejido y lavado. Los músculos diseccionados se mantuvieron en la solución con carbógeno (95% O₂:5% CO₂) durante 30 minutos. Tras esto, se fijaron por inmersión durante 90 minutos con paraformaldehído (PFA) al 4% preparado en PBS, manteniéndose a 4 °C. Después se lavó el tejido 3 veces durante 5 minutos con PBS y se dejó en esta solución a 4 °C hasta el día siguiente, que se inició el protocolo de inmunohistoquímica. Véase ejemplo de protocolo completo en el Anexo 2. Este proceso se realizó en el modelo SMNΔ7, ya que los músculos recibidos desde laboratorio de la Dra. Wirth ya se encontraban fijados en PFA al 4%.

2. Bloqueo y permeabilización del tejido. Primero se añadió a la preparación glicina 0'1 M en PBS durante 30 minutos, para neutralizar los

restos de PFA. Se permeabilizó el tejido con PBS-Tritón X-100 al 1%, tras lo cual, se bloquearon los sitios de unión inespecíficos para los anticuerpos con BSA al 5% en PBS-Tritón X-100 al 1%.

3. Incubación con anticuerpo primario. Se incubó la preparación durante la noche con el anticuerpo primario correspondiente en PBS-Tritón X-100 1%, BSA 5%. Los anticuerpos primarios que se utilizaron en estos experimentos para las diferentes tinciones están especificados en la Tabla 5.

Tabla 5. Anticuerpos primarios utilizados para el marcaje de diferentes proteínas del terminal presináptico.

Anticuerpo	Casa comercial	Referencia	Dilución	Comentarios
Anti-vAChT (policlonal de conejo)	Synaptic System	139103	1:500	Transportador vesicular de acetilcolina
Anti-SV2 (monoclonal de ratón)	DSHB	SV2-c	1:500	Proteína transmembrana de las vesículas sinápticas
Anti- NF (monoclonal de ratón)	Millipore	MAB5254	1:750	Neurofilamentos
Anti-bassoon (monoclonal de ratón)	Stressgen	VAM-PS003F	1:100	Proteína de andamiaje de las zonas activas
Anti-tubulina acetilada (monoclonal de ratón)	Sigma	T7451	1:1000	Microtúbulos recién polimerizados
Anti MAP-1B (policlonal de cabra)	Santa Cruz Biotechnology	Sc-8970	1:500	Proteínas asociadas a los microtúbulos
Anti-piccolo (policlonal de conejo)	Synaptic System	142 003	1:100	Proteína de andamiaje de las zonas activas

4. Incubación con anticuerpo secundario. Tras varios lavados con PBS-Triton X-100 0'05% se añadieron los anticuerpos secundarios en PBS-Tritón X-100 0'05%, BSA 2'5%, incubándose la preparación durante 1 h. Los anticuerpos secundarios utilizados se especifican en la Tabla 6. Se utilizó el anticuerpo secundario adecuado a la especie del primario.

Tabla 6. Anticuerpos secundarios utilizados para la visualización de los anticuerpos primarios correspondientes.

Anticuerpo	Casa comercial	Referencia	Dilución	Excitación/Emisión
Alexa Fluor 488 (burro anti-conejo o cabra anti-ratón)	Invitrogen	A21206 A11029	1:500	495 nm/519 nm
Alexa Fluor 594 (burro anti-conejo o cabra anti-ratón)	Invitrogen	A21207 A11032	1:500	590 nm/617 nm
Alexa Fluor 647 (burro anti-conejo o cabra anti-ratón)	Invitrogen	A31573 A21236	1:500	650 nm/668 nm
CF 488 (burro anti-conejo o cabra anti-ratón)	Biotium	BT-20015 BT-20014	1:400	493 nm/518 nm

Junto con los anticuerpos secundarios, se añadió bungarotoxina-rodamina (BTX-rho) o bungarotoxina conjugada con Alexa647 (BTX-647) (0'5 µg/ml) para la tinción de los receptores nicotínicos de acetilcolina y por tanto, marcar el terminal postsináptico. Por último se hicieron lavados con solución PBS-Tritón al 0'05%.

5. Montaje del tejido. Se montaron los músculos sobre portaobjetos, bajo un microscopio estereoscópico, con medio de montaje (SlowFade). Se recubrieron con cubreobjetos y se sellaron con laca de uñas. Las preparaciones se mantuvieron en oscuridad y a 4 °C hasta su posterior observación en microscopía confocal.

En el caso del modelo de AME taiwanés, los músculos ya diseccionados y fijados (PFA 4%) se recibieron inmersos en una solución PBS. El primer paso fue sumergirlos en sacarosa al 20%, 24 h, seguido de 30%, 24 h. Esto se realizó como crioprotección para los tejidos antes de ser congelados. Los músculos se insertaron en un bloque de gelatina (gelatina 15% y sacarosa 20%), tras la cual se congelaron a -80°C. Los bloques se embebieron en OCT,

para asegurar que la temperatura de corte fuese la óptima, y se cortaron en un criostato (*MICROM HM525*) en secciones de 40 μm . Las secciones se colocaron en cestillos y éstos en placas de 12 pocillos (\varnothing 35 mm), tras lo que realizó la inmunohistoquímica mediante el protocolo anteriormente descrito. Los anticuerpos utilizados se muestran en la Tabla 5.

Del mismo modo, para el marcaje de los receptores postsinápticos de ACh, se utilizó BTX-rho. También se realizó marcaje de actina, en cuyo caso se utilizó Faloidina-Alexa647 a una concentración de 165 nM. La Faloidina es una toxina que produce el hongo *Amanita phalloides* y que se une específicamente a la actina filamentosa (F-actina) (Small et al., 1999). Se utilizó una Faloidina conjugada con el fluoróforo Alexa647, por lo que la tinción se realizó de forma directa añadiendo la toxina a la vez que los anticuerpos secundarios y la BTX-rho.

Las secciones se montaron en portaobjetos de la misma manera que el músculo completo y se mantuvieron en oscuridad y a 4°C hasta su observación en microscopía confocal.

Adquisición y análisis de imágenes

Las imágenes se adquirieron con un microscopio laser confocal multiespectral motorizado Olympus FV1000 (Fig. 23). La microscopía confocal ofrece varias ventajas sobre la microscopía óptica convencional, las cuales incluyen la habilidad de eliminar la información que no se encuentra en el plano de foco y la capacidad de adquirir secciones ópticas seriadas.

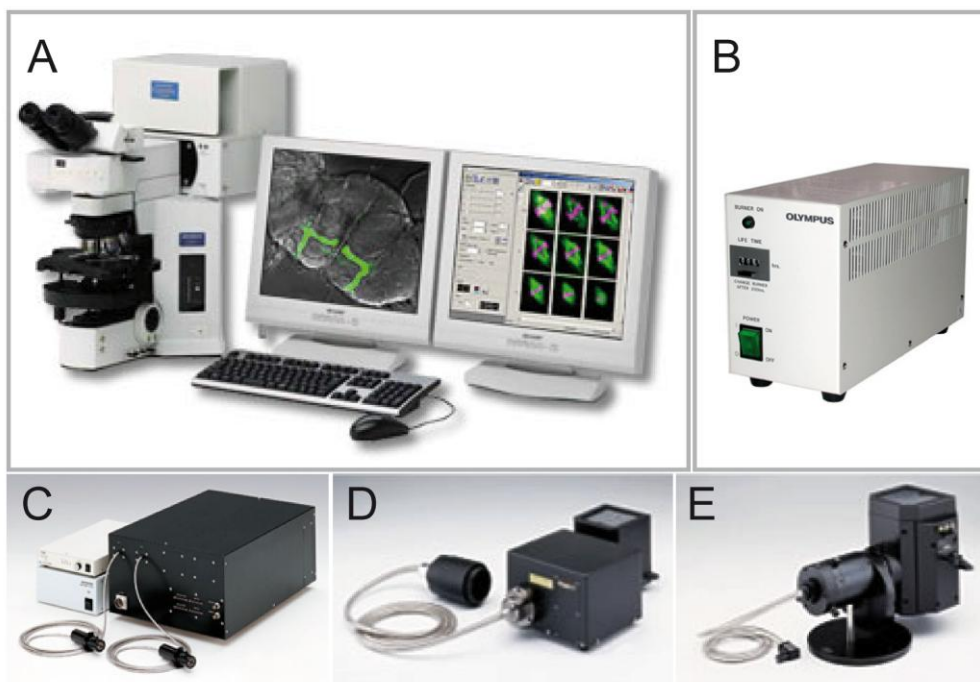


Figura 23. Componentes del microscopio láser confocal Olympus FV1000. **A.** Microscopio motorizado de transmisión directa Olympus FV1000. **B.** Lámpara de fluorescencia de mercurio (*Olympus U-RFL-T*). **C.** Sistema de láser con dos fibras. Equipado con láser de Argón y de Helio-Neón (*Melles Griot*). **D.** Módulo de detección de luz transmitida. **E.** Módulo de iluminación de fluorescencia.

El microscopio confocal utilizado en nuestros experimentos está equipado con 3 líneas láser de excitación: M_Ar (láser multilínea de argón con excitación a 458, 488 y 515 nm), HeNeG (láser de helio-neón verde, excitación a 543 nm) y HeNeR (láser de helio-neón rojo, excitación a 633 nm). La adquisición de imágenes se realizó de forma secuencial para los diferentes láseres, para evitar la excitación cruzada de las muestras marcadas con diferentes fluoróforos. Se usó un objetivo de inmersión en aceite de 60x con una apertura numérica de 1'42. Las imágenes de los terminales pre- y postsinápticos se obtuvieron mediante la adquisición de secciones ópticas con un desplazamiento de 0'5 μm en el eje Z/sección y una apertura confocal de $\sim 115 \mu\text{m}$. Para la adquisición se utilizó el programa FV10-ASW 1.7 Viewer (Olympus), diseñado mediante un sistema de ventanas compuesto por dos partes principales: (1) menú de control con un sistema de pestañas con las distintas opciones de captura y (2) visualización de la imagen (Fig. 24)

Todas las imágenes para un marcaje concreto fueron adquiridas con los mismos parámetros para los distintos genotipos: misma intensidad del láser, mismo voltaje (hv), ganancia y offset. Ver Anexo 3 para las especificaciones del microscopio y los parámetros de adquisición de las imágenes. Con el programa FV10-ASW 1.7 Viewer se transformaron las imágenes de formato OIB a formato TIFF para su análisis.

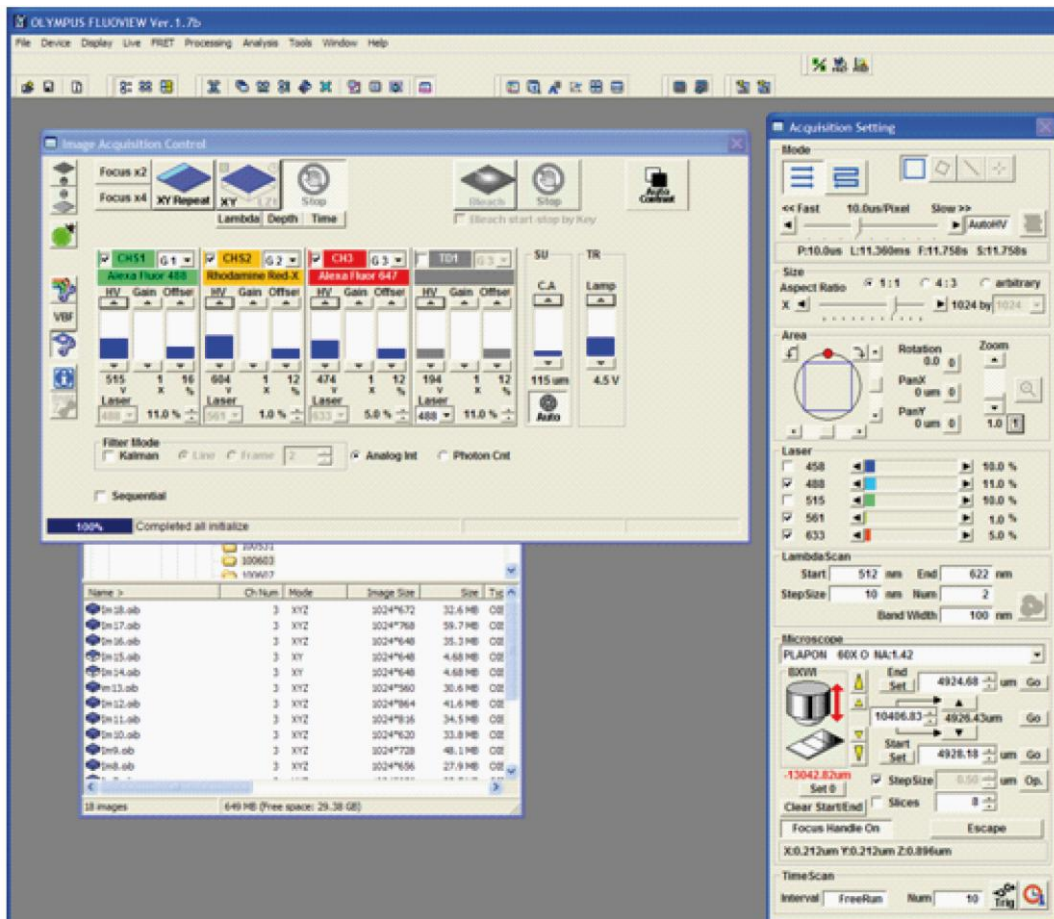


Figura 24. Programa FV10-ASW utilizado para la adquisición de imágenes

Los análisis morfométricos y de intensidad de las imágenes se llevaron a cabo con el programa *ImageJ* (W. Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Análisis del área postsináptica. Se hizo una proyección máxima en Z a partir de la secuencia de imágenes correspondientes al marcaje con BTX-Rho. La imagen resultante se convirtió de 16-bits (RGB) a 8-bits (escala de grises). Después, se creó una máscara a partir de un umbral de intensidad de fluorescencia elegido manualmente a fin de medir el área total del terminal postsináptico (Fig. 25).

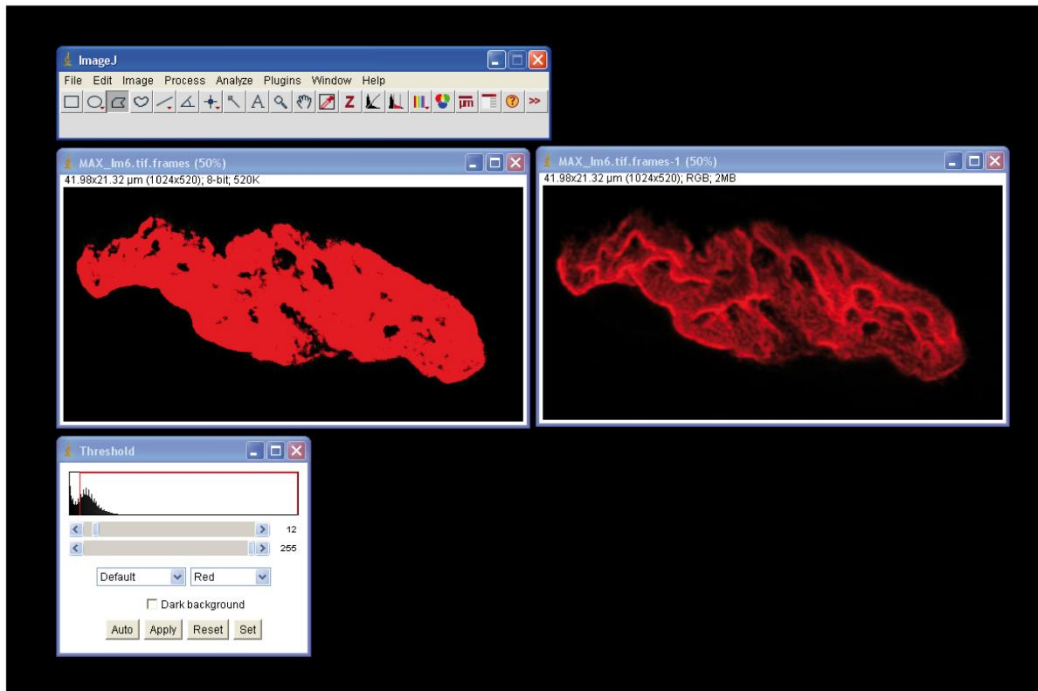


Figura 25. Ejemplo de análisis del área postsináptica en un terminal procedente de un ratón WT a P14.

Análisis de las vesículas sinápticas. Para el análisis de las vesículas sinápticas se transformaron las imágenes de 16-bits (RGB) a 8-bits (escala de grises) y se estableció manualmente un umbral de intensidad de fluorescencia. A través de la opción *Analizar partículas* se obtuvo el número de agrupaciones de vesículas y el área de cada una de ellas. Mediante la suma de las áreas individuales se obtuvo, así mismo, el área total. Este valor se utilizó posteriormente como valor absoluto o referido al área postsináptica.

Análisis del número y distribución de zonas activas (bassoon). La cuantificación del número y la distancia entre partículas se realizó mediante la

rutina *Encontrar máximo*. Se estableció un umbral a partir del cual se calculó el número de partículas y la localización X,Y de cada una de ellas, mediante el cálculo del centroide. Posteriormente, utilizando una rutina escrita en *Microsoft Office Excel* (cortesía del Prof. Álvarez de Toledo) se calculó la distancia entre cada partícula y las demás, de donde se obtuvieron las distancias mínimas entre partículas.

Análisis del área ocupada por las zonas activas (piccolo). Para este análisis, se estableció un umbral de intensidad tres veces superior a la desviación estándar de la intensidad del fondo. A través de la máscara obtenida a partir de este umbral se calculó la intensidad total, la intensidad media y el área total de piccolo.

Análisis del área de otros elementos del terminal presináptico. El área de los neurofilamentos, microtúbulos y MAP1B se determinó con máscaras basadas en umbrales de intensidad de fluorescencia, de la misma forma que para los terminales postsinápticos.

Análisis de F-actina presináptica. El perfil postsináptico (proyección máxima) se utilizó para determinar el área presináptica marcada con faloidina excluyéndose toda el área no coincidente en cada sección óptica. Posteriormente, se realizó la proyección Z de las imágenes y se obtuvo un histograma de intensidad a partir del cual se calculó la intensidad media, la intensidad total y el área ocupada por la actina intraterminal.

Los datos estadísticos se expresaron como media \pm el error estándar de la media, siendo n el número de terminales sinápticos analizados y N el número de ratones utilizados para las tinciones. Las diferencias entre los diferentes grupos se evaluaron usando el t-test para dos colas, ya que los datos seguían una distribución normal. Se consideraron que existían diferencias significativas cuando la p era menor de 0'05.

Electrofisiología

Registro intracelular

Los registros se realizaron en el músculo TVA de ratones controles y mutantes SMN Δ 7 en los días postnatales 9-11 (P9 - P11). A continuación se describen los distintos componentes del dispositivo experimental (Fig. 26).

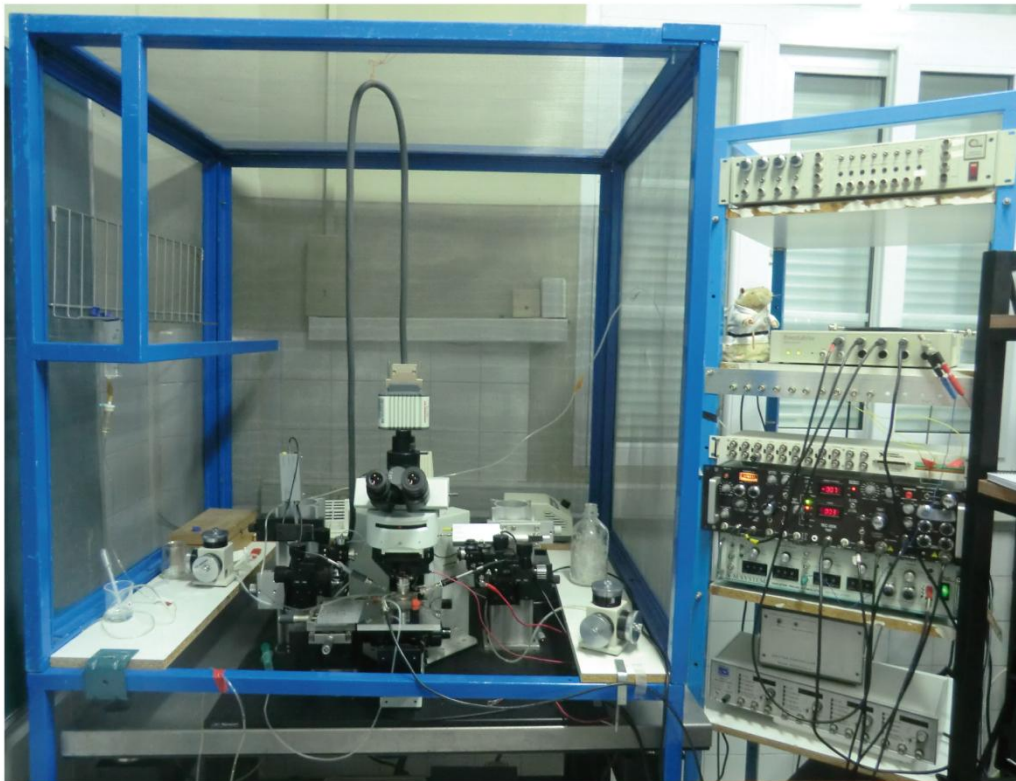


Figura 26. Dispositivo experimental utilizado para el registro intracelular.

El nervio se estimuló mediante un electrodo de succión, compuesto por un tubo de polietileno de 2 mm de diámetro que aloja un hilo de plata clorurado (Ag-AgCl, electrodo activo) y sobre el que se enrolla otro hilo conductor (Ag-AgCl, electrodo de referencia) (Fig. 27). Este dispositivo se conectó a un generador de pulsos aislado (*Isolated Pulse Stimulator* modelo 2100, *A-M Systems*) y a un sistema de succión mediante un tubo y una jeringa con solución salina extracelular (Fig. 28). La estimulación del nervio se realizó aplicando una diferencia de potencial entre ambos terminales del electrodo de

succión mediante el estimulador de pulsos (Fig. X). La estimulación consistió en pulsos cuadrados de 0.2 ms y de 2 – 60 V, a frecuencias variables (0.5 – 20 Hz).

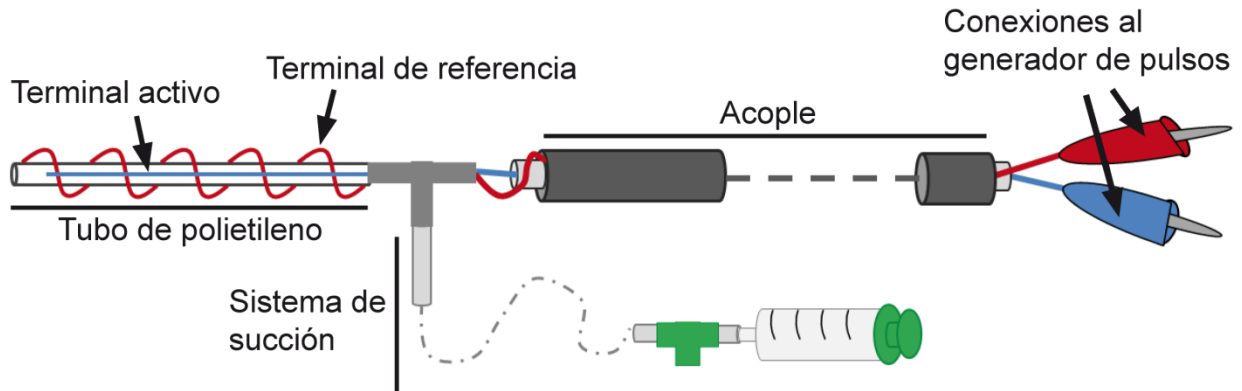


Figura 27. Diagrama mostrando los componentes del electrodo de succión.



Figura 28. Estimulador generador de pulsos (*Isolated Pulse Stimulator*, modelo 2100, A-M Systems). En el panel frontal se encuentran, entre otros, los diales para fijar la frecuencia, la duración del tren de pulsos y la duración del estímulo, junto con el potenciómetro para fijar la amplitud del pulso (V), las conexiones de salida para el electrodo de succión y el *trigger* para la interfaz.



Figura 29. Estirador horizontal de vidrio (Puller, modelo P-97, *Sutter Instrument Co.*) utilizado para la fabricación de micropipetas para registro intracelular.

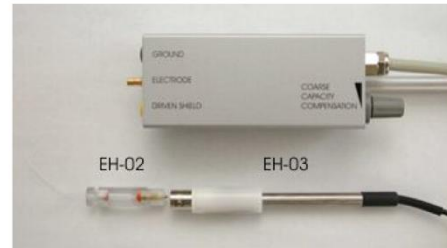
Para registrar los potenciales postsinápticos en las fibras musculares, se utilizaron micropipetas fabricadas a partir de capilares de vidrio de borosilicato (1 mm \varnothing exterior x 0.75 mm \varnothing interior) mediante un estirador de vidrio horizontal (Puller modelo P-97, *Sutter Instrument Co.*) (Fig. 29) con los siguientes parámetros: calor = 460, tirón = 200, velocidad = 80 y tiempo = 200. Las micropipetas se rellenaron con 3 M KCl. La solución salina de la micropipeta se conectó a un alambre de plata clorurado conectado con el seguidor de voltaje y éste, a su vez, con el cuerpo principal del amplificador de registro intracelular (TEC-05X) (Fig. 30). La micropipeta se sujetó a un sistema asociado a un micromanipulador (*Narishige* MHW-3) (Fig. 31). La salida del amplificador se conectó a un convertidor analógico digital o interfaz (*PowerLab/4SP*), que transformó la señal analógica en digital mandando, posteriormente, la información al ordenador. El dispositivo experimental (microscopio, micromanipuladores, seguidor de voltaje...) se colocó sobre una mesa antivibratoria (*Newport*). Este dispositivo se aisló eléctricamente del resto de los aparatos mediante una jaula de Faraday.



TEC-05X

Potenciómetros:

1. Compensación de la resistencia de la pipeta
2. Corrección del potencial de unión líquido
3. Compensación de la capacidad de la pipeta
4. Conexión con el seguidor de voltaje



Seguidor de voltaje y sistema de sujeción de la pipeta

Figura 30. Amplificador de registro intracelular TEC-0.5X. Detalle del seguidor de voltaje y el sistema de sujeción de la micropipeta.

Figura 31. Micromanipulador hidráulico de tres ejes MHW-3 (Narishige).



Para los registros electrofisiológicos, la preparación neuromuscular se colocó en una camarita de registro de metacrilato especialmente diseñada para ello, con un sistema de intercambio continuo de solución burbujeada con carbógeno. A su vez, en el interior de la solución de la camarita se ubicó un electrodo clorurado conectado con la tierra del seguidor de voltaje. Para penetrar las fibras musculares, la pipeta se colocó cercana a la superficie del músculo, visualizándose bajo un microscopio de transmisión directa (Olympus BX50WI). La resistencia de la micropipeta dentro de la solución varió entre 10 y 30 M Ω . Esta resistencia se compensó mediante el amplificador, igual que la capacidad de la pipeta y el potencial de unión líquido debido a las soluciones del baño y la pipeta (Fig. 32A y 32B). Mediante el micromanipulador se aproximó la

micropipeta a una fibra muscular, de manera que en la pantalla del ordenador se observó un aumento progresivo de la resistencia. Una vez la micropipeta penetró en una fibra muscular, se registró el potencial de membrana como una deflexión hacia abajo (Fig. 32C). Posteriormente, se dejaron de aplicar pulsos cuadrados a través de la micropipeta y se estimuló mediante el electrodo de succión el nervio. Tras dar un estímulo, se midió el tiempo de subida (10 – 90%) del potencial de placa evocado (EPP), para saber la cercanía al terminal motor, considerando aceptable valores < 1'5 ms.

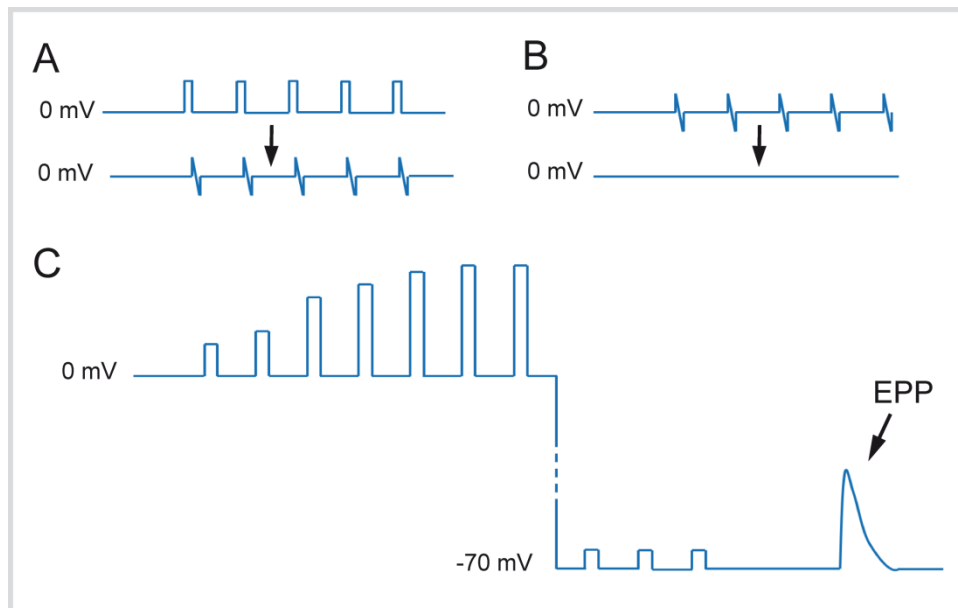


Figura 32. Esquema de los cambios producidos en el registro durante el proceso de penetración de la micropipeta en una fibra muscular. **A.** Aplicación de un pulso cuadrado con la micropipeta en el baño y compensación de la resistencia de ésta. **B.** Compensación de la capacidad. **C.** Aumento de la señal al aumentar la resistencia entre la pipeta y el electrodo de referencia. Finalmente, penetración en la fibra muscular y registro de V_m . Cese de aplicación del pulso cuadrado que pasa por la pipeta y aplicación de un estímulo a través del electrodo de succión para registrar los potenciales evocados de placa.

Tras comprobar la viabilidad de la preparación, la contracción muscular se bloqueó mediante la adición en el baño de 3 μM de μ -Conotoxina GIIIB, bloqueante específico de los canales de sodio dependientes de voltaje del músculo. Tras el bloqueó se cerró el sistema de intercambio de solución y el burbujeo de la solución se trasladó a la precámara de registro. Los

experimentos se realizaron con una solución con la siguiente composición (mM): 110 NaCl, 5 KCl, 25 NaHCO₃, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂ y 30 glucosa.

Se registraron potenciales de placa en miniatura (mEPPs) y potenciales de placa evocados (EPPs) en diferentes fibras de un mismo músculo. Los datos fueron adquiridos con el programa Chart5 (Fig. 33). Todos los registros se realizaron a temperatura ambiente.

En los experimentos con R-roscovitina, se registró en condiciones estándar y después se añadió a la cámara de registro la droga diluida en DMSO. Las concentraciones de ensayo fueron de 100 µM (0'1% DMSO) y 10 µM (0'01% DMSO) de R- roscovitina. Tras incubar durante media hora, se realizaron registros de potenciales de mEPPs y EPPs en varias fibras de cada músculo. También, se realizaron experimentos controles donde se registró con una concentración de 0.1% de DMSO.

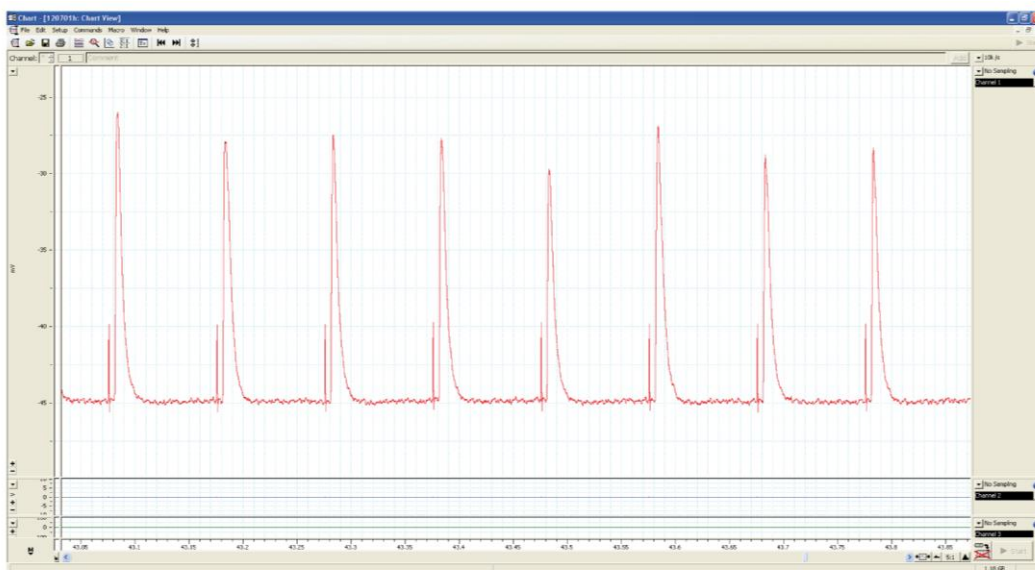


Figura 33. Ejemplo de respuestas evocadas en una fibra muscular bajo un tren de estímulos a 5 Hz. Pueden observarse los artefactos de estimulación justo antes de las respuestas evocadas.

Análisis de los registros

Con el mismo programa usado para la adquisición (Chart 5, *ADinstruments*) se analizó la amplitud y la cinética de los EPPs y de los mEPPs en cada uno de los registros. Para los EPPs, los potenciales se corrigieron por la sumación no lineal (Boyd and Martin, 1955), del siguiente modo:

$$EPP_c = EPP_r / 1 - (EPP_r / (V_m - E_r))$$

donde EPP_c es la amplitud del potencial postsináptico corregido.

Además, las amplitudes medidas fueron linealmente normalizadas a -70 mV de potencial de membrana (Kretschmannova and Zemkova, 2004):

$$EPP_{-70} = EPP_c \cdot F$$

siendo EPP_{-70} la amplitud del EPP corregido por el potencial de membrana; EPP_r , la amplitud del potencial registrado y F , el factor de corrección que se definió de la siguiente forma:

$$F = (V_s - E_r) / (V_m - E_r)$$

donde V_s es el potencial de membrana elegido para la corrección lineal, en nuestro caso -70 mV; V_m , el potencial de membrana medido durante el registro de la fibra correspondiente; y E_r , el potencial de reversión (que asumimos como -5 mV).

Las amplitudes de los mEPPs se normalizaron también a -70 mV del potencial de membrana.

El contenido cuántico, definido como el número de vesículas que liberan neurotransmisor desde el terminal presináptico tras un potencial de acción, se calculó mediante el método indirecto y el método directo (Fig. 34).

Método directo:

$$QC = \text{amplitud media de EPPs} / \text{amplitud media de los mEPPs}$$

El cálculo del contenido cuántico mediante el método indirecto se basa en que en condiciones de bajo calcio o de alteración de la maquinaria sináptica,

ocurren fallos (f), es decir, que tras un estímulo no se produce un potencial evocado en el músculo en un porcentaje de casos. Eso se debe a que disminuye la probabilidad de liberación. El cálculo se hizo de la siguiente forma:

$$QC = \text{Ln } N / f$$

siendo N el número total de estímulos y f el número de fallos producidos (Del Castillo and Katz, 1954).

Todos los datos se representan como la media \pm el error estándar de la media, siendo n el número de fibras musculares registradas y N el número de ratones registrados. Todos los experimentos se realizaron en, al menos, tres ratones por genotipo. Las diferencias entre los diferentes grupos se evaluaron usando el t-test para dos colas, ya que los datos siguieron una distribución normal.

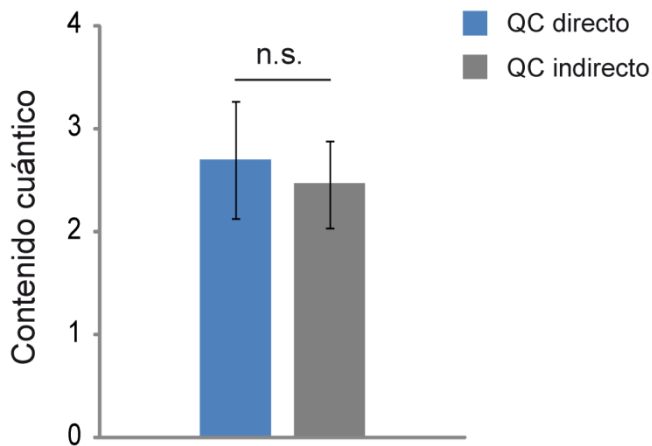


Figura 34. Cuantificación del contenido cuántico a través del método directo e indirecto en terminales motores SMN Δ 7. Véase que hay no diferencias significativas entre los resultados obtenidos con ambos métodos ($p = 0.75$; $n, N = 11$ terminales, 4 ratones).

RESULTADOS

Para entender mejor las alteraciones que tienen lugar en AME, se llevó a cabo un estudio morfológico y funcional de la NMJ en dos modelos murinos, el modelo SMN Δ 7 y el modelo PLS3-SMA. Para ello, se realizaron los experimentos en dos músculos (1) el *Transversus abdominis* (TVA), un músculo de tipo predominantemente lento que está especialmente afectado en la enfermedad en el modelo SMN Δ 7 (Murray et al., 2008; Ruiz et al., 2010); y (2) el *Levator auris longus* (LAL), que es un músculo rápido y que se encuentra menos afectado (Ruiz et al., 2010). En general, los estudios morfológicos se llevaron a cabo, predominantemente, a dos edades, en el día postnatal 7 (P7), donde ya aparecen alteraciones en cuanto a la transmisión sináptica (Ruiz et al., 2010) y a P14, que se corresponde con los últimos estadios de la enfermedad. A nivel postsináptico se exploró el tamaño de los terminales y la distribución de los receptores de acetilcolina nicotínicos y, a nivel presináptico, la organización de las vesículas sinápticas, la distribución de las zonas activas y diferentes componentes del citoesqueleto. En el estudio funcional, los experimentos se realizaron en el modelo SMN Δ 7 a P10 y se registraron los potenciales de placa evocados (EPPs) y los potenciales de placa en miniatura (mEPPs), a partir de los cuales se cuantificaron diferentes aspectos funcionales de la neurotransmisión.

1. Modelo SMN Δ 7

1.1. Características generales

En el momento del nacimiento los ratones mutantes y controles eran indistinguibles en apariencia. Durante la primera semana de vida, los ratones SMN Δ 7 presentaron menor tamaño en comparación con sus hermanos de camada controles, característica presente durante todo el periodo de vida (Fig. 35).

La actividad motora de los ratones deficientes en SMN estaba reducida, con movimientos menos activos y lactancia menor que sus hermanos de camada controles. La duración del tiempo que los ratones tardan en girar sobre sí

mismo al ser colocados sobre un lateral (*righting reflex test*) para evaluar la pérdida de función motora (Donnelly et al., 2012) mostró que los ratones controles se giraron casi instantáneamente, mientras que los ratones SMN Δ 7 tenían esta capacidad reducida, como se ha descrito anteriormente (El-Khodor et al., 2008; Donnelly et al., 2012). Además, mostraron una pérdida progresiva de fuerza en las extremidades, con disminución de la deambulación.

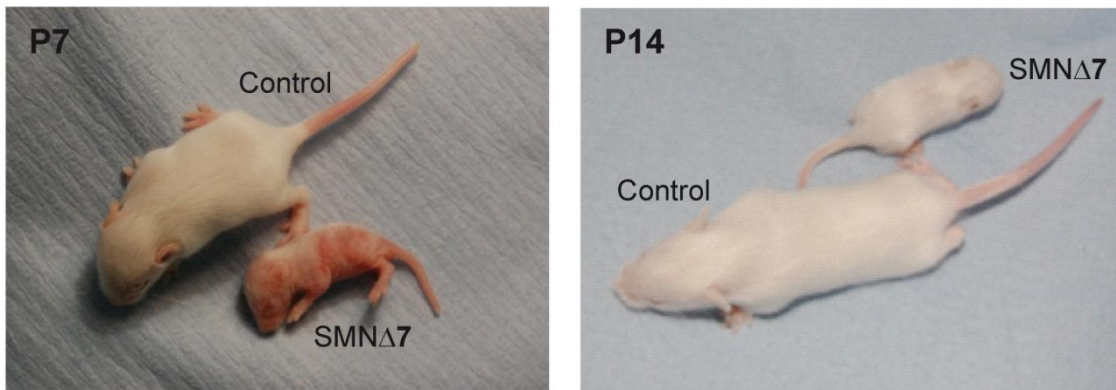
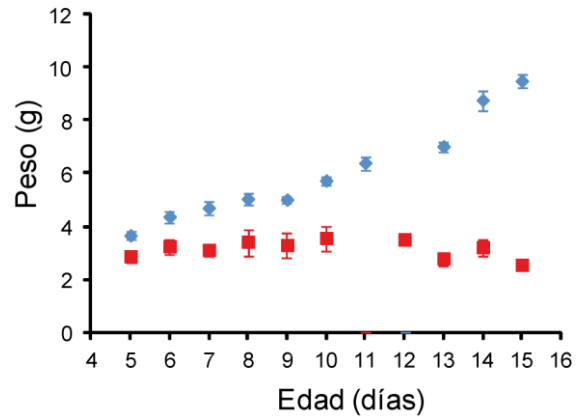


Figura 35. Los ratones SMN Δ 7 exhiben un menor tamaño en comparación con sus hermanos de camada controles. Las imágenes muestran el aspecto que presentan tanto los ratones controles como los SMN Δ 7 tras una y dos semanas después de su nacimiento.

1.1.1. Peso corporal

En el momento del nacimiento, no se observaron diferencias significativas en el peso corporal entre los mutantes y sus hermanos de camada controles. Desde P5, el peso de los ratones mutantes se mantuvo siempre por debajo del de sus hermanos de camada controles, observándose diferencias significativas entre ellos. El peso medio de los ratones afectados se mantuvo aproximadamente constante a lo largo de las dos primeras semanas de vida e incluso en los últimos días de vida se apreció una pérdida de peso (Fig. 36A; $N = 11$ mutantes y 11 controles).

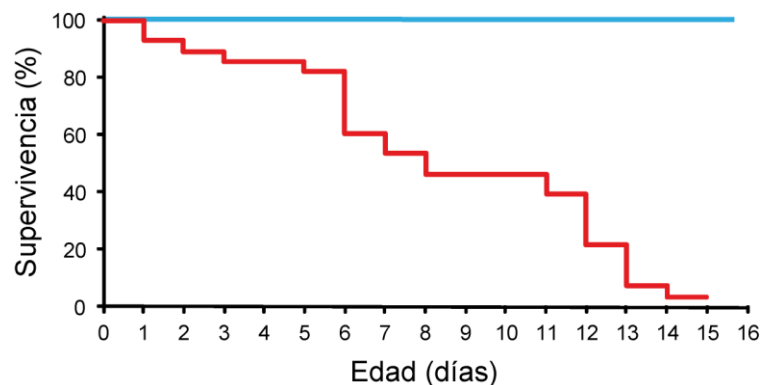
Figura 36. Los ratones SMN Δ 7 tienen un peso medio menor que los controles. La curva de peso muestra que el peso medio de los ratones controles (azul; $N = 11$ ratones) es mayor que el de los mutantes (rojo; $N = 11$ ratones) desde P5 hasta P15.



1.1.2. Supervivencia

En los ratones controles no se observó mortalidad en las dos primeras semanas de vida, sin embargo, la supervivencia máxima de los ratones SMN Δ 7 fue de 14-15 días. El análisis de supervivencia (curva de Kaplan-Meier; (Kaplan and Meier, 1958) mostró que, tras la primera semana, el 47 % de los ratones afectados habían muerto (Fig. 37B), siendo la supervivencia media de 9.4 ± 0.8 días.

Figura 37. Curva de supervivencia Kaplan-Meier para los ratones controles y los ratones mutantes SMN Δ 7 donde se observa que la supervivencia máxima de éstos es de aproximadamente 15 días (SMN Δ 7: $N = 28$ ratones, control: $N = 28$ ratones).



1.2. Organización sináptica

La NMJ de mamíferos experimenta una serie de cambios estructurales y funcionales durante las primeras semanas postnatales encaminados a la maduración tanto del terminal presináptico como del postsináptico. Las fibras musculares se encuentran multi-inervadas al nacer y durante el período de maduración se produce una retracción de las fibras nerviosas, seleccionándose las que presentan más actividad, quedando finalmente una sola fibra nerviosa

inervando la fibra muscular. Al mismo tiempo, el terminal postsináptico sufre un proceso de maduración en el que los receptores de ACh pasan de estar extendidos por toda la placa motora a agruparse en las crestas que se forman en la membrana postsináptica.

1.1.3. Terminal postsináptico

En el terminal postsináptico, durante la primera semana postnatal, los receptores de ACh se encuentran en una estructura con forma de placa elíptica. Tras la retracción de las fibras nerviosas en exceso, las zonas con menos densidad de receptores de ACh desaparecen, los receptores se van agrupando en crestas y aparecen invaginaciones en el terminal postsináptico (Sanes and Lichtman, 1999).

Para explorar las características del terminal postsináptico a P7 y P14, se marcaron los receptores de ACh con bungarotoxina (BTX) conjugada con rodamina en el TVA.

A P7, se observó una distribución homogénea del marcaje de los receptores de ACh en la placa, tanto en los terminales controles como en los mutantes (Fig. 38A). No obstante, en los terminales controles se observó el inicio de la formación de bandas, mientras que en los mutantes el patrón de agrupación de los receptores de ACh fue más punteado.

A P14, se observaron signos de maduración en los terminales motores controles, como la aparición de perforaciones y bandas bien definidas (Fig. 38B, flecha). Sin embargo, a esta edad, los terminales mutantes mostraron una forma similar a la que presentaban a P7; las agrupaciones de receptores de ACh siguió siendo predominantemente punteada y presentaban pocas, o no presentaban, perforaciones ni bandas en dichos terminales (Fig. 38B).

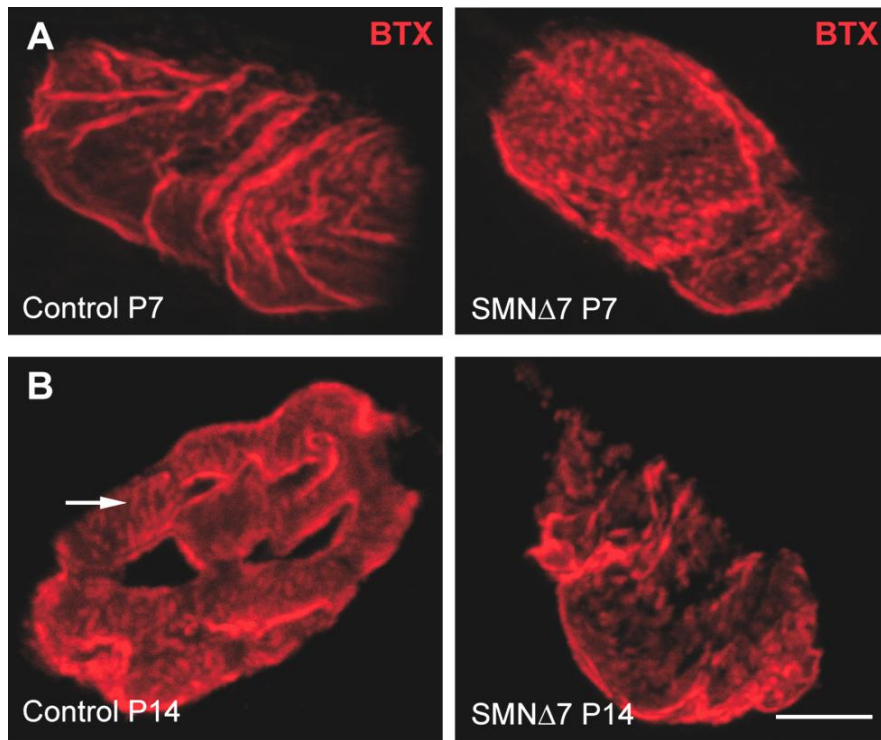


Figura 38. El terminal postsináptico sigue inmaduro a P14 en las fibras musculares de los ratones SMN Δ 7. Receptores postsinápticos de ACh marcados con bungarotoxina (BTX) conjugada con rodamina. **A.** Terminales control (izquierda) y mutante (derecha) a P7. **B.** Terminales control (izquierda), donde se señalan las bandas que forman los receptores de ACh (flecha) y mutante (derecha), a P14. *Barra de calibración: 5 μ m.*

El análisis del área del terminal postsináptico mediante el marcaje de los receptores de ACh teñidos con BTX-rodamina mostró que, en ambos genotipos, no incrementó significativamente el área media desde P7 a P14 (Fig. 39). Sin embargo, el área de los terminales mutantes fue significativamente más pequeña que la de los controles tanto a P7 (control: $193'3 \pm 7'5 \mu\text{m}^2$ y mutante: $139'2 \pm 7'5 \mu\text{m}^2$) como a P14 (control: $208'2 \pm 8'3 \mu\text{m}^2$ y mutante: $140'2 \pm 6'8 \mu\text{m}^2$; Tabla 7), siendo aproximadamente un 30% menor a ambas edades ($p < 0'0005$ en ambos casos).

Estos datos muestran que el terminal postsináptico permanece inmaduro durante la segunda semana postnatal en los ratones SMN Δ 7, presentando además un tamaño menor desde P7 en relación al tamaño de los terminales controles.

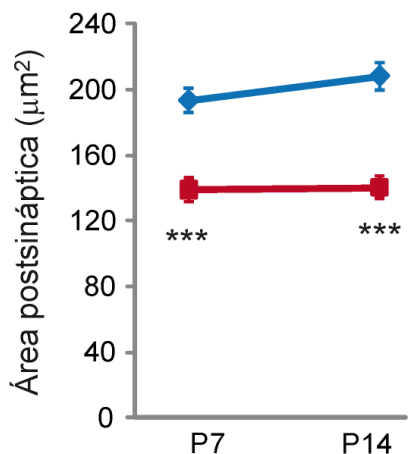


Figura 39. El área postsináptica es significativamente menor en los terminales SMNΔ7 que en los controles tanto a P7 como a P14. Representación gráfica del tamaño medio de los terminales postsinápticos de controles (azul) y mutantes (rojo), tanto a P7 como a P14. ***: $p > 0.0005$.

Tabla 7. Valores absolutos del área postsináptica media de los terminales del TVA de ratones control y mutante a las dos edades estudiadas, P7 y P14.

	Control	SMNΔ7
P7	193'3 ± 7'5 µm ² <i>n, N = 38 terminales, 3 ratones</i>	139'2 ± 7'5 µm ² <i>n, N = 37 terminales, 3 ratones</i>
P14	208'2 ± 8'3 µm ² <i>n, N = 52 terminales, 5 ratones</i>	140'2 ± 6'8 µm ² <i>n, N = 58 terminales, 5 ratones</i>

1.2.2. Terminal presináptico

A. Anomalías en la distribución de las vesículas sinápticas en los terminales SMNΔ7

La distribución y el área ocupada por las vesículas sinápticas en los terminales motores que inervan el TVA se estimaron mediante el uso de un anticuerpo primario contra el transportador vesicular de la ACh (VACHT) y un anticuerpo secundario conjugado con un fluoróforo (Alexa488). Las tinciones se hicieron tanto a P7, cuando ya han comenzado los signos de la enfermedad, como a P14, etapa final de la enfermedad.

En los ratones controles y en los deficientes en SMN, al comenzar el período de maduración postnatal de la NMJ (primera semana de vida), se observó que el marcaje de las vesículas sinápticas aparecía concentrado en pequeñas agrupaciones distribuidas de forma homogénea por toda la superficie

(Fig. 40A y 40B). Sin embargo, en la segunda semana, ya que la NMJ ha progresado en la maduración, el marcaje de las vesículas sinápticas apareció extendido por todo el terminal en los controles (Fig. 40C), mientras que en los mutantes, el marcaje de las vesículas sinápticas permaneció formando agrupaciones similares a las observadas en P7 (Fig. 40D). Estas observaciones nos sugieren que las vesículas sinápticas se encuentran más concentradas cuando el terminal aún está madurando, mientras que después se organizan ocupando todo el terminal, y que este proceso está deteriorado en los terminales SMN Δ 7.

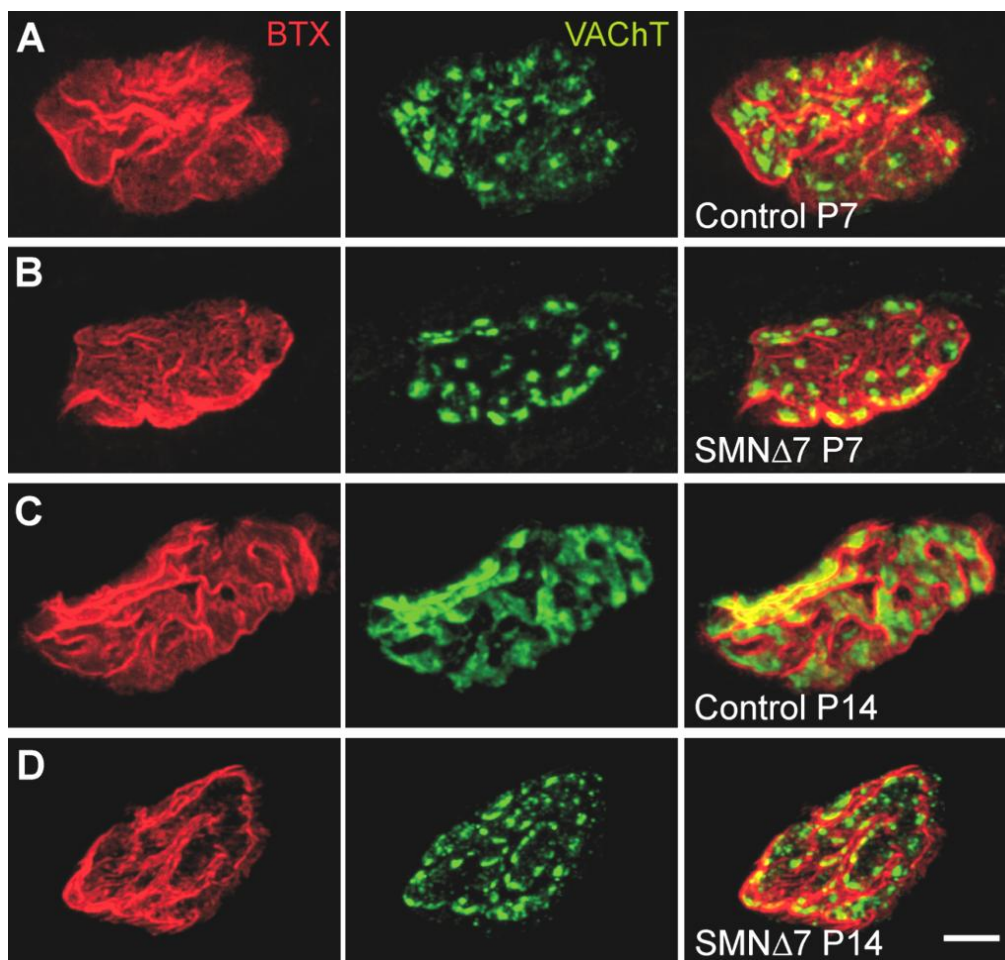


Figura 40. Las vesículas sinápticas están anómalamente distribuidas en los terminales SMN Δ 7 a P14. Terminales postsinápticos teñidos con BTX-rodamina y vesículas sinápticas marcadas con anticuerpo contra VACHT. **A y B.** Terminales control y mutante, respectivamente, a P7. **C y D.** A P14, la distribución de las vesículas sinápticas aparece menos madura en los mutantes (D) que en los controles (C); las vesículas se mantienen agrupadas en los terminales mutantes, mientras que en los controles aparecen dispersas por el terminal. *Barra de calibración: 5 μ m.*

Para la cuantificación del área que ocupaban las vesículas sinápticas en el terminal, se tuvo en cuenta el área postsináptica, ya que, como se ha mostrado anteriormente, el área de la placa terminal de los mutantes era menor (Fig. 39). La razón del área ocupada por las vesículas sinápticas respecto al tamaño postsináptico, a P7 fue un 30% menor en los terminales mutantes ($0'27 \pm 0'02$) que en los controles ($0'38 \pm 0'02$; $p < 0'0001$; Fig. 41A y Tabla 8). A P14, esta diferencia entre ambos genotipos aumentó hasta ~50%, ya que la razón área de las vesículas sinápticas/área postsináptica aumentó en los controles ($0'48 \pm 0'02$) mientras que se mantuvo constante en los terminales mutantes ($0'24 \pm 0'01$; $p > 0'0001$; Fig. 41A y Tabla 8).

La cuantificación del tamaño de las agrupaciones que formaban las vesículas sinápticas a P7 mostró una reducción de aproximadamente un 30% en los terminales mutantes en relación a los controles ($p = 0'02$; Fig. 41B; Tabla 8). Aunque a esta edad las vesículas se encontraban en agrupaciones en los terminales controles, ya se observó en los terminales SMN Δ 7 una disminución en el tamaño de las mismas. A P14, la diferencia de tamaño incrementó hasta ~75%, ya que, como se ha comentado anteriormente, en los controles las vesículas se extendieron dentro del terminal ocupando áreas mayores, mientras que en los mutantes se mantuvieron como a P7 ($p < 0'0001$) (Fig. 41B; Tabla 8). Al aumentar el tamaño de las agrupaciones en los terminales controles a P14, el número de éstas disminuyó notablemente (Fig. 41C, azul; Tabla 8), mientras que los mutantes no sufrieron cambios durante la segunda semana de vida ni en el tamaño (Fig. 41B, rojo; Tabla 8), ni en el número de agrupaciones por terminal (Fig. 41C, rojo; Tabla 8).

Estos resultados sugieren que existe una interrupción en la reorganización de las vesículas sinápticas en el terminal presináptico de los ratones deficientes en SMN, ya que no progresan de la misma forma que los terminales controles.

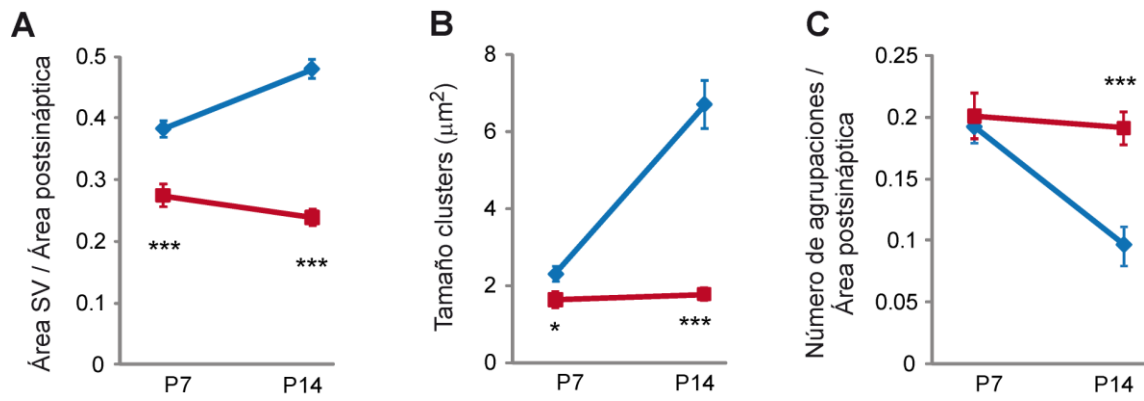


Figura 41. Características de la organización de las vesículas sinápticas en los terminales SMNΔ7. **A.** En los controles aumenta la razón entre el área de las vesículas sinápticas y el área postsináptica en el terminal desde P7 a P14, mientras que en los terminales SMNΔ7 se mantiene constante durante este periodo. **B.** El tamaño medio de las agrupaciones de vesículas es mayor en los terminales controles que en los SMNΔ7a ambas edades. **C.** El número medio de agrupaciones en relación al área postsináptica se mantuvo en los terminales mutantes durante este periodo, mientras que disminuía en los controles. *Control: azul; SMNΔ7: rojo.* *: $p > 0'05$; ***: $p > 0'0005$.

Tabla 8. Área que ocupan las vesículas sinápticas respecto al área postsináptica, y tamaño y número de las agrupaciones de las vesículas en los terminales controles y mutantes, tanto a P7 como a P14.

	Control		SMNΔ7	
	P7	P14	P7	P14
Área total vesículas	74.28 ± 4'22 μm ² <i>n, N = 38 terminales, 3 ratones</i>	96'66 ± 3'96 μm ² <i>n, N = 52 terminales, 5 ratones</i>	35'91 ± 2'29 μm ² <i>n, N = 37 terminales, 3 ratones</i>	36'51 ± 2'43 μm ² <i>n, N = 58 terminales, 5 ratones</i>
A vesículas / A post	0'38 ± 0'02 <i>n, N = 38 terminales, 3 ratones</i>	0'48 ± 0'02 <i>n, N = 52 terminales, 5 ratones</i>	0'27 ± 0'02 <i>n, N = 37 terminales, 3 ratones</i>	0'24 ± 0'01 <i>n, N = 58 terminales, 5 ratones</i>
Tamaño agrupaciones	2'30 ± 0'20 μm ² <i>n, N = 38 terminales, 3 ratones</i>	6'69 ± 0'63 μm ² <i>n, N = 65 terminales, 5 ratones</i>	1'63 ± 0'21 μm ² <i>n, N = 37 terminales, 3 ratones</i>	1'77 ± 0'16 μm ² <i>n, N = 68 terminales, 5 ratones</i>
Número agrupaciones	36'3 ± 1'9 <i>n, N = 38 terminales, 3 ratones</i>	19'4 ± 1'2 <i>n, N = 65 terminales, 5 ratones</i>	26'8 ± 1'5 <i>n, N = 37 terminales, 3 ratones</i>	24'75 ± 1'3 <i>n, N = 68 terminales, 5 ratones</i>

B. VACHT y SV2 colocalizan en los terminales presinápticos de AME

Para comprobar que la organización de las vesículas sinápticas observadas en los terminales controles y mutantes del TVA marcadas con anticuerpo anti-VACHT podía distinguirse con otro marcador vesicular, se llevó a cabo una doble tinción de las vesículas usando anticuerpos contra VACHT y contra la proteína de las vesículas sinápticas SV2.

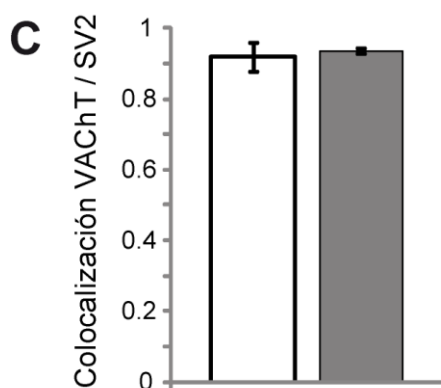
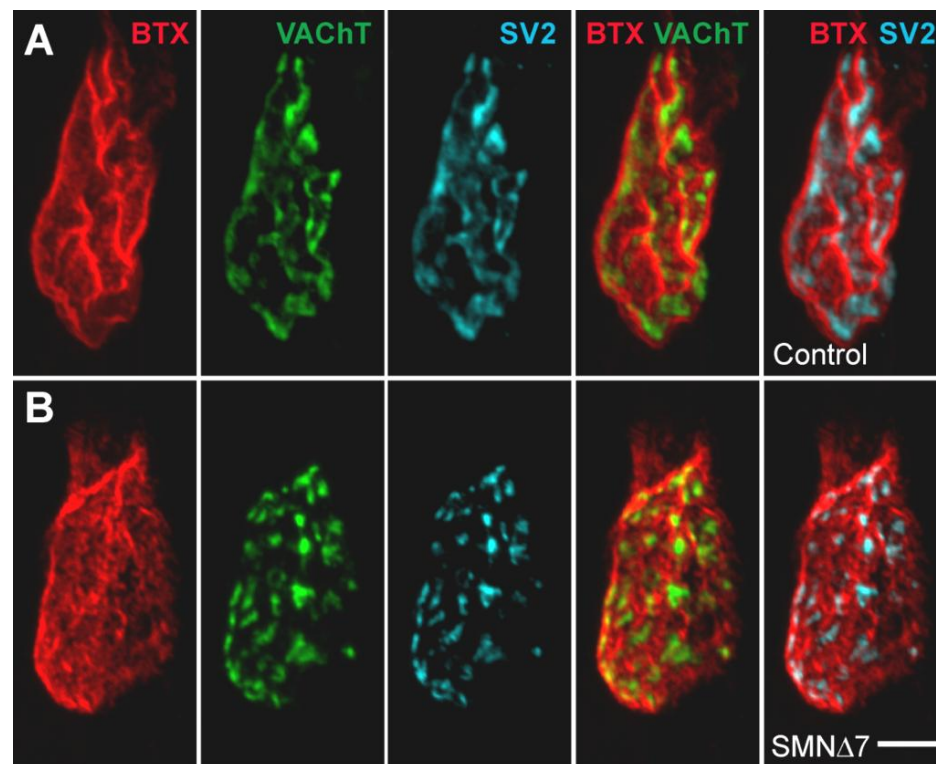


Figura 42. VACHT y SV2 colocalizan en las vesículas sinápticas. A y B. Ejemplos de terminales control y SMN Δ 7 a P14 en el TVA. Las imágenes son proyecciones en Z. Barra de calibración: 5 μ m. C. La cuantificación de la colocalización según el coeficiente de Pearson no muestra diferencias significativas entre los terminales SMN Δ 7 ($n = 9$ terminales, gris) y los controles ($n = 4$ terminales, blanco) ($p = 0.78$).

El patrón vesicular de fluorescencia observado con anti-VACHT (verde) fue muy similar al observado con anti-SV2 (azul), tanto en terminales controles (Fig. 42A) como en terminales mutantes (Fig. 42B). El análisis cuantitativo de las señales de inmunofluorescencia indicó una buena colocalización entre

estos dos marcadores en ambos tipos de terminales (coeficiente de Pearson ~ 0.9 ; Fig. 42C). Estos datos corroboraron el pequeño tamaño de las agrupaciones de vesículas sinápticas en los terminales de los mutantes a P14, en comparación con la distribución más extendida observada en los terminales controles y descartó la existencia de una población atípica de vesículas sinápticas desprovistas de transportador vesicular en ambos genotipos.

C. Afectación selectiva de los terminales motores en el LAL

Los datos anteriores muestran que el déficit de proteína SMN produce defectos pre- y postsinápticos en las NMJ del músculo TVA. La pregunta que se planteó a continuación fue si las anomalías encontradas en los terminales se debían al pequeño tamaño que tienen los ratones mutantes. Para examinar esta cuestión, se exploró si el contenido vesicular era anómalo en los terminales motores del músculo LAL de los mutantes, un músculo cuyo terminal postsináptico se ha descrito que madura casi al mismo tiempo que los ratones controles (Murray et al., 2008). Se realizó en el LAL el mismo análisis llevado a cabo en el TVA, no obstante, ya que trabajos previos han identificado la mayor vulnerabilidad de los terminales nerviosos en la porción caudal del LAL en comparación con la rostral (Murray et al., 2008; Ruiz et al., 2010), se comparó la organización de las vesículas sinápticas y el grado de madurez de los terminales postsinápticos en ambas localizaciones.

La Figura 43 muestra un ejemplo representativo de un terminal postsináptico en la región rostral del LAL de un ratón SMN $\Delta 7$ (panel B, izquierdo) donde se observaron el inicio de la formación de perforaciones, típicas de los terminales maduros, al igual que ocurre en los ratones controles (panel A, izquierdo). Sin embargo, las vesículas permanecieron agrupadas en el terminal presináptico del mutante (Fig. 43B, centro), a diferencia del terminal control donde se observó que las vesículas se encontraban más extendidas por el terminal (Fig. 43A, centro).

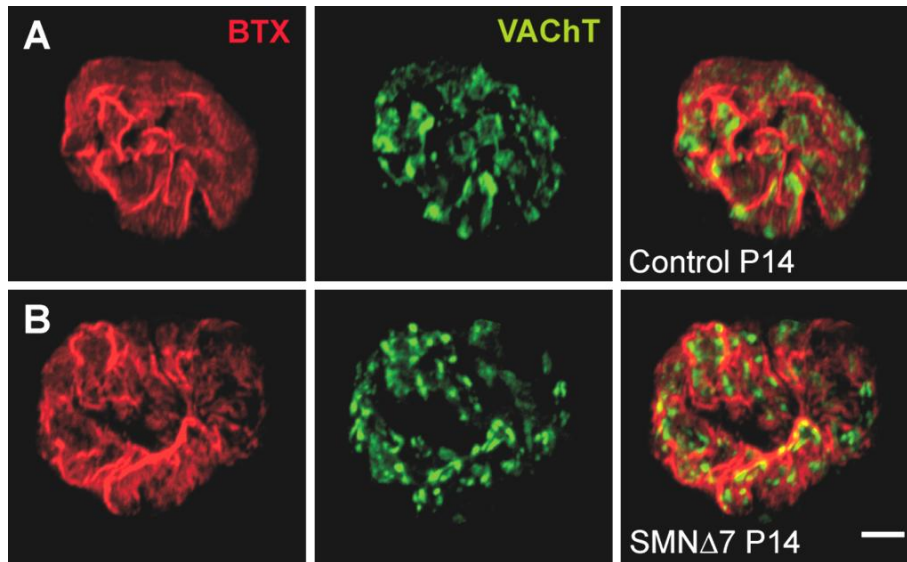


Figura 43. El terminal postsináptico progresa en la maduración en los terminales SMN Δ 7 del LAL. A y B. Imágenes representativas de la unión neuromuscular de la porción rostral del LAL de un control (A) y un mutante (B) a P14. Se muestra el terminal postsináptico marcado con BTX- rodamina (rojo) y las vesículas con anticuerpo contra VACHT (verde). Se observa el agrupamiento de las vesículas sinápticas a pesar de la apariencia madura del terminal postsináptico en los terminales SMN Δ 7. Barra de calibración: 5 μ m.

En relación al área postsináptica, se mostró que no había diferencias significativas entre los genotipos, ni en la porción rostral ni en la caudal, a P7 (Fig. 44A y 44D; Tabla 9). Sin embargo, a P14, los terminales SMN Δ 7 exhibían un área significativamente menor en la zona caudal (control: $249'9 \pm 18'6 \mu\text{m}^2$; mutante: $191'8 \pm 16'1 \mu\text{m}^2$; Fig. 44A y 44D; Tabla 9). Por otro lado, la cuantificación de las imágenes reveló que, en la porción rostral, la razón área de las vesículas sinápticas/área postsináptica (Fig. 44B) y el área media de las agrupaciones (Fig. 44C) no fueron diferentes en los controles ($0'28 \pm 0'02$ y $1'63 \pm 0'31 \mu\text{m}^2$, respectivamente) y en los mutantes a P7 ($0'27 \pm 0'02$ y $1'37 \pm 0'20 \mu\text{m}^2$, respectivamente), mientras que ambos parámetros se encontraron reducidos en los mutantes a P14 ($p = 0'0003$ y $p = 0'006$, respectivamente; Fig. 44B y 44C; Tabla 9). En la parte caudal, sin embargo, el área ocupada por las vesículas sinápticas y el área media de las agrupaciones de vesículas, estaban reducidas ya desde P7 ($p = 0'0007$ y $p = 0.003$, respectivamente; Fig. 44E y 44F; Tabla 9) incrementándose significativamente la diferencia entre genotipos a P14 ($p = 2'6e^{-7}$ y $p = 4'1e^{-5}$, respectivamente; Fig. 44E y 44 F; Tabla 9).

Estos resultados sugieren que en el LAL la maduración de los terminales postsinápticos parece ocurrir con normalidad a pesar de los defectos tempranos en el presináptico, lo que sugiere una interrupción en la normal coordinación temporal de la diferenciación del pre- y el postsináptico. Además, existe una afectación selectiva de los terminales que inervan las dos bandas del LAL, produciéndose una mayor alteración en los terminales de la porción caudal.

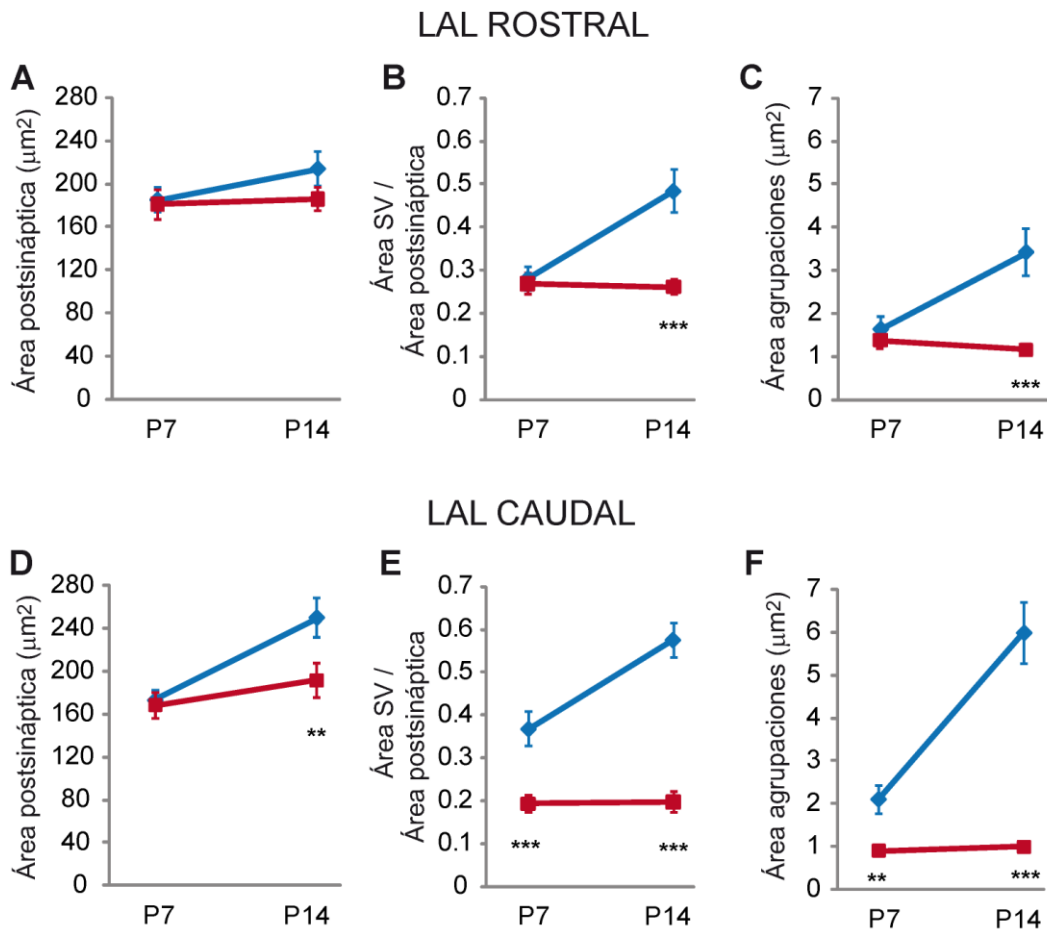


Figura 44. Alteración selectiva de las vesículas sinápticas en los terminales motores del LAL. Área postsináptica media (A y D), razón entre el área de las vesículas sinápticas y el área postsináptica (B y E) y área de las agrupaciones de vesículas (C y F) en terminales controles y SMNΔ7. **A - C.** Porción rostral del LAL (control: *n*, *N* = 21 terminales, 2 ratones; mutante: *n*, *N* = 22 terminales, 3 ratones). **D - E.** Porción caudal del LAL (control: *n*, *N* = 16 terminales, 2 ratones; mutante: *n*, *N* = 14 terminales, 3 ratones). Puede observarse como el área de las vesículas y el tamaño de las agrupaciones de las vesículas no es diferente en la división rostral a P7, mientras que estos parámetros están significativamente reducidos a P14. Sin embargo, en la porción caudal, se manifiestan las deficiencias en los terminales SMNΔ7 desde P7. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.005$; ***: $p < 0.0005$.

Tabla 9. Parámetros cuantificados en las porciones rostral y caudal del LAL los terminales controles y mutantes a ambas edades estudiadas, P7 y a P14

	ROSTRAL			
	Control		SMNΔ7	
	P7	P14	P7	P14
Área postsináptica	185'2 ± 11'4 μm ²	213'7 ± 15'8 μm ²	181'1 ± 13'7 μm ²	185'9 ± 11'0 μm ²
A vesículas / A post	0'28 ± 0'02	0'48 ± 0'05	0'27 ± 0'02	0'26 ± 0'02
Tamaño agrupaciones	1'63 ± 0'31 μm ²	3'41 ± 0'55 μm ²	1'37 ± 0'20 μm ²	1'15 ± 0'10 μm ²
Número agrupaciones	37'3 ± 2'8	32'6 ± 4'5	39'2 ± 3'1 μm ²	42'8 ± 2'4
	CAUDAL			
	Control		SMNΔ7	
	P7	P14	P7	P14
Área postsináptica	173'2 ± 9'4 μm ²	249'9 ± 18'6 μm ²	168'4 ± 12'1 μm ²	191'8 ± 16'1 μm ²
A vesículas / A post	0'37 ± 0'04	0'57 ± 0'04	0'19 ± 0'02	0'19 ± 0'02
Tamaño agrupaciones	2'10 ± 0'34 μm ²	5'99 ± 0'72 μm ²	0'90 ± 0'10 μm ²	0'99 ± 0'08 μm ²
Número agrupaciones	31'6 ± 2'5	27 ± 3'7	37'2 ± 2'9	37'1 ± 4'4

D. Las zonas activas están reducidas y no homogéneamente distribuidas en los terminales motores de ratones SMN Δ 7

Dada la reducción morfológica en el área que ocupaban las vesículas en los mutantes, se planteó si existían también anomalías en cuanto al número de zonas activas y su distribución en los terminales SMN Δ 7 en comparación con los controles. Para identificar las zonas activas en el TVA, en la última fase de la enfermedad (P14) donde el fenotipo es más evidente, se usó un anticuerpo contra bassoon, que es una proteína de andamiaje de las zonas activas (tom Dieck et al., 1998). Este anticuerpo marca las zonas activas como un patrón punteado distribuido por el terminal presináptico (Ruiz et al., 2011).

La Figura 45 muestra dos terminales en los que se observa el marcaje de las zonas activas y su distribución en un control (panel A, centro) y en mutante (panel B, centro) a P14. En ambos casos, la proteína bassoon aparece en los terminales con un patrón punteado, pudiéndose observar a esta edad diferencias evidentes entre ambos genotipos. En los terminales controles los puntos de bassoon aparecieron distribuidos regularmente (Fig. 45A, panel central), al igual que las vesículas sinápticas se encontraron dispersas por todo el terminal a esta edad (Fig. 45A, panel derecho). Es interesante destacar que en los mutantes los puntos aparecieron agrupados y algunas áreas se hallaban desprovistas de marcaje para bassoon (Fig. 45B, panel central), presentando una patrón muy similar al de las vesículas sinápticas (Fig. 45B, panel derecho). La Figura 45C ilustra los puntos de bassoon en otro terminal procedente de un mutante, en una imagen de un único plano longitudinal. Se observó que los puntos de bassoon estaban claramente asociados con los agrupamientos de vesículas y, en muchos casos, el marcaje de las vesículas sinápticas, que se sugiere que corresponde con un agrupamiento de éstas, aparecía rodeado por puntos de bassoon (Fig. 45C, ampliación).

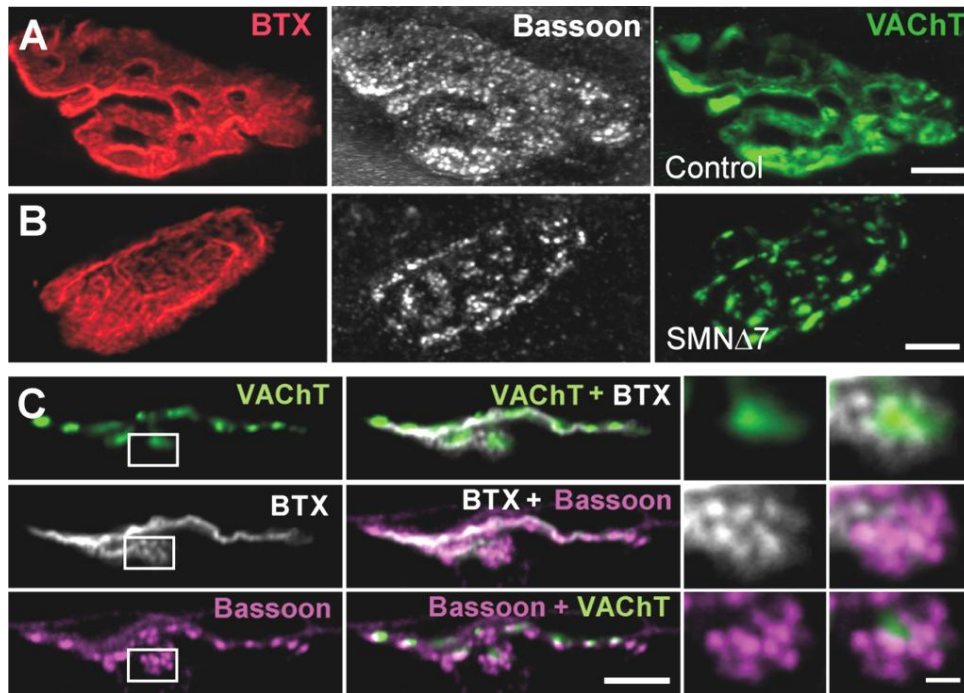


Figura 45. Las zonas activas no se distribuyen homogéneamente por los terminales SMN Δ 7. Zonas activas fueron marcadas con anticuerpo contra bassoon (gris), los receptores postsinápticos con BTX y las vesículas sinápticas con anticuerpo contra VACHT, en terminales motores a P14. **A.** Terminal control *en face* en el que las zonas activas aparecen distribuidas por todo el terminal al igual que las vesículas. **B.** Terminal SMN Δ 7 en el que el marcaje de bassoon aparece en agrupaciones con áreas desprovistas de marcaje, patrón similar al que presentan las vesículas. *Barra de calibración: 5 μ m (A y B).* **C.** Sección óptica longitudinal de un terminal mutante. Las agrupaciones de vesículas aparecen rodeadas de puntos de bassoon. *Barra de calibración: 5 y 1 μ m, respectivamente.*

En los ejemplos mostrados en la Figura 45A y 45B, el número total de puntos de bassoon contados en cada terminal fue de 273 en el control (Fig. 45A, panel central) y 139 en el mutante (Fig. 45B, panel central), lo que resulta en 1'29 y 0'69 puntos/ μ m², respectivamente. Cuando se realizó el análisis estadístico en los terminales registrados, se encontró que el número medio de puntos de bassoon por terminal fue aproximadamente un 50% menor en los mutantes en comparación con los controles ($p = 0'0002$; Fig. 46A). En los controles fue de 208 ± 20 puntos/terminal ($n, N = 20$ terminales, 3 ratones) y 102 ± 12 puntos/terminal, en los mutantes ($n, N = 15$ terminales, 3 ratones; Fig. 46A). La cuantificación de la densidad del marcaje de las zonas activas, ya que los terminales postsinápticos fueron más pequeños en los ratones SMN Δ 7,

mostró diferencias significativas entre ambos genotipos, siendo la densidad en los controles 1.1 ± 0.1 puntos de bassoon/ μm^2 y en los mutantes 0.7 ± 0.1 ($p = 0.009$; Fig. 46B).

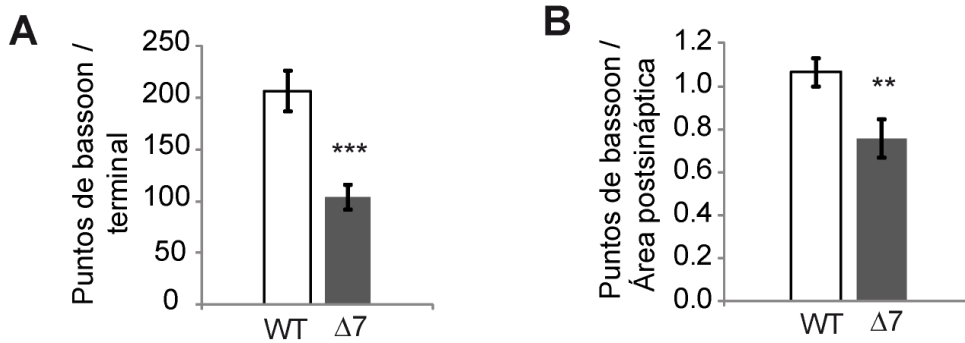


Figura 46. Las zonas activas están reducidas en los terminales SMN $\Delta 7$. **A.** El número medio de puntos de bassoon por terminal se encuentra significativamente reducido en los terminales SMN $\Delta 7$ respecto a los controles. **B.** La densidad media de las zonas activas en los terminales mutantes está significativamente disminuida. **: $p < 0.005$; ***: $p < 0.0005$.

La distribución espacial de los puntos de bassoon dentro del terminal presináptico se cuantificó con el análisis de la menor distancia entre vecinos (*nearest neighbour*). Este análisis consistió en obtener las coordenadas de cada punto tras realizar un ajuste gaussiano 2D a la señal y calcular la distancia entre cada punto y todos los demás, seleccionando la menor distancia entre cada punto y sus vecinos. La Figura 47 muestra los histogramas de frecuencia de las distancias más cortas entre vecinos de un terminal control (Fig. 47A) y un terminal mutante (Fig. 47B). En ambos casos, la forma de la distribución fue *quasi* normal. La media de la separación entre un punto y su punto más cercano en controles fue de 876 ± 27 nm ($n = 694$ partículas, $N = 3$ terminales) y en mutantes fue de 921 ± 29 nm ($n = 399$ partículas, $N = 3$ terminales) no existiendo diferencias significativas entre ellos ($p = 0.27$).

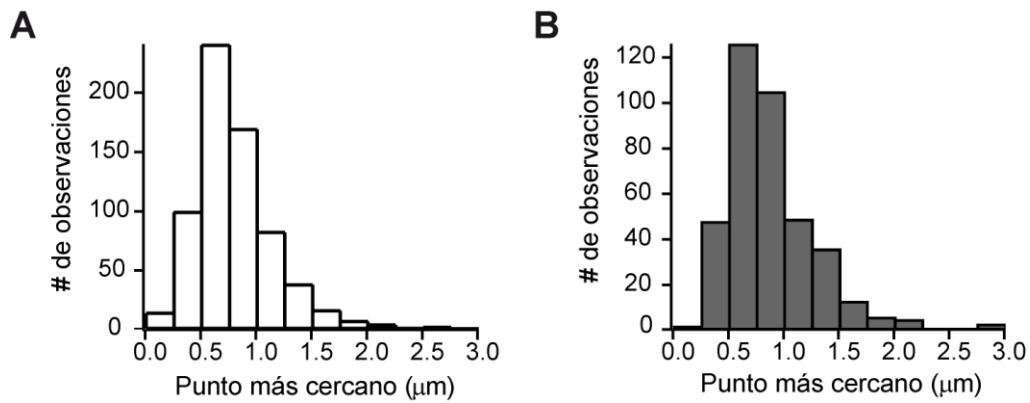


Figura 47. La distancia entre puntos de basson es similar en los terminales controles y SMNΔ7. Ejemplos de la distribución de las distancias entre los puntos de basson en un terminal control (A) y en un terminal mutante (B).

Estos resultados indican que en los mutantes las zonas activas están regularmente espaciadas pero que se pierden en algunas zonas, que son aquellas donde no se observa marcaje. Esto resulta en un aparente agrupamiento anómalo de las zonas activas que presenta un patrón similar al agrupamiento que se observa en las vesículas sinápticas en los terminales SMNΔ7.

E. La acumulación de neurofilamentos en el terminal presináptico es posterior al defecto vesicular

Las alteraciones descritas en el terminal presináptico como son la agrupación de vesículas y la organización anómala de las zonas activas, planteó el estudio de la morfología del citoesqueleto en los terminales SMNΔ7 y en los controles. La acumulación de neurofilamentos es un distintivo de muchas enfermedades neurodegenerativas (Horgren et al, 2003), incluyendo los modelos murinos de AME (Cifuentes-Diaz et al., 2002; Kariya et al., 2008; Murray et al., 2008; Kong et al., 2009; Ruiz et al., 2010). Por ello, para entender mejor la fisiopatología de este proceso, se estudió la distribución espacial de los neurofilamentos, y la relación entre éstos y las vesículas sinápticas en los terminales motores del TVA. Para el marcaje de los neurofilamentos, se utilizó

un anticuerpo contra neurofilamentos de 160 kDa, que son las subunidades medias (NF-M) que forman estos filamentos intermedios.

La distribución de los neurofilamentos fue similar en controles y mutantes a P7, formando una red distribuida por el terminal y en el que los agregados de vesículas sinápticas se localizaron a lo largo de la trayectoria de los neurofilamentos (Fig. 48A y 48B). En muchos casos, los neurofilamentos terminaron en estructuras similares a lazos con un diámetro aproximado de $1.35 \mu\text{m}$ (flechas), los cuales albergaban agrupamientos de vesículas (Fig. 48A y 48B, ampliación). Estas estructuras en forma de lazos son características del citoesqueleto de terminales inmaduros (Roos et al., 2000; Fox et al., 2007). A esta edad se observó que fueron igual de frecuentes tanto en los terminales mutantes como en los controles (número medio de lazos/terminal: 4.4 ± 0.6 , n , $N = 38$, 3 en $\text{SMN}\Delta 7$ y 4 ± 0.4 , n , $N = 37$, 3 en controles; $p = 0.45$).

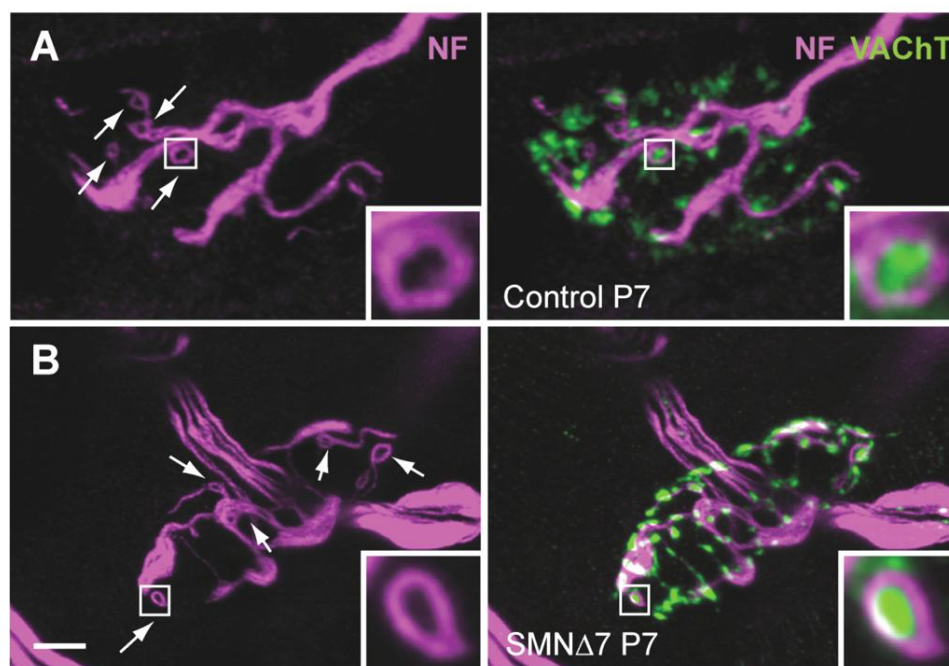


Figura 48. Los neurofilamentos presentan signos de inmadurez a P7 tanto en los terminales controles como en los $\text{SMN}\Delta 7$. En la imagen, los neurofilamentos se muestran en magenta y las vesículas en verde. **A. y B.** Terminal control y terminal mutante, respectivamente, en los que puede observarse la distribución de las vesículas sinápticas en relación con los neurofilamentos. Las flechas señalan las estructuras en lazos que presentan los neurofilamentos a esta edad. Véase en las secciones amplificadas cómo estos lazos rodean las vesículas sinápticas. *Barra de calibración: $5 \mu\text{m}$.*

A P14, los neurofilamentos formaron ramas delgadas en los terminales controles, sin embargo, en los mutantes aparecían dilatados y con signos de acumulación (Fig. 49). Al mismo tiempo, la localización espacial de las vesículas sinápticas a los largo de la trayectoria de los neurofilamentos persistió en los mutantes (Fig. 49B) mientras que fue menos obvia en los terminales controles (Fig. 49A), ya que las vesículas abarcaban la mayor parte del terminal. Además, a esta edad, en los terminales controles los lazos fueron poco frecuentes (0.9 ± 0.2 lazos/terminal, $n = 52$) y de pequeño tamaño ($1.2 \pm 0.1 \mu\text{m}$ de diámetro, $n = 20$) (Fig.49, ampliación), mientras que en los mutantes fueron significativamente más abundantes (2.9 ± 0.3 lazos/terminal, $n, N = 48, 3$) ($p < 0.0001$) y de mayor tamaño ($1.7 \pm 0.1 \mu\text{m}$ de diámetro, $n, N = 20, 3$) ($p = 0.0014$) (Fig. 49B, ampliación). Estas estructuras, se encontraban en los terminales mutantes rodeados de pequeñas acumulaciones de vesículas. (Fig. 49B, ampliación).

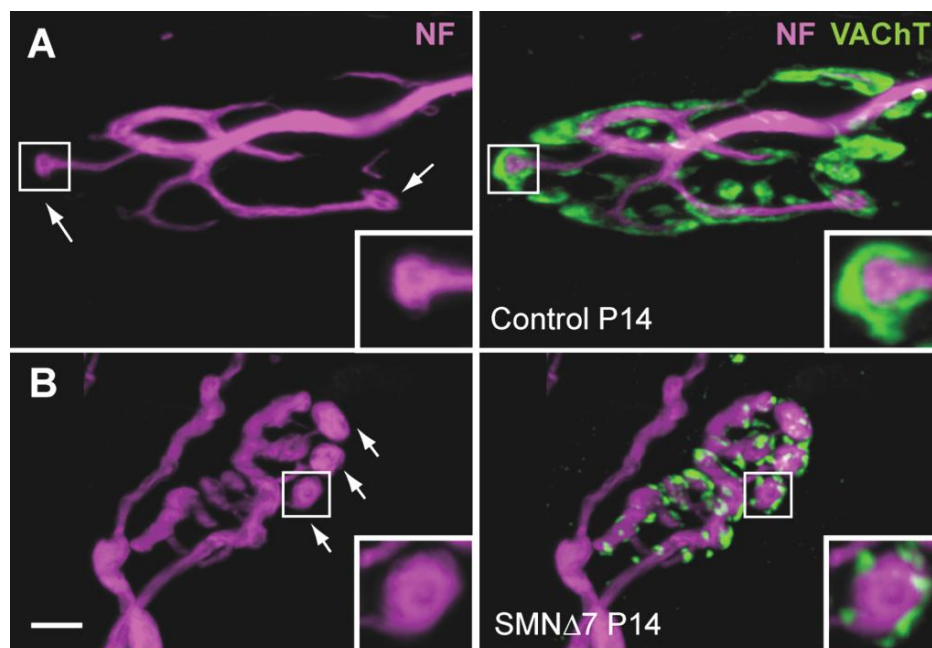


Figura 49. Los neurofilamentos se encuentran acumulados y persisten las estructuras inmaduras en los terminales SMN Δ 7 a P14. A. Ejemplo de un terminal control, donde puede verse como las vesículas sinápticas se extienden por el terminal. **B.** Ejemplo de un terminal mutante donde puede observarse la acumulación de los neurofilamentos, con los lazos engrosados y las vesículas que se distribuyen alrededor de dichos lazos. *Barra de calibración: 5 μm .*

El área media ocupada por los neurofilamentos en el terminal, respecto al área postsináptica, no fue significativamente diferente entre ambos genotipos a

P7 ($p = 0'68$). Sin embargo, a P14, fue 1'7 veces mayor en los terminales mutantes en relación a los controles (SMN Δ 7: $0'51 \pm 0'02$, $n, N = 38, 3$; control: $0'30 \pm 0'01$; $n, N = 38, 3$; $p < 0'0001$) (Fig. 50A).

La razón entre la superficie ocupada por los neurofilamentos y las vesículas a P7 fue $\sim 1'5$ veces mayor en los terminales mutantes en comparación con los controles (SMN Δ 7: $1'43 \pm 0'13$; control: $0'95 \pm 0'04$; $n, N = 38, 3$; en ambos casos; $p = 0'0009$; Fig. 50B), debido a que a esta edad el área de las vesículas ya se encontró reducida. Dado que la acumulación de los neurofilamentos fue evidente a P14 y que la distribución por el terminal de las vesículas sinápticas no progresó durante este periodo, la diferencia entre la razón neurofilamentos/vesículas fue $\sim 3'5$ veces mayor en mutantes que en controles (SMN Δ 7: $2'22 \pm 0'21$; control: $0'64 \pm 0'02$; $n, N = 38, 3$; en ambos casos; $p < 0'0001$; Fig. 50B).

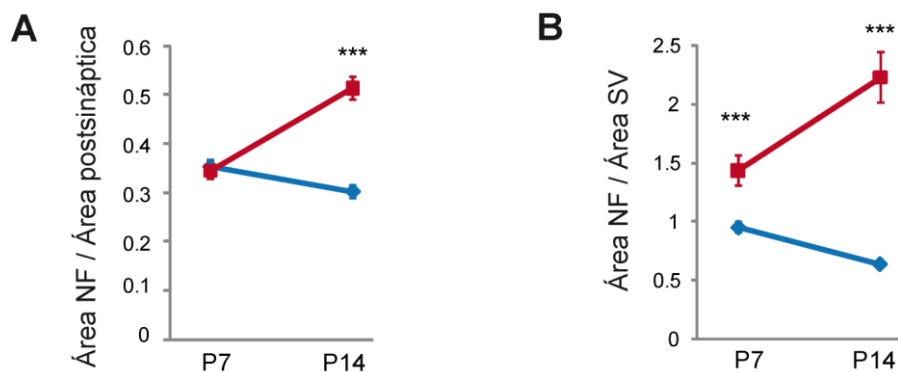


Figura 50. La acumulación de los neurofilamentos en los terminales SMN Δ 7 ocurre en los últimos estadios de la enfermedad. A. El área media de los neurofilamentos normalizada al área del terminal postsináptico, a P7, no fue distinta en mutantes y controles. Sin embargo, a P14, el área ocupada por los NF en los terminales SMN Δ 7 fue superior que en los terminales controles. **B.** La relación entre el área ocupada por los NF y las vesículas presentó diferencias significativas desde P7. Estas diferencias aumentaron a P14. ***: $p < 0'0005$.

Estos resultados indican que en los terminales mutantes motores la maduración de los neurofilamentos está interrumpida y que se produce su acumulación durante la segunda semana postnatal. Los datos mostraron también que la acumulación de neurofilamentos parece ser un fenómeno posterior al defecto vesicular.

F. El área presináptica de los terminales motores SMN Δ 7

Los datos previos plantean la posibilidad de que el terminal presináptico no cubra totalmente al postsináptico, lo que explicaría la disminución en el área total de las vesículas y en el número de zonas activas por terminal. Para determinar el área presináptica se realizó un doble marcaje de los neurofilamentos y las vesículas sinápticas con el mismo anticuerpo secundario.

El análisis de las imágenes mostró que, a P7, el terminal presináptico, a pesar de que no ocupaba totalmente todo el área de los receptores de ACh, sí se extendía por toda la superficie del terminal postsináptico, tanto en los controles como en los mutantes (Fig. 51A y 51B). A P14, el área del terminal postsináptico aparece también ocupada por el terminal presináptico en ambos genotipos (Fig. 51C y 51D).

El área presináptica no aumentó significativamente de P7 a P14 en ninguno de los dos genotipos (control: $121'2 \pm 4'7 \mu\text{m}^2$ a P7 y $133'4 \pm 6 \mu\text{m}^2$ a P14, $p = 0'11$; mutante: $70'6 \pm 3'6 \mu\text{m}^2$ a P7 y $80'8 \pm 4'4 \mu\text{m}^2$ a P14, $p = 0'08$; Fig. 52A; Tabla 10). Sin embargo, el área de los terminales mutantes fue, en ambos casos, aproximadamente un 40% menor que el de los controles ($p < 0'0001$ en ambas edades; Fig. 52A; Tabla 10). En los terminales controles la razón área presináptica/área postsináptica se mantuvo durante este periodo ($0'64 \pm 0'02$ a P7 y $0'65 \pm 0'02$ a P14, $p = 0'55$; Fig. 52B; Tabla 10). Sin embargo, en los ratones SMN Δ 7 se observó un aumento de ésta relación que pasó de ser $0'53 \pm 0'02$ en la primera semana a $0'63 \pm 0'02$ en la segunda semana ($p = 0'0016$, Fig. 52B; Tabla 10). Este aumento se debió, probablemente, a la acumulación de neurofilamentos en los terminales mutantes en la segunda semana.

Los resultados mostrados anteriormente muestran una disminución de las vesículas sinápticas, del número de zonas activas y de los terminales postsinápticos en los terminales SMN Δ 7, lo que podría llevar a pensar que la disminución de tamaño de la NMJ se debe al tamaño reducido de los ratones. Sin embargo, aunque este factor podría ser parte del fenotipo, la diferencia entre la razón área presináptica/área postsináptica de P7 a P14 en los

terminales mutantes, junto con los signos de inmadurez del postsináptico, sugieren un efecto específico de SMN sobre la maduración sináptica.

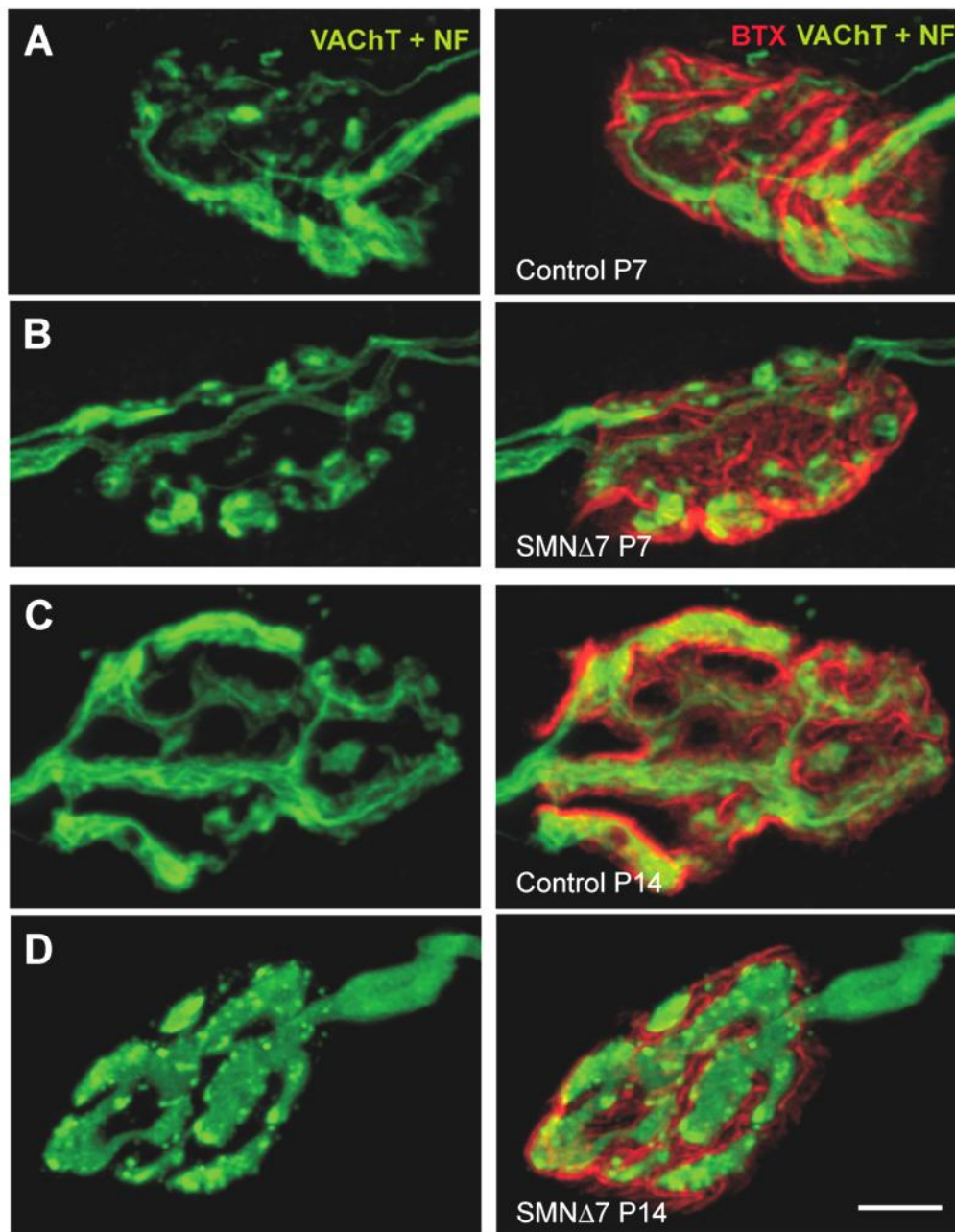


Figura 51. El terminal presináptico desde P7 a P14. Terminales presinápticos marcados con anticuerpos contra neurofilamentos y contra VACht. **A –D.** Terminales presinápticos representativos (izquierda) a P7 (A y B) y a P14 (C y D) procedentes del TVA de ratones controles (A y C) y mutantes (B y D). A la derecha se muestra la superposición de cada terminal motor con su placa motora. *Barra de calibración: 5 μ m.*

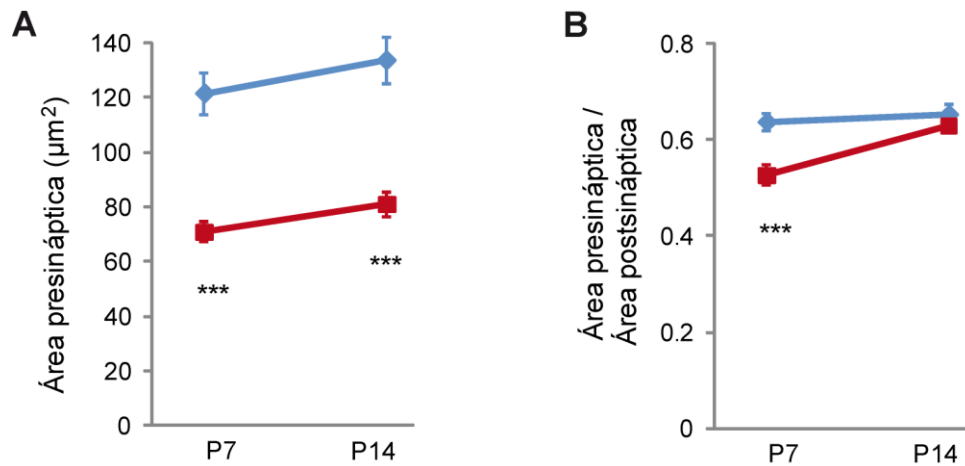


Figura 52. El área presináptica es más pequeña en los terminales SMN Δ 7. A. El área presináptica total ya se encuentra disminuida en los terminales mutantes en relación con los controles desde P7. **B.** La razón área presináptica/área postsináptica está disminuida a P7 en los terminales mutantes; sin embargo, no se observan diferencias significativas a P14 debido a la acumulación de neurofilamentos que sucede a esta edad. ***: $p < 0.0005$.

Tabla 10. Área presináptica y relación área presináptica/área postsináptica en los terminales procedentes de ambos genotipos a P7 y P14.

	Control		SMN Δ 7	
	P7	P14	P7	P14
Área presináptica	121'2 \pm 4'7 μm^2	133'4 \pm 6 μm^2	70'6 \pm 3'6 μm^2	80'8 \pm 4'4 μm^2
A presináptica / A postsináptica	0'64 \pm 0'02	0'65 \pm 0'02	0'53 \pm 0'02	0'63 \pm 0'02

G. Inmadurez en la distribución de los microtúbulos en los terminales SMN Δ 7

Los microtúbulos proporcionan los raíles para el transporte de organelos a lo largo del axón a través de proteínas motoras asociadas a microtúbulos. Para examinar la organización de los microtúbulos en el axón y en el terminal nervioso motor de controles y de mutantes SMN Δ 7 a P9-P11, se usó un anticuerpo contra tubulina acetilada, el cual se une a la tubulina polimerizada.

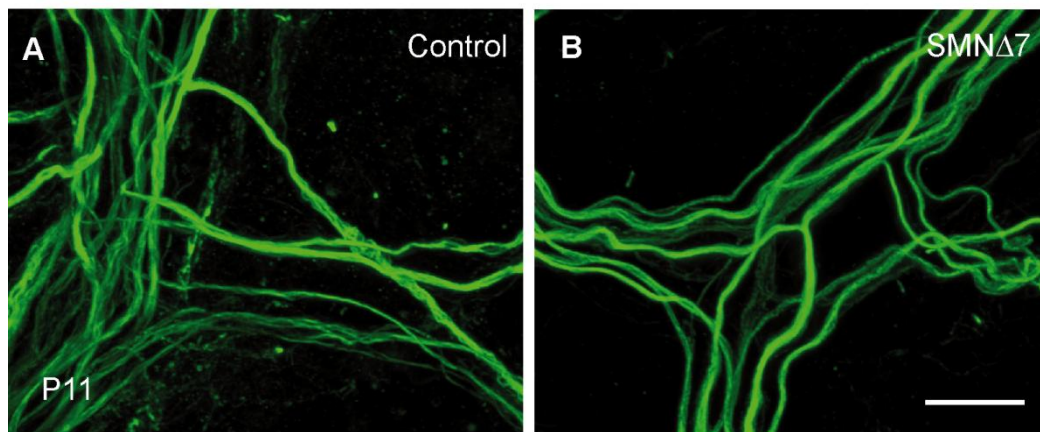


Figura 53. Los microtúbulos no se encuentran desorganizados en los axones de los ratones SMN Δ 7. Los microtúbulos marcados con anticuerpo contra tubulina acetilada en los ratones controles (A) y mutantes (B). *Barra de calibración: 10 μ m.*

La Figura 53 muestra dos ejemplos representativos del marcaje de los microtúbulos en los axones procedentes del TVA de ratones controles y mutantes hermanos de camada a P11. En ambos casos el marcaje fue homogéneo y continuo, no observándose diferencias apreciables, lo que sugiere que la orientación y la fasciculación axonal no estaban afectadas en los ratones SMN Δ 7 (Fig. 53). Por otro lado, en el terminal presináptico, la organización de la tubulina polimerizada difería entre ratones controles y mutantes (Fig. 54). Generalmente en los terminales controles, los microtúbulos aparecieron agrupados en haces finos (Fig. 54A). Sin embargo, en la mayoría de los mutantes los microtúbulos aparecieron esparcidos por todo el terminal y, en vez de encontrarse fasciculados, presentaban una apariencia punteada (Fig. 54B). Se cuantificó el porcentaje de terminales con patrones ramificados, difusos o ambos (mixto) (Fig. 55A). En los ratones controles, el patrón

ramificado fue el más frecuente (74%), y el patrón puntuado con la tubulina esparcida por el terminal no fue observado en ningún caso. En los mutantes, por otro lado, la mayoría de los terminales mostraron una distribución anómala de la tubulina (~54% patrón mixto y ~28% patrón puntuado) y sólo un 18% mostró un patrón de distribución ramificado similar al observado en los terminales controles.

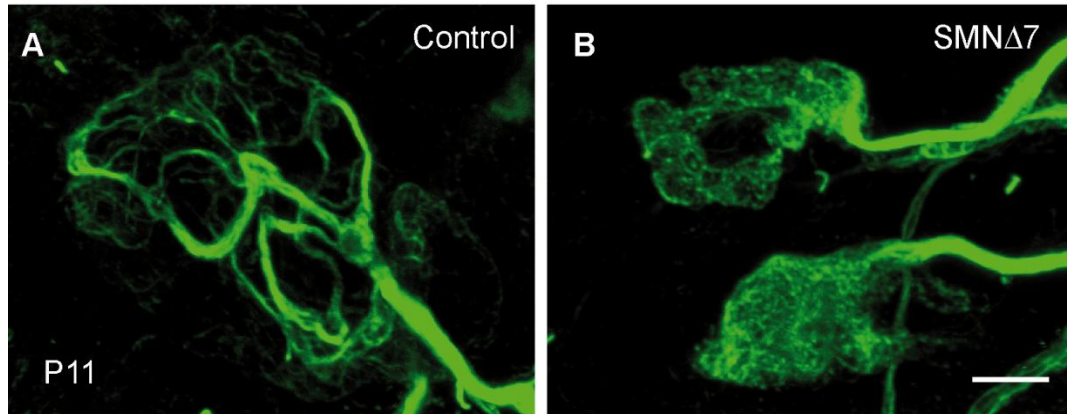


Figura 54. Los microtúbulos presentan una organización anómala en los terminales SMN Δ 7 a P11. Microtúbulos marcados con anti-tubulina acetilada. **A.** Los microtúbulos aparece formando una red con haces finos en los terminales controles. **B.** En los terminales mutantes puede observarse como la tubulina aparece esparcida y puntuada por el terminal. *Barra de calibración: 5 μ m.*

La cuantificación del área total ocupada por la tubulina en los terminales no mostró diferencias significativas entre controles y mutantes ($81'09 \pm 3'81 \mu\text{m}^2$, $n = 32$ terminales, y $76'49 \pm 3'72 \mu\text{m}^2$, $n = 33$ terminales, en ambos genotipos; $p = 0'39$). Sin embargo, cuando estos valores se normalizaron al área postsináptica, los mutantes mostraron una señal relativa mayor que los controles (mutantes: $0'44 \pm 0'02$; controles: $0'37 \pm 0'02$; $p = 0'0083$; Fig. 55B).

Dado que, como se mostró anteriormente, observamos un defecto en la maduración de los neurofilamentos en los terminales motores de los ratones SMN Δ 7, se hipotetizó que el déficit de SMN pudiera producir un efecto similar en los microtúbulos. Para explorar si la organización anómala de los microtúbulos en los terminales mutantes se debía a un defecto en la maduración, se examinó la distribución de los microtúbulos a una edad más temprana (P4). Los resultados mostraron que, sorprendentemente, tanto en los

terminales controles como en los mutantes, los microtúbulos aparecían extendidos por el terminal y con un patrón punteado (Fig. 56A, panel izquierdo), similar al patrón observado en los mutantes a P11 (Fig. 54B y 56B, paneles derechos).

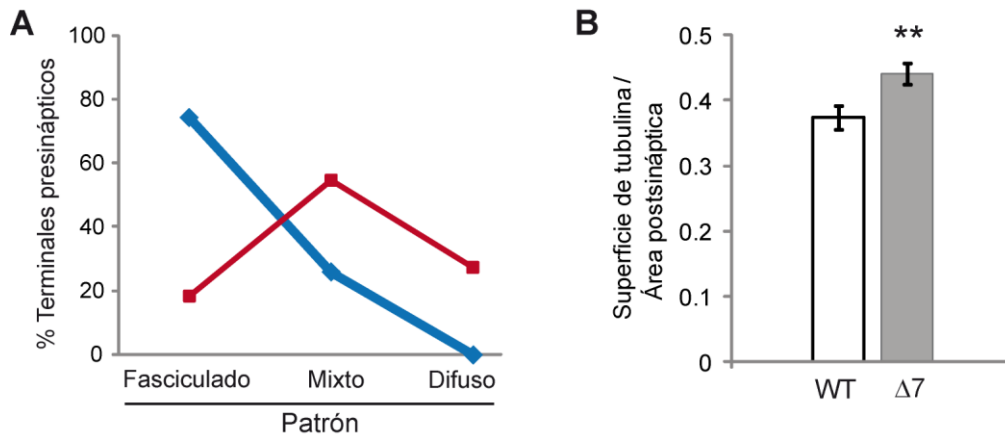


Figura 55. Los terminales SMN Δ 7 presentan un patrón de distribución anómalo de la tubulina. A. Representación del porcentaje de terminales controles y mutantes que presentan un patrón fasciculado, difuso o mixto. Control, azul; SMN Δ 7, rojo. **B.** Cuantificación del área media que ocupa la señal de marcaje de la tubulina en relación al área postsináptica. **: $p < 0'005$.

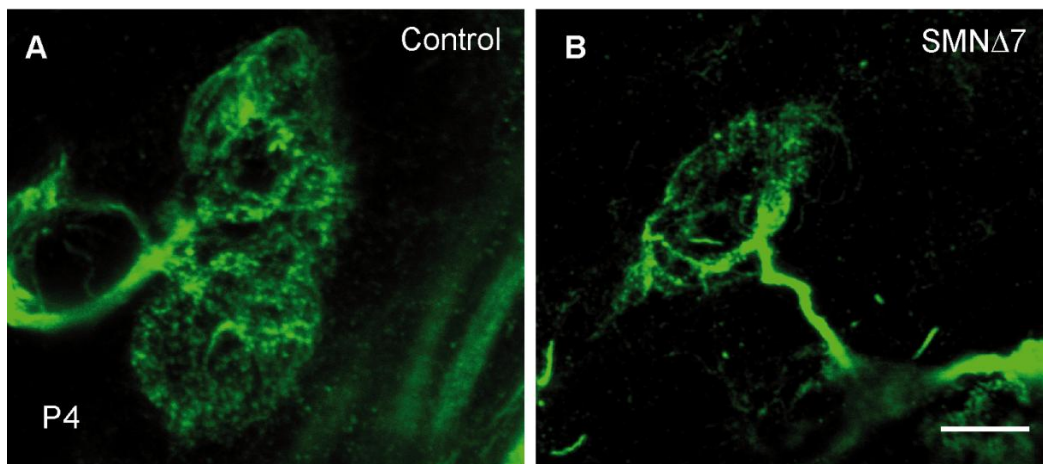


Figura 56. El patrón de distribución de los microtúbulos en los terminales controles a P4 es similar. A. Distribución de la tubulina en un terminal control. **B.** Organización de la tubulina en un terminal mutante. *Barra de calibración: 5 μ m.*

Estos datos sugieren un defecto en la reorganización de los microtúbulos durante el período postnatal en los terminales mutantes produciéndose una parada en la maduración de este elemento del citoesqueleto.

H. La proteína MAP-1B está disminuida en los terminales SMN Δ 7

El papel de las proteínas motoras asociadas a microtúbulos en el transporte de organelos a lo largo de los microtúbulos es bien conocido. Además, existen otras proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) con diferentes funciones como son: estabilizar y desestabilizar los microtúbulos, guiarlos hacia localizaciones específicas celulares, unir microtúbulos y mediar las interacciones de los microtúbulos con otras proteínas celulares. Las MAPs pueden dividirse en dos grupos: estructurales y dinámicas. Las proteínas estructurales MAP-1A, -1B y -2 funcionan estimulando el ensamblaje de la tubulina, aumentando la estabilidad de los microtúbulos e influyendo en la distribución espacial de estos microtúbulos en las células. Curiosamente, el gen que codifica la proteína MAP-1B se encuentra mapeado en el cromosoma 5q13 muy próximo al gen *SMN1*. Por esta razón y por el fenotipo observado en los microtúbulos, quisimos explorar si existía una alteración en la distribución y cantidad de esta proteína en los terminales motores SMN Δ 7.

Para el marcaje se utilizó un anticuerpo contra MAP-1B a P11, misma edad a la que se habían estudiado los microtúbulos. En los axones no se observó alteración en cuanto a la distribución de la proteína. Sin embargo, en los terminales nerviosos se advirtió un menor marcaje de MAP-1B en los mutantes en comparación con los controles (Fig. 57A y 57B).

El área que ocupada por MAP-1B en los terminales SMN Δ 7 fue significativamente menor ($22'34 \pm 3'33 \mu\text{m}^2$; $n, N = 26, 4$) en comparación con los terminales motores ($54'63 \pm 4'21 \mu\text{m}^2$; $n, N = 27, 4$; $p < 0'0001$; Fig. 58A). En cuanto a la razón entre el área ocupada por la tubulina y el área ocupada por MAP-1B, se observó una reducción del ~40% en los terminales mutantes en relación a los controles (controles: $0'83 \pm 0'05$; SMN Δ 7: $0'50 \pm 0'06$; $p = 0'0002$; Fig. 58B). Incluso, normalizando el área de MAP-1B al área postsináptica, se observó una diferencia del ~27% entre los terminales de ambos genotipos (controles: $0'22 \pm 0'02$; mutantes: $0'16 \pm 0'02$; $p = 0'04$; Fig. 58C).

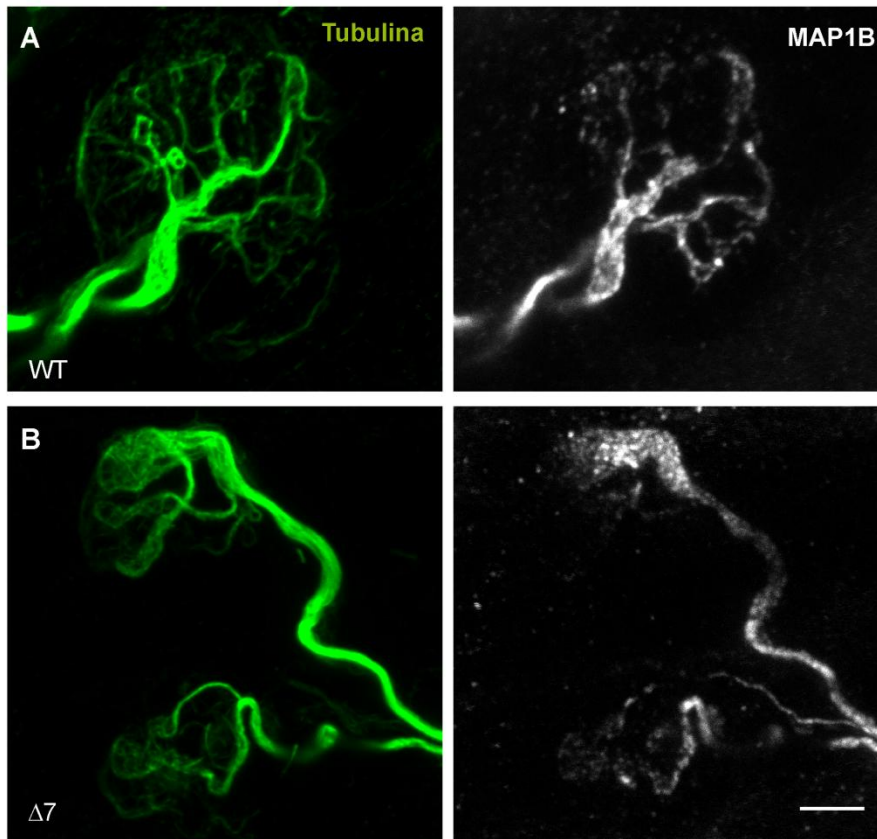


Figura 57. MAP-1B se expresa tanto en los terminales controles como en los terminales SMN Δ 7. El marcaje se realizó con anticuerpo contra tubulina acetilada y contra MAP-1B. **A.** La imagen representa un terminal control a P11. **B.** Imagen donde aparecen dos terminales SMN Δ 7. Barra de calibración: 5 μ m.

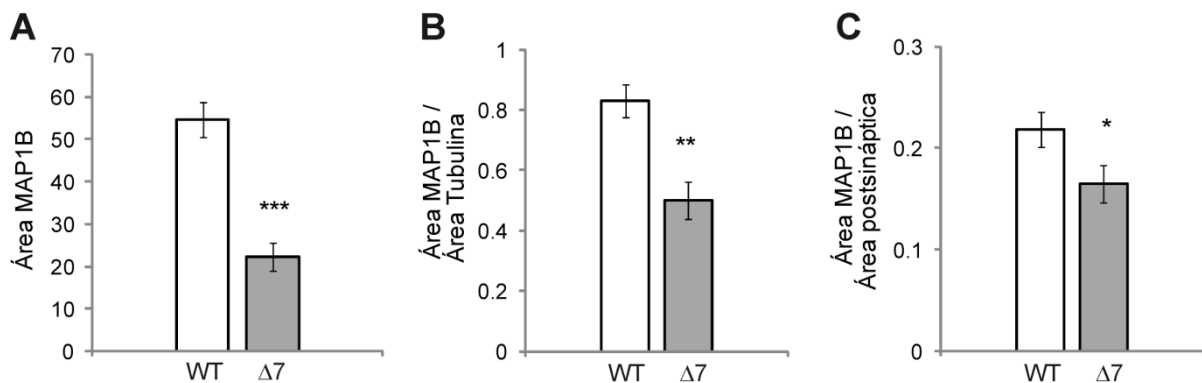


Figura 58. El área que ocupa MAP-1B es significativamente diferente en los terminales controles y los terminales SMN Δ 7. **A.** El área total de MAP-1B está significativamente reducida en los terminales SMN Δ 7. **B.** La relación entre la cantidad de MAP-1B y de tubulina se encuentra significativamente reducida en los terminales mutantes en relación con los controles. **C.** El área de MAP-1B normalizada al área postsináptica media presenta diferencias significativas entre terminales controles y mutantes. *: $p < 0'05$; **: $p < 0'005$; ***: $p < 0'0005$.

Estos datos sugieren que la menor cantidad de proteína MAP-1B en los terminales mutantes podría participar en el fenotipo de inmadurez de los microtúbulos en dichos terminales, ya que esta proteína es la responsable de organizar y estabilizar los haces de tubulina.

1.3. Experimentos funcionales. Electrofisiología

Los resultados descritos en los apartados anteriores muestran que la arquitectura de la NMJ está alterada en los ratones SMN Δ 7, tanto en el terminal presináptico como en el terminal postsináptico. La disminución en el número tanto de vesículas sinápticas, como de zonas activas, así como, la disminución del contenido cuántico en los terminales mutantes (Ruiz et al., 2010), planteó la necesidad de realizar un estudio funcional de la capacidad de los terminales motores de modular la liberación de neurotransmisor. Por ello, hemos utilizado R-roscovitina, un modificador de los canales de calcio voltaje-dependientes, que en la NMJ de rana (Cho and Meriney, 2006) y en sinapsis de hipocampo (Yan et al., 2002; Kim and Ryan, 2010) aumenta la liberación de neurotransmisor. Todos los experimentos descritos a continuación se realizaron con la técnica de registro intracelular con microelectrodos de vidrio en fibras musculares de preparaciones neuromusculares del TVA procedentes de ratones hermanos de camada control y SMN Δ 7, entre P9-P11. Los experimentos se realizaron a una concentración de Ca²⁺ extracelular de 1 mM para cuantificar mejor el efecto de la droga sobre la neurotransmisión.

1.3.1. Amplitud y frecuencia de los potenciales espontáneos

Para explorar las características de la liberación espontánea de neurotransmisor en los terminales del TVA en los ratones deficientes de SMN, se registraron los potenciales de placa en miniatura (mEPPs) en las fibras musculares de controles y mutantes, en las condiciones antes descritas, ratones entre P9-11 y 1 mM calcio en la solución de la cámara de registro.

La Figura 59A muestra registros representativos de actividad espontánea en un terminal control y en un mutante, donde ya pueden intuirse algunas diferencias. El análisis de la amplitud acumulada de los mEPPs mostró un desplazamiento hacia la derecha de la curva en las fibras SMN Δ 7 en relación con los controles (Fig. 59B).

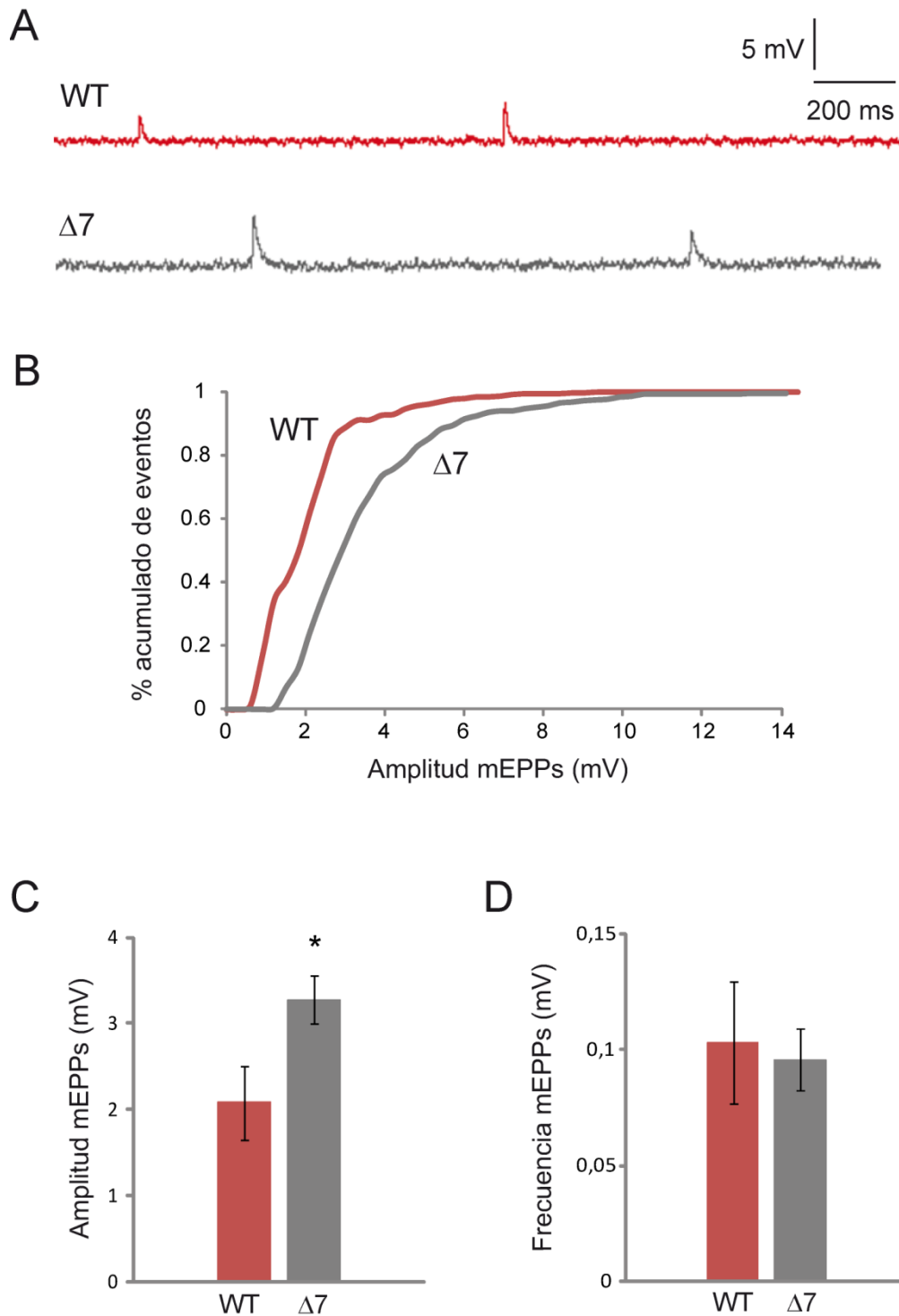


Figura 59. Los mEPPs tienen una amplitud mayor en los terminales SMN $\Delta 7$. A. Trazos representativos de una fibra control y una fibra mutante. **B.** Frecuencia acumulada de las amplitudes de los mEPPs en controles (rojo, $n, N = 20, 6$) y mutantes (gris, $n, N = 22, 6$). **C.** La amplitud media de los mEPPs es mayor en los terminales SMN $\Delta 7$ que en los controles. **D.** La frecuencia de mEPPs no está afectada en las fibras musculares de los ratones SMN $\Delta 7$. *: $p < 0'05$.

La amplitud media de los mEPPs en los mutantes fue $3'27 \pm 0'19$ mV (n , $N = 26$, 7) y en los controles $2'07 \pm 0'24$ mV (n , $N = 23$, 7; $p = 0'0004$; Fig. 59C). Este aumento en la amplitud de los mEPPs en los mutantes es debido, al menos en parte, al menor tamaño de las fibras musculares, ya que esto, generalmente, produce un aumento en la resistencia de entrada y un mayor cambio de voltaje para una misma cantidad de corriente a través de los receptores postsinápticos. La frecuencia de los eventos espontáneos no se encontró alterada en el fenotipo mutante ($p = 0'7$; Fig. 59D).

1.3.2. La cinética de los potenciales de placa evocados está enlentecida en los terminales de SMN Δ 7

La cinética de los EPPs proporciona información sobre la velocidad con la que se libera el neurotransmisor contenido en las vesículas sinápticas en el terminal nervioso así como la velocidad de la respuesta de los receptores nicotínicos de acetilcolina en el terminal postsináptico.

Como se observa en la Figura 60A, los picos de los EPPs registrados en los terminales SMN Δ 7 muestran una anchura mayor que la de los EPPs registrados en los terminales controles, indicativo de una cinética diferente entre los evocados de ambos genotipos.

La cuantificación nos mostró que el tiempo de subida de los EPPs (medido entre 10-90% de la amplitud del trazo) en los terminales mutantes fue significativamente más lenta que la de los terminales control (mutantes: $1'57 \pm 0'13$ ms, n , $N = 14$, 4; control: $0'85 \pm 0'04$ ms, n , $N = 15$, 5; $p = 0'0001$; Fig. 60B). En cuanto a la fase de caída, se cuantificó mediante el cálculo de la constante de tiempo de bajada (τ , calculada desde el 50% de la amplitud del EPP hasta la línea base) de los evocados en los terminales mutantes y controles, observándose un enlentecimiento en las fibras SMN Δ 7 en relación con las controles (mutantes: $7'85 \pm 0'92$ ms, n , $N = 23$, 7; control: $3'51 \pm 0'30$ ms, n , $N = 23$, 7; $p = 0'0004$; Fig. 60C).

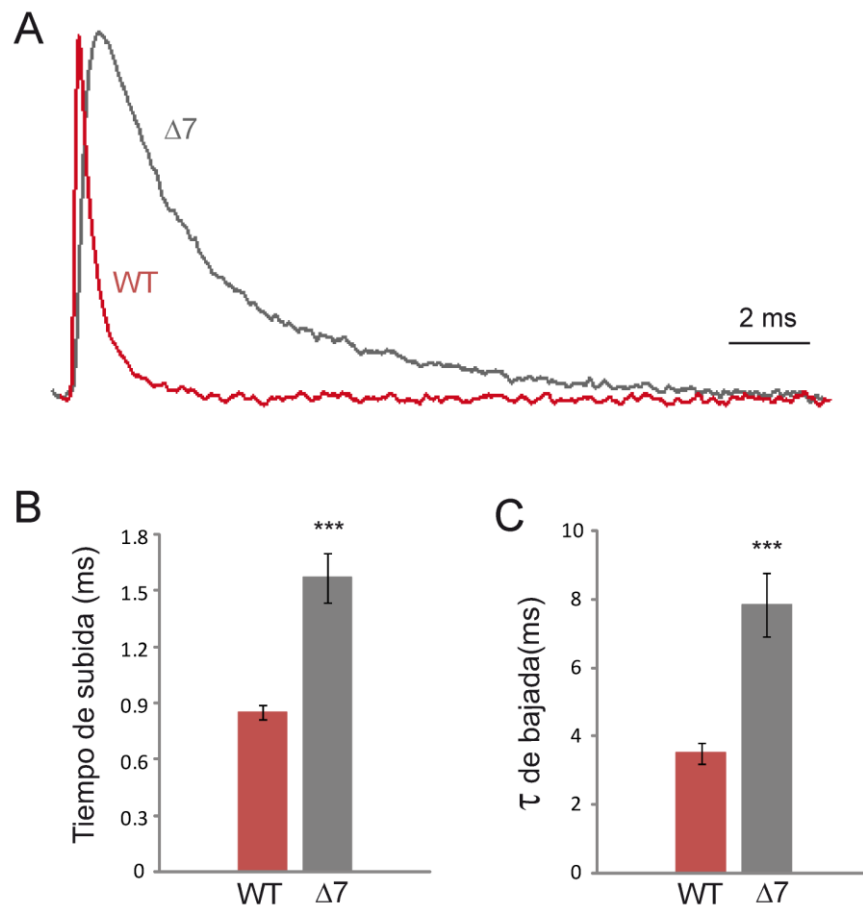


Figura 60. Diferencias en la cinética de los potenciales evocados en los ratones SMN Δ 7 y controles. **A.** Trazos representativos de dos EPPs normalizados en los que se observa que las fases de subida y de bajada son más lentas en los terminales SMN Δ 7 en comparación con los controles. **B.** Cuantificación del tiempo de subida media de los EPPs. **C.** Constante de tiempo media de la fase de bajada de los potenciales evocados. ***: $p < 0.0005$.

1.3.3. La amplitud de la respuesta evocada no está disminuida en los terminales motores de SMN Δ 7 pero sí la liberación de neurotransmisor

Se ha descrito previamente que en condiciones fisiológicas de calcio extracelular (2 mM) la neurotransmisión está disminuida en los terminales motores del TVA en los ratones SMN Δ 7, sin que existan diferencias en el tamaño de los EPPs a P14 (Ruiz et al., 2010). Para determinar estos parámetros a P9-11 y con una concentración de calcio extracelular más baja (1 mM) analizamos la amplitud de los EPPs y el contenido cuántico en ratones

controles y mutantes, mediante la aplicación de trenes de estímulos a 0'5 Hz durante 200 s.

La Figura 61A muestra el valor medio de la amplitud de los EPPs durante el registro en las fibras controles (rojo, $n, N = 23, 7$) y mutantes (gris, $n, N = 26, 7$). No se observaron diferencias entre genotipos, ni al inicio ni durante el resto del registro, como muestra la media total de los EPPs (control: $9'57 \pm 1'37$ mV; mutante: $9'91 \pm 1'09$ mV; $p = 0'84$; Fig. 61B).

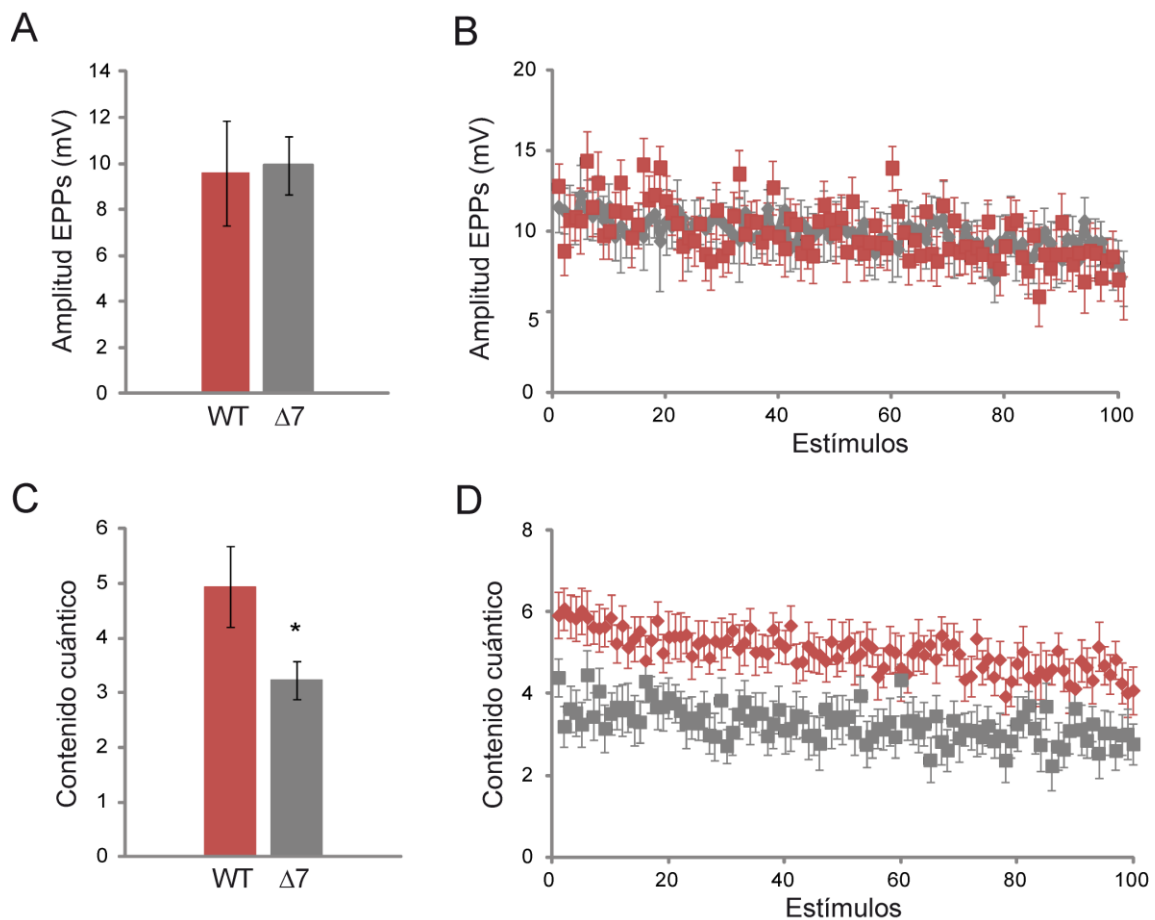


Figura 61. La amplitud de los EPPs en ambos genotipos es similar, aunque el contenido cuántico está disminuido en los terminales SMN Δ 7. A. Amplitud media de los EPPs registrados en respuesta a cada potencial de acción (0'5 Hz, 200 s). Control, rojo. Mutante, gris. **B.** Amplitud media de los EPPs en los terminales control y mutante. **C.** Número medio de vesículas liberadas en respuesta a cada potencial de acción (0'5 Hz, 200 s). **D.** Contenido cuántico medio en los terminales control ($n, N = 23, 7$) y mutante ($n, N = 26, 7$). Control, rojo. Mutante, gris. *: $p < 0'05$.

El contenido cuántico se calculó para obtener información sobre la cantidad de vesículas que se fusionan en respuesta a la llegada de un potencial de acción al terminal presináptico. El contenido cuántico se halló por el método directo, excepto en los casos en que no se pudo determinar con precisión la amplitud de los mEPPs y existían fallos en la liberación evocada, en cuyo caso se utilizó el método indirecto. Como control, en una serie de fibras se aplicaron ambos métodos, no observándose diferencias en los valores obtenidos en uno y otro caso (ver Figura 34 en *Materiales y Métodos*), por lo que todas las fibras registradas se analizaron juntas. Los resultados de este análisis mostraron que en nuestras condiciones experimentales la cantidad de vesículas liberada en respuesta a la estimulación nerviosa está disminuida un 35% en los terminales SMN Δ 7 en comparación con los terminales controles (control: 4.94 ± 0.42 ; mutante: 3.22 ± 0.38 ; $p = 0.004$; Fig. 61C y 61D).

1.3.4. La respuesta a pulsos pareados no está alterada en los terminales SMN Δ 7

Para explorar la plasticidad sináptica a corto plazo en los terminales controles y mutantes se midió la amplitud del primer y el segundo potencial evocado (protocolo de *pulso pareado*), registrados tras la aplicación de dos estímulos a 20 Hz (intervalo entre estímulos 50 ms). Dividiendo la amplitud de la segunda respuesta entre la de la primera se obtuvo la razón entre ambas, indicativo de facilitación o depresión sináptica a corto plazo. La Figura 62A y 62B muestra ejemplos representativos de las respuestas en una fibra control y otra mutante. En ambos genotipos, el potencial evocado en respuesta al segundo estímulo fue mayor que el registrado en respuesta al primer estímulo. La cuantificación mostró que no existía diferencia significativa en la razón media entre pulsos en los terminales mutantes y controles (mutantes: 1.34 ± 0.2 ; control: 1.32 ± 0.1 ; $p = 0.93$; Fig. 62C), indicando que el grado de facilitación es similar en ambos casos a esta edad y en condiciones de 1 mM Ca²⁺.

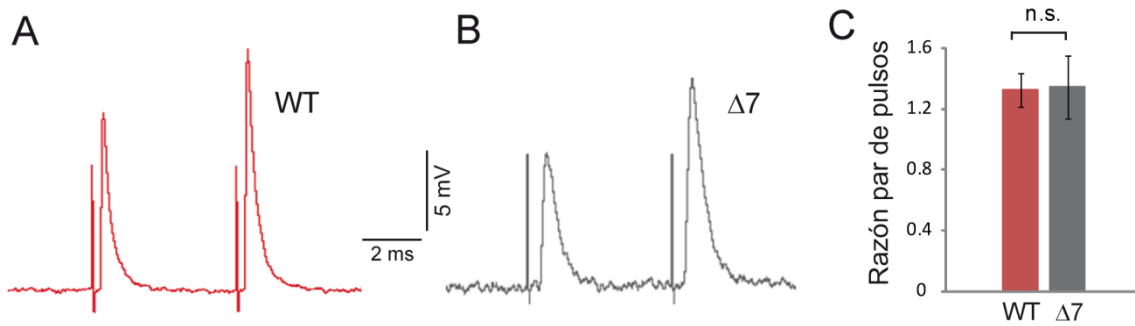


Figura 62. La facilitación durante pares de pulsos es similar en terminales control y mutantes. A y B. Respuestas evocadas en una fibra control (A) y otra mutante (B) en respuesta a dos pulsos de estimulación a 20 Hz. **C.** La razón de la amplitud entre el segundo y el primer estímulo no es diferente en fibras mutantes ($n, N = 10, 3$) y controles ($n, N = 8, 3$). *n.s.*: no significativo.

1.3.5. El tratamiento con R-roscovitina a baja concentración no afecta a la liberación de neurotransmisor

Trabajos previos han descrito que la R-roscovitina aumenta el tamaño de las respuestas evocadas (EPPs) en la NMJ de rana y neuronas en cultivo por incremento de la liberación de neurotransmisor mediante el enlenteciendo la desactivación de los canales de Ca^{2+} tipo N y tipo P/Q (Yan et al., 2002); (Cho and Meriney, 2006). En neuronas de hipocampo en cultivo se ha descrito, bien mediante electrofisiología (Tomizawa et al., 2002) o bien por imágenes (Kim and Ryan, 2010), una aumento de la fusión de vesículas a través de la inhibición de cdk5. Para explorar la acción de la R-roscovitina sobre la liberación de neurotransmisor en la NMJ de ratones mutantes se realizaron registros en ausencia y presencia de la droga y se estudió el efecto sobre la liberación espontánea, sobre los potenciales de placa evocados y sobre el contenido cuántico en los ratones SMN Δ 7. En cada músculo, primero se realizó el registro en condiciones estándar en una serie de fibras (6-8), como se ha descrito en los apartados anteriores, tras lo que se añadió R-roscovitina en la cámara de registro a una concentración de 10 ó 100 μM (diluida en DMSO al 0'01% y 0'1%, respectivamente), dejándose en incubación durante 20 minutos.

Transcurrido este tiempo, se registraron los EPPs y los mEPPs en presencia de la droga en una serie de fibras (6-8).

El análisis de la liberación espontánea en los registros reveló que la R-roscovitina, a 10 μ M, no tuvo efecto en la amplitud media de los mEPPs ni en los terminales controles ni en los mutantes (control sin roscovitina: $1'60 \pm 0'19$ mV, $n, N = 13, 4$; control roscovitina: $1'64 \pm 0'21$ mV, $n, N = 17, 4$; mutante sin roscovitina: $2'83 \pm 0'23$ mV, $n, N = 16, 5$; mutante roscovitina: $2'40 \pm 0'31$ mV, $n, N = 13, 4$. Fig. 63A; Tabla 11). Sin embargo, se observó un incremento significativo en la frecuencia de los eventos espontáneos en ambos genotipos (control: $p = 0'01$; mutante: $p = 0'04$; Fig. 63B; Tabla 11).

En los registros realizados tras la aplicación de 10 μ M R-roscovitina en la solución extracelular, se cuantificó la liberación evocada de neurotransmisor bajo la estimulación repetitiva a 0'5 Hz (200 s). No se observaron diferencias en la amplitud media de los potenciales evocados en los terminales controles antes y después del tratamiento con R-roscovitina, ni en los terminales mutantes (control sin roscovitina: $7'24 \pm 1'45$ mV, $n, N = 13, 4$; control roscovitina: $7'11 \pm 0'98$ mV, $n, N = 17, 4$; mutante sin roscovitina: $7'40 \pm 0'86$ mV, $n, N = 16, 5$; mutante roscovitina: $5'73 \pm 0'87$ mV, $n, N = 13, 4$; Fig. 63A y 63B; Tabla 11). Así mismo, la amplitud media de los EPPs no fue significativamente diferente tras la adición de la R-roscovitina a esta concentración (control: $p = 0'94$; mutante: $p = 0'18$; Fig. 63C; Tabla 11).

Los resultados del análisis del contenido cuántico reveló que éste no se vio afectado en los terminales controles ni en mutantes tras la aplicación de la R-roscovitina (control: $p = 0'58$; mutante: $p = 0'98$; Fig. 63D; Tabla 11).

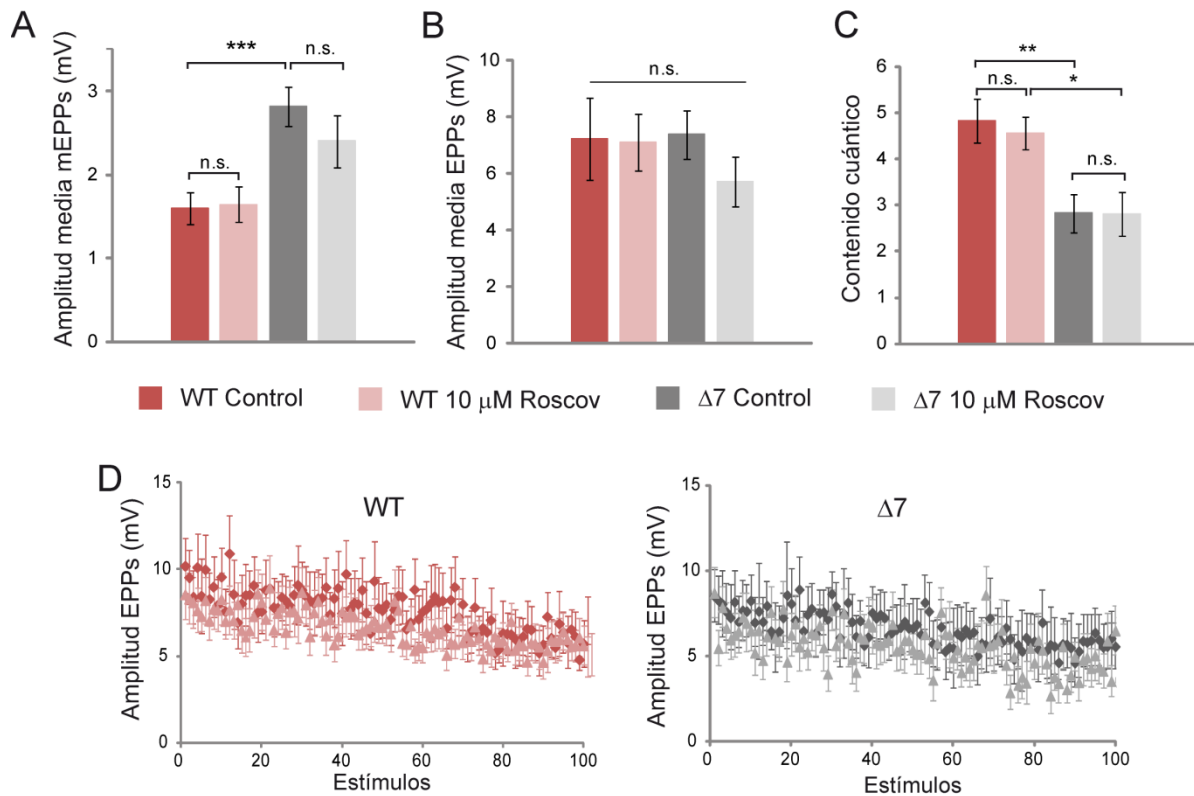


Figura 63. La R-roscovitina aplicada a una concentración de 10 μM no tiene efecto en la liberación de neurotransmisor. **A.** Amplitud media de los eventos espontáneos en terminales control y mutantes antes y después de la aplicación de R-roscovitina. **B.** Amplitud media de los potenciales evocados en controles y mutantes antes y después de la aplicación de R-roscovitina. **C.** Contenido cuántico medio de terminales controles y mutantes antes y después de la aplicación de R-roscovitina. **D.** Amplitud media de los EPPs en respuesta a los potenciales de acción (0'5 Hz) en los terminales control (A) y mutante (B). *: $p < 0'05$; **: $p < 0'005$; ***: $p < 0'0005$; n.s.: no significativo.

1.3.6. La R-roscovitina a alta concentración aumenta la frecuencia de la liberación espontánea, la amplitud de los EPPs y el contenido cuántico en los terminales motores

Dado que la aplicación de R-roscovitina a una baja concentración (10 μM) no tuvo ninguno efecto en la liberación evocada de vesículas sinápticas, se realizaron experimentos con una concentración diez veces mayor de la droga. Tras los registros realizados en condiciones normales, se añadió R-roscovitina en la cámara de registro a una concentración de 100 μM (diluida en DMSO al

0'1%) y se dejó incubar durante 20 minutos. Tras este tiempo, se registraron los EPPs y los mEPPs.

El análisis de la liberación espontánea en los registros reveló que la R-roscovitina, a esta concentración, no tuvo efecto en la amplitud media de los mEPPs ni en los terminales controles ni en los mutantes (control: $n, N = 10, 3$; control roscovitina: $n, N = 15, 3$; mutante: $n, N = 13, 3$; mutante roscovitina: $n, N = 9, 3$; Fig. 64A; Tabla 11). Lo que indicó que la droga no afectó a la respuesta de los receptores de ACh en el terminal postsináptico. Sin embargo, se observó un aumento en la frecuencia de los eventos espontáneos en ambos genotipos (control: $p = 0'0007$; mutante: $p = 0'0007$; Fig. 64B; Tabla 11), que no se debía a un efecto del DMSO (véase más adelante).

La amplitud de los EPPs en respuesta a cada potencial de acción mostró que la liberación evocada de neurotransmisor estaba incrementada en los terminales controles y en los mutantes en presencia de R-roscovitina (control: $12'62 \pm 2'29$ mV, $n, N = 10, 3$; control roscovitina: 35.13 ± 4.87 mV, $n, N = 15, 3$; mutante: $10'56 \pm 1'25$ mV, $n, N = 13, 3$; mutante roscovitina: 31.18 ± 5.05 mV, $n, N = 9, 3$; Fig. 64D). La amplitud media de los potenciales evocados aumentó ~280% en las fibras controles ($p = 0'0005$) y ~295% en las fibras SMN Δ 7 ($p = 0'003$; Fig. 64C; Tabla 11) tras el tratamiento con la R-roscovitina.

El contenido cuántico aumentó tras la adicción de R-roscovitina en las fibras de ambos genotipos, como se representa en la Figura 64F. Se cuantificaron diferencias significativas en las fibras controles (control: $4'98 \pm 0'74$; control con roscovitina: $10 \pm 1'17$, $p = 0'001$) y mutantes (mutante: $3'07 \pm 0'35$; mutante con roscovitina: $10'64 \pm 2'01$; $p = 0'006$; Fig. 64E; Tabla 11) tras la aplicación de la droga a alta concentración.

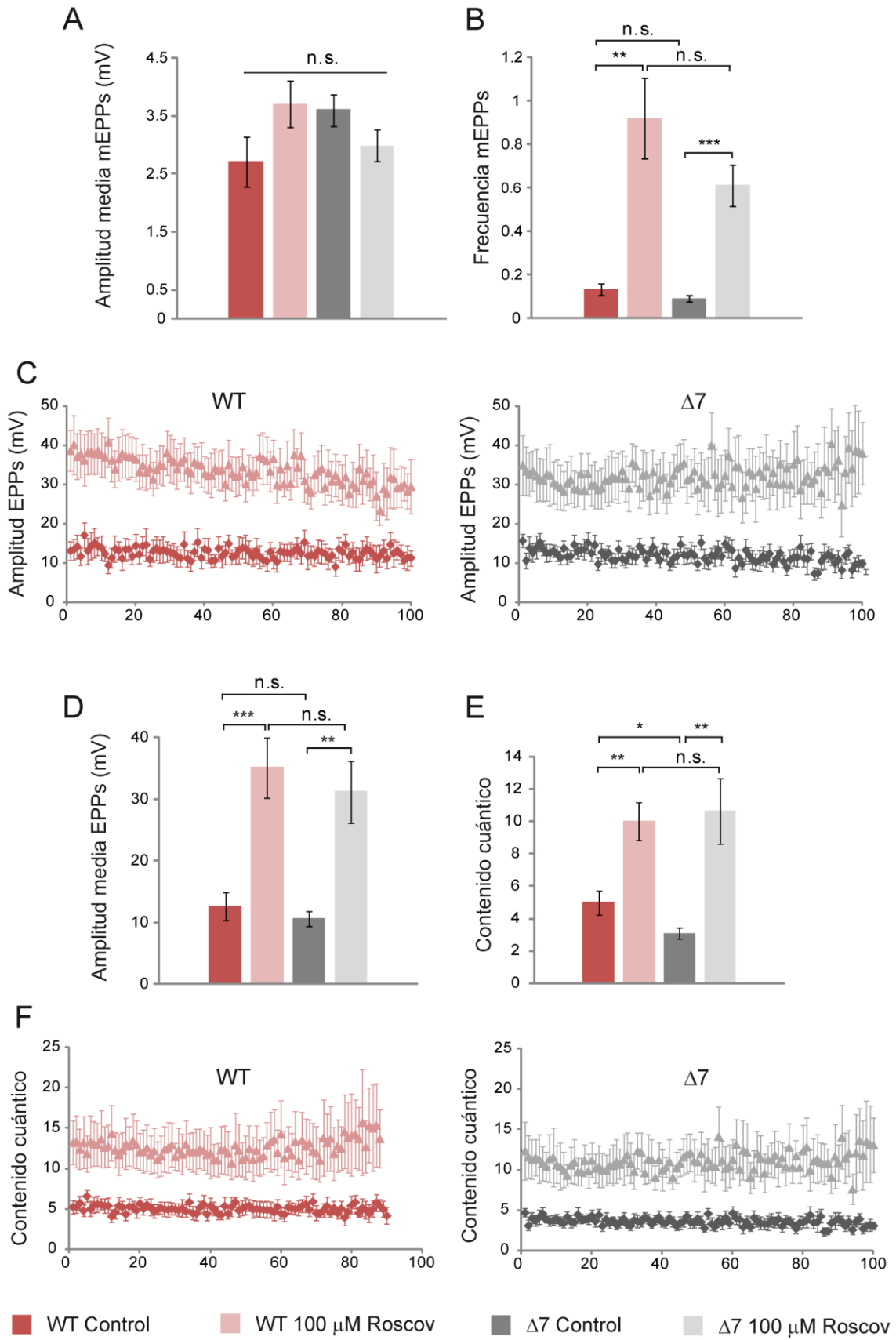


Figura 64. La alta concentración de R-roscovitina (100 μ M) aumenta la frecuencia de mEPPs, la liberación evocada de neurotransmisor y el número de vesículas fusionadas por estímulo en los terminales de ambos genotipos. A. Amplitud media de los eventos espontáneos en terminales control y mutantes antes y después de la aplicación de R-roscovitina. **B.** Frecuencia de mEPPs en terminales control y mutantes antes y después de la aplicación de R-roscovitina. **C.** Amplitud media de los EPPs en respuesta a los potenciales de acción (0'5 Hz) en los terminales control (izquierda) y mutante (derecha). **D.** Amplitud media de los EPPs en terminales control y mutante antes y después de la aplicación de R-roscovitina. **E.** Contenido cuántico medio en terminales control y mutante antes y después de la aplicación de R-roscovitina. **F.** Contenido cuántico medido tras la aplicación un tren de estímulos a 0'5 Hz en los terminales control (izquierda) y mutante (derecha) antes y después de la aplicación de R-roscovitina. *: $p < 0'05$; **: $p < 0'005$; n.s.: no significativo.

Estos resultados indican que la R-roscovitina aumenta la liberación de las vesículas sinápticas tanto en los controles como en los mutantes, Este efecto en los mutantes se produce aún cuando las vesículas y las zonas activas están disminuidas, lo que indica que aun conservan la capacidad de aumentar su eficacia sináptica

1.3.7. La R-roscovitina modifica la respuesta a pulsos pareados en los terminales del modelo SMN Δ 7

Para estudiar el efecto de la R-roscovitina sobre la facilitación se aplicó el protocolo de pulsos pareados (20 Hz). La Figura 65A y 65B muestra trazos representativos de una fibra control y otra mutante, en la que se observó que, en ambos genotipos, el evocado registrado en respuesta al segundo estímulo fue similar al registrado en respuesta al primer estímulo. Esto indica que tras la aplicación de 100 μ M de R-roscovitina disminuyó la facilitación observada en las fibras nerviosas del modelo SMN Δ 7. La cuantificación mostró que en los terminales controles hubo diferencias significativas en la razón media entre pulsos (control: $1'33 \pm 0'11$; control con roscovitina: $1'07 \pm 0'005$; $p = 0'04$), mientras que en mutantes se observó una tendencia a la disminución, pero no fue significativa (mutante: $1'64 \pm 0'2$; mutante con roscovitina: $1 \pm 0'05$; $p = 0'19$; Fig. 65C; Tabla 11).

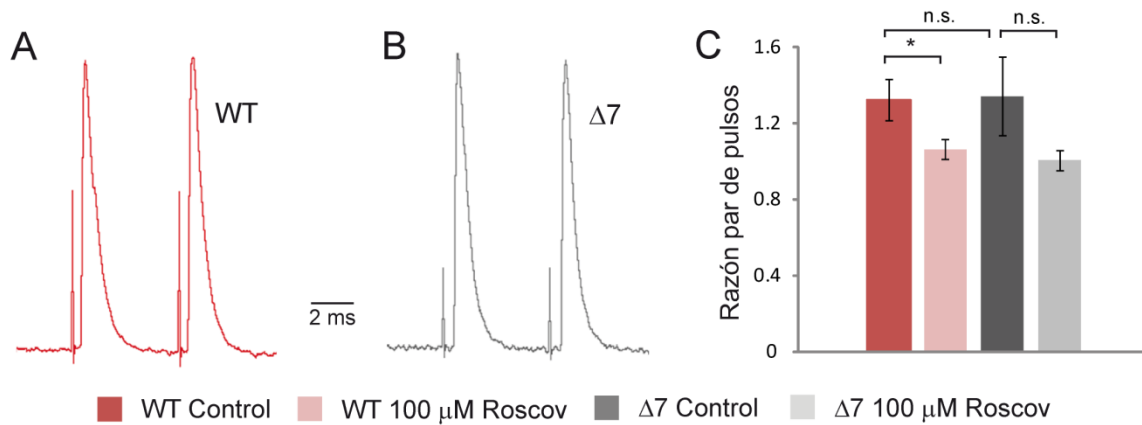


Figura 65. La R-roscovitina disminuye la facilitación en terminales control y mutantes. A y B. Respuestas evocadas en una fibra control (A) y otra mutante (B) normalizadas, tras la aplicación de R-roscovitina, en respuesta a dos pulsos de estimulación a 20 Hz. **C.** La razón entre la amplitud del segundo y del primer estímulo disminuye con la R-roscovitina en fibras mutantes y controles. *: $p < 0'05$; *n.s.* no significativo.

Estos datos indican que la R-roscovitina disminuye la facilitación en las fibras nerviosas tanto de controles como de mutantes, sin que se produzca depresión sináptica.

1.3.8. El efecto de la R-roscovitina a alta concentración no se debe a un efecto subyacente del DMSO

El DMSO debe estar a una baja concentración cuando se realizan registros electrofisiológicos, ya que es tóxico para las células en altas concentraciones y podría tener un efecto en la fusogénesis de las vesículas sinápticas (Geron and Meiri, 1985). Por lo tanto, se realizaron registros de EPPs y mEPPs en las fibras musculares de controles y mutantes tras la adición de DMSO 0'1% en la solución de la cámara de registro.

El análisis cuantitativo de los registros mostró que no había diferencias significativas en las fibras antes y después de la aplicación del DMSO ni en la amplitud de los mEPPs ni en la frecuencia con que aparecieron éstos, en

ambos genotipos (control: $n, N = 10, 2$; control roscovitina: $n, N = 5, 2$; mutante: $n, N = 9, 2$; mutante roscovitina: $n, N = 6, 2$; Fig. 66; Tabla 11). Respecto a la amplitud media de los potenciales evocados, tampoco se observaron diferencias significativas y el contenido cuántico no cambió tras la aplicación del DMSO en las fibras controles y mutantes (Fig. 66; Tabla 11).

Por lo tanto, el efecto observado cuando se añade R-roscovitina a la solución de registro extracelular, no se debe a un efecto subyacente del DMSO en el que se encuentra diluida la droga.

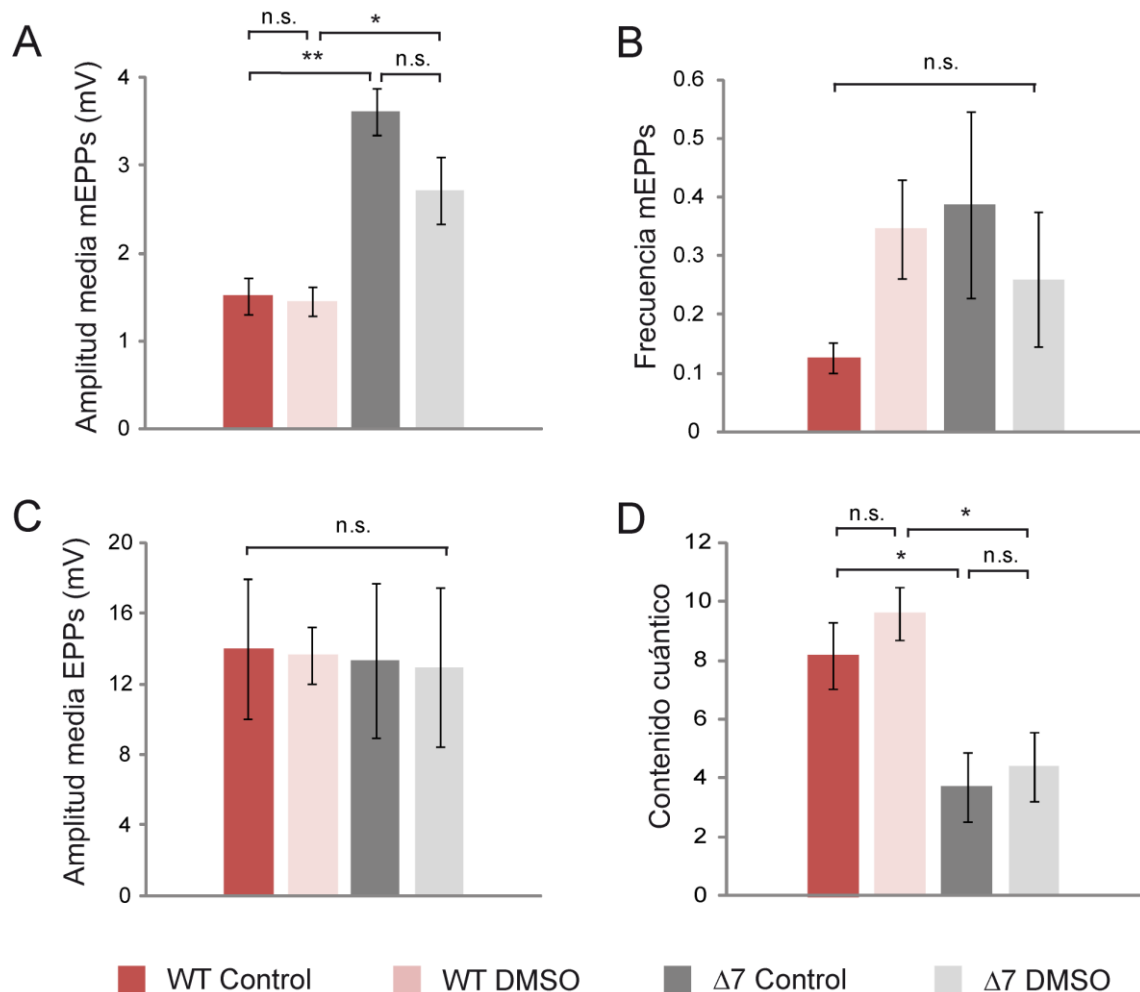


Figura 66. El DMSO al 0'1% no produce ningún efecto en la fusión de las vesículas sinápticas en los terminales controles y mutantes. **A.** Amplitud media de los mEPPs en ambos genotipos. **B.** Frecuencia de aparición de la liberación espontánea en controles y mutantes. **C.** Amplitud media de los EPPs antes y después de la aplicación del DMSO en ambos genotipos. **D.** Contenido cuántico en los terminales control y mutantes antes y después de la aplicación del DMSO. *: $p < 0'05$; **: $p < 00'05$; *n.s.* no significativo.

Tabla 11. Variación de la amplitud y frecuencia de los mEPPs, de la amplitud de los EPPs y del contenido cuántico de las fibras controles y mutantes indicadas como la razón entre los datos obtenidos en presencia y ausencia de la droga en cada caso. En las condiciones control se muestran los valores absolutos.

		Amplitud mEPPs	Frecuencia mEPPs	Amplitud EPPs	Contenido cuántico
Control (valor absoluto)	WT	2.08 ± 0.24 Mv	0.10 ± 0.014 Hz	9.58 ± 1.38 Mv	4.94 ± 0.42
	Δ7	3.27 ± 0.19 Mv	0.09 ± 0.010 Hz	9.91 ± 1.09 Mv	3.22 ± 0.38
Roscovitina 10Mm (razón)	WT	1'03 ± 0'13	3'07 ± 0'72	0'98 ± 0'14	0'94 ± 0'07
	Δ7	0'85 ± 0'11	2'52 ± 0'65	0'77 ± 0'12	0'99 ± 0'17
Roscovitina 100Mm (razón)	WT	1'37 ± 0'15	6'99 ± 1'40	2'78 ± 0'38	2'01 ± 0'23
	Δ7	0'83 ± 0'08	6'74 ± 1'06	2'95 ± 0'48	3'46 ± 0'65
DMSO (razón)	WT	0'95 ± 0'11	2'73 ± 0'66	0'97 ± 0'11	1'17 ± 0'11
	Δ7	0'75 ± 0'11	0'97 ± 0'29	0'96 ± 0'33	1'18 ± 0'32

2. Modelo PLS3-SMA

La actina filamentosa (F-actina) desempeña un papel importante tanto en la organización de los elementos presinápticos como en la función sináptica. Para conocer mejor las alteraciones de la NMJ en AME y su relación con la plastina 3 (PLS3), como modificador de esta enfermedad e, indirectamente, con la actina, se llevaron a cabo estudios morfológicos en la NMJ del TVA en ratones generados en el laboratorio de la Dra. Brunhilde Wirth (Universidad de Colonia, Alemania) que sobreexpresa PLS3. El modelo de AME utilizado para este estudio fue el modelo taiwanés desarrollado por Hsieh-Li, con un fondo genético 50% C57B16: 50% FVB/N (véase los genotipos de controles y mutantes en Tabla 4 de *Materiales y Métodos*).

2.1. Efecto de la PLS3 sobre el tamaño del terminal postsináptico

Antes de explorar diferentes elementos del terminal presináptico, se cuantificó el área de los terminales postsinápticos, ya que un área reducida de los terminales SMA podría dar una infraestimación de las áreas de otros componentes. A P4, no se observaron diferencias significativas entre los terminales SMA y los controles; además, la sobreexpresión de PLS3 en los terminales SMA tampoco aumentó el área de estos terminales (Fig. 67; Tabla 12). Sólo se observó un aumento en el área de los terminales controles que sobreexpresaron PLS3 (HET-PLS3). A P14, el área de los terminales mutantes se encontró disminuida en relación a los terminales controles (HET: $170'9 \pm 15'6 \mu\text{m}^2$; SMA: $115'5 \pm 7'9 \mu\text{m}^2$; Fig. 67; Tabla 12). La sobreexpresión de PLS3 aumentó el área de los terminales SMA hasta los niveles de los terminales HET (SMA-PLS3: $156'8 \pm 12'1 \mu\text{m}^2$), no observándose diferencias significativas entre ellos ($p = 0'48$).

Estos datos sugieren que la sobreexpresión de PLS3 podría tener un efecto positivo en el tamaño del terminal postsináptico en los ratones deficientes en Smn.

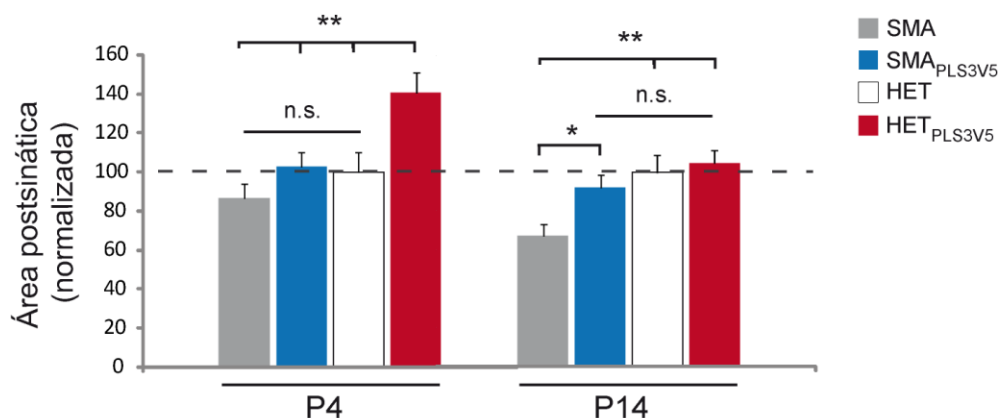


Figura 67. El área postsináptica es menor en los terminales SMA que en los HET a P14 y la sobreexpresión de PLS3 hace que aumente el área en los terminales mutantes. Cuantificación del área postsináptica en los genotipos estudiados P4 y a P14. *: $p < 0'05$; **: $p < 0'005$; n.s.: no significativo.

Tabla 12. Relación de las áreas postsinápticas de los terminales SMA, SMA-PLS3, HET y HET-PLS3 a P4 y P14

	P4	P14
SMA	67'3 ± 5'8 μm^2	115'5 ± 7'9 μm^2
SMA-PLS3	79'8 ± 5'7 μm^2	156'8 ± 12'1 μm^2
HET	79'7 ± 8'6 μm^2	170'9 ± 15'6 μm^2
HET-PLS3	107'5 ± 7'8 μm^2	178'5 ± 11'8 μm^2

2.2. La sobreexpresión de PLS3 aumenta las vesículas sinápticas

En trabajos previos, y anteriormente en esta tesis, se ha demostrado que la cantidad de vesículas sinápticas en los terminales motores de ratones SMN Δ 7 está reducida en comparación con los terminales motores de sus hermanos de camada controles (Kong et al., 2009); Fig. 41 en *Resultados*). Para confirmar esta reducción en el modelo actual de AME y comprobar si la sobreexpresión de PLS3V5 afecta al contenido de vesículas sinápticas y a su

distribución, se llevó a cabo marcaje con un anticuerpo contra vAChT a dos edades, a P4 y a P14.

En la Figura 68A y 68B se muestran imágenes representativas del marcaje de las vesículas sinápticas en los terminales presinápticos de SMA, SMA-PLS3, HET y HET-PLS3, a las dos edades estudiadas. A P4, las vesículas sinápticas aparecen en todos los genotipos formando las típicas agrupaciones de los terminales inmaduros. Sin embargo, a P14 las vesículas aparecen dispersas por todo el terminal, no observándose una clara diferencia entre los terminales SMA y los controles (HET), por lo que el fenotipo vesicular no se encontró muy afectado en este modelo.

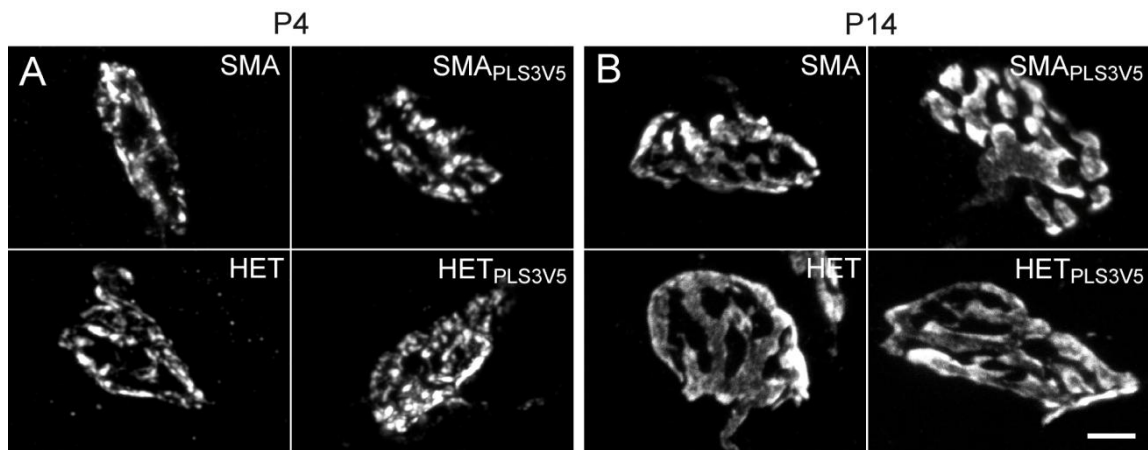


Figura 68. Las vesículas se mantienen agrupadas a P4 y se dispersan por el terminal a P14 en todos los genotipos. Imágenes confocales representativas de las vesículas sinápticas en el terminal presináptico marcadas con anticuerpo anti-vAChT. El marcaje se realizó en el TVA de ratones SMA, SMA-PLS3, HET y HET-PLS3, a P4 (A) y a P14 (B). *Barra de calibración: 5 μm .*

Sin embargo, la cuantificación de las imágenes obtenidas reveló que, a P4, el área ocupada por las vesículas sinápticas en los terminales mutantes ($24.3 \pm 2 \mu\text{m}^2$) fue significativamente menor ($\sim 33\%$) que en los controles ($36.2 \pm 4.9 \mu\text{m}^2$; $p = 0.03$). Lo mismo ocurre a P14, donde el área de las vesículas en los terminales SMA fue un $\sim 34\%$ menor que en los HET (SMA: $53 \pm 4 \mu\text{m}^2$; HET: $80.9 \pm 7 \mu\text{m}^2$; $p = 0.002$; Fig. 69A). Por otro lado, la sobreexpresión de PLS3 en los mutantes restauró el área de las vesículas sinápticas hasta los niveles de los controles en las dos edades ($p > 0.05$ en ambas edades; Fig.

69B; Tabla 13) pero no produjo ningún cambio en los controles ($p > 0'05$) a ninguna de las dos edades estudiadas (Tabla 13).

Para comprobar si esta reducción en el área que ocupaban las vesículas en los ratones SMA era debido al menor tamaño de los terminales postsinápticos (Fig. 69), se normalizó el área total de las vesículas al área postsináptica. La Figura 69B muestra los valores de la razón área de vesículas/área postsináptica de los cuatro genotipos, tanto a P4 como a P14. No se observaron diferencias significativas entre los genotipos a P4, lo que indica que el área menor de las vesículas en los terminales SMA se debe al menor tamaño de la NMJ en estos ratones. Sin embargo, a P14 se observó que, incluso normalizando al área postsináptica, el área de las vesículas aumentó en los terminales SMA-PLS3 en comparación con los terminales SMA ($p = 0'02$) y también respecto a los terminales controles ($p = 0'01$; Fig. 69B; Tabla 13).

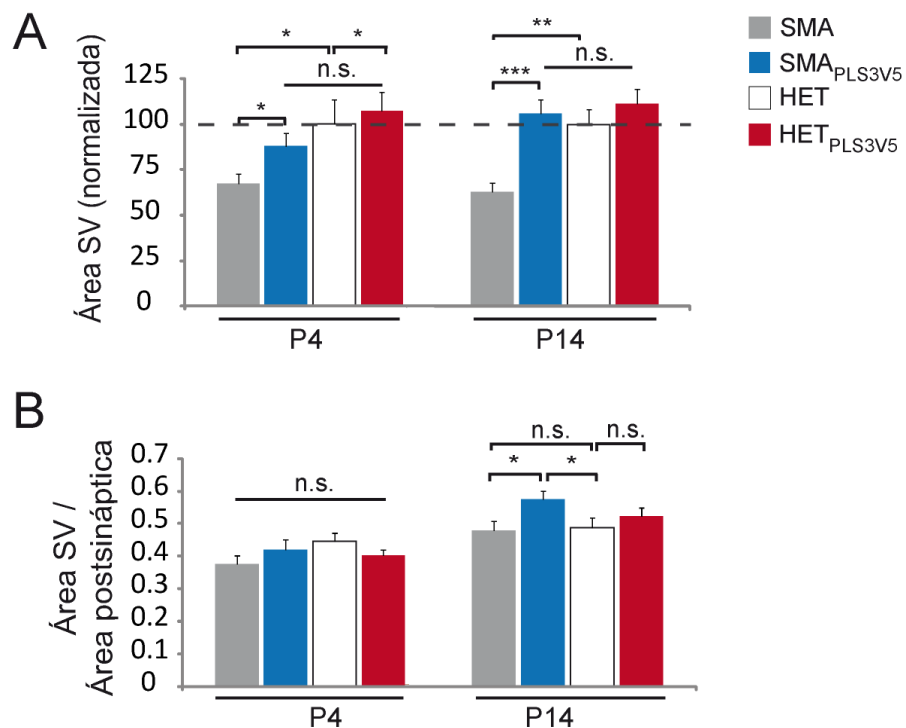


Figura 69. Cuantificación de área que ocupan las vesículas en los diferentes genotipos estudiados. A. Área que ocupan las vesículas sinápticas en el terminal presináptico normalizada al área media de los terminales HET en cada edad, P4 y P14. **B.** Área de las vesículas sinápticas expresada en relación al área media del postsináptico de cada genotipo. *: $p < 0'05$; **: $p < 0'005$; ***: $p < 0'0005$; n. s.: no significativo.

Por otro lado, se representaron los valores absolutos del área de las vesículas sinápticas frente al área postsináptica individual de cada terminal para cada genotipo a P14 (Fig. 70). En todos los casos existió una relación lineal entre el contenido de vesículas sinápticas y el tamaño postsináptico. En los terminales SMA se observó que, en la mayoría, las vesículas ocupan un área menor a $80 \mu\text{m}^2$ y el área postsináptica no superó los $250 \mu\text{m}^2$ (Fig. 70A). No obstante, en los terminales SMA-PLS3 las vesículas ocuparon un área mayor y se observó un incremento del área postsináptica, manteniéndose la relación lineal entre ambos (Fig. 70B). Estos valores fueron similares a los obtenidos en los terminales controles sin y con PLS3 (Fig. 70C y 70D).

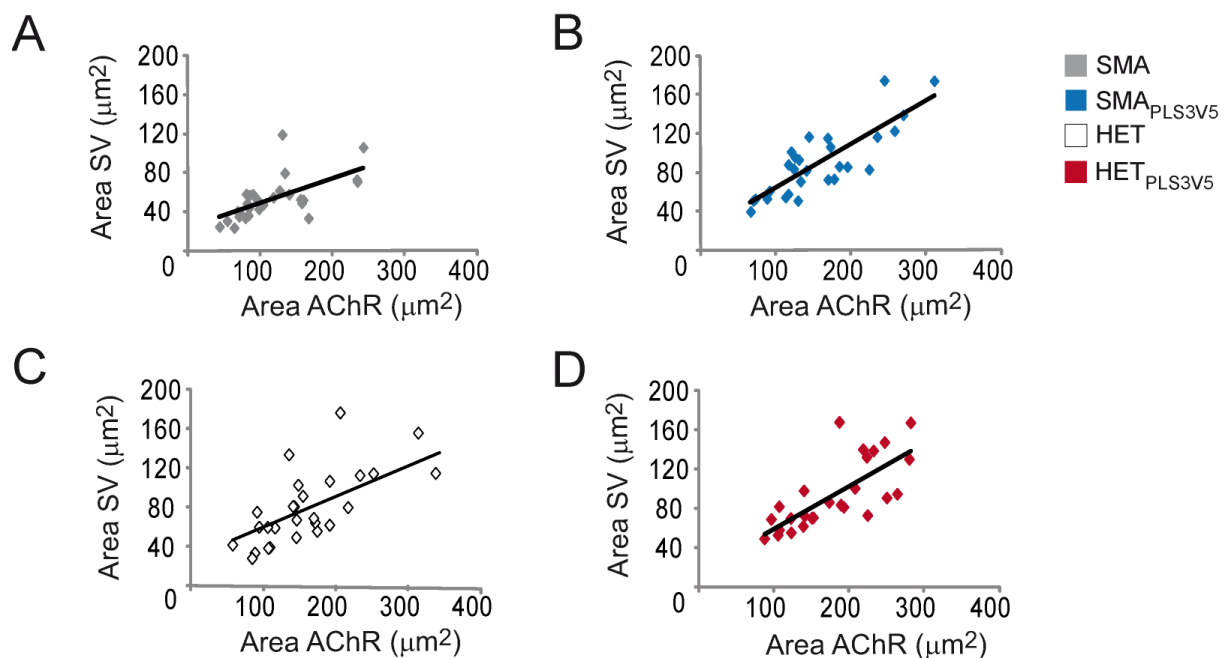


Figura 70. Relación entre el área individual de las vesículas sinápticas y el área postsináptica en SMA-PLS3, HET y HET-PLS3 a P14. Véase que existe una relación lineal entre ambos parámetros en todos los casos cuyos coeficientes de correlación (R) son: SMA: 0'62, SMA-PLS3: 0'83, HET: 0'69 y HET-PLS3: 0'74

Estos datos nos indican que la sobreexpresión de PLS3 aumenta el área que ocupan las vesículas sinápticas en los terminales SMA, inicialmente por un aumento del tamaño de la NMJ (P4) pero posteriormente en mayor cuantía de lo que correspondería por el aumento de tamaño de la NMJ.

Tabla 13. Área total de las vesículas sinápticas y área de las vesículas normalizada al terminal postsináptico en los terminales de los cuatro genotipos estudiados a P4 y a P14.

	Área vesículas (μm^2)		A vesículas / A post	
	P4	P14	P4	P14
SMA	24'3 \pm 2	53 \pm 4	0'37 \pm 0'02	0'49 \pm 0'02
SMA-PLS3	31'8 \pm 2'3	89'1 \pm 6'6	0'42 \pm 0'03	0'58 \pm 0'02
HET	36'2 \pm 4'9	80'9 \pm 7	0'44 \pm 0'02	0'50 \pm 0'03
HET-PLS3	43'7 \pm 3'7	93'7 \pm 6'9	0'4 \pm 0'01	0'54 \pm 0'02

2.3. Piccolo se encuentra disminuida en los terminales SMA, incrementándose con la sobreexpresión de PLS3

Entre las proteínas que forman la citomatriz de las zonas activas, se ha descrito que piccolo está relacionada con la regulación de la dinámica de la F-actina en los terminales (Waites et al., 2011). Una disminución en la cantidad de piccolo reduce la cantidad de actina polimerizada. Debido a ello, en el presente proyecto, se exploró el efecto de la sobreexpresión de PLS3 en el contenido de piccolo en los terminales SMA y controles. Así pues, para examinar la organización y la abundancia de las zonas activas en los terminales presinápticos de este modelo, se realizó marcaje con anticuerpo anti-piccolo en los terminales de los diferentes genotipos.

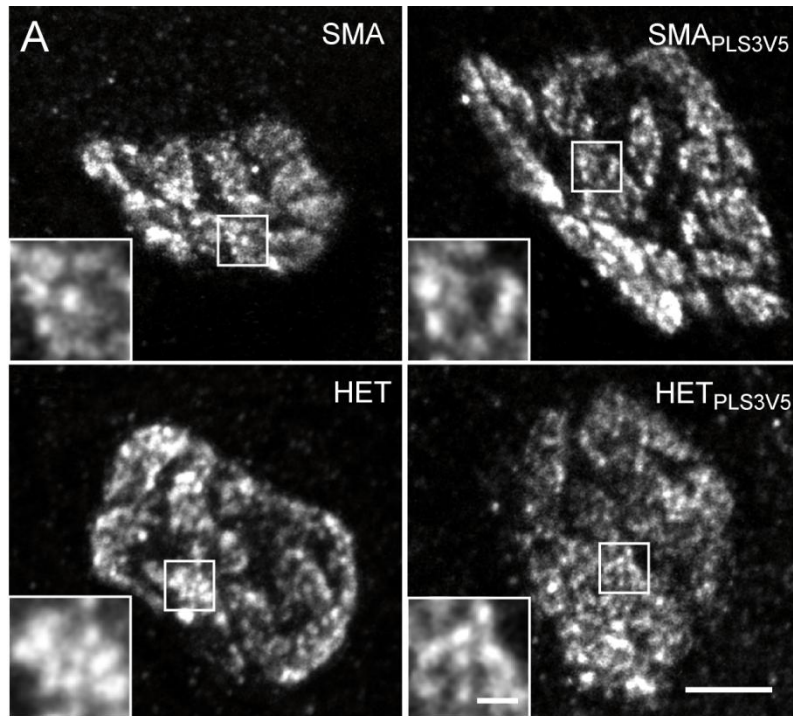


Figura 71. Imágenes representativas muestran el marcaje con piccolo en los terminales nerviosos de SMA-PLS3, HET y HET-PLS3 del músculo TVA a P14. Se muestra en detalle los puntos de piccolo en una mayor magnificación. *Barra de calibración: 5 y 1 μ m, respectivamente.*

El marcaje con piccolo dio lugar a un punteado brillante distribuido homogéneamente por todo el terminal presináptico en los ratones SMA, SMA-PLS3, HET y HET-PLS3 (Fig. 71). No se observó una clara diferencia entre los genotipos, aunque cualitativamente, los terminales HET y HET-PLS3 parecían tener un marcaje distribuido por todo el terminal (Fig. 71).

Para estimar la cantidad relativa de piccolo en los terminales estudiados, primero se estableció un umbral de intensidad de la señal tres veces por encima de la desviación estándar del fondo de cada imagen adquirida. Esto nos permitió determinar la intensidad y el área de piccolo en los terminales nerviosos. La Figura 72A muestra la intensidad media de piccolo para cada genotipo, que se encontró significativamente reducida en los terminales SMA ($22'74 \pm 1'23$ u.a.f.) en relación a los controles ($34'72 \pm 2'02$ u.a.f.; $p < 0.00001$). La sobreexpresión de PLS3 aumentó la intensidad media en SMA hasta los niveles de los controles (SMA-PLS3: $32'14 \pm 1'93$ u.a.f.; $p = 0'36$; Fig.

72A). Sorprendentemente, la sobreexpresión de PLS3 no afectó la señal de piccolo en los terminales controles. Esta misma tendencia ocurrió con el área de piccolo. Los terminales SMA presentaron un área reducida en comparación con los HET ($p < 0.00001$), la PLS3 aumentó el área de los SMA al nivel de los HET ($p = 0.12$), sin embargo, en los controles no tuvo ningún efectos la sobreexpresión de PLS3 ($p = 0.91$; Fig. 72B; Tabla 14). No obstante, cuando el área de piccolo se normalizó al tamaño postsináptico, no se encontraron diferencias significativas entre genotipos (Fig. 72C; Tabla 14).

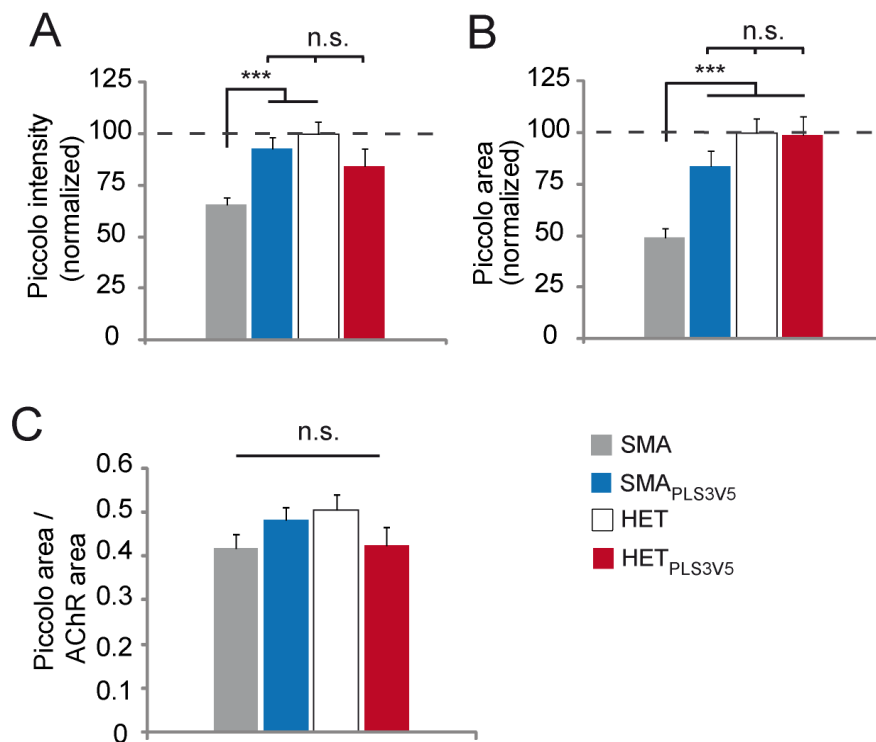


Figura 72. Cuantificación del marcaje de piccolo en los genotipos estudiados. A. Intensidad media de piccolo en los terminales SMA ($n = 25$ terminales), SMA-PLS3 ($n = 27$ terminales), HET ($n = 22$ terminales), y HET-PLS3 ($n = 21$ terminales), normalizada al valor medio de los HET. **B.** Intensidad media de piccolo normalizada al área de HET. **C.** Razón entre el área de piccolo y el área postsináptica ***: $p < 0.0005$; n. s.: no significativo.

La baja intensidad de la señal de marcaje de piccolo en los terminales mutantes (Fig. 72A) indica, posiblemente, una menor cantidad de esta proteína, más allá del pequeño tamaño de los terminales SMA. Por otra parte,

los resultados indican que la sobreexpresión de PLS3 aumenta la cantidad de piccolo en los terminales SMA.

Tabla 14. Intensidad media de piccolo, área total de piccolo y normalizada al área postsináptica de cada genotipo estudiado a P14.

	SMA	SMA-PLS3	HET	HET-PLS3
Intensidad piccolo	22'74 ± 1'23 u.a.f.	32'14 ± 1'93 u.a.f.	34'72 ± 2'02 u.a.f.	29'28 ± 2'85 u.a.f.
Área piccolo	37'78 ± 3'32 μm^2	64'22 ± 5'98 μm^2	76'87 ± 5'30 μm^2	75'95 ± 6'70 μm^2
Área piccolo/ Área post	0'42 ± 0'03	0'48 ± 0'03	0'50 ± 0'03	0'43 ± 0'03

2.4. La actina se encuentra alterada en los terminales SMA

Ya que PLS3 es una proteína de unión a F-actina, investigamos la distribución y la abundancia aparente de ésta en los terminales nerviosos presinápticos, mediante el marcaje de F-actina con Faloidina-Alexa647, una toxina específica producida por la *Amanita phalloides* que se une a la actina filamentosa.

El marcaje reveló que, en los cuatro genotipos, la actina se encontró tanto en el citoplasma formando una red (Fig. 73A) como en la región subplasmalema, muy cercana a la membrana (Fig. 73B). En ocasiones, se observó estructuras de actina en forma de lazos en cuyo interior se localizaban vesículas sinápticas (Fig. 73A, flecha). Por otro lado, se observó que en algunas regiones aparecían huecos o espacios entre la actina subplasmalema y la membrana plasmática del terminal presináptico (Fig. 73C). Estos huecos se encontraron ocupados por vesículas sinápticas (Fig. 73D).

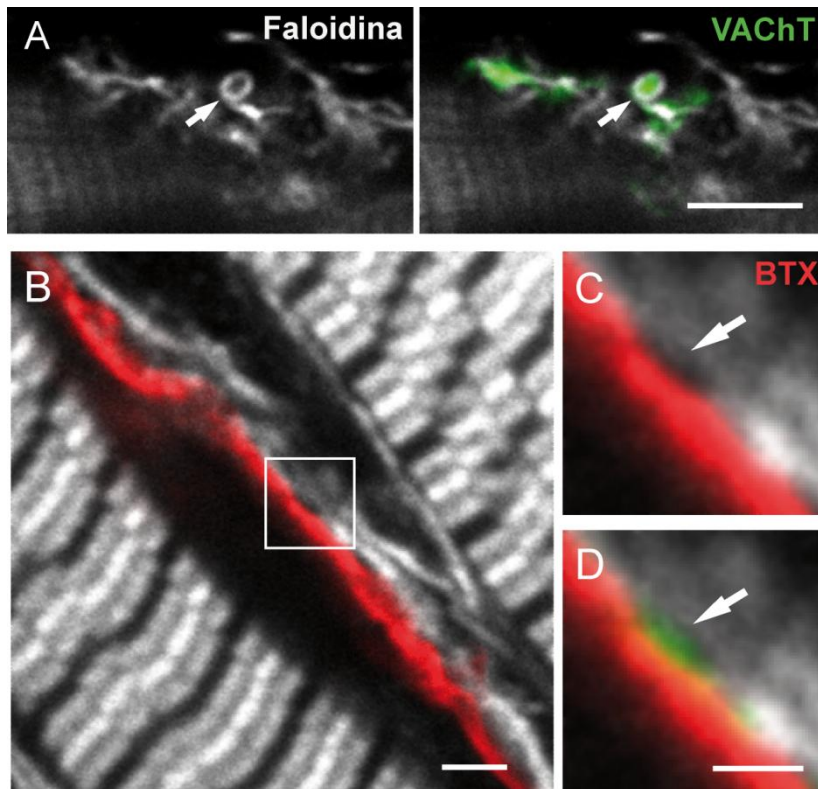


Figura 73. F- actina marcada con faloidina-Alexa647 en los terminales motores del TVA. **A.** Distribución de la F-actina y las vesículas sinápticas en un terminal presináptico. Véanse las estructuras en lazo que forma la F-actina (flecha). **B.** F-actina localizada en la zona subplasmalema del terminal nervioso. **C y D.** Magnificación en la que se observa que las zonas donde la F-actina no se encuentra estrechamente relacionada con la membrana (C, flecha) están ocupadas por las vesículas sinápticas (D, flecha). *Barra de calibración: 5 μ m.*

La Figura 74 muestra ejemplos representativos de proyecciones máximas de la F-actina en los terminales nerviosos de cada genotipo. Las imágenes sugieren que la cantidad de señal de fluorescencia es menor en los terminales SMA que en los controles, pero que es mayor en terminales SMA-PLS3 que en los mutantes (Fig. 74). Los criterios para considerar que la señal de faloidina pertenecía al terminal presináptico fueron estar dentro de los límites de la NMJ (Fig. 74, trazo rojo) y su relación con las vesículas sinápticas (no mostrado en la figura).

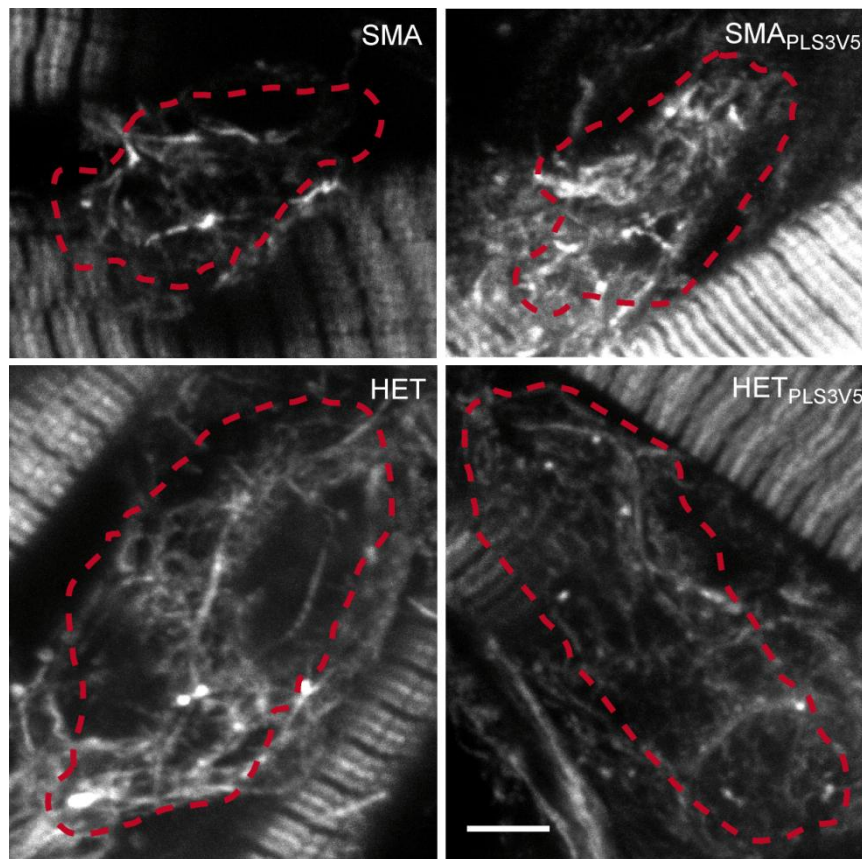


Figura 74. Proyección máxima de imágenes representativas que muestran el marcaje de la Faloidina-Alexa647 en los terminales nerviosos de SMA, SMA-PLS3, HET y HET-PLS3 en el TVA a P14. Las líneas rojas discontinuas delimitan el perímetro del terminal postsináptico. La señal fuera del límite no se consideró para la cuantificación de la actina. Barra de calibración: 5 μm .

La cuantificación de la intensidad media confirmó que la faloidina era un 26% menor en los terminales SMA (40.4 ± 1.13 u.a.f.) que en los controles (54.2 ± 5.08 u.a.f.; $p = 0.01$; Fig. 75A; Tabla 15). La sobreexpresión de PLS3 intensificó la fluorescencia media de los terminales mutantes hasta los niveles de los controles (58.7 ± 4.17 u.a.f.; $p > 0.05$; Fig. 75A; Tabla 15). La cuantificación del área ocupada por la faloidina indicó que existían grandes diferencias entre los diferentes genotipos (Fig.75XB), siendo el área en los terminales SMA ($39.9 \pm 6 \mu\text{m}^2$) menor que en los controles ($127.87 \pm 13 \mu\text{m}^2$; $p < 0.00001$) y no existiendo diferencias significativas entre los terminales SMA-PLS3 y los HET (SMA-PLS3: $163.8 \pm 18 \mu\text{m}^2$; $p = 0.12$; Fig. 75B; Tabla 15). Normalizando en área de la faloidina al área postsináptica se mantuvieron las diferencias observadas entre los diferentes genotipos (Fig. 75C; Tabla 15). Un

dato curioso, fue que en los HET la sobreexpresión de PLS3 disminuyó el área ocupada por la faloidina en los terminales. Fue un dato inesperado, que podría ser debido a un mecanismo compensatorio, por el cual la gran cantidad de PLS3 en el terminal hace que la cantidad de F-actina sea menor que en los controles.

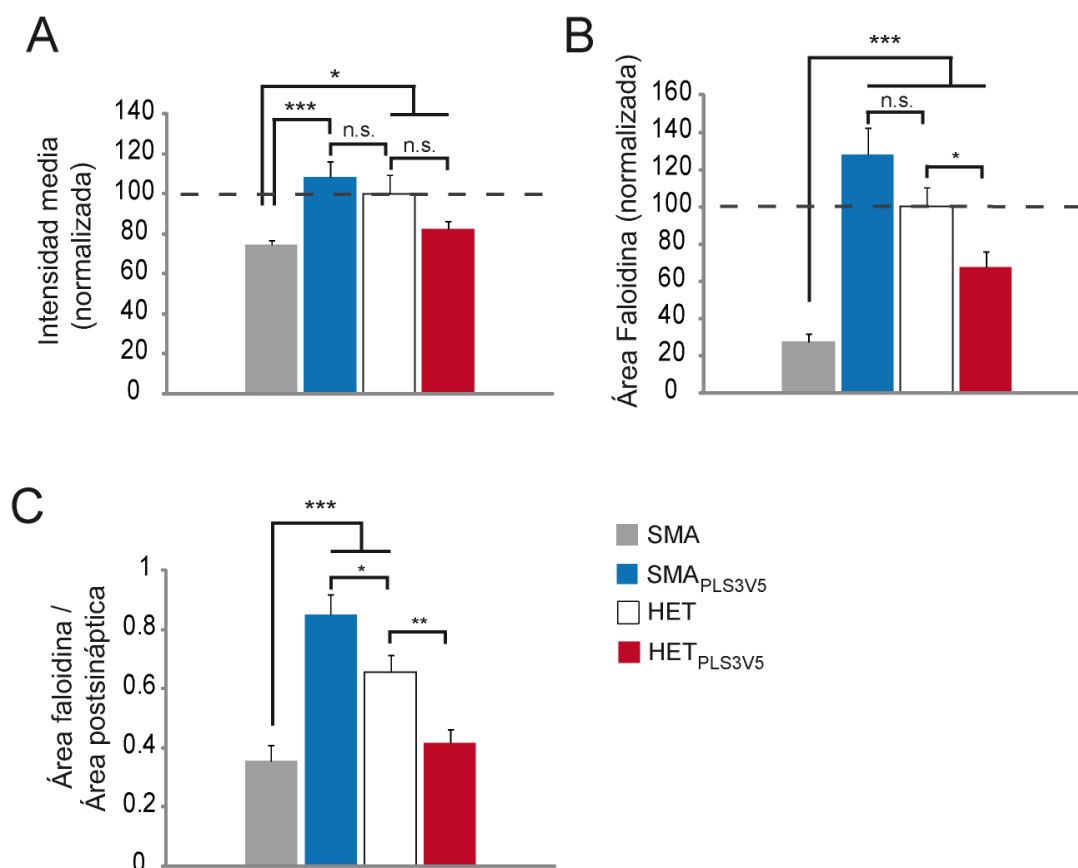


Figura 75. A. Intensidad media de la faloidina para los terminales SMA, SMA-PLS3, HET y HET-PLS3 normalizada al valor de los HET. **B.** Área media de la faloidina normalizada al área de los HET. **C.** Área media de la faloidina en el terminal presináptico normalizada al área postsináptica media de cada genotipo. *: $p < 0'05$; **: $p < 0'005$; ***: $p < 0'0005$; n. s.: no significativo.

Estos resultados nos indican que la sobreexpresión de PLS3 en los terminales motores de un modelo de AME aumentan tanto la cantidad de F-actina, dado por la intensidad observada en el marcaje, como el área de F-actina hasta los niveles que presentan los terminales de los ratones controles, produciéndose un rescate del fenotipo de la actina en los ratones afectados.

Tabla 15. Intensidad media de faloidina, área total de faloidina y normalizada al área postsináptica de cada genotipo estudiado a P14.

	SMA	SMA-PLS3	HET	HET-PLS3
Intensidad faloidina	40'4 ± 1'13 u.a.f.	58'7 ± 4'17 u.a.f.	54'2 ± 5'08 u.a.f.	44'8 ± 1'63 u.a.f.
Área faloidina	39' 9 ± 6 μm ²	163 '8 ± 18 μm ²	127' 87 ± 13 μm ²	85'9 ±11 '02 μm ²
Área faloidina/ Área post	0'49 ± 0'07	1'34 ± 0'09	0'88 ± 0'08	0'55 ± 0'07

DISCUSIÓN

Los mecanismos que subyacen a la maduración postnatal de las especializaciones pre y post-sinápticas están finamente controlados para asegurar una transmisión temporal y espacial fiable de la información en el sistema nervioso. Este proceso implica cambios estructurales importantes como el incremento del tamaño de la sinapsis y redistribución de organelos, receptores pre- y postsinápticos, citoesqueleto, canales iónicos, proteínas sinápticas, etc. Al final del proceso se logra la óptima yuxtaposición de los receptores postsinápticos y los sitios de liberación de neurotransmisor presinápticos y la optimización de la maquinaria secretora. En el presente proyecto hemos estudiado los defectos en la maduración postnatal de la NMJ en un modelo murino de AME, donde existe un déficit de la proteína SMN. Los resultados muestran que el déficit de la proteína SMN produce una parada en la maduración sináptica del terminal motor. A nivel postsináptico se caracteriza por la interrupción de la normal distribución de los receptores de ACh. A nivel presináptico por una disminución de vesículas sinápticas y un patrón anormal de distribución, junto con un menor número de zonas activas y signos de inmadurez en el citoesqueleto. Los neurofilamentos presentan estructuras en lazo, los microtúbulos aparecen dispersos y el contenido de actina está disminuido. Estas alteraciones se acompañan a nivel funcional de una reducción de la transmisión sináptica, aunque permite, aún, cierto grado de modulación positiva. Así mismo, hemos podido demostrar que la sobreexpresión de PLS3, proteína estabilizadora de F-actina, recupera el contenido de vesículas y zonas activas, al mismo tiempo que aumenta la F-actina intraterminal.

A pesar de que SMN es una proteína ubicua esencial para la vida que se expresa altamente durante el desarrollo prenatal, tras el nacimiento su nivel de expresión disminuye excepto en las motoneuronas espinales. No se conoce, sin embargo, a qué se debe esta diferencia y qué hace que las motoneuronas, fundamentalmente las que inervan músculos axiales y proximales, sean especialmente vulnerables a la deficiencia de SMN. Así, comprendiendo cómo una mutación en un gen que se expresa ubicuamente causa una enfermedad neurológica podría darnos pistas sobre la pregunta de cómo la deficiencia en SMN causa AME.

Función de la proteína SMN en motoneuronas

Existen dos hipótesis sobre los mecanismos por los que la deficiencia de SMN causa AME. La primera apunta a que la afectación de la función de las snRNP da lugar a que no se transcriban correctamente una serie de proteínas que son necesarias para las motoneuronas (Wan et al., 2005; Winkler et al., 2005; Gabanella et al., 2007; Pellizzoni, 2007; Zhang et al., 2008; Burghes and Beattie, 2009). La segunda, sugiere que SMN tiene un papel adicional y específico en las motoneuronas (Fan and Simard, 2002; McWhorter et al., 2003; Rossoll et al., 2003; Carrel et al., 2006; Eggert et al., 2006; Gabanella et al., 2007; Pellizzoni, 2007; Burghes and Beattie, 2009).

Algunos de los eventos encontrados en diferentes modelos animales apoyan una u otra teoría. Se ha demostrado que los bajos niveles de SMN que se produce en modelos de AME, provoca una reducción en el ensamblaje de los complejos snRNPs, lo cual altera la maduración de los transcritos primarios (Gabanella et al., 2007; Zhang et al., 2008). Por otro lado, se ha encontrado SMN en estructuras granulares similares a las RNP en las dendritas (Jablonka et al., 2001), en el cono axónico (Fan and Simard, 2002) y, colocalizando con elementos del citoesqueleto, a lo largo del axón (Rossoll et al., 2002; Zhang et al., 2003). El déficit de SMN en motoneuronas en cultivo procedentes de ratones deficientes en SMN, o en motoneuronas en las que se ha disminuido *in vitro* la expresión de la proteína mediante ARN de interferencia, da lugar a un menor crecimiento de las neuritas y del cono axónico (Jablonka et al., 2007; Garcera et al., 2011). A su vez, los bajos niveles de SMN produce un déficit en el transporte axónico de ARNm para β -actina (Rossoll et al., 2003), que podría provocar una reducción de la transducción local, y una disminución de actina y de canales de calcio en el cono de crecimiento axónico (Jablonka et al., 2007). Así mismo, en algunos modelos animales de AME, como en el pez cebra, se ha observado que la disminución de SMN altera la axonogénesis y la trayectoria de los axones motores hacia su diana específica (McWhorter et al., 2003; Oprea et al., 2008). Este tipo de alteración, sin embargo, no parece tener lugar en mamíferos, posiblemente por la existencia de mecanismos compensatorios (McGovern et al., 2008); Kariya, 2008 #8; Murray, 2008 #22; Torres-Benito, 2011 #258}.

Estudios estructurales y funcionales a nivel de la NMJ en distintos modelos animales de AME han mostrado alteraciones tempranas en los terminales motores (Cifuentes-Diaz et al., 2002; Kariya et al., 2008; Murray et al., 2008; Ruiz et al., 2010; Dachs et al., 2011), que sugieren que la NMJ participa de forma importante en la patogénesis de AME e, incluso, se pueda considerar como una enfermedad de la sinapsis. Es más, posiblemente la alteración sináptica no solo se produce a nivel de la NMJ sino también a nivel central como lo demuestra un estudio reciente donde el número de contactos sinápticos entre las neuronas sensoriales propioceptivas y las motoneuronas espinales está disminuido desde P4 (Mentis et al., 2011).

En el presente trabajo, hemos mostrado que en el TVA de ratones deficientes en SMN, las vesículas sinápticas permanecen en agrupaciones durante la segunda semana postnatal, al contrario de lo que ocurre en ratones controles donde las vesículas se encuentran dispersas y ocupan áreas mayores. Además, los terminales motores deficientes en SMN, aparentemente, paran de acumular vesículas sinápticas a P7, lo que resulta en una disminución del 50% en el área que ocupan las vesículas en mutantes en comparación con los controles a las dos semanas de edad. Este último hallazgo está de acuerdo con la disminución en el tamaño del contingente de vesículas sinápticas (RRP) encontrado electrofisiológicamente a esta edad (Torres-Benito et al., 2011). Dos estudios ultraestructurales, uno en el TA y otro en el EDL, en el mismo modelo de AME muestran una disminución de la densidad de vesículas sinápticas en los terminales nerviosos motores (Kong et al., 2009; Lee et al., 2011). Por el contrario, en el diafragma, que es músculo que apenas está afectado en esta enfermedad, no se han encontrado diferencias significativas en el número de vesículas sinápticas en los terminales (Kariya et al., 2009). De forma similar, en nuestro estudio hemos encontrado que en la banda rostral del LAL estas alteraciones aparecen una semana después que en el TVA (Fig. 44), lo que sugiere que existe una correlación entre el grado de afectación del músculo y la variabilidad en el contenido de las vesículas sinápticas.

Por otro lado, se ha encontrado una disminución del ~50% en la superficie total de mitocondrias activas en los terminales presinápticos mutantes (Torres-Benito et al., 2011), sin que haya una aparente alteración en

su organización espacial respecto a las vesículas sinápticas. Los estudios ultraestructurales en el TA muestran que la densidad mitocondrial está reducida a la mitad en mutantes mientras que la forma es normal (Carrel et al., 2006; Kong et al., 2009). En el diafragma, sin embargo, las mitocondrias presinápticas son más pequeñas en mutantes que en controles, sin que se hayan encontrado diferencias en el terminal postsináptico (Kariya et al., 2008). En cultivos de neuronas en los que se ha disminuido la cantidad de proteína Smn se observa, así mismo, que la función mitocondrial está alterada, registrándose una disminución en los niveles de ATP, aumento de la producción de radicales libres y despolarización del potencial de membrana mitocondrial (Acsadi et al., 2009). Defectos mitocondriales se han descrito también en otras enfermedades de las motoneuronas como ELA (Hervias et al., 2006; Nguyen et al., 2006) y AMBE (Ranganathan et al., 2009).

En paralelo a la reducción y el agrupamiento de las vesículas sinápticas y las mitocondrias en los terminales mutantes, hemos descrito una reducción en la densidad de las zonas activas (Fig. 46). Esta reducción, junto con la disminución del tamaño del RRP (Torres-Benito et al., 2011), podría explicar la disminución en la liberación de neurotransmisor estimada mediante el cálculo del contenido cuántico (Kong et al., 2009; Ruiz et al., 2010; presente trabajo). Es interesante resaltar el paralelismo entre la disminución de las vesículas sinápticas, las mitocondrias y las zonas activas en los terminales deficientes en SMN, dado que el correcto balance entre mitocondrias y vesículas sinápticas es relevante para las funciones dependientes de ATP como el rellenado de las vesículas con neurotransmisor, el movimiento de vesículas, o la exocitosis. Por otro lado, la estrecha colocalización entre zonas activas y vesículas sinápticas es esencial para el llenado de los sitios de liberación de forma eficaz. Además, la proximidad de la mitocondria a la membrana plasmática proporciona energía de forma inmediata para el ciclo vesicular y participa en la regulación de los niveles de calcio citosólico. Así, en los terminales deficientes en SMN, la reducción de las mitocondrias podría ser parcialmente responsable de la alteración funcional de la sinapsis. Es difícil discernir, sin embargo, si la disminución de la densidad mitocondrial es una consecuencia de la disminución del contingente de vesículas. Otra posibilidad, también plausible, es, por

ejemplo, un mal funcionamiento de los mecanismos que controlan el mantenimiento de un contingente adecuado de mitocondrias en el terminal presináptico. La interacción de las mitocondrias y las vesículas con el citoesqueleto es crucial para la localización y el mantenimiento de estos organelos en sus lugares de acción. Por ejemplo, la actina parece estar implicada en la localización subcelular de la mitocondria (Chada and Hollenbeck, 2004; Reynolds et al., 2004). A su vez, la dinámica de la actina está regulada a través de RhoA, cuya vía que está afectada en modelos murinos de AME (Bowerman et al., 2010). Finalmente, una deficiencia en el transporte axonal anterógrado de vesículas y mitocondrias por un déficit en los microtúbulos, o de las proteínas motoras responsables de estas cargas, podría causar, así mismo, una disminución de vesículas sinápticas y mitocondrias en el terminal presináptico. Apoyando esta posibilidad, se ha descrito recientemente que hay una disminución en la tubulina polimerizada en los axones del nervio ciático en ratones deficientes en SMN (Wen et al., 2010).

Por todo ello, estudiamos también el estado del citoesqueleto (neurofilamentos, microtúbulos y filamentos de actina) en los terminales motores de SMN Δ 7. Trabajos previos habían ya descrito una acumulación de neurofilamentos en los axones motores y en el terminal de modelos murinos de AME (Cifuentes-Diaz et al., 2002; Kariya et al., 2008; Murray et al., 2008; Kong et al., 2009; Ruiz et al., 2010; Dachs et al., 2011). En otras enfermedades de motoneuronas, como ELA, aparece acumulación de neurofilamentos en el citoplasma de las motoneuronas y en los axones preterminales (Tu et al., 1996). Sin embargo, en ELA no se ha descrito acumulación en los terminales presinápticos (Cifuentes-Diaz et al., 2002), lo que indicaría que este defecto es específico de AME, y que no está causado por un proceso de degeneración axonal, en cierto modo inespecífico, como ocurre en ELA. La importancia de la acumulación de neurofilamentos en la patogénesis de AME es difícil de determinar. Un exceso de neurofilamentos podría alterar el transporte axonal a los terminales y la correcta distribución de los organelos en el terminal presináptico. En el presente trabajo hemos encontrado que la acumulación de neurofilamentos es un fenómeno más tardío que la reducción en el contenido de vesículas sinápticas en los terminales nerviosos del TVA, ya reducido en la

primera semana de vida, edad a la que la acumulación anormal de neurofilamentos no fue evidente (Fig. 48). Además, encontramos también un aumento significativo de estructuras inmaduras (lazos y esferas) en los neurofilamentos intraterminales en los mutantes a P14, que sugiere una posible alteración en el ensamblaje y la renovación de los mismos, y es otra evidencia más de que la maduración presináptica es defectuosa en los terminales motores de los ratones SMN Δ 7.

No debe ser descartado un posible defecto en el transporte axonal en los animales modelo deficientes de SMN. Como se ha comentado anteriormente, SMN está implicada en el transporte de ARNm de β -actina y otras cargas (GEMIN2 y GEMIN3) necesarias para la integridad y la función neuronal (Rossoll et al., 2003; Peter et al., 2011).

Recientemente, se ha descrito que la polimerización de microtúbulos está interrumpida en células en cultivo NSC34 deficientes en Smn (Wen et al, 2010). Por otro lado, la cantidad de tubulina acetilada en el nervio ciático de los ratones taiwaneses tipo I es una tercera parte de la de los controles. El número de microtúbulos por axón, así mismo, está reducido un 25% en los ratones mutantes (Wen et al., 2010). En nuestro estudio, sin embargo, hemos encontrado que los terminales presinápticos motores de SMN Δ 7 muestran una reducción y una anormal distribución en el terminal pero no en el axón. Esta diferencia en los axones con respecto al trabajo de Wen y colaboradores se debe, probablemente, a que el modelo utilizado es más severo que el de nuestro trabajo. La alteración del patrón de distribución de microtúbulos encontrada en este trabajo (ver Fig. 54) es compatible con la parada en la maduración postnatal de los terminales presinápticos. La expansión de los microtúbulos en los terminales mutantes, podría de hecho, contribuir al retraso en la organización de los organelos sinápticos. A este retraso podría contribuir la disminución en la cantidad de proteína MAP-1B observada en los terminales SMN Δ 7 (Fig. 58), ya que es una de las proteínas responsables de la estabilización y la distribución espacial de los microtúbulos.

En resumen, estos resultados demuestran que SMN es esencial para la maduración postnatal de las vesículas sinápticas, las zonas activas, y

diferentes elementos del citoesqueleto en los terminales motores nerviosos. Sugerimos también que esta interrupción en la arquitectura presináptica podría limitar la transmisión sináptica en los músculos más afectados. Estos resultados, junto con otros que muestran un retraso en la maduración de los terminales postsinápticos, fallos en el crecimiento de las fibras musculares y una disminución en la entrada sináptica en las motoneuronas espinales (Ling et al., 2010; Park et al., 2010; Mentis et al., 2011), apoyan un posible papel de SMN en el desarrollo neuromuscular.

Calcio y neurotransmisión. R-Roscovitina

La entrada de calcio en el terminal presináptico, a través de los canales de calcio dependientes de voltaje, desencadena la fusión de las vesículas sinápticas y por tanto la liberación de neurotransmisor. La entrada de calcio a través de los canales aumenta la concentración de calcio intracelular en unas regiones llamadas microdominios, lo que conlleva la fusión de las vesículas sinápticas con la membrana plasmática. Existen diferentes canales de calcio en el sistema nervioso: los tipo L, N, P/Q, T y R; con diferentes características en cuanto a conductancia y sensibilidad a ciertos bloqueantes. En la NMJ de ratón se expresan principalmente los canales tipo N, en estado embrionario y a edades tempranas, y los tipo P/Q, en adultos. Conocer el funcionamiento de los canales de calcio es fundamental para entender los mecanismos por los que se produce la secreción dependiente de calcio.

En las NMJ de ratones SMN Δ 7 se ha demostrado que existe una disminución tanto en el tamaño del potencial de placa evocado (EPP), en diferentes músculos, como una disminución en la liberación de neurotransmisor (Kong et al., 2009; Ling et al., 2010; Ruiz et al., 2010; Torres-Benito et al., 2011). En uno de los músculos más afectados (Ling et al., 2012), el TVA, el contenido cuántico disminuye hasta el 50-55%. A pesar de la cuantía de este decremento, se podría aún producir potenciales de acción en fibras musculares atroficas con una alta resistencia de entrada dado el alto factor de seguridad en

la transmisión neuromuscular. Esta alteración, en principio, no sería capaz de explicar la parálisis muscular observada en los ratones deficientes en SMN. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en los registros electrofisiológicos se desestiman las fibras que solo presentan liberación espontánea (Ruiz et al., 2010), lo que supone una subestimación de la disfunción. Por otro lado, ante estimulaciones repetidas la depresión sináptica es mayor en los mutantes (Torres-Benito et al., 2011) lo que predice que tienen una menor capacidad de aumentar la tensión en los músculos más afectados, aún cuando puedan mantenerla en los menos afectados, como en el EDL (Ling et al., 2010).

En el TVA, la liberación asincrónica de neurotransmisor dependiente de la acumulación de calcio en el terminal durante una estimulación repetida está aumentada, lo que sugiere una alteración en la homeostasis de Ca^{2+} intraterminal (Ruiz et al., 2010). Esta disfunción puede ser debida a diferentes mecanismos como son el aumento de la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} en el terminal, una disminución en la capacidad de tamponamiento del Ca^{2+} , una reducción en la extrusión Ca^{2+} o un descenso en la recaptación de Ca^{2+} por los organelos intraterminales (mitocondria ó retículo endoplásmico).

Aunque la liberación de neurotransmisor está claramente disminuida en las terminaciones motoras de distintos músculos en los ratones SMN Δ 7 (Kong et al., 2009; Ling et al., 2010; Ruiz et al., 2010; Torres-Benito et al., 2011; Ling et al., 2012), la capacidad de aumentar la neurotransmisión en los terminales en mutantes era desconocida. En este trabajo hemos abordado esta pregunta usando un agente farmacológico, la R-roscovitina, que, en otras preparaciones aumenta la liberación de neurotransmisor (Yan et al., 2002); (Cho and Meriney, 2006); (Tomizawa et al., 2002). La acción de la R-roscovitina está mediada por dos mecanismos, la inhibición de la quinasa 5 dependiente de ciclina (Cdk5) y la modificación de las características funcionales de los canales de calcio. Cdk5 es una quinasa serina/treonina cuya actividad se ha descrito como crítica para el desarrollo neural (Ou et al., 2010), las vías de señalización neuronales y la neurogénesis (Lagace et al., 2008). La asociación de Cdk5 con sus moléculas activadoras (ciclinas) es esencial para su función como quinasa (Tang et al., 1995). El complejo que forman Cdk5 y p35 tiene múltiples funciones en las

neuronas tales como migración neural, diferenciación y sinaptogénesis en neuronas inmaduras. Se ha descrito que el complejo Cdk5/p35 está involucrado en la degeneración neuronal en la enfermedad de Alzheimer (Lee et al., 2000; Cruz and Tsai, 2004), lo que desvela funciones de Cdk5 en el cerebro inmaduro y en la vejez. Sin embargo, la función fisiológica de Cdk5/p35 en las neuronas maduras no se conoce bien. Se ha descrito, así mismo, la interacción de Cdk5 con diferentes sustratos como Munc-18 (Shuang et al., 1998), sinapsina1 (Jovanovic et al., 1996; Matsubara et al., 1996), y anfifisina I (Floyd et al., 2001), proteínas que se localizan en el terminal presináptico y tienen un papel en la liberación de neurotransmisor, lo que atribuye a Cdk5 un posible papel en la en la regulación de la neurotransmisión.

Como se mencionó anteriormente, la roscovitina (2-(1-etil-2-hidroxietilamino)-6-bencilamino-9-isopropilpurina) es un inhibidor selectivo de Cdk5. Existen dos enantiómeros de la roscovitina: la S-roscovitina y la R-roscovitina. Algunos autores han propuesto que R-roscovitina tiene un efecto sobre los canales de Ca^{2+} independiente de la inhibición de las Cdks (Yan et al., 2002; Buraei et al., 2005; Cho and Meriney, 2006) ya que S-roscovitina no modifica la actividad de los canales de calcio. El efecto de la R-roscovitina sobre los canales de calcio tipo N y tipo P/Q es un enlentecimiento de la cinética de cierre (desactivación) (Yan et al., 2002; Buraei et al., 2005; Buraei et al., 2007; DeStefino et al., 2010), lo que resulta en un aumento en la liberación de neurotransmisor (Yan et al., 2002; Cho and Meriney, 2006) en los terminales presinápticos. Por otro lado, se ha descrito que el efecto de la R-roscovitina en el aumento de la fusión de vesículas sinápticas se debe a un efecto a través de la inhibición de Cdk5 (Tomizawa et al., 2002; Kim and Ryan, 2010), lo que provoca una mayor movilización del contingente de vesículas y aumenta el número de vesículas sinápticas listas para ser liberadas.

Nuestros resultados demuestran que el tratamiento con R-roscovitina (100 μ M) a concentración saturante (Tomizawa et al., 2002) en los terminales motores del modelo SMN Δ 7 produce un aumento de la liberación de neurotransmisor. Este efecto podría deberse a la mayor movilización de las vesículas sinápticas hacia los sitios de fusión a través de la inhibición de la Cdk5 (Kim and Ryan, 2010). Por otro lado, podría ser también que la mayor

entrada de calcio por el enlentecimiento en la desactivación de los canales de Ca^{2+} aumente la probabilidad de liberación en los terminales motores. Desafortunadamente, no podemos discernir entre estas dos posibilidades. Las evidencias que apoyan que el efecto agonista de la R-roscovitina sobre los canales de Ca^{2+} es independiente de la inhibición de las Cdk son difícilmente aplicables a la NMJ. La aplicación intracelular de R-roscovitina, donde se espera que se una a Cdk5, no afecta a los canales de Ca^{2+} (Yan et al., 2002). Por otro lado, el efecto ejercido por la R-roscovitina sobre el enlentecimiento de la desactivación de los canales es rápida (~2 s) (Buraei et al., 2005). Como hemos comentado anteriormente, la aplicación de S-roscovitina y olomuocina, otros inhibidores de Cdk, no enlentecen la desactivación de los canales (Buraei and Elmslie, 2008). En neuronas que no tienen activadas Cdk5, por la falta de p35, R-roscovitina enlentece la desactivación de los canales de calcio (Yan et al., 2002). No obstante, se plantea la posibilidad de que el efecto de la R-roscovitina en ausencia de p35 se deba a una actividad residual de p39, una ciclina de Cdk5 localizada sinápticamente (Humbert et al., 2000). En relación a este punto, se ha demostrado que la total ausencia de Cdk5 no produce un efecto de R-roscovitina sobre la fusión de vesículas sinápticas (Kim and Ryan, 2010). Por otra parte, el efecto de R-roscovitina sobre la liberación a través de Cdk5, se ha descrito como una movilización de las vesículas sinápticas desde el contingente de vesículas de reserva, además de la relación de esta enzima con la actividad sináptica de diferentes botones sinápticos (Kim and Ryan, 2010).

No debe descartarse que R-roscovitina tenga un doble efecto sobre la liberación de neurotransmisor. Por una parte, ejerciendo su actividad extracelularmente sobre los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, con una cinética de acción rápida. Por otro lado, a través de Cdk5, intracelularmente, produciría la movilización de vesículas sinápticas desde contingentes de vesículas de reserva, con una cinética de acción mucho más lenta.

Genes modificadores

Se han descrito casos de hermanos discordantes en AME, es decir, que aún presentando ambos ausencia de *SMN1* e igual número de copias de *SMN2* manifiestan muy distinto grado de afectación motora. Esto ha planteado la posibilidad de la existencia de genes modificadores para SMN.

El gen *PLS3* se localiza en el cromosoma X en humanos (región Xq23) y codifica una proteína relacionada con el citoesqueleto denominada plastina 3 (*PLS3*). Normalmente, la *PLS3* se expresa fuertemente en las motoneuronas espinales, tanto en la etapa embrionaria como en la adulta (Oprea et al., 2008). Una de sus funciones mejor conocida es su interacción con los filamentos de actina formando puentes, que favorecen la formación de haces y la reorganización y elongación de las estructuras de actina. El análisis del transcriptoma de seis familias discordantes de AME ha revelado que la expresión de *PLS3* se encuentra elevada en algunas hermanas discordantes con poca o ninguna sintomatología en comparación con sus hermanas afectas (Oprea et al., 2008). Sin embargo, otro análisis de cuatro familias discordantes sólo se encontraron diferencias en la expresión de *PLS3* en el caso de hermanos de diferente género (Bernal et al., 2011). *PLS3* actúa modificando los niveles de F-actina, colocalizando en gránulos en los axones de motoneuronas y su sobreexpresión aumenta la longitud de las neuritas en células deficientes de SMN (Oprea et al., 2008; Stratigopoulos et al., 2010).

La F-actina regula negativamente la probabilidad de liberación de las vesículas, ya que se ha demostrado que su despolimerización incrementa transitoriamente la probabilidad de liberación (Morales et al., 2000; Cingolani and Goda, 2008). Además, mantiene el RP (contingente de vesículas de reserva) y media la traslocación de las vesículas al RRP (Jensen et al., 2007; Cingolani and Goda, 2008). También se ha descrito su papel regulador en la endocitosis de vesículas junto con proteínas como la dinamina, la Abp1 y la sinapsina (Engqvist-Goldstein and Drubin, 2003; Dillon and Goda, 2005; Evergren et al., 2007).

En diferentes modelos de SMA se ha propuesto que la dinámica de la actina está alterada por la desregulación de proteínas que intervienen en la

polimerización/despolimerización de la misma, tales como la profilinall, la plastina 3, RhoA/ROCK (Bowerman et al., 2007; Bowerman et al., 2009; Bowerman et al., 2010). La actina filamentosa (F-actina) es un elemento muy importante en los terminales nervioso, ya que interacciona con diferentes organelos y es crucial para la localización de éstos en su lugar de acción. Por ejemplo, la F-actina juega un papel importante en el reciclaje de las vesículas sinápticas (Shupliakov et al., 2002; Bloom et al., 2003). Además, la localización subcelular de las mitocondrias se logra por la estabilización de los filamentos de actina a través de la vía de la RhoA/forminas (Minin et al., 2006). Por otro lado, ya que se ha demostrado que los niveles de actina son importantes para la axonogénesis (crecimiento, rastreo y ramificación), los bajos niveles de actina podrían explicar la longitud defectuosa que presentan las neuritas en los cultivos de motoneuronas deficientes en SMN (Jablonka et al., 2007; Garcera et al., 2011). Apoyando esta hipótesis, se ha descrito que la sobreexpresión de PLS3 contrarresta la disminución de la longitud de las neuritas en motoneuronas en cultivo procedentes de un modelo murino de AME, y restaura la inervación motora y los niveles de proteína SV2, así como algunos defectos motores descritos en el pez cebra (Oprea et al., 2008; Hao le et al., 2012). Por otro lado, se ha observado que, en modelos animales con bajos niveles de SMN, la PLS3 se encuentra disminuida y la profilina IIa (proteína de unión a actina, que disminuye su estabilidad) se encuentra aumentada (Bowerman et al., 2009). Ya que la PLS3 se ha descrito como protector para AME y que su actividad estabilizando la F-actina, se sugiere que la desregulación de la dinámica de la actina podría ser la causa de la fisiopatología de esta enfermedad.

Nuestros resultados demuestran que existe una disminución de la cantidad de F-actina en los terminales nerviosos motores deficientes en proteína SMN (26% menos de intensidad y ~70% menos de área) y que la sobreexpresión de PLS3 tiene un efecto positivo aumentando considerablemente los niveles de F-actina, en los terminales SMA (Fig. 75). La recuperación de la F-actina en el terminal presináptico, produce la restauración del contenido en vesículas sinápticas y zonas activas (piccolo) así como el aumento del tamaño del terminal postsináptico en los ratones SMA (Figs. 69 y

72). Estos datos proporcionan evidencias para un efecto protector de PLS3 sobre la funcionalidad y el desarrollo de la arquitectura de las motoneuronas.

Nuestros datos sugieren, además, que la posible alteración de la dinámica de la actina en los terminales nerviosos donde actúa regulando la movilidad de las vesículas y la localización de las mitocondrias y, en general, participa en la organización de los organelos, puede ser importante en la patogenia de esta enfermedad. De ahí, que el papel de la PLS3 como modificador de SMN sea a tener en cuenta en el desarrollo de terapias contra AME. Además, el mecanismo de PLS3 independiente de SMN en la regulación del citoesqueleto presináptico, podría tener efectos neuroprotectores también sobre otras enfermedades neurodegenerativas como ELA.

CONCLUSIONES

1. Modelo SMAΔ7

1.1. Los ratones SMNΔ7 muestran un menor tamaño y peso, movilidad reducida y defectos motores en comparación con sus hermanos de camada controles. Su vida media es de 9.4 ± 0.8 días.

1.2. El terminal postsináptico presenta signos de inmadurez a P14 y el área postsináptica es significativamente menor en los terminales SMNΔ7 que en los controles, tanto a P7 como a P14.

1.3. Existe una interrupción en la reorganización de las vesículas sinápticas de los ratones deficientes en SMN, ya que no progresan de la misma forma que los terminales controles. Las vesículas sinápticas están anómalamente distribuidas y ocupan un área menor en relación con el tamaño del terminal postsináptico en los ratones SMNΔ7 a P14.

1.4. Existe una afectación selectiva de los terminales que inervan las dos bandas del LAL, produciéndose una mayor alteración en la disposición y la cantidad de vesículas sinápticas en los terminales de la porción caudal, en los ratones mutantes.

1.5. Las zonas activas están reducidas y no homogéneamente distribuidas en los terminales motores de ratones SMNΔ7.

1.6. Los neurofilamentos muestran signos de inmadurez y se encuentran acumulados en los terminales presinápticos de ratones afectados de AME.

1.7. El área presináptica está disminuida en los ratones SMNΔ7 desde P7. La relación área presináptica/área postsináptica no se mantiene en los ratones mutantes durante el periodo estudiado, lo que indica una especificidad de los fenotipos estudiados.

1.8. Se observa inmadurez en la distribución de los microtúbulos en los terminales SMNΔ7 en comparación con los terminales controles. Esta disminución podría deberse a la reducción en la cantidad de proteína MAP-1B en los terminales mutantes.

1.9. Los potenciales postsinápticos espontáneos muestran un mayor tamaño en los terminales SMNΔ7 en comparación con los controles.

1.10. La cinética de los potenciales de placa evocados está enlentecida en los terminales de SMN Δ 7

1.11. La amplitud de la respuesta evocada no está disminuida en los terminales motores de SMN Δ 7 pero sí la liberación de neurotransmisor

1.12. La respuesta a pulsos pareados no está alterada en los terminales SMN Δ 7. La facilitación durante pares de pulsos es similar en terminales control y mutantes.

1.13. La R-roscovitina a 10 μ M aumenta la frecuencia de mEPPs en los terminales de ambos genotipos. Sin embargo, no afecta a la liberación evocada de neurotransmisor ni al contenido cuántico.

1.14. La R-roscovitina a alta concentración aumenta la amplitud de los EPPs y el contenido cuántico en los terminales motores.

1.15. La R-roscovitina, aplicada a 100 μ M, modifica la respuesta a pulsos pareados en los terminales del modelo SMN Δ 7.

1.16. El efecto de la R-roscovitina a alta concentración no se debe a un efecto subyacente del DMSO, donde se encuentra diluida la droga.

1.17. En este apartado se puede concluir que la proteína SMN es esencial para la maduración y la organización sináptica de la NMJ, así como para la correcta funcionalidad de los terminales.

2. Modelo SMA-PLS3

2.1. El área postsináptica en los terminales SMA de este modelo es menor que en los controles (HET). La sobreexpresión de PLS3 aumenta el área de los terminales SMA.

2.2. Las vesículas sinápticas se encuentran disminuidas en los terminales SMA en comparación con los terminales controles y la sobreexpresión de PLS3 aumenta el área que ocupan las vesículas.

2.3. La cantidad de piccolo se encuentra disminuida en los terminales SMA en relación a los controles, incrementándose la cantidad de proteína con la sobreexpresión de PLS3.

2.4. La cantidad de actina en el terminal presináptico se encuentra disminuida en los terminales SMA en comparación con los terminales controles. La sobreexpresión de PLS3 produce un aumento de la señal en los terminales SMA-PLS3, alcanzando los niveles de los controles.

2.5. En relación a este modelo, se puede concluir que la sobreexpresión de PLS3, proteína que actúa en la estabilización de la F-actina, en un modelo murino de AME, mejora el fenotipo molecular de los terminales motores.

BIBLIOGRAFÍA

- Acsadi G, Lee I, Li X, Khaidakov M, Pecinova A, Parker GC, Huttemann M (2009) Mitochondrial dysfunction in a neural cell model of spinal muscular atrophy. *Journal of neuroscience research* 87:2748-2756.
- Al-Chalabi A, Jones A, Troakes C, King A, Al-Sarraj S, van den Berg LH (2012) The genetics and neuropathology of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 124:339-352.
- Andreassi C, Angelozzi C, Tiziano FD, Vitali T, De Vincenzi E, Boninsegna A, Villanova M, Bertini E, Pini A, Neri G, Brahe C (2004) Phenylbutyrate increases SMN expression in vitro: relevance for treatment of spinal muscular atrophy. *Eur J Hum Genet* 12:59-65.
- Atkin JD, Farg MA, Walker AK, McLean C, Tomas D, Horne MK (2008) Endoplasmic reticulum stress and induction of the unfolded protein response in human sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 30:400-407.
- 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.
- Bernal S, Also-Rallo E, Martinez-Hernandez R, Alias L, Rodriguez-Alvarez FJ, Millan JM, Hernandez-Chico C, Baiget M, Tizzano EF (2011) Plastin 3 expression in discordant spinal muscular atrophy (SMA) sibilings. *Neuromuscul Disord* 21:413-419.
- Bloom O, Evergren E, Tomilin N, Kjaerulff O, Low P, Brodin L, Pieribone VA, Greengard P, Shupliakov O (2003) Colocalization of synapsin and actin during synaptic vesicle recycling. *J Cell Biol* 161:737-747.
- Bosch-Marce M, Wee CD, Martinez TL, Lipkes CE, Choe DW, Kong L, Van Meerbeke JP, Musaro A, Sumner CJ (2011) Increased IGF-1 in muscle modulates the phenotype of severe SMA mice. *Hum Mol Genet* 20:1844-1853.
- Bowerman M, Shafey D, Kothary R (2007) Smn depletion alters profilin II expression and leads to upregulation of the RhoA/ROCK pathway and defects in neuronal integrity. *J Mol Neurosci* 32:120-131.
- Bowerman M, Beauvais A, Anderson CL, Kothary R (2010) Rho-kinase inactivation prolongs survival of an intermediate SMA mouse model. *Hum Mol Genet* 19:1468-1478.
- Bowerman M, Anderson CL, Beauvais A, Boyl PP, Witke W, Kothary R (2009) SMN, profilin IIa and plastin 3: a link between the deregulation of actin dynamics and SMA pathogenesis. *Mol Cell Neurosci* 42:66-74.
- Boyd IA, Martin AR (1955) The quantal composition of the mammalian end-plate potential. *J Physiol* 129:14-15P.
- Bretscher A (1981) Fimbrin is a cytoskeletal protein that crosslinks F-actin in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:6849-6853.
- 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.
- Brujin LI, Houseweart MK, Kato S, Anderson KL, Anderson SD, Ohama E, Reaume AG, Scott RW, Cleveland DW (1998) Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science* 281:1851-1854.
- 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, 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, 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, Schofield G, Elmslie KS (2007) Roscovitine differentially affects CaV2 and Kv channels by binding to the open state. *Neuropharmacology* 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.
- Burke RE, Levine DN, Tsairis P, Zajac FE, 3rd (1973) Physiological types and histochemical profiles in motor units of the cat gastrocnemius. *J Physiol* 234:723-748.
- Burnett BG, Munoz E, Tandon A, Kwon DY, Sumner CJ, Fischbeck KH (2009) Regulation of SMN protein stability. *Mol Cell Biol* 29:1107-1115.
- Caldwell JH (2000) Clustering of sodium channels at the neuromuscular junction. *Microsc Res Tech* 49:84-89.
- Carrel TL, McWhorter ML, Workman E, Zhang H, Wolstencroft EC, Lorson C, Bassell GJ, Burghes AH, Beattie CE (2006) Survival motor neuron function in motor axons is independent of functions required for small nuclear ribonucleoprotein biogenesis. *J Neurosci* 26:11014-11022.
- Cartegni L, Krainer AR (2002) Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1. *Nat Genet* 30:377-384.
- Cartegni L, Hastings ML, Calarco JA, de Stanchina E, Krainer AR (2006) Determinants of exon 7 splicing in the spinal muscular atrophy genes, SMN1 and SMN2. *Am J Hum Genet* 78:63-77.
- 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. *Human molecular genetics* 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.
- Clermont O, Bulet P, Burglen L, Lefebvre S, Pascal F, McPherson J, Wasmuth JJ, Cohen D, Le Paslier D, Weissenbach J, et al. (1994) Use of genetic and physical mapping to locate the spinal muscular atrophy locus between two new highly polymorphic DNA markers. *Am J Hum Genet* 54:687-694.
- Covert 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.
- Cox GA, Mahaffey CL, Frankel WN (1998) Identification of the mouse neuromuscular degeneration gene and mapping of a second site suppressor allele. *Neuron* 21:1327-1337.
- Crawford TO, Pardo CA (1996) The neurobiology of childhood spinal muscular atrophy. *Neurobiology of disease* 3:97-110.
- Cruz JC, Tsai LH (2004) Cdk5 deregulation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends Mol Med* 10:452-458.

- Culican SM, Nelson CC, Lichtman JW (1998) Axon withdrawal during synapse elimination at the neuromuscular junction is accompanied by disassembly of the postsynaptic specialization and withdrawal of Schwann cell processes. *J Neurosci* 18:4953-4965.
- Chada SR, Hollenbeck PJ (2004) Nerve growth factor signaling regulates motility and docking of axonal mitochondria. *Curr Biol* 14:1272-1276.
- 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 HC, Dimlich DN, Yokokura T, Mukherjee A, Kankel MW, Sen A, Sridhar V, Fulga TA, Hart AC, Van Vactor D, Artavanis-Tsakonas S (2008) Modeling spinal muscular atrophy in *Drosophila*. *PLoS One* 3:e3209.
- Chang JG, Hsieh-Li HM, Jong YJ, Wang NM, Tsai CH, Li H (2001) Treatment of spinal muscular atrophy by sodium butyrate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9808-9813.
- Chio A, Mora G, Calvo A, Mazzini L, Bottacchi E, Mutani R (2009) Epidemiology of ALS in Italy: a 10-year prospective population-based study. *Neurology* 72:725-731.
- 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.
- Dachs E, Hereu M, Piedrafita L, Casanovas A, Caldero J, Esquerda JE (2011) Defective neuromuscular junction organization and postnatal myogenesis in mice with severe spinal muscular atrophy. *J Neuropathol Exp Neurol* 70:444-461.
- Del Castillo J, Katz B (1954) Quantal components of the end-plate potential. *J Physiol* 124:560-573.
- 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.
- Dillon C, Goda Y (2005) The actin cytoskeleton: integrating form and function at the synapse. *Annu Rev Neurosci* 28:25-55.
- 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.
- Donnelly EM, Quach ET, Hillery TM, Heeke BL, Snyder BR, Handy CR, O'Connor DM, Boulis NM, Federici T (2012) Characterization of a murine model of SMA. *Neurobiol Dis* 45:992-998.
- Eggert C, Chari A, Laggerbauer B, Fischer U (2006) Spinal muscular atrophy: the RNP connection. *Trends Mol Med* 12:113-121.
- El-Khodori BF, Edgar N, Chen A, Winberg ML, Joyce C, Brunner D, Suarez-Farinas M, Heyes MP (2008) Identification of a battery of tests for drug candidate evaluation in the SMN Δ 7 neonate model of spinal muscular atrophy. *Exp Neurol* 212:29-43.
- Engqvist-Goldstein AE, Drubin DG (2003) Actin assembly and endocytosis: from yeast to mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19:287-332.
- Evergren E, Benfenati F, Shupliakov O (2007) The synapsin cycle: a view from the synaptic endocytic zone. *J Neurosci Res* 85:2648-2656.
- Fan L, Simard LR (2002) Survival motor neuron (SMN) protein: role in neurite outgrowth and neuromuscular maturation during neuronal differentiation and development. *Hum Mol Genet* 11:1605-1614.
- 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.
- Finsterer J (2010) Perspectives of Kennedy's disease. *J Neurol Sci* 298:1-10.

- Fischbeck KH, Ionasescu V, Ritter AW, Ionasescu R, Davies K, Ball S, Bosch P, Burns T, Hausmanowa-Petrusewicz I, Borkowska J, et al. (1986) Localization of the gene for X-linked spinal muscular atrophy. *Neurology* 36:1595-1598.
- Fischer LR, Culver DG, Tennant P, Davis AA, Wang M, Castellano-Sanchez A, Khan J, Polak MA, Glass JD (2004) Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Exp Neurol* 185:232-240.
- Fischer U, Liu Q, Dreyfuss G (1997) The SMN-SIP1 complex has an essential role in spliceosomal snRNP biogenesis. *Cell* 90:1023-1029.
- Floyd SR, Porro EB, Slepnev VI, Ochoa GC, Tsai LH, De Camilli P (2001) Amphiphysin 1 binds the cyclin-dependent kinase (cdk) 5 regulatory subunit p35 and is phosphorylated by cdk5 and cdc2. *J Biol Chem* 276:8104-8110.
- Flucher BE, Daniels MP (1989) Distribution of Na⁺ channels and ankyrin in neuromuscular junctions is complementary to that of acetylcholine receptors and the 43 kd protein. *Neuron* 3:163-175.
- 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.
- Fox MA, Sanes JR, Borza DB, Eswarakumar VP, Fassler R, Hudson BG, John SW, Ninomiya Y, Pedchenko V, Pfaff SL, Rheault MN, Sado Y, Segal Y, Werle MJ, Umemori H (2007) Distinct target-derived signals organize formation, maturation, and maintenance of motor nerve terminals. *Cell* 129:179-193.
- Frey D, Schneider C, Xu L, Borg J, Spooren W, Caroni P (2000) Early and selective loss of neuromuscular synapse subtypes with low sprouting competence in motoneuron diseases. *J Neurosci* 20:2534-2542.
- 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.
- Garcera A, Mincheva S, Gou-Fabregas M, Caraballo-Miralles V, Llado J, Comella JX, Soler RM (2011) A new model to study spinal muscular atrophy: neurite degeneration and cell death is counteracted by BCL-X(L) Overexpression in motoneurons. *Neurobiol Dis* 42:415-426.
- Geron N, Meiri H (1985) The fusogenic substance dimethyl sulfoxide enhances exocytosis in motor nerve endings. *Biochim Biophys Acta* 819:258-262.
- Gieseemann T, Rathke-Hartlieb S, Rothkegel M, Bartsch JW, Buchmeier S, Jockusch BM, Jockusch H (1999) A role for polyproline motifs in the spinal muscular atrophy protein SMN. Profilins bind to and colocalize with smn in nuclear gems. *J Biol Chem* 274:37908-37914.
- Gould TW, Buss RR, Vinsant S, Prevette D, Sun W, Knudson CM, Milligan CE, Oppenheim RW (2006) Complete dissociation of motor neuron death from motor dysfunction by Bax deletion in a mouse model of ALS. *J Neurosci* 26:8774-8786.
- Grohmann K, Rossoll W, Kobsar I, Holtmann B, Jablonka S, Wessig C, Stoltenburg-Didinger G, Fischer U, Hubner C, Martini R, Sendtner M (2004) Characterization of Ighmbp2 in motor neurons and implications for the pathomechanism in a mouse model of human spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1 (SMARD1). *Hum Mol Genet* 13:2031-2042.
- Guenther UP, Varon R, Schlicke M, Dutrannoy V, Volk A, Hubner C, von Au K, Schuelke M (2007) Clinical and mutational profile in spinal muscular atrophy with respiratory distress (SMARD): defining novel phenotypes through hierarchical cluster analysis. *Hum Mutat* 28:808-815.
- Guidetti D, Sabadini R, Ferlini A, Torrente I (2001) Epidemiological survey of X-linked bulbar and spinal muscular atrophy, or Kennedy disease, in the province of Reggio Emilia, Italy. *Eur J Epidemiol* 17:587-591.

- Hao le T, Burghes AH, Beattie CE (2011) Generation and Characterization of a genetic zebrafish model of SMA carrying the human SMN2 gene. *Mol Neurodegener* 6:24.
- 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.
- Harding AE, Thomas PK, Baraitser M, Bradbury PG, Morgan-Hughes JA, Ponsford JR (1982) X-linked recessive bulbospinal neuronopathy: a report of ten cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 45:1012-1019.
- Hegedus J, Putman CT, Gordon T (2007) Time course of preferential motor unit loss in the SOD1 G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 28:154-164.
- Henneman E, Somjen G, Carpenter DO (1965) Functional Significance of Cell Size in Spinal Motoneurons. *J Neurophysiol* 28:560-580.
- Hermann A, Reuner U, Ziethe G, Brauer A, Golnitz U, Rolfs A, Ricci C (2011) Vocal cord paralysis and rapid progressive motor neuron disease by the I113F mutation in SOD1 gene. *Amyotroph Lateral Scler* 12:382-384.
- Hervias I, Beal MF, Manfredi G (2006) Mitochondrial dysfunction and amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 33:598-608.
- Hesselmans LF, Jennekens FG, Van den Oord CJ, Veldman H, Vincent A (1993) Development of innervation of skeletal muscle fibers in man: relation to acetylcholine receptors. *Anat Rec* 236:553-562.
- 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, 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.
- Humbert S, Lanier LM, Tsai LH (2000) Synaptic localization of p39, a neuronal activator of cdk5. *Neuroreport* 11:2213-2216.
- Igarashi S, Tanno Y, Onodera O, Yamazaki M, Sato S, Ishikawa A, Miyatani N, Nagashima M, Ishikawa Y, Sahashi K, et al. (1992) Strong correlation between the number of CAG repeats in androgen receptor genes and the clinical onset of features of spinal and bulbar muscular atrophy. *Neurology* 42:2300-2302.
- 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, 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.
- Jensen V, Walaas SI, Hilfiker S, Ruiz A, Hvalby O (2007) A delayed response enhancement during hippocampal presynaptic plasticity in mice. *J Physiol* 583:129-143.
- Jovanovic JN, Benfenati F, Siow YL, Sihra TS, Sanghera JS, Pelech SL, Greengard P, Czernik AJ (1996) Neurotrophins stimulate phosphorylation of synapsin I by MAP kinase and regulate synapsin I-actin interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:3679-3683.
- Kaindl AM, Guenther UP, Rudnik-Schoneborn S, Varon R, Zerres K, Schuelke M, Hubner C, von Au K (2008) Spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1 (SMARD1). *J Child Neurol* 23:199-204.
- Kaplan EL, Meier P (1958) Nonparametric estimation from incomplete observations. *Journal of the American statistical association*:457-481.
- Kariya S, Mauricio R, Dai Y, Monani UR (2009) The neuroprotective factor Wld(s) fails to mitigate distal axonal and neuromuscular junction (NMJ) defects in mouse models of spinal muscular atrophy. *Neurosci Lett* 449:246-251.
- 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.

- Kashima T, Manley JL (2003) A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy. *Nat Genet* 34:460-463.
- Katsuno M, Adachi H, Minamiyama M, Waza M, Tokui K, Banno H, Suzuki K, Onoda Y, Tanaka F, Doyu M, Sobue G (2006) Reversible disruption of dynactin 1-mediated retrograde axonal transport in polyglutamine-induced motor neuron degeneration. *J Neurosci* 26:12106-12117.
- Kennedy WR, Alter M, Sung JH (1968) Progressive proximal spinal and bulbar muscular atrophy of late onset. A sex-linked recessive trait. *Neurology* 18:671-680.
- Kieran D, Woods I, Villunger A, Strasser A, Prehn JH (2007) Deletion of the BH3-only protein puma protects motoneurons from ER stress-induced apoptosis and delays motoneuron loss in ALS mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:20606-20611.
- Kim SH, Ryan TA (2010) CDK5 serves as a major control point in neurotransmitter release. *Neuron* 67:797-809.
- 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.
- Kugelberg E, Welander L (1956) Heredofamilial juvenile muscular atrophy simulating muscular dystrophy. *AMA Arch Neurol Psychiatry* 75:500-509.
- Kwiatkowski TJ, Jr., Bosco DA, Leclerc AL, Tamrazian E, Vanderburg CR, Russ C, Davis A, Gilchrist J, Kasarskis EJ, Munsat T, Valdmanis P, Rouleau GA, Hosler BA, Cortelli P, de Jong PJ, Yoshinaga Y, Haines JL, Pericak-Vance MA, Yan J, Ticozzi N, Siddique T, McKenna-Yasek D, Sapp PC, Horvitz HR, Landers JE, Brown RH, Jr. (2009) Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 323:1205-1208.
- La Spada AR, Wilson EM, Lubahn DB, Harding AE, Fischbeck KH (1991) Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature* 352:77-79.
- Lagace DC, Benavides DR, Kansy JW, Mapelli M, Greengard P, Bibb JA, Eisch AJ (2008) Cdk5 is essential for adult hippocampal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:18567-18571.
- Latvanlehto A, Fox MA, Sormunen R, Tu H, Oikarainen T, Koski A, Naumenko N, Shakirzyanova A, Kallio M, Ilves M, Giniatullin R, Sanes JR, Pihlajaniemi T (2010) Muscle-derived collagen XIII regulates maturation of the skeletal neuromuscular junction. *J Neurosci* 30:12230-12241.
- 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, Coover 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 L, Davies SE, Liu JL (2009) The spinal muscular atrophy protein SMN affects *Drosophila* germline nuclear organization through the U body-P body pathway. *Dev Biol* 332:142-155.
- Lee MS, Kwon YT, Li M, Peng J, Friedlander RM, Tsai LH (2000) Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature* 405:360-364.
- Lee YI, Mikesh M, Smith I, Rimer M, Thompson W (2011) Muscles in a mouse model of spinal muscular atrophy show profound defects in neuromuscular development even in the absence of failure in neuromuscular transmission or loss of motor neurons. *Dev Biol*.

- 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.
- 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.
- Li XH, Zhuang JJ, Xie QY, Li AP, Liang XL, Feng YQ, Fang YY, Li JR, Liang YX (2007) [Clinical manifestations and molecular genetics of spinal bulbar muscular atrophy: report of 5 cases]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 87:1611-1615.
- Liddell EGT, Sherrington CS (1925) Recruitment and some other features of reflex inhibition. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Containing Papers of a Biological Character* 97:488-518.
- 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, Dreyfuss G (1996) A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. *Embo J* 15:3555-3565.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 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.
- Maddatu TP, Garvey SM, Schroeder DG, Hampton TG, Cox GA (2004) Transgenic rescue of neurogenic atrophy in the nmd mouse reveals a role for Ighmbp2 in dilated cardiomyopathy. *Hum Mol Genet* 13:1105-1115.
- Matsubara M, Kusubata M, Ishiguro K, Uchida T, Titani K, Taniguchi H (1996) Site-specific phosphorylation of synapsin I by mitogen-activated protein kinase and Cdk5 and its effects on physiological functions. *J Biol Chem* 271:21108-21113.
- Mattis VB, Butchbach ME, Lorson CL (2008) Detection of human survival motor neuron (SMN) protein in mice containing the SMN2 transgene: applicability to preclinical therapy development for spinal muscular atrophy. *J Neurosci Methods* 175:36-43.
- McAndrew PE, Parsons DW, Simard LR, Rochette C, Ray PN, Mendell JR, Prior TW, Burghes AH (1997) Identification of proximal spinal muscular atrophy carriers and patients by analysis of SMNT and SMNC gene copy number. *Am J Hum Genet* 60:1411-1422.
- McGovern VL, Gavrilina TO, Beattie CE, Burghes AH (2008) Embryonic motor axon development in the severe SMA mouse. *Hum Mol Genet* 17:2900-2909.
- 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.
- Meister G, Buhler D, Pillai R, Lottspeich F, Fischer U (2001) A multiprotein complex mediates the ATP-dependent assembly of spliceosomal U snRNPs. *Nature cell biology* 3:945-949.
- Melki J, Sheth P, Abdelhak S, Burlet P, Bachelot MF, Lathrop MG, Frezal J, Munnich A (1990) Mapping of acute (type I) spinal muscular atrophy to chromosome 5q12-q14. The French Spinal Muscular Atrophy Investigators. *Lancet* 336:271-273.

- Melki J, Bulet P, Clermont O, Pascal F, Paul B, Abdelhak S, Sherrington R, Gurling H, Nakamura Y, Weissenbach J, et al. (1993) Refined linkage map of chromosome 5 in the region of the spinal muscular atrophy gene. *Genomics* 15:521-524.
- 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, Chan YB, Davies KE, van den Heuvel M (2000) Disruption of SMN function by ectopic expression of the human SMN gene in *Drosophila*. *FEBS Lett* 486:99-102.
- 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.
- Minin AA, Kulik AV, Gyoeva FK, Li Y, Goshima G, Gelfand VI (2006) Regulation of mitochondria distribution by RhoA and formins. *J Cell Sci* 119:659-670.
- 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.
- Monani UR, Pastore MT, Gavrilina TO, Jablonka S, Le TT, Andreassi C, DiCocco JM, Lorson C, Androphy EJ, Sendtner M, Podell M, Burghes AH (2003) A transgene carrying an A2G missense mutation in the SMN gene modulates phenotypic severity in mice with severe (type I) spinal muscular atrophy. *J Cell Biol* 160:41-52.
- Montie HL, Cho MS, Holder L, Liu Y, Tsvetkov AS, Finkbeiner S, Merry DE (2009) Cytoplasmic retention of polyglutamine-expanded androgen receptor ameliorates disease via autophagy in a mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 18:1937-1950.
- Morales M, Colicos MA, Goda Y (2000) Actin-dependent regulation of neurotransmitter release at central synapses. *Neuron* 27:539-550.
- Mourelatos Z, Gonatas NK, Stieber A, Gurney ME, Dal Canto MC (1996) The Golgi apparatus of spinal cord motor neurons in transgenic mice expressing mutant Cu,Zn superoxide dismutase becomes fragmented in early, preclinical stages of the disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:5472-5477.
- Munsat TL, Hollander D, Andres P, Finison L (1991) Clinical trials in ALS: measurement and natural history. *Adv Neurol* 56:515-519.
- 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.
- 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.
- Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, Bruce J, Schuck T, Grossman M, Clark CM, McCluskey LF, Miller BL, Masliah E, Mackenzie IR, Feldman H, Feiden W, Kretschmar HA, Trojanowski JQ, Lee VM (2006) Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 314:130-133.
- Nguyen DM, Yeow WS, Ziauddin MF, Baras A, Tsai W, Reddy RM, Chua A, Cole GW, Jr., Schump DS (2006) The essential role of the mitochondria-dependent death-signaling cascade in chemotherapy-induced potentiation of Apo2L/TRAIL cytotoxicity in cultured

- thoracic cancer cells: amplified caspase 8 is indispensable for combination-mediated massive cell death. *Cancer journal* (Sudbury, Mass 12:257-273.
- Nishimune H, Valdez G, Jarad G, Moulson CL, Muller U, Miner JH, Sanes JR (2008) Laminins promote postsynaptic maturation by an autocrine mechanism at the neuromuscular junction. *J Cell Biol* 182:1201-1215.
- Oppenheim RW, Cole T, Prevette D (1989) Early regional variations in motoneuron numbers arise by differential proliferation in the chick embryo spinal cord. *Dev Biol* 133:468-474.
- 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.
- Ou CY, Poon VY, Maeder CI, Watanabe S, Lehrman EK, Fu AK, Park M, Fu WY, Jorgensen EM, Ip NY, Shen K (2010) Two cyclin-dependent kinase pathways are essential for polarized trafficking of presynaptic components. *Cell* 141:846-858.
- Pardo CA, Xu Z, Borchelt DR, Price DL, Sisodia SS, Cleveland DW (1995) Superoxide dismutase is an abundant component in cell bodies, dendrites, and axons of motor neurons and in a subset of other neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:954-958.
- Park GH, Maeno-Hikichi Y, Awano T, Landmesser LT, Monani UR (2010) Reduced survival of motor neuron (SMN) protein in motor neuronal progenitors functions cell autonomously to cause spinal muscular atrophy in model mice expressing the human centromeric (SMN2) gene. *J Neurosci* 30:12005-12019.
- 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.
- Pearn J (1978) Incidence, prevalence, and gene frequency studies of chronic childhood spinal muscular atrophy. *J Med Genet* 15:409-413.
- 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, Dreyfuss G (1999) SMN mutants of spinal muscular atrophy patients are defective in binding to snRNP proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:11167-11172.
- Pellizzoni L, Yong J, Dreyfuss G (2002) Essential role for the SMN complex in the specificity of snRNP assembly. *Science (New York, NY)* 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*.
- Pettmann B, Henderson CE (1998) Neuronal cell death. *Neuron* 20:633-647.
- Piazzon N, Rage F, Schlotter F, Moine H, Branlant C, Massenet S (2008) In vitro and in cellulo evidences for association of the survival of motor neuron complex with the fragile X mental retardation protein. *J Biol Chem* 283:5598-5610.
- Porensky PN, Mitrapant 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.
- Porter JD, Baker RS (1996) Muscles of a different 'color': the unusual properties of the extraocular muscles may predispose or protect them in neurogenic and myogenic disease. *Neurology* 46:30-37.
- Puls I, Oh SJ, Sumner CJ, Wallace KE, Floeter MK, Mann EA, Kennedy WR, Wendelschafer-Crabb G, Vortmeyer A, Powers R, Finnegan K, Holzbaaur EL, Fischbeck KH, Ludlow CL (2005) Distal spinal and bulbar muscular atrophy caused by dynactin mutation. *Ann Neurol* 57:687-694.

- Pun S, Santos AF, Saxena S, Xu L, Caroni P (2006) Selective vulnerability and pruning of phasic motoneuron axons in motoneuron disease alleviated by CNTF. *Nat Neurosci* 9:408-419.
- Rajendra TK, Gonsalvez GB, Walker MP, Shpargel KB, Salz HK, Matera AG (2007) A *Drosophila melanogaster* model of spinal muscular atrophy reveals a function for SMN in striated muscle. *J Cell Biol* 176:831-841.
- Ranganathan S, Fischbeck KH (2010) Therapeutic approaches to spinal and bulbar muscular atrophy. *Trends Pharmacol Sci* 31:523-527.
- Ranganathan S, Harmison GG, Meyertholen K, Pennuto M, Burnett BG, Fischbeck KH (2009) Mitochondrial abnormalities in spinal and bulbar muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 18:27-42.
- Reynolds IJ, Malaiyandi LM, Coash M, Rintoul GL (2004) Mitochondrial trafficking in neurons: a key variable in neurodegeneration? *J Bioenerg Biomembr* 36:283-286.
- Riesland 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.
- Roos J, Hummel T, Ng N, Klambt C, Davis GW (2000) *Drosophila* Futsch regulates synaptic microtubule organization and is necessary for synaptic growth. *Neuron* 26:371-382.
- Rossoll W, Kroning AK, Ohndorf UM, Steegborn C, Jablonka S, Sendtner M (2002) Specific interaction of Smn, the spinal muscular atrophy determining gene product, with hnRNP-R and gry-rbp/hnRNP-Q: a role for Smn in RNA processing in motor axons? *Hum Mol Genet* 11:93-105.
- 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.
- Roy N, Mahadevan MS, McLean M, Shutler G, Yaraghi Z, Farahani R, Baird S, Besner-Johnston A, Lefebvre C, Kang X, et al. (1995) The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell* 80:167-178.
- 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, Cano R, Casanas JJ, Gaffield MA, Betz WJ, Tabares L (2011) Active zones and the readily releasable pool of synaptic vesicles at the neuromuscular junction of the mouse. *J Neurosci* 31:2000-2008.
- Ruiz R, Lin J, Forgie A, Foletti D, Shelton D, Rosenthal A, Tabares L (2005) Treatment with trkC agonist antibodies delays disease progression in neuromuscular degeneration (nmd) mice. *Hum Mol Genet* 14:1825-1837.
- Sanes JR, Lichtman JW (1999) Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu Rev Neurosci* 22:389-442.
- Sanes JR, Lichtman JW (2001) Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. *Nat Rev Neurosci* 2:791-805.
- Saxena S, Cabuy E, Caroni P (2009) A role for motoneuron subtype-selective ER stress in disease manifestations of FALS mice. *Nat Neurosci* 12:627-636.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:9920-9925.
- Sherrington CS (1906) Observations on the scratch-reflex in the spinal dog. *J Physiol* 34:1-50.
- Shuang R, Zhang L, Fletcher A, Groblewski GE, Pevsner J, Stuenkel EL (1998) Regulation of Munc-18/syntaxin 1A interaction by cyclin-dependent kinase 5 in nerve endings. *J Biol Chem* 273:4957-4966.

- Shupliakov O, Bloom O, Gustafsson JS, Kjaerulff O, Low P, Tomilin N, Pieribone VA, Greengard P, Brodin L (2002) Impaired recycling of synaptic vesicles after acute perturbation of the presynaptic actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:14476-14481.
- Small J, Rottner K, Hahne P, Anderson KI (1999) Visualising the actin cytoskeleton. *Microsc Res Tech* 47:3-17.
- Soares VM, Brzustowicz LM, Kleyn PW, Knowles JA, Palmer DA, Asokan S, Penchaszadeh GK, Munsat TL, Gilliam TC (1993) Refinement of the spinal muscular atrophy locus to the interval between D5S435 and MAP1B. *Genomics* 15:365-371.
- Song W, Song Y, Kincaid B, Bossy B, Bossy-Wetzel E (2012) Mutant SOD1(G93A) triggers mitochondrial fragmentation in spinal cord motor neurons: Neuroprotection by SIRT3 and PGC-1alpha. *Neurobiol Dis*.
- Steinbach JH (1981) Developmental changes in acetylcholine receptor aggregates at rat skeletal neuromuscular junctions. *Dev Biol* 84:267-276.
- Stratigopoulos G, Lanzano P, Deng L, Guo J, Kaufmann P, Darras B, Finkel R, Tawil R, McDermott MP, Martens W, Devivo DC, Chung WK (2010) Association of plastin 3 expression with disease severity in spinal muscular atrophy only in postpubertal females. *Arch Neurol* 67:1252-1256.
- Sumner CJ, Wee CD, Warsing LC, Choe DW, Ng AS, Lutz C, Wagner KR (2009) Inhibition of myostatin does not ameliorate disease features of severe spinal muscular atrophy mice. *Hum Mol Genet* 18:3145-3152.
- 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.
- Suzuki K, Katsuno M, Banno H, Takeuchi Y, Atsuta N, Ito M, Watanabe H, Yamashita F, Hori N, Nakamura T, Hirayama M, Tanaka F, Sobue G (2008) CAG repeat size correlates to electrophysiological motor and sensory phenotypes in SBMA. *Brain* 131:229-239.
- 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.
- Tang D, Yeung J, Lee KY, Matsushita M, Matsui H, Tomizawa K, Hatase O, Wang JH (1995) An isoform of the neuronal cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) activator. *J Biol Chem* 270:26897-26903.
- Thompson TG, DiDonato CJ, Simard LR, Ingraham SE, Burghes AH, Crawford TO, Rochette C, Mendell JR, Wasmuth JJ (1995) A novel cDNA detects homozygous microdeletions in greater than 50% of type I spinal muscular atrophy patients. *Nat Genet* 9:56-62.
- tom Dieck S, Sanmarti-Vila L, Langnaese K, Richter K, Kindler S, Soyke A, Wex H, Smalla KH, Kampf U, Franzer JT, Stumm M, Garner CC, Gundelfinger ED (1998) Bassoon, a novel zinc-finger CAG/glutamine-repeat protein selectively localized at the active zone of presynaptic nerve terminals. *J Cell Biol* 142:499-509.
- 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.
- 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.
- Tu PH, Raju P, Robinson KA, Gurney ME, Trojanowski JQ, Lee VM (1996) Transgenic mice carrying a human mutant superoxide dismutase transgene develop neuronal cytoskeletal pathology resembling human amyotrophic lateral sclerosis lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:3155-3160.

- Valori CF, Ning K, Wyles M, Mead RJ, Grierson AJ, Shaw PJ, Azzouz M (2010) Systemic delivery of scAAV9 expressing SMN prolongs survival in a model of spinal muscular atrophy. *Sci Transl Med* 2:35ra42.
- van Zundert B, Peuscher MH, Hynynen M, Chen A, Neve RL, Brown RH, Jr., Constantine-Paton M, Bellingham MC (2008) Neonatal neuronal circuitry shows hyperexcitable disturbance in a mouse model of the adult-onset neurodegenerative disease amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 28:10864-10874.
- Velasco E, Valero C, Valero A, Moreno F, Hernandez-Chico C (1996) Molecular analysis of the SMN and NAIP genes in Spanish spinal muscular atrophy (SMA) families and correlation between number of copies of cBCD541 and SMA phenotype. *Hum Mol Genet* 5:257-263.
- Villarroel A, Sakmann B (1996) Calcium permeability increase of endplate channels in rat muscle during postnatal development. *J Physiol* 496 (Pt 2):331-338.
- Waites CL, Leal-Ortiz SA, Andlauer TF, Sigrist SJ, Garner CC (2011) Piccolo regulates the dynamic assembly of presynaptic F-actin. *J Neurosci* 31:14250-14263.
- Wan L, Battle DJ, Yong J, Gubitza AK, Kolb SJ, Wang J, Dreyfuss G (2005) The survival of motor neurons protein determines the capacity for snRNP assembly: biochemical deficiency in spinal muscular atrophy. *Mol Cell Biol* 25:5543-5551.
- Warita H, Manabe Y, Murakami T, Shiote M, Shiro Y, Hayashi T, Nagano I, Shoji M, Abe K (2002) Tardive decrease of astrocytic glutamate transporter protein in transgenic mice with ALS-linked mutant SOD1. *Neurol Res* 24:577-581.
- Wen HL, Lin YT, Ting CH, Lin-Chao S, Li H, Hsieh-Li HM (2010) Stathmin, a microtubule-destabilizing protein, is dysregulated in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 19:1766-1778.
- Winkler C, Eggert C, Gradl D, Meister G, Giegerich M, Wedlich D, Lagerbauer B, Fischer U (2005) Reduced U snRNP assembly causes motor axon degeneration in an animal model for spinal muscular atrophy. *Genes Dev* 19:2320-2330.
- Wirth B, Pick E, Leutner A, Dadze A, Voosen B, Knapp M, Piechaczek-Wappenschmidt B, Rudnik-Schoneborn S, Schonling J, Cox S, et al. (1994) Large linkage analysis in 100 families with autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA) and 11 CEPH families using 15 polymorphic loci in the region 5q11.2-q13.3. *Genomics* 20:84-93.
- 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.
- Ymlahi-Ouazzani Q, O JB, Paillard E, Ballagny C, Chesneau A, Jadaud A, Mazabraud A, Pollet N (2010) Reduced levels of survival motor neuron protein leads to aberrant motoneuron growth in a *Xenopus* model of muscular atrophy. *Neurogenetics* 11:27-40.
- 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.
- Zhang B, Tu P, Abtahian F, Trojanowski JQ, Lee VM (1997) Neurofilaments and orthograde transport are reduced in ventral root axons of transgenic mice that express human SOD1 with a G93A mutation. *J Cell Biol* 139:1307-1315.
- Zhang HL, Pan F, Hong D, Shenoy SM, Singer RH, Bassell GJ (2003) Active transport of the survival motor neuron protein and the role of exon-7 in cytoplasmic localization. *J Neurosci* 23:6627-6637.
- Zhang Z, Lotti F, Dittmar K, Younis I, Wan L, Kasim M, Dreyfuss G (2008) SMN deficiency causes tissue-specific perturbations in the repertoire of snRNAs and widespread defects in splicing. *Cell* 133:585-600.
- 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 1. Genotipado de la línea SMA Δ 7

El genotipado de los ratones modelo de AME para experimentación se llevó a cabo amplificando el ADN extraído del tejido de las biopsias digitales.

Extracción del ADN

Las biopsias digitales se trataron con 50 μ l de un reactivo de lisis alcalino, compuesto por 25 mM de NaOH y 0.2 mM de EDTA. Al choque alcalino le siguió un choque térmico (65 °C durante 30 minutos y 98 °C durante 15 minutos), lo que produjo la disgregación del tejido. Para evitar la evaporación de las muestras, éstas se colocaron en hielo durante unos minutos. Tras lo cual se añadieron 50 μ l de reactivo neutralizante para parar la reacción alcalina, cuya composición era 40 mM Tris ajustado a pH 4 con HCl. Se centrifugaron las muestras tras lo cual se recuperaron 50 μ l de sobrenadante donde se encontraba el ADN que se utilizó posteriormente para la amplificación de los genes deseados. Mediante este proceso de extracción se obtenía una concentración aproximada de ADN de 1 μ g/ μ l. En nuestro caso, se añadió 1 μ l de la solución conteniendo el ADN en la reacción de la PCR.

Amplificación mediante PCR

Los transgenes SMN2 y SMN Δ 7 no se genotiparon para la realización de los experimentos, ya que previamente se consiguió la homocigosis de dichos transgenes en esta línea. Por lo tanto, para la genotipación se usaron los oligonucleótidos para detectar el gen *Smn*. Los oligonucleótidos (*Sigma*) utilizados fueron:

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

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

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

Los oligonucleótidos que amplificaban la banda KO (Smn -) eran NeoB y A2R y los oligonucleótidos que amplificaban la banda WT (Smn +) eran A2R y A2F.

Los ciclos usados en el termociclador para la amplificación de las secuencias fueron los siguientes:

- 1.- 4 minutos a 95 °C.
- 2.- 1 minuto y 30 segundos a 95 °C.
- 3.- 1 minuto y 30 segundos a 63 °C.
- 4.- 1 minuto y 30 segundos a 72 °C.
Volvemos al paso dos 34 veces.
- 5.- 4 minutos a 72 °C.
- 6.- 4 °C, hasta sacar las muestras del aparato.



Termociclador (*Biometra*) donde se amplificaron las secuencias de oligonucleótidos.

La química de la reacción fue la siguiente:

- 9'3 µl H₂O
- 4 µl MgCl₂, 25 mM
- 2'5 µl Buffer 10X
- 2'5 µl de cada oligonucleótido (10 µM)
- 0'5 µl de d'NTPs, 25 mM
- 0'2 µl Taq-polimerasa
- 1 µl DNA stock

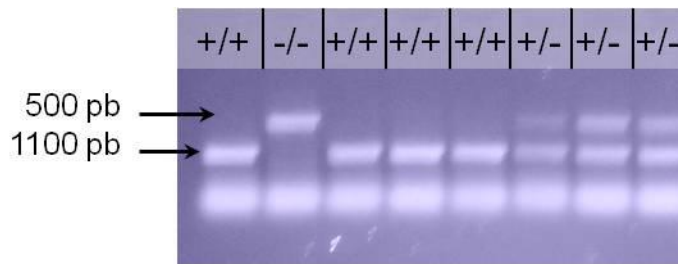
Resolución de la PCR

La resolución de la PCR se realizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%, siendo el tamaño esperado de las bandas:

-Banda WT: 500 pb

-Banda KO: 1100 pb

De esta forma se identificaron tanto los animales heterocigotos ($Smn^{+/-}$; $SMN2^{+/+}$; $SMN\Delta7^{+/+}$) como los homocigotos para el gen Smn ($Smn^{+/+}$; $SMN2^{+/+}$; $SMN\Delta7^{+/+}$ y $Smn^{-/-}$; $SMN2^{+/+}$; $SMN\Delta7^{+/+}$), los cuales fueron usados para los distintos experimentos.



Anexo 2. Protocolo de inmunofluorescencia contra bassoon y vAChT

Para la comparación de estructuras morfológicas se realizaron las tinciones inmunohistoquímicas de ratones controles y mutantes en paralelo, siendo éstos hermanos de camada. El protocolo de marcaje se elaboró de la siguiente manera:

Día 1

1. Se diseccionaron los músculos de los ratones a experimentar en solución fisiológica externa.
2. Tras la disección, se mantuvo la preparación durante 30 minutos en solución fisiológica burbujeada con carbógeno.
3. Se fijaron los músculos con PFA frío al 4% y se mantuvieron a 4 °C durante 90 minutos. Tras lo cual, se lavaron los músculos tres veces con PBS y se almacenaron a 4 °C durante toda la noche.

Día 2

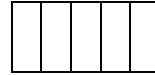
1. Se incubaron los músculos durante 30 minutos con glicina 0,1M en PBS, añadiéndose 2 ml por pocillo y manteniéndose en movimiento continuo.
2. Se permeabilizó el tejido con varios lavados con PBS Tritón-X al 1% (PBS-T): 2x5 minutos/ 2x10 minutos/ 2x30 minutos



3. Se bloquearon los sitios de unión inespecíficos con BSA al 5% preparado en PBS-T al 1%, durante 3 horas.
4. Se incubaron los músculos con los anticuerpos primarios correspondientes: anti-bassoon (dilución 1:100) y anti-vAChT (1:500) preparados en 2,5% BSA en PBS-T 1%. Se añadía un volumen final de 1 ml por pocillo y se dejó incubando durante 30 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual, se dejaron en el frigorífico durante toda la noche.

Día 3

1. Se incubaron los músculos con los anticuerpos primarios a temperatura ambiente durante 30 minutos.
2. Se lavaron con PBS-T 0,05%: se cambió la solución tres veces y después se hicieron 5 lavados de una hora.



3. Se incubaron los músculos con los anticuerpos secundarios correspondientes: cabra anti-ratón conjugado con Alexa 647 y cabra anti-conejo Alexa 488, ambos preparados a dilución 1:500 en BSA 5% en PBS-T al 0'05 %. Se añade 1 ml por pocillo. Se añadió además 1 μ l de BTX-Rho por ml de solución cada pocillo. Se cubrieron las placas con una hoja de aluminio para evitar la exposición a la luz.

4. Se lavaron los músculos con PBS-T 0,05%: el primer lavado durante 30 minutos y después 6 lavados de 10 minutos



5. Se montaron los músculos bajo la lupa, retirándose los restos de tejido adheridos a ellos y las partes adyacentes que no pertenecían a éstos. Se pusieron los músculos sobre un portaobjetos y tras añadir 12 μ l de medio de montaje (SlowFade, *Sigma*) se cubrieron con un cubreobjetos y se sellaron con laca de uñas.

Este mismo protocolo se usó para el marcaje de las diferentes estructuras. La única diferencia en otros casos era que, en el segundo paso del tercer día, los 5 lavados eran de 10 minutos. En el caso de bassoon, los lavados eran más largos, porque al tomar las imágenes había mucho ruido de fondo, que se evitaba al hacer lavado más largos.

Anexo 3. Especificaciones del microscopio confocal

Microscopio Confocal FV1000

Escaneo y Detección	Laser	Ultravioleta/ Láser de luz visible	LD láser: 405nm: 50mW, 440nm: 25mW, 473nm: 15mW, 559nm: 15mW, 635mW, 20mW Multi Ar laser (457nm, 488nm, 515nm, Total 30mW), HeNe(G) láser (543nm, 1mW)
	Fibra		Tipo banda ancha (400nm-650nm)
	Módulo de escaneo		3 puertos láser estándar, VIS - UV - IR Torreta con espejo dicromático, 6 posiciones, escáner de galvanómetro dual (X, Y)
	Módulo detector		3 canales confocales estándar (3 detectores fotomultiplicadores) Detector: Fotomultiplicador Hamamatsu R7862
	Filtros		Filtros de alto rendimiento, espejos dicromáticos y filtros de barrido.
	Método de escaneo		2 espejos galvanómetros de escaneo
	Modo de escaneo		Tamaño del pixel: 64 x 64 — 4096 x 4096 Velocidad de escaneo: 512 x 512 (1'1 s, 1'6 s, 2'7 s, 3'3 s, 3'9 s, 5'9 s, 11'3 s, 27'4 s, 54'0 s) 256 x 256 escaneo bidireccional (0'064 s, 0'129 s) 0'5 o 1 ms de tiempo de vida por punto para escaneo rápido bidireccional X,Y,T,Z Línea de escaneo: línea recta con orientación libre, línea libre y punto de escaneo
	Método de Fotodetección		2 modos de detección: Integración análoga y cálculo de fotón híbrido
	<i>Pinhole</i>		<i>Pinhole</i> único motorizado Diámetro del <i>pinhole</i> : $\varnothing 50 - 800\mu\text{m}$ (fase de $1\mu\text{m}$)
	Número de campo (N.A.)		18
	Zoom óptico		1x - 50x con incremento en 0'1x
	Z-drive		Módulo de enfoque motorizado integrado, incremento mínimo $0'01\mu\text{m}$ ó 10 nm
	Microscopio	Unidad detectora de transmisión directa	
Microscopio motorizado			De transmisión directa BX61
Unidad de iluminación de fluorescencia			Fuente de luz de fluorescencia externa con obturador motorizado, adaptación de fibra a puerto óptico de unidad de escaneo Cambio motorizado entre el camino de luz LSM y la iluminación de fluorescencia

Objetivos

	N.A.	W.D.	Grosor del cubreobjetos	Inmersión
UPLSAPO 10x2	0.40	3.1	0.17	
UPLSAPO 60xO	1.35	0.15	0.17	Aceite

Adquisición de imágenes

	Intensidad láser	Anchura rodaja	Voltaje ($h\nu$)	Ganancia	Offset
BTX- Rho		0.5 μm			
SV		0.5 μm			
Bassoon	488: 5%	1 μm	450 – 600 V	0	12 - 14
NF	561: 1%	0.5 μm			
Microtúbulos	633: 5%	0.5 μm			
MAP-1B		0.5 μm			

ANEXO 4.

A continuación se detalla una lista de los productos (exceptuando los anticuerpos que ya se han especificado en los materiales y métodos), aparatos y programas utilizados.

Lista de productos

	Casa comercial	Referencia
Elastómero de silicona (Sylgar)	Dow Corning Corporation	184
Tijeras pequeñas disección		FST 15000-10
Paraformaldehído (PFA)	Sigma	P6148
PBS	Sigma	P4417
Glicina	Sigma	G7126
Triton X-100	Sigma	X100
Albúmina de suero bovino (BSA)	Sigma	A7906
Bungarotoxina- rodamina (BTX-rho)	Sigma	T0195
Bungarotoxina conjugada con Alexa647 (BTX-647)	Molecular Probes	B35450
Portaobjetos	Myc Diagnostica	910968
Medio de Montaje (SlowFade)	Sigma	S36936
Cubreobjetos	Myc diagnostica	911040
OCT	Eulabor	62550-01
Faloidina-Alexa647	Invitrogen	A22287
Capilares de vidrio	A-M System	615000
μ -Conotoxina GIIIB	Alomone Laboratories	C-270
R- roscovitina	Sigma	R7772
DMSO	Sigma	D5879
NaCl	Sigma	S7653
KCl	Sigma	P5405
NaHCO ₃	Sigma	S8875
CaCl ₂	Sigma	C3881
MgCl ₂	Sigma	M2670
Glucosa	Sigma	G7528
NaOH	Sigma	S8045
EDTA	Fluka	3677
Tris	Roche	3573826001
d’NTPs	Invitrogen	10297-018
Taq polimerasa y buffer 10X	Biotools	10043
Agarosa	Labotaq	E5000

Lista de aparatos

	Modelo	Fabricante
Microscopio estereoscópico	SMZ 1500	Nikon
Microscopio confocal	FV1000	Olympus
Lámpara mercurio	U-RFL-T	Olympus
Láser Argón y Helio-Neón		Melles Griot
Estimulador generador de pulsos	2100	A-M Systems
Estirador de vidrio horizontal	P-97	Sutter Instrument Co.
Amplificador	TEC-05X	npi electronic GmbH
Convertidor analógico digital	PowerLab/4SP	AD Instruments
Mesa antivibratoria		Newport
Microscopio transmisión directa	BX50WI	Olympus
Micromanipulador	MHW-3	Narishige
Termociclador		Biometra

Lista de programas

	Procedencia
FV10-ASW 1.7 Viewer	Olympus
ImageJ	<i>W. Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD</i>
Chart5	<i>AD Instruments</i>