

UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA



FACULTAD DE CIENCIAS

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR Y GENÉTICA**

*Análisis de la localización y función de bombas de calcio
y de sus isoformas en cerebelo adulto y en desarrollo*

TESIS DOCTORAL

presentada por

M^a DEL ROSARIO SEPÚLVEDA JUSTO

Para optar al Título de Doctora en Biología
por la Universidad de Extremadura
Badajoz, 2006



UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética
Facultad de Ciencias

Avda de Elvas s/n
06071 Badajoz
Tel/Fax: 924 289419

ANA M^a MATA DURÁN, Profesora Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética, y **MATÍAS HIDALGO SÁNCHEZ**, Profesor Contratado Doctor del Departamento de Ciencias Morfológicas y Biología Celular y Animal, de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Extremadura,

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral titulada “*Análisis de la localización y función de bombas de calcio y de sus isoformas en cerebelo adulto y en desarrollo*”, de la que es autora **M^a del Rosario Sepúlveda Justo**, se ha realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de de Bioquímica y Biología Molecular y Genética de la Universidad de Extremadura.

Revisada la memoria presentada, autorizamos su presentación y defensa pública frente al tribunal correspondiente

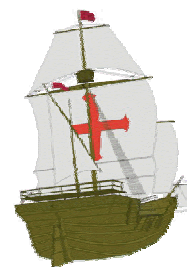
Y para que así conste y surta los efectos oportunos, expedimos el presente certificado en Badajoz, a 6 febrero de 2006.

Fdo.: Ana M^a Mata Durán
Directora de la Tesis Doctoral

Fdo.: Matías Hidalgo Sánchez
Co-director de la Tesis Doctoral

*Emprender el viaje, días de tormenta, mar en calma,
..... llegada a Puerto.....*

*Una travesía que no hubiera sido posible sin las siguientes personas, a las que
quiero expresar mi agradecimiento:*



A la Dra. Ana M. Mata Durán, Directora de esta Tesis y mi mentora científica, sin cuyo ánimo, ilusión y dedicación no hubiera sido posible este trabajo. Gracias por tu tiempo, por tus enseñanzas, por introducirme en un mundo jamás soñado y por procurarme siempre todo lo mejor.

Al Dr. Matías Hidalgo Sánchez, Co-director de esta Tesis y guía en la Biología Celular y del Desarrollo, por su labor en mi formación y aliento en todo momento.

A mis compañeros de grupo, Javier Palacios, dedicado ya a otros menesteres, María Berrocal y Daniel Marcos, savia nueva que me ha dado siempre fuerzas para seguir adelante, día a día, experimento a experimento. Los mejores.

Al Prof. Jesús Ávila, del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CBMSO, CSIC-UAM) de Madrid, quién me ofreció generosamente su laboratorio para completar mi formación y con el que disfruté y aprendí cada minuto con sus ideas y discusiones sobre mi trabajo. A la Dra. Mar Pérez, quién me ayudó en mis primeros ensayos de Biología Molecular y de cultivos neuronales, modelo de calidad humana y científica. También agradecer a los Dres. J.J. Lucas y Félix Hernández por sus consejos durante mis estancias, y en particular a mis compañeros y amigos Alberto, Elena, Raquel, Santi, Raquel, Tobías y Eva, por su aliento, ayuda y cariño en todo momento.

Una mención especial va dirigida a la Prof. Margarita Salas, reflejo de capacidad y energía para todos y para quién no tengo suficientes palabras de gratitud... Gracias por todo. También gracias por permitirme estar una semana en su laboratorio del CBMSO y conocer a José María Lázaro, cuyas enseñanzas siempre llevaré conmigo.

Gracias a la Dra. María Gasset, del Instituto de Química-Física Rocasolano (CSIC) de Madrid, quién nos reveló el mundo de los rafts y cuya amabilidad ha permitido desarrollar un precioso trabajo. También agradecer a José A. Rodríguez-Navarro y Gema Elvira, por la colaboración prestada.

Al Prof. Frank Wuytack, del Depto. de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Katholieke Universiteit Leuven, de Leuven (Bélgica), mi primer contacto con el mundo exterior. Su dinamismo, ilusión por la ciencia y amabilidad me hicieron sentir como en casa y que iniciara los estudios con la SPCA. Un agradecimiento especial al Dr. Kurt Van Baelen, supervisor y gran compañero, demostrándome que no existen barreras de lenguaje en el laboratorio. También gracias al Prof. Luc Raeymaekers por su interés en mis ensayos, al Dr. Leonard Dode, Yves Parijs y Tomas Luyten por su ayuda en los experimentos, y en especial a mis compañeros belgas Peter, Jo, Verlee, Leen, Marleen, Sylvia, Karolina, Yves, y mis dos salvavidas Karel Talavera y Miriam Llorián, grandes investigadores y amigos de corazón.

A la Dra. M^a Teresa Rejas del Servicio de Microscopía Electrónica del CBMSO, quién me permitió aprender numerosas técnicas de microscopía electrónica con muchas facilidades, junto con Milagros y Curra.

Al Prof Emmanuel E. Strehler, de la Clínica Mayo en Minnesota (EEUU), por su amabilidad en proporcionarnos plásmidos y anticuerpos y compartir su entusiasmo por las bombas de calcio.

Este trabajo, desarrollado en distintas especies animales, ha sido posible gracias en primer lugar al veterinario Pablo Berrocal (FRICOSI, Matadero de Olivenza S.L., Badajoz), quién nos suministraba con el alba los cerebelos de cerdo más frescos, extraídos con maestría por Juanjo y Chola. Mi agradecimiento a los Servicios de Animalario de la UEx (Badajoz) y del CBMSO (Madrid) por sus enseñanzas en la manipulación con ratones y conejos. Gracias también a J.C. Casillas de Almendralejo (Badajoz), por proveernos de estupendas gallinas ponedoras, y en especial a Bartolomé González, siempre colaborador, imprescindible en el cuidado de pollos, y tan atento con todos los estudiantes durante los fines de semana.

Al Área de Bioquímica y Biología Molecular (Fac. de Ciencias) del Depto. de Bioquímica y Biología Molecular y Genética de la UEx, donde he realizado esta Tesis Doctoral. Gracias a todos los que amablemente me ayudaron en algún momento, especialmente al grupo del Dr. Pedro Fernández, siempre dispuestos a compartir material y protocolos. A Juana Serván, la más amable y dispuesta. También a los miembros de este departamento en la Fac. de Medicina, por su disposición para el uso de centrifugas.

A todos los miembros del Área de Genética (Fac. de Ciencias), quienes me han demostrado el valor del compañerismo y la amistad. Gracias a Estrella, compañera de viaje y cuyo apoyo ha sido muy importante estos años. Gracias a Rocío, M^a Toñi, Israel y Jose, por tantos momentos de ciencia y de vida. También quiero resaltar a Encarna Ferrera, por su ayuda, cariño y constante amabilidad.

También quiero expresar mi agradecimiento a los miembros del Área de Biología Celular del Depto. de Ciencias Morfológicas y Biología Celular y Animal (UEx), en cuyas instalaciones realicé muchos de mis experimentos. Gracias en especial al Dr. Gervasio Martín, por resolver siempre mis dudas, iniciarme en la microscopía electrónica y estar dispuesto a dedicarme parte de su tiempo.

Las imágenes presentadas han sido posibles gracias a poder utilizar el microscopio del Dr. Manuel Ramírez (Depto. Microbiología, Fac. de Ciencias, UEx). También, esporádicamente, fueron amablemente dispuestos los microscopios del Dr. Virgino García Martínez y del Dr. Pedro J. Casero (Depto. de Ciencias Morfológicas y Biología Celular y Animal).

Agradecer al Dr. Miguel González Velasco (Fac. de Ciencias, sección Matemáticas, UEx), por su inestimable colaboración en los análisis estadísticos.

Gracias a todos los profesores y compañeros que me manifestaron su apoyo y cariño en este tiempo, en especial a la Dra. Ana Ortega, al Dr. Luis Miguel Hernández, a Isabel Rocha (Vicerrectorado de Investigación), amigos de Zoología y del resto de departamentos del edificio de Biología...

A mis amigos, de todas partes, que me dieron fuerzas y ánimos en todo momento para hacer más fácil el tiempo invertido. A Paco, Mamen y Fátima, apoyos cercanos durante estos años.

Y a Héctor, quién ha vivido más de cerca este viaje y ha sido el mejor compañero, el aire fresco que necesitaba cada día... También gracias a toda su familia, por su cariño y ánimos constantes, y en especial a su abuelo Ángel, quien ocasionalmente se convertía en el técnico de instrumentación de nuestro laboratorio.

Y por último, mi Familia. A mis padres, referentes de mi vida en cada momento. A mi hermano, e Irene, por su apoyo y comprensión. A mi tía Feli, que me ha seguido desde que aprendí a diferenciar hojas caducas y perennes. A mis abuelos y demás familia, que siendo tan heterogénea, es la mejor.

*Gracias papá y mamá. Gracias Héctor. Gracias Ana.
A todos, mi más sincera gratitud.*

Chary Sepúlveda (Marzo, 2006).-

Somos de la misma sustancia que los sueños.
William Shakespeare.-

PUBLICACIONES OBTENIDAS DE ESTA TESIS DOCTORAL

M.R. Sepúlveda, M. Hidalgo-Sánchez y A.M. Mata (2004) Localization of endoplasmic reticulum and plasma membrane Ca^{2+} -ATPases in subcellular fractions and sections of pig cerebellum. *Eur. J. Neurosci.* **19**, 542-551.

M.R. Sepúlveda y A.M. Mata (2005) Localization of intracellular and plasma membrane Ca^{2+} -ATPases in the cerebellum. *The Cerebellum* **4**, 82-89.

A.M. Mata y **M.R. Sepúlveda** (2005) Calcium pumps in the central nervous system. *Brain Res. Rev.* **49**, 398-405.

M.R. Sepúlveda, M. Hidalgo-Sánchez y A.M. Mata (2005) A developmental profile of the levels of calcium pumps in chick cerebellum. *J. Neurochem.* **95**, 673-683.

M.R. Sepúlveda, M. Berrocal-Carrillo, M. Gasset y A.M. Mata (2006) The plasma membrane Ca^{2+} -ATPase isoform 4 is localized in lipid rafts of cerebellum synaptic plasma membranes. *J. Biol. Chem.* **281**, 447-453.

COMUNICACIONES A CONGRESOS

M.R. Sepúlveda, M. Hidalgo-Sánchez, J. Palacios y A.M. Mata (2002) Subcellular distribution of the intracellular and plasma membrane Ca^{2+} -ATPases in pig cerebellum. *31th Forum of European Neuroscience*, P201. París (Francia).

M.R. Sepúlveda, M. Hidalgo-Sánchez y A.M. Mata (2004) Functional and immunological analysis of Ca^{2+} -ATPases in specific areas of pig cerebellar cortex. *New insights of developmental neurobiology. Symposium in honour of Rosa Magda Alvarado-Mallart. Sociedad Española de Neurociencia (SENC)*, P52. Cádiz (España).

M.R. Sepúlveda, M. Hidalgo-Sánchez, J. Palacios y A.M. Mata (2004) Developmental expression of calcium pumps in the chick cerebellum. *4th Forum of European Neuroscience (FENS)*, A072.16. Lisboa (Portugal).

M.R. Sepúlveda, J. Palacios y A.M. Mata (2005) Analysis of SERCA and PMCA proteins in developing chick cerebellum. *30th FEBS Congress & 9th IUBMB Conference*, C1-061P. Budapest (Hungria).

M.R. Sepúlveda, M. Berrocal-Carrillo, F. Wuytack y A.M. Mata (2005) Distribución de la Ca^{2+} -ATPasa de vías secretoras (SPCA1) en cerebelo de cerdo. *XXVIII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular*, T2.5-17. Zaragoza (España).

M.R. Sepúlveda, M. Hidalgo-Sánchez y A.M. Mata (2005) A developmental profile of the levels of calcium pumps in chick cerebellum. *Ochoa, 100 años mirando al futuro. FECyT-Universidad Complutense Madrid*, P101. Madrid (España).

M.R. Sepúlveda, María Berrocal-Carrillo, María Gasset y A.M. Mata (2006) Isoform-specific distribution of plasma membrana calcium pumps from pig cerebellum in lipid raft microdomains. *31th FEBS Congress* (pendiente de celebración). Estambul (Turquía).

A	Amperio
Å	Angstrom
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
BAPTA	Ácido 1,2-bis (2-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético
Brij 96V	Polietilenglicol oleil éter
BSA	Albúmina de suero bovino
ccci	Capa celular cortical interna
ccp	Capa de células de Purkinje
cg	Capa granular
cge	Capa granular externa
cgi	Capa granular interna
cm	Capa molecular
cpm	Cuentas por minuto
DAB	3,3'-diaminobencidina tetrahidroclorada
DAPI	4'-6-diamidino-2-fenilindol
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOC	Desoxicolato
D.E.	Desviación estándar
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	Ácido etilenglicol bis (2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraacético
g	Aceleración de la gravedad
h	Hora(s)
IVv	Cuarto ventrículo
Hepes	Ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-etanosulfónico)
K_{0,5}	Concentración de inhibidor que produce 50 % de inhibición
kDa	Kilodalton
LDH	Lactato deshidrogenasa
min	Minuto(s)
MPS	Vesículas de membrana plasmática sinaptosomal
NADH	Nicotinamida adenín dinucleótido (forma reducida)
np	Núcleos profundos
pCa	-log de la concentración de Ca ²⁺
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEP	Fosfoenolpiruvato

Pi	Fosfato inorgánico
PK	Piruvato quinasa
plc	Plexos coroideos
PMCA	Ca ²⁺ -ATPasa de membrana plasmática
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
p/p	Relación peso/peso
PrP^C	Proteína prión celular
PS	Fosfatidilserina
p/v	Relación peso/volumen
PVDF	Difluoruro de polivinilideno
RNA	Ácido ribonucleico
sb	Sustancia blanca
SDS	Dodecilsulfato sódico
SERCA	Ca ²⁺ -ATPasa de retículo sarco(endo)plásmico
SPCA	Ca ²⁺ -ATPasa de vías secretoras
TBS	Tampón Tris salino
TEMED	N, N, N', N'-tetrametilendiamina
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
VM	Vesículas de membrana
V	Voltio(s)
v/v	Relación volumen/volumen

ÍNDICE GENERAL**INTRODUCCIÓN**

EL CALCIO EN LA CÉLULA.....	1
PROPIEDADES GENERALES DE LAS BOMBAS DE CALCIO.....	2
LA Ca ²⁺ -ATPasa DE RETÍCULO SARCO(ENDO)PLÁSMICO.....	3
Estructura de la SERCA.....	4
Isoformas SERCA.....	5
Regulación de la SERCA.....	7
LA Ca ²⁺ -ATPasa DE MEMBRANA PLASMÁTICA.....	8
Estructura de la PMCA.....	8
Isoformas PMCA.....	10
Regulación de la PMCA.....	12
LA Ca ²⁺ -ATPasa DE VÍAS SECRETORAS.....	14
Estructura de la SPCA.....	15
Isoformas SPCA.....	15
Regulación de la SPCA.....	16
MEMBRANAS BIOLÓGICAS Y MICRODOMINIOS LIPÍDICOS.....	17
EL CALCIO EN EL SISTEMA NERVIOSO.....	19
EL CEREBELO EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.....	20
DESARROLLO DEL CEREBELO.....	22
LA CORTEZA CEREBELOSA.....	25
Capa molecular.....	25
Capa de las células de Purkinje.....	26
Capa granular.....	27
CIRCUITOS DE INTEGRACIÓN Y SINAPSI CEREBELOSAS.....	29
Aferencias al cerebelo.....	29
Circuitos internos.....	29
Emisión de información.....	31
NÚCLEOS PROFUNDOS DEL CEREBELO.....	31
EL IV VENTRÍCULO Y LOS PLEXOS COROIDEOS.....	32
OBJETIVOS.....	33

MÉTODOS GENERALES**1) PREPARACIÓN DE FRACCIONES DE MEMBRANA:**

FRACCIONES SUBCELULARES DE CEREBELO DE CERDO.....	37
Preparación de sinaptosomas y de vesículas de membrana plasmática sinaptosomal.....	38
Preparación de microsomas.....	39
PURIFICACIÓN DE LA Ca ²⁺ -ATPasa DE MEMBRANA PLASMÁTICA SINAPTOSOMAL DE CEREBELO DE CERDO.....	39
Solubilización de las MPS.....	40
Cromatografía de afinidad en calmodulina-agarosa.....	40
PREPARACIÓN DE VESÍCULAS DE MEMBRANA DE RETÍCULO SARCOPLÁSMICO CARDIACO DE CERDO.....	40
PREPARACIÓN DE VESÍCULAS DE MEMBRANA DE CEREBELO DE POLLO O DE RATÓN.....	41
Disección y preparación de vesículas.....	41

2) DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA:

MÉTODO DE BRADFORD.....	42
MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO DE ABSORBANCIA A 280 nm.....	42

3) ANÁLISIS DE FRACCIONES SUBCELULARES E INMUNODETECCIÓN POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN:

PREPARACIÓN DE REJILLAS.....	43
TINCIÓN NEGATIVA DE FRACCIONES SUBCELULARES	43
INMUNODETECCIÓN EN SINAPTOSOMAS	
Fijación de sinaptosomas de cerebelo de cerdo.....	43
Inclusión en bloques de gelatina.....	44
Inclusión en resina LRWhite y corte.....	44
Inmunogold.....	44

4) ENSAYOS FUNCIONALES:

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ATPasa: ensayo enzimático acoplado.....	45
DETERMINACIÓN DEL TRANSPORTE DE CALCIO.....	46

5) ELECTROFORESIS Y WESTERN BLOT:

SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.....	47
TINCIÓN Y SECADO DE GELES	
Tinción con Azul Coomassie.....	48
Tinción con plata.....	48
Secado de geles.....	48
WESTERN BLOT.....	48

Electrotransferencia.....	49
Inmunodetección.....	49
6) ENSAYOS HISTOQUÍMICOS:	
PREPARACIÓN DE MATERIAL PARA ESTUDIOS HISTOLÓGICOS	
Fijación de los tejidos.....	50
Microtomía en criostato.....	50
Microtomía en “gloop”.....	51
TINCIÓN DE TEJIDOS	
Tinción de cresil violeta.....	52
Tinción con azul de toluidina.....	52
MONTAJE DE LOS PORTAOBJETOS.....	52
INMUNOHISTOQUÍMICA EN SECCIONES DE TEJIDO.....	53
INMUNOFLUORESCENCIA EN SECCIONES DE TEJIDO.....	53
7) ENSAYOS DE RT-PCR:	
EXTRACCIÓN DE RNA	
Extracción de RNA con Trizol.....	54
Cuantificación.....	55
Electroforesis de RNA en gel de agarosa.....	55
TRANSCRIPCIÓN REVERSA.....	55
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.....	56
ELECTROFORESIS DE DNA EN GEL DE AGAROSA.....	57
8) ENSAYOS EN CULTIVOS NEURONALES PRIMARIOS:	
PREPARACIÓN DE CULTIVOS NEURONALES PRIMARIOS DE CEREBELO DE RATÓN	
Preparación de discos para el cultivo.....	57
Disección, tripsinización y siembra.....	58
INMUNOCITOQUÍMICA DE CÉLULAS EN CULTIVO	
Fijación de las células.....	58
Inmunofluorescencia.....	59
9) PREPARACIÓN DE MEMBRANAS RESISTENTES A DETERGENTES POR FLOTACIÓN.....	59
10) DETERMINACIÓN DE COMPONENTES DE “RAFTS”:	
DETERMINACIÓN DE GM1.....	60
DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE COLESTEROL.....	60
11) ANTICUERPOS	
PREPARACIÓN DE UN ANTICUERPO POLICLONAL.....	61

Inmunización.....	61
Obtención del anticuerpo.....	61
ANTICUERPOS PRIMARIOS UTILIZADOS.....	61
ANTICUERPOS SECUNDARIOS UTILIZADOS.....	63
12) SOPORTES INFORMÁTICOS:	
BAD4.....	64
SigmaPlot 8.02.....	64
AdobePhotoshop7.0.....	64
TINA 2.....	64
EndNote 6.0.....	64
Capítulo 1: LOCALIZACIÓN DE LAS Ca²⁺-ATPasas DE RETÍCULO ENDOPLÁSMICO Y MEMBRANA PLASMÁTICA DE CEREBELO DE CERDO	
Resumen.....	65
INTRODUCCIÓN.....	66
RESULTADOS	
Aislamiento de fracciones subcelulares de cerebelo de cerdo y visualización por microscopía electrónica de transmisión.....	67
Actividad Ca ²⁺ -ATPasa en fracciones subcelulares de cerebelo de cerdo.....	68
Detección inmunológica de SERCA y PMCA en fracciones aisladas.....	69
Inmunodetección de SERCA y PMCA en secciones de sinaptosomas.....	72
Localización de SERCA en secciones de la corteza cerebelosa.....	73
Localización de PMCA en secciones de la corteza cerebelosa.....	75
DISCUSIÓN.....	79
Capítulo 2: EXPRESIÓN FUNCIONAL Y DISTRIBUCIÓN DE LAS BOMBAS DE CALCIO SERCA Y PMCA EN CEREBELO DE POLLO EN DESARROLLO	
Resumen.....	83
INTRODUCCIÓN.....	84
RESULTADOS	
Expresión funcional de SERCA y PMCA en vesículas de membrana durante el desarrollo..	85
Expresión de SERCA y PMCA en fracciones de membrana de cerebelo en desarrollo.....	88
Localización de SERCA y PMCA en secciones de cerebelo de pollo en desarrollo.....	90
DISCUSIÓN.....	97

Capítulo 3: ISOFORMAS DE LA Ca²⁺-ATPasa DE MEMBRANA PLASMÁTICA EN CEREBELO EN DESARROLLO

Resumen.....	101
INTRODUCCIÓN.....	102
RESULTADOS	
Distribución de isoformas PMCA en VM de cerebelo de pollo en el desarrollo pre-natal...103	
Localización de isoformas PMCA en secciones de cerebelo de pollo en desarrollo.....	105
Expresión funcional de PMCA en VM de cerebelo de ratón en el desarrollo post-natal.....	111
Distribución de isoformas PMCA en fracciones de cerebelo de ratón en desarrollo.....	112
Análisis de la expresión génica de isoformas PMCA en cerebelo de ratón en desarrollo....	113
Localización de isoformas PMCA en cultivos primarios de cerebelo de ratón.....	115
DISCUSIÓN.....	117

Capítulo 4: ASOCIACIÓN DE ISOFORMAS DE LA Ca²⁺-ATPasa DE MEMBRANA PLASMÁTICA EN DOMINIOS LIPÍDICOS DE MEMBRANAS DE CEREBELO

Resumen.....	123
INTRODUCCIÓN.....	124
RESULTADOS	
Distribución de lípidos y proteínas característicos de <i>rafts</i> en el gradiente de densidad.....	125
Distribución de isoformas PMCA en el gradiente de densidad.....	127
Análisis de la asociación PMCA- <i>rafts</i>	129
Sensibilidad a hidroxilamina de las isoformas PMCA.....	132
DISCUSIÓN.....	134

Capítulo 5: IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE SPCA1 EN CEREBELO DE CERDO

Resumen.....	137
INTRODUCCIÓN.....	138
RESULTADOS	
Identificación de SPCA1 en fracciones subcelulares de cerebelo de cerdo.....	138
Localización de SPCA1 en secciones de cerebelo. Comparación con la distribución de otras bombas de calcio.....	140
DISCUSIÓN.....	145

CONCLUSIONES.....147**BIBLIOGRAFÍA.....**149

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Esquema general del ciclo de reacción de las Ca^{2+} -ATPasas.....	3
Fig. 2 La Ca^{2+} -ATPasa de retículo sarco(endo)plásmico.....	5
Fig. 3 Opciones de procesamiento alternativo en el extremo C-terminal para las tres isoformas SERCA.....	5
Fig. 4 Células COS-4 sobre-expresando las isoformas SERCA2a y 2b.....	7
Fig. 5 La Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática.....	9
Fig. 6 Opciones de procesamiento alternativo para las cuatro isoformas PMCA.....	10
Fig. 7 Células COS-4 sobre-expresando las isoformas PMCA2, PMCA3 y PMCA4.....	11
Fig. 8 La Ca^{2+} -ATPasa de vías secretoras.....	15
Fig. 9 Opciones de procesamiento alternativo para la isoforma SPCA1.....	15
Fig. 10 Célula COS-4 sobre-expresando la isoforma SPCA1.....	16
Fig. 11 Representación esquemática de un microdominio lipídico “ <i>raft</i> ” en la bicapa.....	19
Fig. 12 Contacto sináptico entre neuronas en cultivo y representación esquemática de una sinapsis química.....	20
Fig. 13 Anatomía del sistema nervioso nentral y del cerebelo.....	21
Fig. 14 Imágenes del desarrollo de un embrión de pollo.....	23
Fig. 15 Diferenciación del cerebelo.....	24
Fig. 16 Últimas etapas en el desarrollo del cerebelo de pollo.....	24
Fig. 17 Corte transversal semi-esquemático de una laminilla cerebelosa de mamífero.....	25
Fig. 18 Interneuronas de la capa molecular.....	26
Fig. 19 Célula de Purkinje.....	27
Fig. 20 Capa granular.....	28
Fig. 21 Aferencias: fibras trepadoras y musgosas.....	29
Fig. 22 Sinapsis cerebelosas.....	30
Fig. 23 Esquema del circuito cerebeloso.....	31
Fig. 24 Plexos coroideos.....	32
Fig. 25 Encéfalo de cerdo fijado en formol al 4% y seccionado sagitalmente.....	37
Fig. 26 Procedimiento de aislamiento de sinaptosomas, vesículas de membrana plasmática sinaptosomal y microsomas de cerebelo de cerdo.....	38
Fig. 27 Procedimiento de aislamiento de vesículas de membrana de cerebelo de pollo o ratón.....	42
Fig. 28 Reacciones enzimáticas que se producen en el sistema acoplado de enzimas piruvato quinasa-lactato deshidrogenasa.....	45
Fig. 29 Micrografías de las fracciones subcelulares aisladas de cerebelo de cerdo.....	67
Fig. 30 Efecto de tapsigargina y vanadato en la actividad Ca^{2+} -ATPasa de fracciones subcelulares y PMCA purificada.....	68
Fig. 31 Electroforesis en gel al 6,5% de poliacrilamida en SDS de fracciones subcelulares y PMCA purificada de cerebelo de cerdo.....	69
Fig. 32 Inmunorreacción de fracciones subcelulares con los anticuerpos IID8 (A), Y/1F4 (B) y anti-SERCA2a (C).....	70
Fig. 33 Inmunorreacción de fracciones subcelulares y PMCA sinaptosomal purificada con los anticuerpos 5F10 (A) y pbPMCA (B).....	71
Fig. 34 Inmunodetección de bombas de calcio en secciones ultrafinas de sinaptosomas de cerebelo de cerdo con oro coloidal.....	73
Fig. 35 Localización de SERCA con el anticuerpo IID8 en secciones sagitales de criostato.....	74
Fig. 36 Inmunohistoquímica de secciones para-sagitales con el anticuerpo Y/1F4 para la localización de SERCA.....	75
Fig. 37 Localización de la PMCA en secciones usando el anticuerpo 5F10.....	76
Fig. 38 Localización de PMCA en secciones para-sagitales usando el anticuerpo pbPMCA.....	77
Fig. 39 Localización de SERCA, PMCA, calbindina y sinaptofisina en la corteza cerebelosa por microscopía de fluorescencia.....	78
Fig. 40 Actividad Ca^{2+} -ATPasa de SERCA y PMCA a diferentes estadios del desarrollo del cerebelo de pollo.....	86

Fig. 41 Transporte de calcio de SERCA y PMCA a diferentes estadios del desarrollo.....	87
Fig. 42 Inmunorreacción de los anticuerpos IID8 y 5F10 con fracciones de membrana de cerebelo en desarrollo.....	89
Fig. 43 Resumen de los ensayos cinéticos y de Western blot.....	90
Fig. 44 Localización de SERCA y PMCA en secciones para-sagitales de cerebelo de pollo en desarrollo.....	91
Fig. 45 Inmunodetección de SERCA y PMCA en la corteza cerebelosa de pollo en desarrollo.....	93
Fig. 46 Inmunofluorescencia de secciones de cerebelo de pollo en E12 con los anticuerpos 5F10 y anti-CaBP.....	94
Fig. 47 Inmunohistoquímica con los anticuerpos IID8 y 5F10 en secciones transversales de cerebelo de pollo del estadio E15.....	94
Fig. 48 Identificación de las proteínas SERCA y PMCA en la capa granular y en los núcleos profundos del cerebelo en el estadio P0.....	95
Fig. 49 Localización de proteínas SERCA y PMCA en los plexos coroideos.....	96
Fig. 50 Representación esquemática de los patrones de expresión temporal y espacial de las proteínas SERCA y PMCA en el desarrollo de la corteza cerebelosa de pollo.....	100
Fig. 51 Inmunodetección de proteínas PMCA en fracciones de membrana y secciones de cerebelo de pollo en desarrollo.....	104
Fig. 52 Inmunorreacción con el anticuerpo a-cb en secciones para-sagitales de cerebelo de pollo en desarrollo.....	105
Fig. 53 Inmunodetección de las isoformas PMCA1, PMCA2 y PMCA3 en secciones de cerebelo de pollo en desarrollo.....	107
Fig. 54 Localización de proteínas PMCA en la capa granular de cerebelo de pollo en P0 mediante ensayos de inmunofluorescencia.....	108
Fig. 55 Localización de isoformas PMCA en los núcleos profundos del cerebelo de pollo durante el desarrollo.....	109
Fig. 56 Inmunodetección de PMCA en los plexos coroideos del IV ventrículo en pollos de los estadios E10 y P0.....	110
Fig. 57 Actividad Ca ²⁺ -ATPasa y transporte de Ca ²⁺ de PMCA a diferentes estadios de desarrollo del cerebelo de ratón.....	111
Fig. 58 Inmunodetección de isoformas PMCA en VM de cerebelo de ratón en desarrollo.....	113
Fig. 59 Análisis de expresión de transcritos de las isoformas PMCA1 y 2 en cerebelo de ratón en desarrollo.....	114
Fig. 60 Inmunodetección de isoformas PMCA en cultivos primarios de cerebelo de ratón.....	116
Fig. 61 Representación de los patrones de expresión temporal y espacial de las isoformas PMCA en el desarrollo de la corteza cerebelosa de pollo.....	119
Fig. 62 Micrografía de vesículas de membrana plasmática sinaptosomal de cerebelo de cerdo.....	125
Fig. 63 Distribución del gangliósido GM1 y de colesterol en las fracciones de MPS extraídas con Brij 96 y sometidas a ultracentrifugación en gradiente de densidad de Nycodenz.....	126
Fig. 64 Distribución de la proteína marcadora de <i>rafts</i> PrP (A,B) y contenido total de proteínas (C) a lo largo del gradiente de densidad.....	127
Fig. 65 Distribución de las isoformas PMCA en las fracciones obtenidas del gradiente de densidad de Nycodenz.....	128
Fig. 66 Actividad Ca ²⁺ -ATPasa de PMCA en fracciones del gradiente de densidad.....	129
Fig. 67 Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las cuatro isoformas PMCA.....	130
Fig. 68 Sensibilidad a hidroxilamina de las isoformas PMCA.....	133
Fig. 69 Distribución de isoformas PMCA en la membrana plasmática sinaptosomal.....	136
Fig. 70 Inmunoreacción con los anticuerpos anti-SPCA1 y anti- γ -adaptina en fracciones subcelulares de cerebelo de cerdo.....	139
Fig. 71 Localización de SPCA1 en secciones para-sagitales de cerebelo de cerdo.....	140
Fig. 72 Doble inmunolocalización de SPCA1 con γ -adaptina, otras bombas de Ca ²⁺ y sinaptofisina en las capas de Purkinje y molecular.....	142
Fig. 73 Doble inmunolocalización de SPCA1 con γ -adaptina, otras bombas de calcio y sinaptofisina en la capa granular.....	143

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Reactivos utilizados para la preparación de los geles separador y concentrador de poliacrilmida para electroforesis en condiciones desnaturalizantes.....	47
Tabla 2	Secuencias de los cebadores utilizados en los ensayos de PCR.....	56
Tabla 3	Relación de anticuerpos primarios anti-SERCA.....	62
Tabla 4	Relación de anticuerpos primarios anti-PMCA.....	62
Tabla 5	Anticuerpo primario anti-SPCA.....	63
Tabla 6	Relación de otros anticuerpos primarios usados en los ensayos de inmunodetección.....	63
Tabla 7	Relación de anticuerpos secundarios usados en los ensayos de inmunodetección.....	63
Tabla 8	Comparación de secuencias de isoformas PMCA: residuos diferentes en la PMCA4 y comunes para las PMCA 1, 2 y 3.....	132
Tabla 9	Resumen de la distribución de SPCA1, γ -adaptina y otras bombas de calcio en la corteza cerebelosa de cerdo.....	144

INTRODUCCIÓN

EL CALCIO EN LA CÉLULA

El ión calcio (Ca^{2+}) desempeña un papel fundamental en el metabolismo y la fisiología de las células, controlando procesos que dependen de la amplitud, la frecuencia y la localización subcelular de las señales de Ca^{2+} citosólico (Berridge, 1993). En las células nerviosas, el Ca^{2+} interviene en funciones tan importantes como la plasticidad neuronal, el impulso nervioso, el envejecimiento neuronal o la apoptosis, entre otras (Squier y Bigelow, 2000). La regulación de la concentración de Ca^{2+} en estos procesos es crítica. La concentración de Ca^{2+} citosólico en neuronas en reposo oscila entre 50 y 300 nM, aumentando hasta el orden de μM en el inicio de muchos procesos neuronales. Una vez finalizados, la concentración de Ca^{2+} debe volver a los estados basales, pues de no ser así sería dañino para la célula. De hecho, numerosas enfermedades neurológicas llevan consigo una alteración de la homeostasis de Ca^{2+} (Mattson *et al.*, 2000). Por ello, es muy importante conocer en profundidad los sistemas implicados en mantener los niveles apropiados del Ca^{2+} intracelular.

En las células existen grandes diferencias en las concentraciones de Ca^{2+} entre el citoplasma, los orgánulos celulares y el exterior celular. De esta forma, se producen flujos de Ca^{2+} a través de las membranas que varían la concentración citosólica de este ión según el requerimiento celular. También existen proteínas que unen Ca^{2+} en el citoplasma que intervienen en su regulación. La entrada de Ca^{2+} al citosol de la célula se produce a través de canales específicos existentes en la membrana plasmática (*canales sensibles a voltaje* o

sensibles a ligandos) y en la membrana de orgánulos subcelulares que actúan como reservorios de Ca^{2+} (*receptor de IP_3* y *receptor de rianodina*). La disminución de la concentración de Ca^{2+} citosólico se produce por diferentes transportadores localizados en las membranas: el *intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$* (situado en la membrana plasmática, con una gran capacidad de transporte de Ca^{2+} desde el citosol al exterior celular, pero con una baja afinidad por Ca^{2+}), el *uniportador de Ca^{2+}* (localizado en la membrana mitocondrial, utiliza el gradiente electroquímico de protones para la entrada de Ca^{2+} dentro de la matriz) y las **ATPasas transportadoras de Ca^{2+}** (Ca^{2+} -ATPasas o bombas de calcio), que presentan una alta afinidad por Ca^{2+} . Se han identificado tres familias de bombas de Ca^{2+} : la *Ca^{2+} -ATPasa de Retículo Sarco(Endo)plásmico* (SERCA), la *Ca^{2+} -ATPasa de Membrana Plasmática* (PMCA) y la *Ca^{2+} -ATPasa de Vías Secretoras* (SPCA).

PROPIEDADES GENERALES DE LAS BOMBAS DE CALCIO: CICLO DE REACCIÓN

Las Ca^{2+} -ATPasas son responsables del transporte activo de iones Ca^{2+} a expensas de la hidrólisis de ATP en distintos tipos de membranas celulares. Son miembros de la clase de ATPasas de tipo P, denominadas así por formar un intermedio fosforilado durante su ciclo de reacción (Fig. 1). En la primera etapa de este ciclo, el Ca^{2+} se une al dominio citosólico de la enzima en su conformación de alta afinidad (E1) e inmediatamente se fosforila un residuo de ácido aspártico por ATP. Como consecuencia, la enzima fosforilada (E1P) cambia su conformación a un estado E2P que expone el Ca^{2+} al interior lumenal (en el caso de la SERCA o la SPCA) o al exterior celular (para la PMCA). Entonces, se produce la liberación del Ca^{2+} y la hidrólisis del intermedio fosforilado, causada por la baja afinidad a Ca^{2+} de la forma E2P de la bomba. Tras la disociación del intermedio fosforilado, la bomba vuelve a su conformación E1 (Lee, 2002).

Una etapa alternativa en el ciclo de reacción es la denominada “*slippage*” o deslizamiento, que implica la liberación del Ca^{2+} unido al intermedio fosforilado en el sitio citoplasmático de la membrana en lugar de ser transportado al lumen o al espacio extracelular. Este deslizamiento se ha descrito para la SERCA de músculo esquelético (Inesi y de Meis, 1989; Logan-Smith *et al.*, 2001) y muy recientemente se ha mostrado en nuestro laboratorio para la PMCA de cerebro (Palacios *et al.*, 2004). Como resultado de este

proceso, la hidrólisis de ATP no está acoplada al transporte de Ca^{2+} y la mayoría de la energía derivada de esa hidrólisis se utiliza en la producción de calor, contribuyendo al control térmico en mecanismos de hibernación y anoxia (de Meis, 2003).

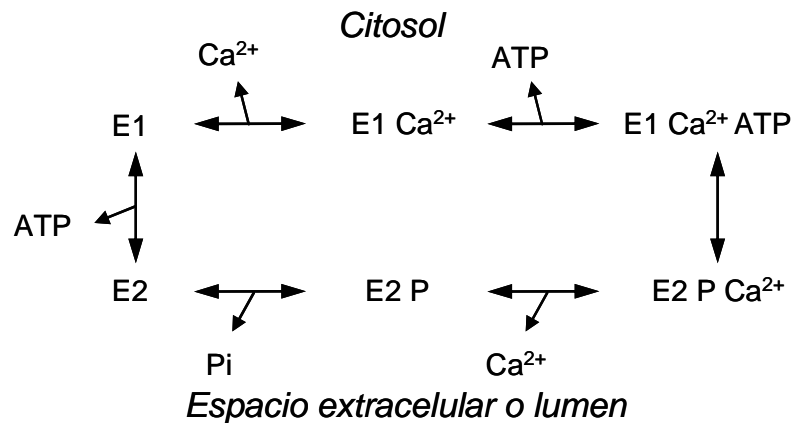


Fig. 1 Esquema general del ciclo de reacción de las Ca^{2+} -ATPasas. La enzima (E) existe en dos estados conformacionales: el primero (E1) une Ca^{2+} con alta afinidad en la cara citoplasmática de la membrana, el segundo (E2) tiene menor afinidad por Ca^{2+} y lo libera al otro lado de la membrana. El ATP fosforila un ácido aspártico antes de la translocación del Ca^{2+} . La estequiometría $\text{Ca}^{2+}/\text{ATP}$ no está especificada en el esquema, siendo 2/1 para la SERCA y 1/1 para la PMCA y la SPCA.

Los distintos tipos de bombas de Ca^{2+} comparten diversas propiedades básicas como son su alta afinidad por Ca^{2+} , similar organización de sus dominios catalíticos y diferentes conformaciones durante su ciclo de reacción. Sin embargo, presentan diferencias estructurales y funcionales que las caracterizan.

LA Ca^{2+} -ATPasa DE RETÍCULO SARCO(ENDO)PLÁSMICO

La bomba de Ca^{2+} de retículo sarco(endo)plásmico o SERCA se identificó y purificó por primera vez en retículo sarcoplásmico de músculo esquelético (Hasselbach, 1964; MacLennan, 1970). En este tejido, se encuentra la isoforma SERCA1 constituyendo el 90% del total de proteínas de membrana (Inesi, 1972), desempeñando un papel muy importante en la contracción/relajación muscular.

La SERCA es una proteína anfifílica, integrada en las membranas del retículo sarco(endo)plásmico. Transporta 2 iones Ca^{2+} desde el citoplasma al lumen de esos compartimentos utilizando la energía de hidrólisis del ATP en presencia de Mg^{2+} (Inesi,

1987). Además funciona como una bomba electrogénica en relación $1 \text{ Ca}^{2+}/1 \text{ H}^{+}$ (Yu *et al.*, 1993).

En el tejido nervioso, el contenido en SERCA es inferior al del músculo esquelético, encontrándose la isoforma SERCA2 en lugar de la SERCA1 (Salvador *et al.*, 2001). Sin embargo, desempeña un papel crucial en numerosos procesos neuronales regulados por Ca^{2+} (Simpson *et al.*, 1995). Diversos estudios con anticuerpos, inhibidores y análisis de patrones de fosforilación han aportado una importante información acerca de la distribución de la SERCA en fracciones subcelulares de cerebro, donde coexiste con la bomba de Ca^{2+} de membrana plasmática (Salvador y Mata, 1998; Salvador *et al.*, 2001).

Estructura de la SERCA

Los estudios más exhaustivos sobre la estructura y función de la SERCA se han realizado en retículo sarcoplásmico de músculo esquelético, que contiene sólo este tipo de Ca^{2+} -ATPasa (concretamente la isoforma SERCA1), y en concentraciones que facilitan su purificación. Estudios con proteasas (Migala *et al.*, 1973), con anticuerpos monoclonales y antipeptidos producidos frente a determinados segmentos (Mata *et al.*, 1989, 1992), mutagénesis dirigida (MacLennan, 1990) y transferencia de energía de fluorescencia (Mata *et al.*, 1993; Stefanova *et al.*, 1993a,b), entre otros, han contribuido a la elaboración de su modelo estructural. Sin embargo, la formación de cristales tridimensionales de SERCA1 y de imágenes de alta resolución (2,6 Å) obtenidas por microscopía crioelectrónica de cristales tubulares (Toyoshima *et al.*, 2000) han permitido obtener una información más amplia sobre la estructura de la SERCA, así como de los mecanismos cinéticos de la proteína y de los cambios conformacionales asociados con la unión de Ca^{2+} (Lee y East, 2001; Toyoshima *et al.*, 2003).

La proteína SERCA está constituida por unos 1.000 aminoácidos y tiene una masa molecular de aproximadamente 110 kDa. Presenta los extremos N-terminal y C-terminal hacia el citoplasma y 10 dominios transmembranales. Tiene una cabeza globular constituida por 2 dominios citoplasmáticos, uno de los cuales es el *dominio catalítico*, que es donde se encuentra el ácido aspártico que se fosforila y el sitio de unión de ATP (Fig. 2).

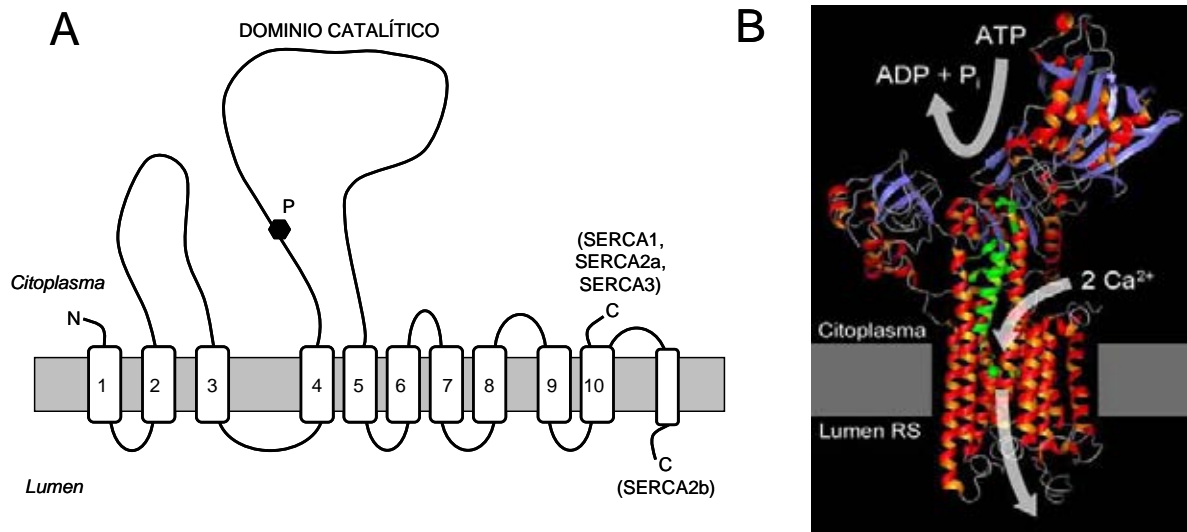


Fig. 2 La Ca^{2+} -ATPasa de retículo sarco(endo)plásmico. A, representación esquemática de la estructura de la SERCA, mostrando los segmentos transmembranales numerados, el dominio catalítico, el sitio de fosforilación (P) y el extremo C-terminal para las distintas isoformas. B, modelo tridimensional de la SERCA1.

Isoformas SERCA

La SERCA es producto de una familia multigénica. Se han identificado 3 genes que dan lugar a las isoformas SERCA1, SERCA2 y SERCA3, y a una diversidad adicional de variantes de estas isoformas mediante procesamiento alternativo (Fig. 3).

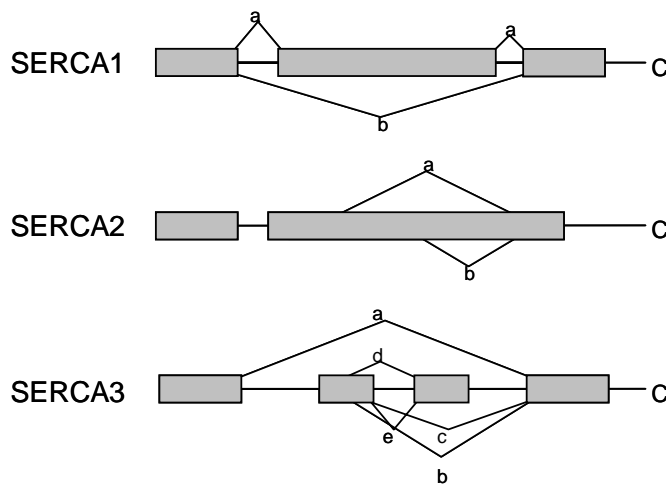


Fig. 3 Opciones de procesamiento alternativo en el extremo C-terminal para las tres isoformas SERCA. Modificado de Wuytack *et al.* (2002).

SERCA1: el gen *ATP2A1* codifica las proteínas SERCA1a (en adultos) y SERCA1b (neonatal) que difieren en su región C-terminal (Brandl *et al.*, 1987). Ambas son específicas del músculo esquelético de contracción rápida, contribuyendo al flujo de Ca^{2+} implicado en la contracción/relajación muscular y siendo la SERCA1a el 90% de la proteína total en músculo estriado. Mutaciones autosómicas recesivas en el gen de SERCA1 se han asociado con la enfermedad de Brody en humanos (Odermatt *et al.*, 1996), una miopatía rara y hereditaria caracterizada por un aumento perjudicial de la relajación del músculo esquelético durante el ejercicio y que produce rigidez y calambres.

SERCA2: el gen *ATP2A2* da lugar a las variantes SERCA2a y 2b, que difieren en el dominio C-terminal por una secuencia extra en la SERCA2b que da lugar a un dominio transmembranal adicional (Figs. 2A y 3). Este dominio parece ser responsable de una mayor afinidad por Ca^{2+} de la SERCA2b respecto a la SERCA2a (Verboomen *et al.*, 1994). La SERCA2a (Fig. 4) se expresa abundantemente en músculo cardíaco (Lytton y MacLennan, 1988) estando su alteración implicada en procesos de hipertrofia y fallo cardíaco (del Monte y Hajjar, 2003). También se encuentra en músculo esquelético de contracción lenta (MacLennan *et al.*, 1985) y en músculo liso (Eggermont *et al.*, 1989). La SERCA2b (Fig. 4) es la principal isoforma del tejido nervioso (Salvador *et al.*, 2001), aunque también se localiza en músculo liso y en tejidos no musculares como la piel. Mutaciones en SERCA2b autosómicas dominantes están asociadas a la enfermedad de Darier en humanos (Sakuntabhai *et al.*, 1999), una alteración de la piel caracterizada por pérdida de adhesión entre las células epidérmicas y una queratinización anormal. En algunas familias con esta enfermedad se han descrito además problemas neuropsiquiátricos como epilepsia, esquizofrenia, desorden bipolar y depresión (Jones *et al.*, 2002).

SERCA3: el gen *ATP2A3* codifica para 5 variantes de la SERCA3 (a-e). Es la isoforma identificada más recientemente y se diferencia funcionalmente en una menor afinidad por Ca^{2+} y un menor pH óptimo de actividad (Lytton *et al.*, 1992; Poch *et al.*, 1998). Se expresa en células no musculares (Ozog *et al.*, 1998) y generalmente junto con SERCA2b. En el tejido nervioso, se ha mostrado la presencia de SERCA3 en el cerebelo de rata (Baba-Aissa *et al.*, 1996a), pero no se ha detectado en cerebro de cerdo (Salvador *et al.*, 2001). La SERCA3 parece tener una función especial en la relajación del músculo liso vascular y en la regulación de la secreción de insulina. De hecho, mutaciones en SERCA3 parecen estar implicadas en la diabetes tipo II (Varadi *et al.*, 1999). También se ha mostrado su implicación en cáncer de colon y leucemia (Brouland *et al.*, 2005; Papp *et al.*, 2004).

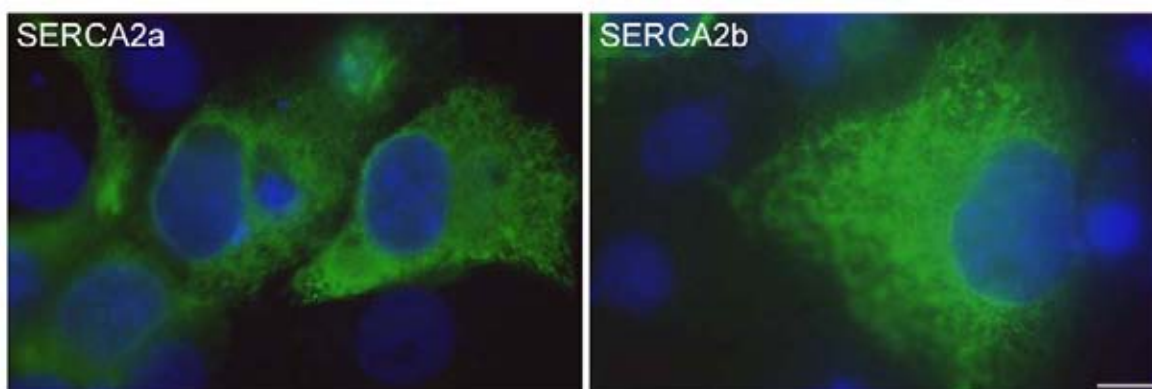


Fig. 4 Células COS-4 sobre-expresando las isoformas SERCA2a y 2b. Las células se transfectaron con el cDNA de SERCA2a y SERCA2b (verde) de cerdo insertado en el plásmido pSV45, se mantuvieron en cultivo 3 días y se realizaron inmunocitoquímicas con anticuerpos específicos. El núcleo de las células se tiñó con DAPI (azul). Barra de escala: 3 μ m.

Regulación de la SERCA

Las isoformas SERCA1 y SERCA2 se modulan por *fosfolambano* (6 kDa) y su homólogo *sarcolipina* (3,7 kDa), que son proteínas de membrana del retículo endoplásmico de ciertas células musculares, donde actúan como inhibidores reversibles (James *et al.*, 1989a; Odermatt *et al.*, 1998). La SERCA2b también se modula por las proteínas *calreticulina* y *calnexina*, también presentes en el retículo (John *et al.*, 1998; Roderick *et al.*, 2000).

El inhibidor más específico de SERCA que se conoce, y que no afecta a otras bombas de calcio, es la *tapsigargina* (Sagara *et al.*, 1992), una lactona sesquiterpénica que se extrae de las raíces de la *Thapsia garganica*. Este inhibidor lleva a la SERCA a un estado inactivo irreversible mediante su unión a la enzima en la conformación E2.

Otros inhibidores menos específicos son el *vanadato* que sólo inhibe a la SERCA a concentraciones superiores a 20 μ M (Caroni y Carafoli, 1981), el *lantano*, que inhibe la formación de fosfoproteína SERCA (Wuytack y Raeymaekers, 1992), el *ácido ciclopiazónico* y la *2,5-di-(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinona* (Inesi y Sagara, 1994). En el tejido nervioso, el uso de estos inhibidores en ensayos cinéticos y de fosforilación ha permitido determinar la mayor contribución de SERCA a la actividad Ca^{2+} -ATPasa total en la fracción microsomal aislada de cerebro de cerdo (Salvador y Mata, 1998).

LA Ca^{2+} -ATPasa DE MEMBRANA PLASMÁTICA

La bomba de Ca^{2+} de membrana plasmática o PMCA se identificó y purificó por primera vez en eritrocitos (Schatzmann, 1966; Nigli *et al.*, 1979), donde se ha estudiado tradicionalmente por ser el único tipo de bomba de Ca^{2+} en esta célula. Se expresa en la mayoría de las células eucariotas, pero en un porcentaje muy bajo, alrededor del 0,1% del total de proteínas de membrana (Garrahan y Rega, 1990). En términos de abundancia total de PMCA, el sistema nervioso es el tejido donde más altamente se expresa (Strehler y Treiman, 2004). Se ha purificado la PMCA de cerebro de rata (Hakim *et al.*, 1982) y posteriormente de cerebro de cerdo (Salvador y Mata, 1996), utilizando la afinidad de la proteína por calmodulina para la purificación, como en eritrocitos. Salvador y Mata optimizaron el método y el rendimiento de la purificación, realizándola en ausencia de lípidos y utilizando glicerol como agente estabilizante. De esta forma, se puede posteriormente reconstituir la PMCA en presencia de distintos lípidos, lo que ha permitido analizar en detalle el efecto sobre la proteína de sustancias neuromoduladoras como la espermina (Palacios *et al.*, 2003), el antipsicótico tioridazina (Palacios *et al.*, 2004), y el etanol (Sepúlveda *et al.*, 2004), entre otros.

La PMCA utiliza la energía de hidrólisis del ATP en presencia de Mg^{2+} para transportar Ca^{2+} del citosol al exterior de la célula, con un mecanismo de reacción para el transporte de Ca^{2+} similar al de la SERCA (ver Figura 1). Sin embargo, tiene una estequiometría molar $\text{Ca}^{2+}/\text{ATP}$ de 1/1 y se comporta como una bomba electrogénica en relación 1 $\text{Ca}^{2+}/1 \text{H}^+$ para la bomba de eritrocito (Hao *et al.*, 1994) y 1 $\text{Ca}^{2+}/0,6 \text{H}^+$ para la de cerebro (Salvador *et al.*, 1998). Esta bomba es el único transportador de Ca^{2+} de alta afinidad de la membrana plasmática, lo que implica un papel importante, no solo en la regulación global del Ca^{2+} intracelular, sino también realizando un fino ajuste de la concentración de Ca^{2+} en eventos próximos a la membrana plasmática que engloban picos y oscilaciones en los niveles de Ca^{2+} .

Estructura de la PMCA

La PMCA es una proteína anfifílica de unos 1.200 aminoácidos y con una masa molecular alrededor de 140 kDa. Aún no se ha conseguido cristalizar, por lo que la

información sobre su estructura es todavía bastante limitada. El modelo topológico más aceptado predice muchas analogías con el establecido para la SERCA1, pero difiere fundamentalmente en la presencia de un dominio adicional autoinhibidor de 30 aminoácidos en el extremo C-terminal, que constituye un dominio de unión de calmodulina. El modelo incluye la existencia de 10 segmentos transmembranales y tres dominios citoplasmáticos principales (Fig. 5).

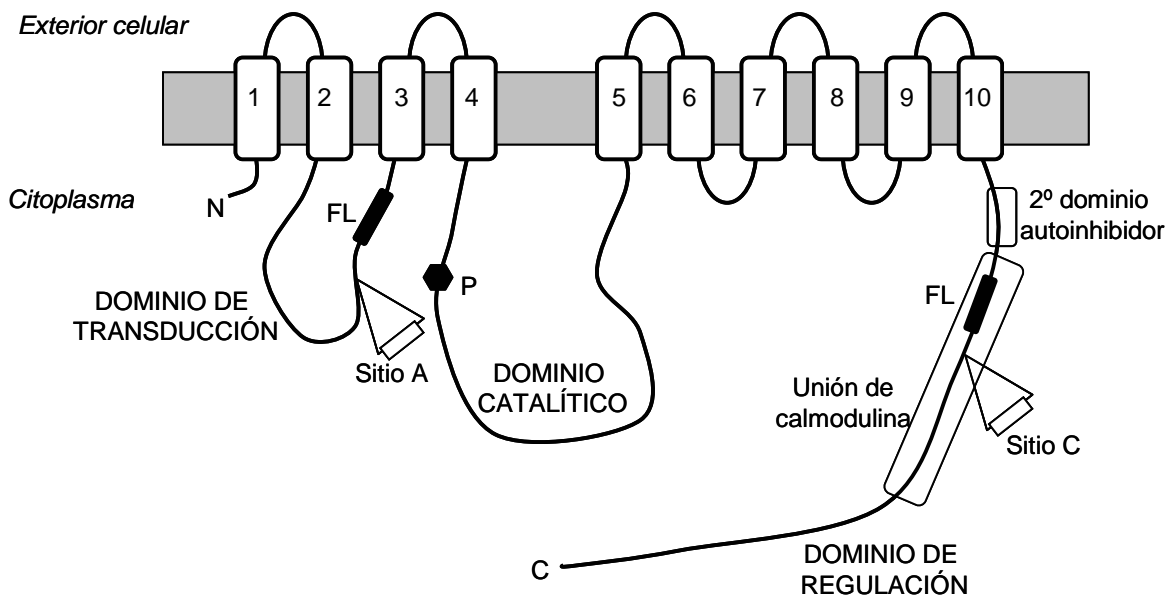


Fig. 5 La Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática. Representación esquemática de la estructura de la PMCA, mostrando los 10 segmentos transmembranales numerados, así como los dominios de transducción, catalítico y de regulación. FL indica los sitios de unión de fosfolípidos y P el sitio de fosforilación. También se señalan los sitios A y C de procesamiento alternativo.

El primer dominio citosólico (*dominio de transducción*) contiene una región de unión de fosfolípidos ácidos y uno de los dos sitios de interacción con el dominio de unión de calmodulina. El segundo dominio (*catalítico*) contiene el sitio de formación del aspartil fosfato y el sitio de unión de ATP. Se ha sugerido una región bisagra flexible donde se encuentra el segundo sitio de interacción con el dominio de calmodulina. El tercer dominio (*de regulación*) es el dominio autoinhibidor y contiene distintos sitios de interacción con moléculas implicadas en la regulación de la actividad de la bomba, entre ellos el de unión a fosfolípidos ácidos y el de calmodulina (Strehler y Zacharias, 2001).

Isoformas PMCA

Se han identificado 4 genes que codifican para las isoformas PMCA1, PMCA2, PMCA3 y PMCA4, existiendo más de 20 variantes distintas por procesamiento alternativo del transcrito primario (Strehler y Zacharias, 2001). El número y tamaño de los exones que codifican para las distintas proteínas están altamente conservados, pudiendo originarse a partir de un ancestro común por duplicación génica. El procesamiento alternativo en la PMCA tiene lugar a partir de dos regiones principales (Fig. 5 y 6): *sitio A* (cercano al sitio de unión de fosfolípidos del primer dominio citosólico) y *sitio C* (localizado en el dominio de regulación del C-terminal). Por combinaciones en estos sitios se obtienen las distintas variantes. Todos los tejidos y tipos celulares expresan al menos una PMCA, aunque su distribución a nivel de isoforma y variantes parece ser dependiente del tipo celular.

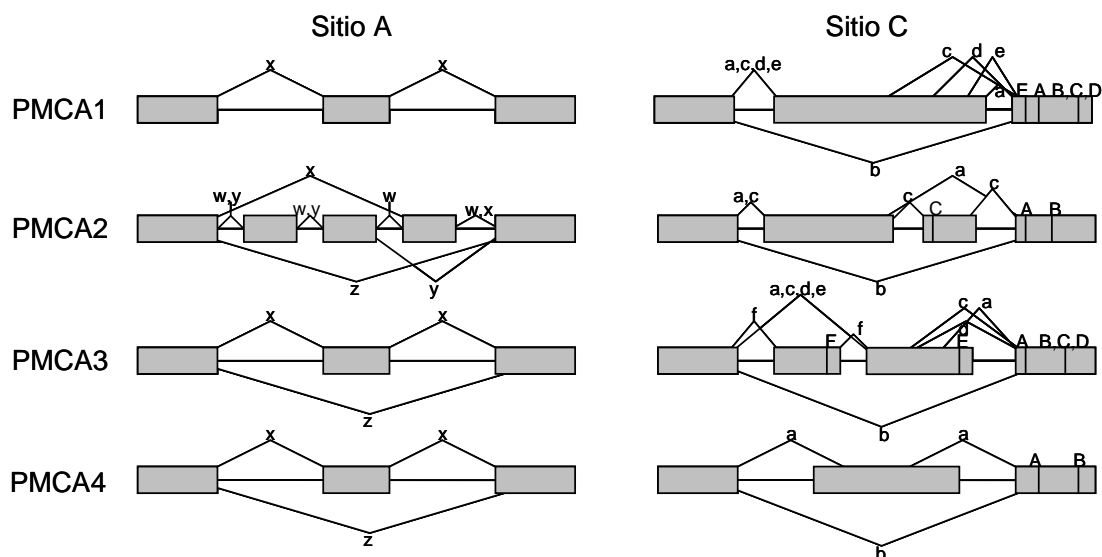


Fig. 6 Opciones de procesamiento alternativo para las cuatro isoformas PMCA. Modificado de Strehler y Zacharias (2001).

PMCA1: el gen *ATP2B1* codifica las distintas variantes de la PMCA1 (a-e). La PMCA1 se expresa en la mayoría de las células y tejidos eucariotas, aunque sus niveles de expresión y distribución de variantes son altamente variables y dependientes del momento celular y del tipo de célula. Estudios con ratones transgénicos carentes de PMCA1 han mostrado que la pérdida de PMCA1 es letal a nivel embrionario (Okunade *et al.*, 2004).

PMCA2: el gen *ATP2B2* codifica para las variantes de PMCA2 producidos por una combinación de los dos sitios de procesamiento, en el sitio A (w, x y z) y en el sitio C (a, b

y c). La proteína PMCA2 (Fig. 7) tiene una distribución muy restringida, expresándose principalmente en el sistema nervioso, y a bajos niveles en las glándulas mamarias, el músculo esquelético, corazón, estómago, hígado, riñón y pulmón. Los primeros indicios asociados a funciones específicas de la PMCA2 han salido a la luz por su alta expresión en el oído interno y a estudios recientes que han mostrado problemas de equilibrio y sordera en animales con mutaciones en este gen, causados por la pérdida o malfunción de la PMCA2 (Kozel *et al.*, 1998; Takahashi y Kitamura, 1999; Ueno *et al.*, 2002).

PMCA3: el gen *ATP2B3* da lugar a variantes de la isoforma PMCA3 por combinación en el procesamiento alternativo en el sitio A (x y z) y en el sitio C (a, b y c). La PMCA3 (Fig. 7) se expresa principalmente en el sistema nervioso central, seguido de músculo esquelético y riñón.

PMCA4: el gen *ATP2B4* codifica la proteína PMCA4 y sus variantes, procesados en el sitio A (x y z) y sitio C (a, b, d). La PMCA4 (Fig. 7) se expresa en la mayoría de células y tejidos, siendo el 70% del total de PMCA en eritrocitos y altamente expresada en tejido nervioso. Estudios con ratones transgénicos carentes de la isoforma PMCA4 son saludables aparentemente, pero los machos son estériles por defecto en la movilidad de sus espermatozoides (Okunade *et al.*, 2004; Schuh *et al.*, 2004).

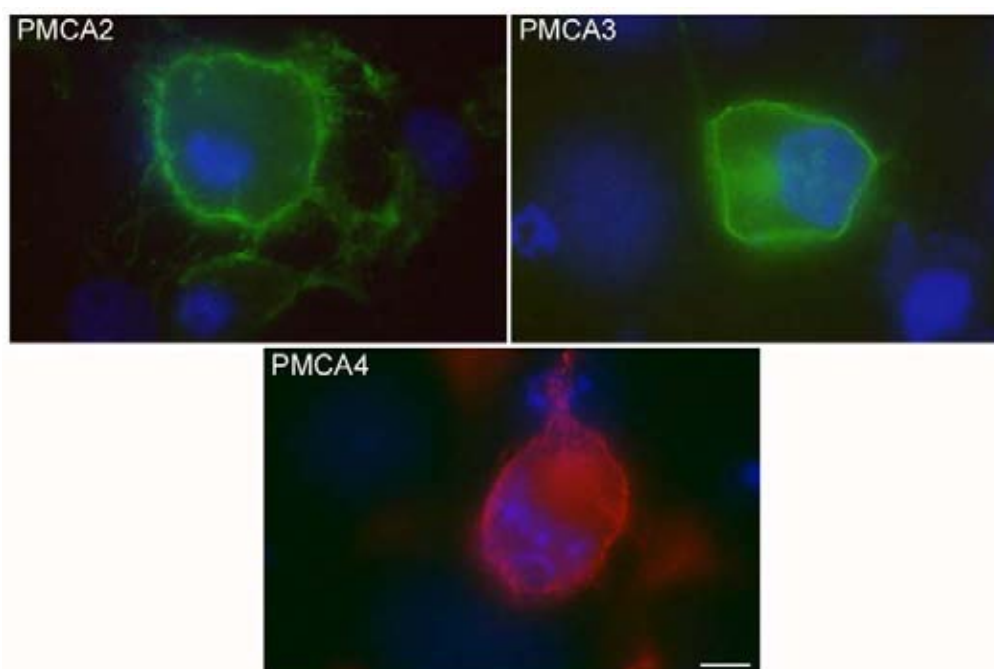


Fig. 7 Células COS-4 sobre-expresando las isoformas PMCA2, PMCA3 y PMCA4. Las células se transfectaron con el cDNA de PMCA2 de humano (verde), PMCA3 de rata (verde) y PMCA4 de humano (rojo) insertado en el plásmido pMM2, se mantuvieron en cultivo 3 días y se realizaron inmunocitquímicas con anticuerpos específicos. El núcleo de las células se tiñó con DAPI (azul). Barra de escala: 3 μ m.

En el tejido nervioso, la PMCA se distribuye principalmente en neuronas, aunque también se han identificado en células gliales (Fresu *et al.*, 1999). Algunas de las isoformas parecen ser específicas de tipos celulares concretos, mientras que otras como la PMCA1 y la PMCA4 se encuentran en casi todas las regiones del sistema nervioso (Lehotsky, 1995).

Actualmente, no se conocen enfermedades humanas relacionadas con las PMCA, ya sea debido a que la alta cantidad de variantes existentes de esta bomba produzcan una redundancia funcional que impida detectar disfunciones o pérdidas de una de ellas, o a que la pérdida de una de ellas sea causa de letalidad. En cualquier caso, recientes estudios comienzan a dar indicios de la implicación de estas bombas en condiciones patológicas en los que la anormal regulación de Ca^{2+} juega un papel importante, como la hipertensión, el cáncer o los desórdenes neurodegenerativos (Lehotsky *et al.*, 2002).

Regulación de la PMCA

La PMCA se caracteriza por estar altamente regulada por distintos moduladores. Entre ellos destacan:

Calmodulina: cuando la concentración de Ca^{2+} en la proximidad de la bomba es baja (menor a 50-100 nM), la PMCA se encuentra en un estado autoinhibido, donde el extremo C-terminal establece contactos intramoleculares con el primer y segundo dominio citosólico (dominios de transducción y catalítico). La calmodulina, una proteína de 17 kDa presente en todas las células eucariotas y con 4 sitios de unión con alta afinidad a Ca^{2+} , puede interactuar con el dominio de regulación de la bomba (Fig. 5), desplazándolo y eliminando la autoinhibición, logrando así incrementar considerablemente la afinidad de la PMCA por Ca^{2+} y su actividad enzimática (Carafoli, 1994). La afinidad por calmodulina es diferente para las distintas isoformas, posiblemente relacionada con un distinto papel en la regulación global y local de Ca^{2+} .

Fosfolípidos: el entorno lipídico tiene un papel muy importante en la función de la bomba. La PMCA contiene en sus dominios de transducción y de regulación 2 sitios de unión de fosfolípidos ácidos (indicados en la Fig. 5). Estos modulan la actividad de la PMCA mediante un efecto bifásico, ya que pequeñas cantidades de estos fosfolípidos activan la PMCA, pero grandes cantidades la inhiben (Missiaen *et al.*, 1989).

Proteolisis: la PMCA se puede activar por eliminación de su dominio de autoinhibición mediante la acción proteolítica controlada de tripsina y calpaína (Zurini *et al.*, 1984).

Proteínas quinasas A y C: el dominio de regulación es muy rico en residuos de serina y treonina, dianas para la fosforilación por proteínas quinasas A y C. Esto logra incrementar la velocidad máxima de la PMCA (James *et al.*, 1989b; Zylinska *et al.*, 1998).

Oligomerización: ensayos con la enzima purificada mostraron que, cuando la concentración de la bomba purificada es superior a 10-20 nM, ésta puede activarse por auto-asociación a través del dominio de unión de calmodulina (Kosk-Kosicka y Bzdega, 1988). Estos estudios presentan dímeros como nivel de agregación, aunque se discute su realidad fisiológica dado el bajo nivel de expresión que tiene esta enzima en las células.

Segundo dominio autoinhibidor: estudios del efecto de etanol sobre la PMCA sinaptosomal purificada de cerebro de cerdo han mostrado evidencias de un subdominio autoinhibidor próximo al de calmodulina en el C-terminal (Sepúlveda *et al.*, 2004). El etanol podría interactuar directamente con este dominio (Fig. 5), desplazándolo y estimulando la actividad de la PMCA de forma adicional a la estimulación por calmodulina. La ingestión de etanol podría sobre-estimular la PMCA, pudiendo afectar drásticamente a la transmisión nerviosa en los individuos.

Inhibidores: actualmente el inhibidor más específico de la PMCA que se conoce es el *vanadato*, que inhibe fuertemente a la PMCA a concentraciones menores de 10 μM (Caroni y Carafoli, 1981). Aunque, como se mencionó anteriormente, el vanadato puede inhibir a la SERCA cuando la concentración es superior a 20 μM , se puede utilizar para inhibir selectivamente a la PMCA a concentraciones inferiores.

Hasta hace muy poco la SERCA y la PMCA se consideraban los dos únicos tipos de bombas de calcio existentes en mamíferos. El descubrimiento en los últimos años de un nuevo tipo de bomba en las vías de secreción de las células y su muy reciente identificación en el tejido nervioso, ha ido modificando muchos planteamientos durante el transcurso de esta Tesis.

LA Ca^{2+} -ATPasa DE VÍAS SECRETORAS

La Ca^{2+} -ATPasa de vías secretoras o SPCA representa un tercer tipo de bomba de Ca^{2+} . Está íntimamente relacionada con la Pmr1 (*Plasma membrane ATPase-related*) de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* que no expresa proteína SERCA (Rudolph *et al.*, 1989). Se han identificado homólogos de esta proteína en hongos, gusanos, insectos, mamíferos e incluso en bacterias, sugiriendo que esta bomba podría representar el tipo más antiguo y ampliamente expresado de bombas de Ca^{2+} (Sorin *et al.*, 1997). La primera que se clonó de mamíferos fue la de rata (Guntenski-Hamblin *et al.*, 1992).

La SPCA presenta numerosas similitudes con las proteínas SERCA y PMCA en cuanto a su estructura primaria y a la conservación de los residuos críticos para el funcionamiento de la bomba, como los sitios de fosforilación y de unión de ATP. Transporta Ca^{2+} con afinidad similar a la SERCA, pero a diferencia de la SERCA y de la PMCA, la SPCA también transporta iones Mn^{2+} con alta afinidad (Van Baelen *et al.*, 2001). La estequiometría catión/ATP de 1/1 (Wei *et al.*, 2000), como la PMCA.

En levaduras y en mamíferos, las proteínas Pmr1 y SPCA se han identificado principalmente en las vías de secreción (complejo de Golgi y diferentes tipos de vesículas de secreción), donde su función transportando Ca^{2+} o Mn^{2+} parece ser importante en el procesamiento, plegamiento y glicosilación de proteínas (Oda, 1992). Además, en levaduras, ejerce un importante papel en la detoxificación de Mn^{2+} , pues altas concentraciones de Mn^{2+} interfieren con los sitios de unión de Mg^{2+} de muchas proteínas, afectando drásticamente a la supervivencia de estos organismos. La eliminación del exceso de Mn^{2+} del citoplasma parece realizarse mediante su transporte por la SPCA al interior de los compartimentos del Golgi y la posterior exocitosis (Hirata, 2002).

Además de estas funciones, la presencia en los complejos de Golgi de canales de Ca^{2+} y de proteínas que unen Ca^{2+} , así como la respuesta de SPCA a ATP en estudios *in vitro* (Missiaen *et al.*, 2001; Missiaen *et al.*, 2002a), dan indicios del papel dinámico en la homeostasis intracelular de estos reservorios.

Estructura de la SPCA

La secuencia de la SPCA contiene unos 950 aminoácidos y su peso molecular es de aproximadamente 100 kDa. Por alineamiento de secuencias y construcción de modelos (Wuytack *et al.*, 2002; Van Baelen *et al.*, 2004) se han podido identificar los 10 segmentos transmembranales y su similitud estructural con otras bombas de calcio (Fig. 8).

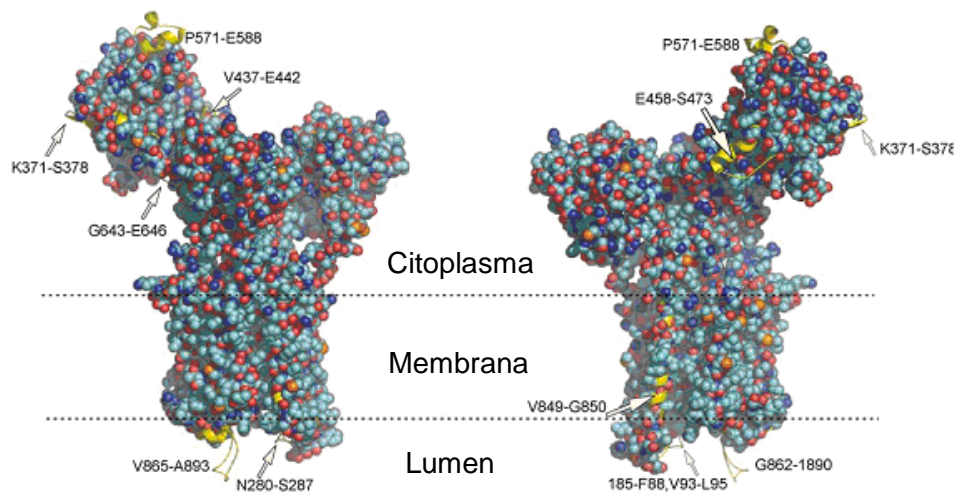


Fig. 8 La Ca^{2+} -ATPasa de vías secretoras. Estructuras superpuestas de SERCA1 (amarillo) y una predicción de SPCA1 (esferas). Modificado de Van Baelen *et al.* (2004).

Isoformas SPCA

Se han identificado dos genes que codifican para las isoformas SPCA1 y SPCA2, que difieren básicamente en el extremo C-terminal.

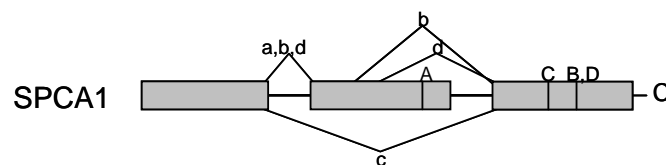


Fig. 9 Opciones de procesamiento alternativo para la isoforma SPCA1. Modificado de Van Baelen *et al.* (2004).

SPCA1: es codificada por el gen *ATP2C1*. Por procesamiento alternativo, este gen da lugar a cuatro variantes de la isoforma SPCA1 (a, b, c y d; Fig. 9). La variante SPCA1a es más larga que SPCA1b, pero no forma un dominio transmembranal adicional como en el caso de SERCA2b. No se han encontrado diferencias funcionales hasta el momento entre variantes. La SPCA1 (Fig. 10) se localiza en muchos tipos celulares, siendo altamente expresada en los queratinocitos epidérmicos. Mutaciones en el gen *ATP2C1* están asociadas con la enfermedad autosómica recesiva de Hailey-Hailey (Hu *et al.*, 2000), un desorden asociado a los queratinocitos que da lugar a ampollas en diversas áreas de la piel. La desregulación de la concentración de Ca^{2+} y/o Mn^{2+} en el Golgi de estas células parece afectar a mecanismos de glicosilación, procesamiento proteolítico, adhesión celular, etc., que desencadenan la enfermedad.

SPCA2: el gen *ATP2C2* codifica la isoforma SPCA2 y presenta un 60% de identidad en su secuencia comparada con la de la SPCA1. Su distribución es más restringida que la SPCA1, expresándose en el tracto gastrointestinal, médula ósea, tráquea y próstata (Vanoevelen *et al.*, 2005). Sin embargo, aún no existen evidencias de la capacidad de transporte de la SPCA2 ni de su función biológica.

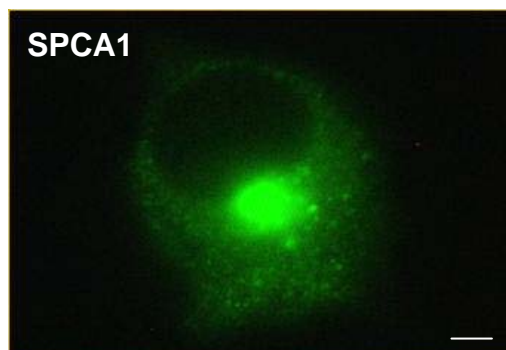


Fig. 10 Célula COS-4 sobre-expresando la isoforma SPCA1. Se transfectó con el cDNA de SPCA1 de humano insertado en el plásmido pSV45, se mantuvieron en cultivo 3 días y se realizó una inmunocitoquímica con un anticuerpo específico. Barra de escala: 3 μm

Regulación de SPCA

Como todas las ATPasas de tipo P, la SPCA también se inhibe por *vanadato*. No es sensible a *tapsigargina* por debajo de 5 μM (Sorin *et al.*, 1997), y es menos sensible que la SERCA a la inhibición por *ácido ciclopiazónico* o *2,5-di-(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinona* (Missiaen *et al.*, 2002b).

MEMBRANAS BIOLÓGICAS Y MICRODOMINIOS LIPÍDICOS

Las membranas celulares tienen como base estructural una capa bimolecular de lípidos que constituye una barrera al paso de sustancias hidrosolubles y donde se encuentran integradas o laxamente asociadas las proteínas de membrana. Esta composición, planteada en el modelo del "mosaico fluido" (Singer y Nicolson, 1972), propone a la membrana como una estructura heterogénea y dinámica. En este sentido, recientes estudios han comenzado a sugerir que no todos los lípidos en la membrana están en un estado fluido y se propone la existencia de microdominios lipídicos cuya composición difiere del resto de la membrana. Estos dominios están enriquecidos en colesterol y esfingolípidos, se encuentran en estado líquido ordenado (Fig. 11) y se han denominado “*rafts*” o balsas lipídicas (Simons e Ikonen, 1997).

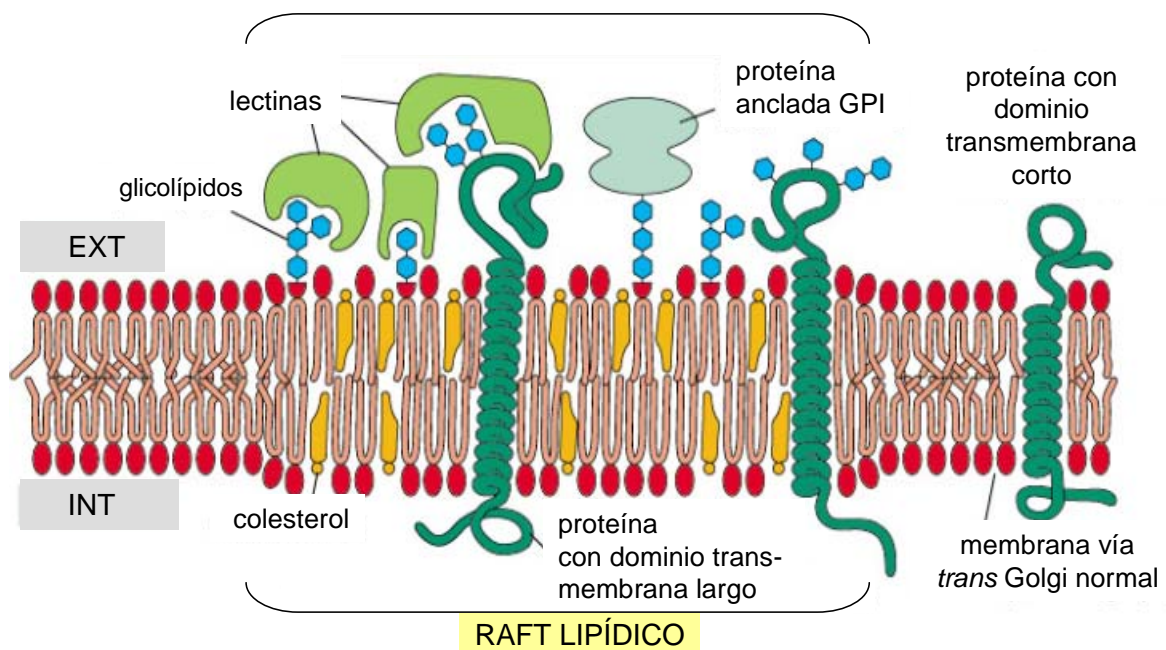


Fig. 11 Representación esquemática de un microdominio lipídico “*raft*” en la bicapa.

La bicapa lipídica en los *rafts* está fuertemente empaquetada y es también asimétrica. Presenta gran cantidad de esfingolípidos y glicosfingolípidos en la cara exoplásmica y glicerolípidos (como fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina) en la cara citoplasmática, estando el colesterol en alta cantidad en ambas caras (Simons e Ikonen, 1997). El alto grado

de empaquetamiento estructural debido al enriquecimiento en lípidos con alta proporción de cadenas saturadas y al colesterol confiere a estos microdominios alta resistencia a la extracción con detergentes y flotabilidad tras ultracentrifugación en gradientes de densidad (Arni *et al.*, 1998).

Un tipo de *rafts* muy estudiado por su característica morfología son las caveolas (Anderson, 1998), pequeñas invaginaciones de membrana plasmática enriquecidas en la proteína caveolina. Se encuentran en muchos tipos celulares, aunque parece ser que no existen en células neurales.

Los *rafts* lipídicos parecen estar implicados en multitud de funciones celulares, entre las que destaca la transducción de señales. De hecho, un número importante de las proteínas encontradas en *rafts* son proteínas G, proteínas quinasas como las tirosina quinasas y las guanilato quinasas asociadas a membrana (MAGUKs), etc., relacionadas con la señalización celular (Miura *et al.*, 2001). Este hecho parece conferir a estos dominios una especialización en esta función, aumentando la rapidez durante la señalización y evitando el cruce de vías (Simons e Ikonen, 1997).

Diversos estudios han mostrado que ciertos patógenos parecen desarrollar su ataque estratégico a través de los *rafts*. Así, virus como el HIV (Mahfoud *et al.*, 2002; Ono y Freed, 2001), el del ébola (Bavari *et al.*, 2002), o el influenza (Scheiffele *et al.*, 1997), entre otros, usan los *rafts* lipídicos en algún momento de su mecanismo de infección. También existen evidencias de proteínas asociadas a *rafts* que intervienen en procesos como la producción de anticuerpos del sistema inmune (Petrie *et al.*, 2000), la agregación plaquetaria (Papanikolaou *et al.*, 2005) o la fertilidad del esperma (Kondoh *et al.*, 2005).

Respecto al sistema nervioso, diversos autores han mostrado que los *rafts* pueden desempeñar un papel importante en enfermedades neurodegenerativas, como son las relacionadas con la proteína Prión (PrP) y la ataxia cerebelosa (Legname *et al.*, 2002) o la enfermedad de Alzheimer (Mahfoud *et al.*, 2002; Molander-Melin *et al.*, 2005). De esta forma, estos microdominios constituyen un campo muy interesante y novedoso de estudio, relacionado con la búsqueda de una función específica de proteínas de membrana localizadas en *rafts* lipídicos.

EL CALCIO EN EL SISTEMA NERVIOSO

La gran cantidad de células, tejidos y órganos que constituyen un organismo celular necesitan que sus funciones estén perfectamente reguladas y coordinadas. Para ello, juega un papel esencial el *sistema nervioso* mediante sus funciones sensitiva, integradora de información y motora, que se realizan en acciones rápidas y directas. Presenta un elevado grado de desarrollo en la escala evolutiva debido a la especialización de su unidad fundamental, la *neurona*, y la complejidad de sus interacciones.

Las células nerviosas están especializadas en recibir y emitir señales. La propagación de estas señales se da a través de la membrana plasmática de la neurona, por cambios en la permeabilidad de la membrana en la zona donde se recibió el estímulo. Como consecuencia, se desarrolla un potencial eléctrico de acción que se propaga a lo largo de toda la neurona. La transmisión de estas señales de una neurona a otra se realiza a través de unas zonas de contacto funcional que se denominan *sinapsis*.

En la denominada *sinapsis química* (Fig. 12), que es la mayoritaria en el sistema nervioso central, interviene: un *terminal pre-sináptico*, constituido por el botón sináptico de la neurona por la que llega la señal eléctrica, con diversos orgánulos celulares, gran número de vesículas de diferentes tipos y una zona activa donde se produce el vaciado de las vesículas sinápticas cargadas de neurotransmisores; una *hendidura pre-sináptica*, que es el espacio al que difunden los neurotransmisores; y un *terminal post-sináptico*, compuesto por las dendritas, el axón o el soma de la neurona que va a recibir la señal y que contiene los receptores específicos para los neurotransmisores liberados desde el terminal pre-sináptico.

En el proceso de la transmisión nerviosa, la llegada de un potencial de acción al terminal pre-sináptico induce la despolarización de la membrana en esta zona. Esto provoca que se abran los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, consiguiendo que la concentración de Ca^{2+} en la zona activa pase de niveles nM a μM en microsegundos. Este incremento tan grande y rápido es necesario para la sincronización en la liberación de neurotransmisores a la hendidura pre-sináptica. Después, para recuperar el potencial de reposo es necesario reducir el nivel de Ca^{2+} citosólico de nuevo a una concentración entre 100 y 300 nM (Michaelis, 1994). En este proceso desempeñan un papel muy importante las bombas de Ca^{2+} .

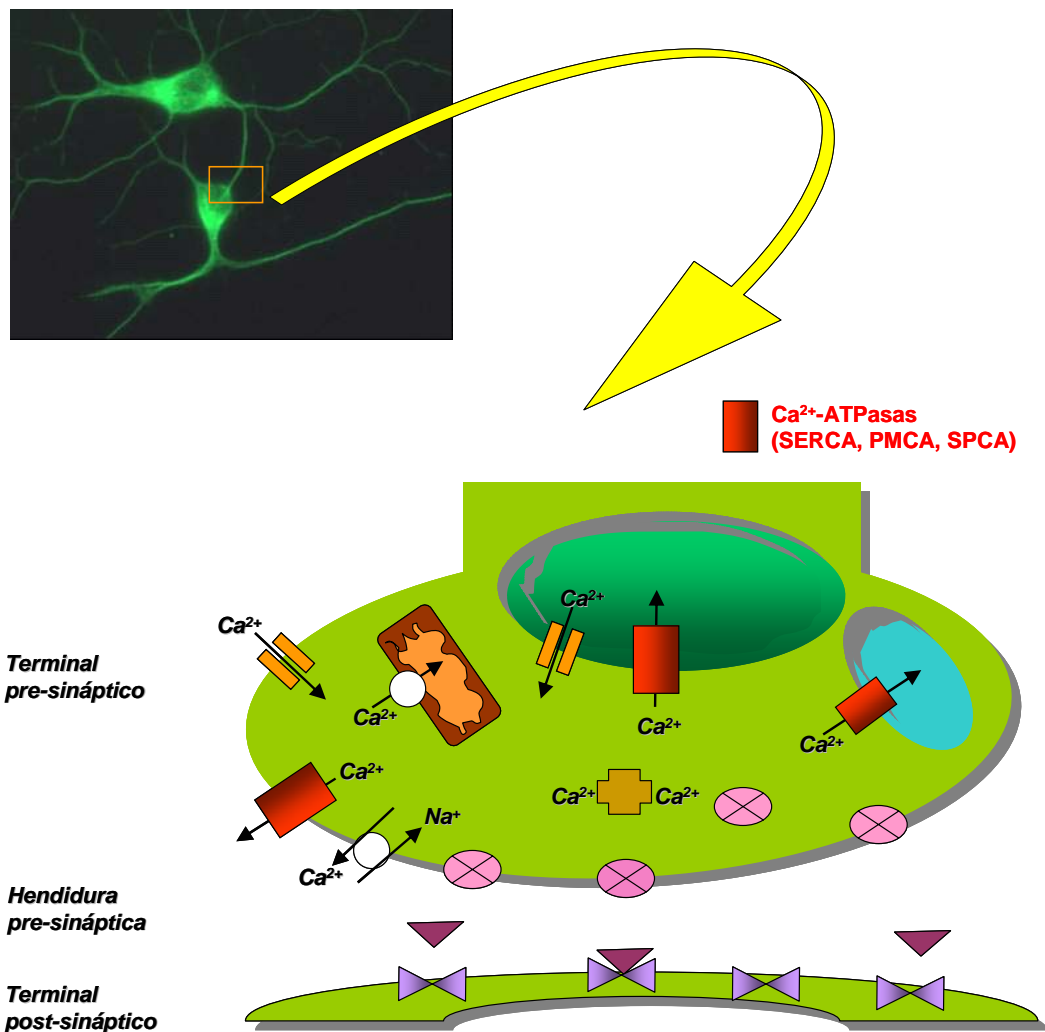


Fig. 12 Contacto sináptico entre neuronas en cultivo y representación esquemática de una sinapsis química. La microfotografía muestra neuronas de cerebelo de ratón en cultivo primario estableciendo sinapsis. El esquema representa una terminal sináptica con los sistemas más implicados en la homeostasis de Ca^{2+} : transportadores, canales y proteínas de unión a Ca^{2+} .

EL CEREBELO EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

El sistema nervioso central está constituido por el encéfalo y la médula espinal. El encéfalo de vertebrados se divide en tres regiones: encéfalo anterior (prosencefalo), encéfalo medio (mesencefalo) y encéfalo posterior (rombencefalo) (Fig. 13A). En esta última región, en posición anterior y dorsal, se localiza el *cerebelo*.

El cerebelo ha sido muy utilizado en las investigaciones neurobiológicas debido a la organización en capas de las poblaciones neuronales que constituyen la corteza cerebelosa y la simplicidad de sus circuitos neuronales. Este órgano está implicado en la coordinación

del movimiento y en el aprendizaje de habilidades motoras. En esencia, el cerebelo recibe información de receptores corporales, propioceptores y mecanoreceptores, que se integra y después envía a los centros de control motor del diencefalo y tronco encefálico. Su normal funcionamiento es necesario para que las respuestas motoras sean homogéneas, coordinadas y eficaces. Disfunciones en este órgano provocan alteraciones en el equilibrio, en el tono muscular, incoordinación de movimientos, etc.

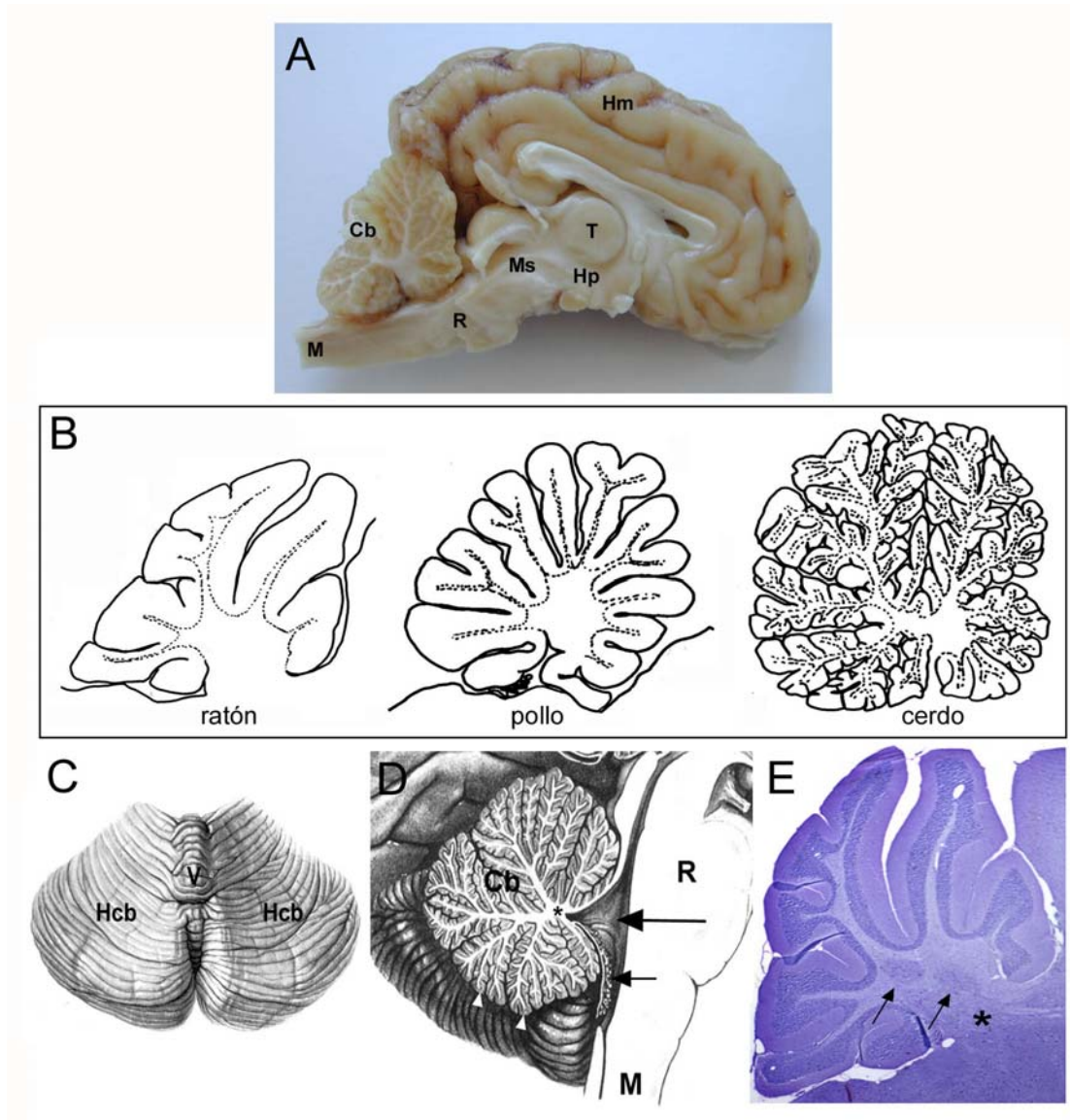


Fig. 13 Anatomía del sistema nervioso central y del cerebelo. A, sección sagital de un encéfalo de cerdo donde se indican los hemisferios cerebrales (Hm), tálamo (T), hipotálamo (Hp), mesencéfalo (Ms), rombencéfalo (R), cerebelo (Cb), y la médula espinal (M). B, dibujos de una sección sagital del cerebelo adulto de ratón, pollo y cerdo. C, visión dorsal del cerebelo humano en el que se observa el vermis (V) y los hemisferios cerebelosos (Hcb). D, esquema en el que se aprecia la sustancia gris (cabezas de flechas blancas) y la sustancia blanca (asterisco) del cerebelo, el ventrículo IV (flecha grande) y los plexos coroideos (flecha pequeña) de cerebelo humano. E, sección sagital del cerebelo de ratón donde se señalan los núcleos profundos del cerebelo (flechas) y los pedúnculos cerebelosos (asterisco). C y D, dibujos obtenidos de Wolf-Heidegger (1984).

El cerebelo está relacionado con la complejidad del movimiento de los organismos. Así, el cerebelo ha ido transformándose durante la evolución del Reino Animal desde una simple expansión dorsal en el tubo neural hasta una región altamente diferenciada, organizada en capas celulares y con crecimiento en tamaño y circunvoluciones, resultado evolutivo de su crecimiento antero-posterior (Fig. 13B).

En mamíferos, el cerebelo está formado por 2 *hemisferios cerebelosos* unidos por una estrecha franja denominada *vermis* (Fig. 13C). El cerebelo presenta multitud de circunvoluciones, con una *sustancia blanca* en el interior, constituida por fibras nerviosas, y una *sustancia gris* en el exterior, donde se concentran somas neuronales, y que se denomina *corteza cerebelosa* (Fig. 13D). En posición ventral al cerebelo se encuentra el *IV ventrículo* y los *plexos coroideos*, estos últimos implicados en la síntesis del líquido cefalorraquídeo (Fig. 13D). Por último, pertenecen también al cerebelo los *núcleos profundos* situados en la en la porción más ventral de la sustancia blanca (Fig. 13E).

DESARROLLO DEL CEREBELO

El conocimiento del desarrollo del sistema nervioso central a nivel histológico ha permitido el progreso en el estudio de los eventos celulares y moleculares que se dan desde los primeros momentos de la embriogénesis. En este sentido, los embriones de pollo han sido una herramienta muy útil por su fácil manipulación, su corto periodo de desarrollo nervioso (pre-natal, completo prácticamente al nacimiento tras 21 días) y el buen conocimiento de los estadios por los que atraviesan a nivel embrionario. Hamburger y Hamilton (1951) establecieron una nomenclatura con 45 estadios muy definidos (HH 1-45) en función de la evolución del desarrollo del embrión de pollo. La figura 14 muestra una progresión de estos estadios, donde HH1 corresponde con el momento de la puesta y HH45 con 20 días de incubación, justo antes del nacimiento.

De igual forma, el uso de roedores también ha permitido avanzar en el conocimiento del desarrollo animal, aunque en este caso, muchos órganos tienen un fuerte desarrollo a nivel neo- y post-natal.

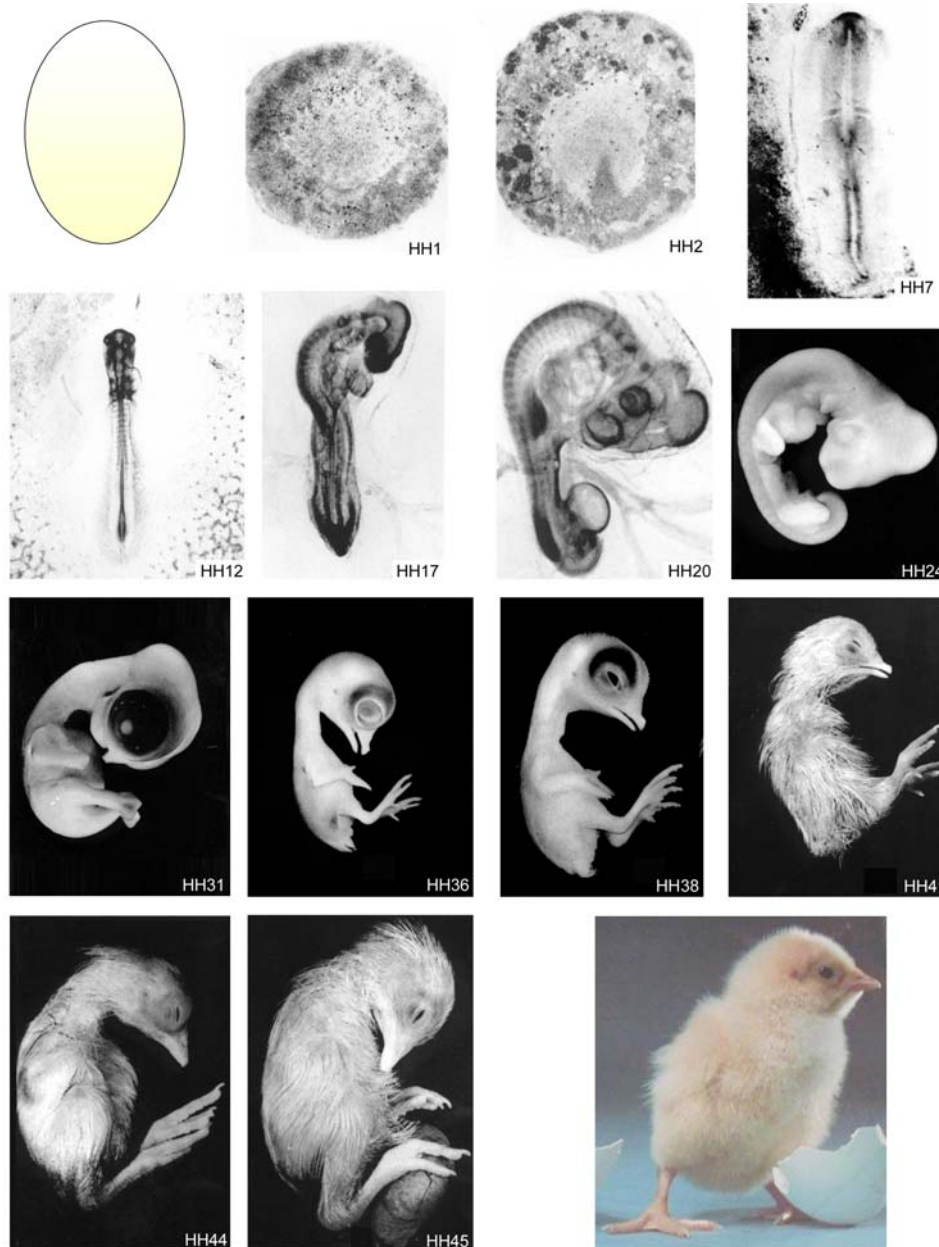


Fig. 14 Imágenes del desarrollo de un embrión de pollo. Se reflejan los estadios de Hamilton y Hamburger (HH) a los que corresponde cada imagen, donde HH1 es huevo recién puesto, HH2 corresponde con 6-7 h de incubación, HH7 con 1 día, HH12 con 2 días, HH17 con 2,5 días, HH20 con 3 días, HH24 con 4 días, HH31 con 7 días, HH36 con 10 días, HH38 con 12 días, HH41 con 15 días, HH44 con 18 días, HH45 con 20 días y el nacimiento a los 21 días de incubación.

El sistema nervioso de vertebrados se desarrolla a partir del tubo neural, constituido por un neuroepitelio de origen ectodérmico, y de la posterior aparición de tres vesículas neurales en la porción anterior del tubo. La determinación del territorio que dará lugar al cerebelo ha sido en gran parte debido a ensayos de trasplantes en el modelo de embriones quimeras pollo/codorniz (Martínez y Alvarado-Mallart, 1989; Alvarado-Mallart, 2000). Con este sistema se ha definido que, en el estadio HH10-12, el primordio cerebelar surge de la

porción más caudal de la vesícula mesencefálica y de la porción rostral del primer pro-rombómero (de Vagge, 1969), a ambos lados de la llamada constricción “mesencefálica/metencefálica” (Hidalgo-Sánchez *et al.*, 1999; Fig. 15). En el estadio HH20, debido a complejos cambios morfogénéticos, el primordio cerebelar completo se relocaliza caudal a esta constricción.

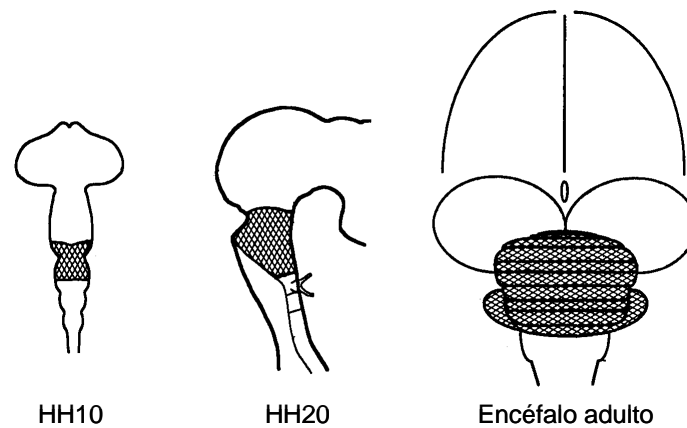


Fig. 15 Diferenciación del cerebelo. El primordio cerebelar en el periodo HH10-20 y el cerebelo adulto (se muestran en gris). Modificado de Hidalgo-Sánchez *et al.* (2005).

Los precursores de las distintas poblaciones neuronales presentes en el cerebelo se originan en dos diferentes zonas germinales: la *zona ventricular* y la *capa granular externa*. En aves, la generación de los precursores neurales se da en estado embrionario, mientras que en roedores los de la zona ventricular tienen lugar en el embrión y los de la capa granular externa es neonatal. Después, las células migran largas distancias hacia su destino final en un tiempo que engloba la transformación del primordio cerebelar en una estructura de aspecto final foliado al que se ha denominado “el árbol de la vida” (Fig. 16), siguiendo vías específicas de migración en un orden espacio-temporal muy preciso.

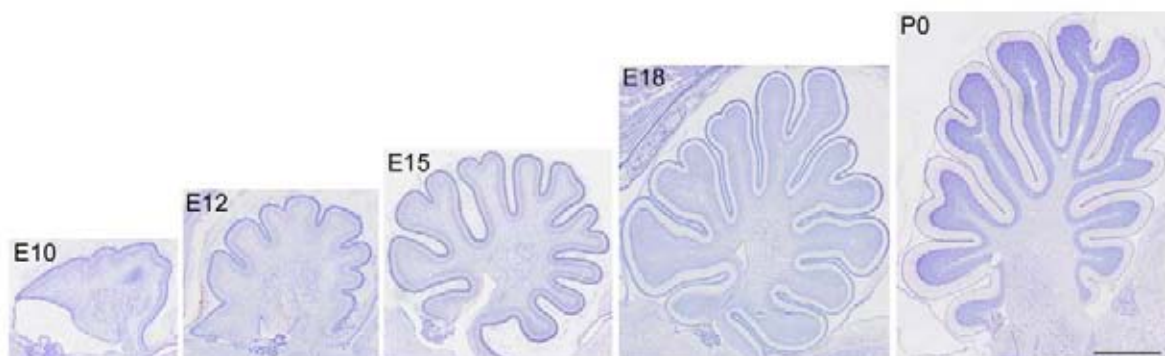


Fig. 16 Últimas etapas en el desarrollo del cerebelo de pollo. Secciones de criostato teñidas con cresil violeta. E: día embrionario; P: día post-natal. Barra de escala, 3 mm.

LA CORTEZA CEREBELOSA

La corteza cerebelosa es reflejo de la organización geométrica del sistema nervioso. Está organizada en 3 capas (Ramón y Cajal, 1904; Fig. 17). Desde la superficie cerebelosa al interior son: *capa molecular*, *capa de las células de Purkinje* y *capa granular*.

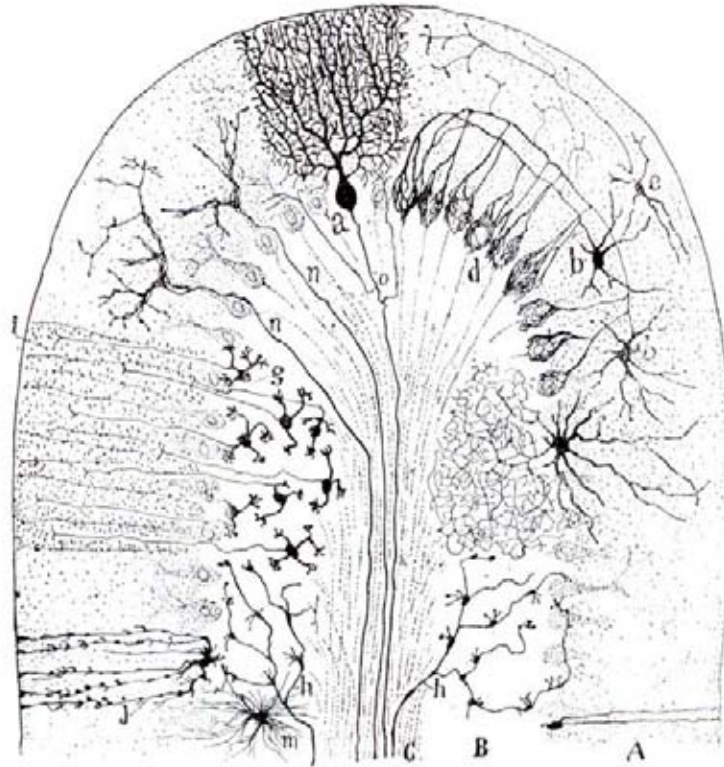


Fig. 17 Corte transversal semi-esquemático de una laminilla cerebelosa de mamífero. A, capa molecular; B, capa granular; C, sustancia blanca; a, célula de Purkinje vista de plano; b, célula de los cestos; d, arborización axónica de las células de los cestos en torno a la células de Purkinje; e, célula estrellada; g, células de los granos con su axón ascendente bifurcado (i); h, fibras musgosas; j, glía de Bergmann; n, fibras trepadoras; m, neuroglía de la capa granular; f, célula Golgi; o, axón colateral de las células de Purkinje. Dibujo de Ramón y Cajal, 1904.

Capa molecular

Es la capa más superficial de la corteza cerebelosa, caracterizada por una baja densidad celular pero con una alta cantidad de sinapsis. Está limitada al interior por la hilera de los somas de las células de Purkinje. Sus tipos neuronales principales son las interneuronas inhibitorias denominadas *células estrelladas* y *células de los cestos*, cuyos precursores se originan en la zona ventricular.

Células estrelladas: son neuronas pequeñas de morfología estrellada que se encuentran en la región más externa de la capa molecular, entremezcladas con la zona superior de la arborización de las células de Purkinje. Poseen un árbol dendrítico con abundantes espinas que reciben sinapsis de las fibras paralelas y un único axón que establece sinapsis de tipo inhibitorio con las células de Purkinje (Fig. 18).

Células de los cestos: se sitúan principalmente en la mitad inferior de la capa molecular. Sus terminaciones dendríticas son escasas y largas y reciben sinapsis de las fibras paralelas. Estas neuronas tienen un único axón con abundantes ramas colaterales que forma un plexo en torno al soma de las células de Purkinje (Fig. 18) y que acaban estableciendo sinapsis inhibitorias sobre el soma de la célula de Purkinje.

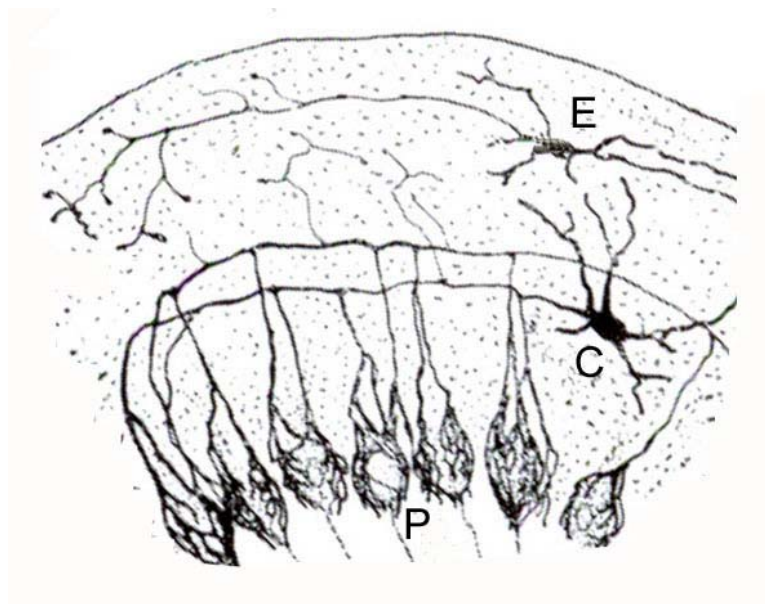


Fig. 18 Interneuronas de la capa molecular. Células estrelladas (E) y células de los cestos (C) mostrando su plexo axónico sobre las células de Purkinje (P). Dibujo de Ramón y Cajal (1904).

Capa de las células de Purkinje

Esta capa está formada por una hilera de somas ovoideos que corresponden a las *células de Purkinje* y que se disponen a lo largo del margen inferior de la capa molecular y superior de la capa granular.

Células de Purkinje: son un tipo neuronal muy diferenciado y característico, que se originan en la zona ventricular del cerebelo. Son de carácter inhibitorio y tienen un tamaño muy superior al resto de las poblaciones celulares del cerebelo (Fig. 19). Poseen un núcleo voluminoso en posición central, con un nucleolo esférico, rodeado a su vez por abundante

retículo endoplásmico. De la parte superior del soma surgen 1 ó 2 troncos dendríticos que se dicotomizan repetidamente formando una arborización de ramas primarias, secundarias y terciarias orientadas en el plano sagital. De estas últimas brotan numerosas ramas dendríticas pequeñas con abundantes varicosidades, cortas y recias, llamadas *espinas dendríticas*. En la base de su cuerpo celular y dirigido a la capa granular, surge un cono axónico muy grande con un único axón que se proyecta a la sustancia blanca, atravesando la capa granular, donde puede dar lugar a colaterales recurrentes. El axón principal constituye la única eferencia de la corteza cerebelosa y establece sinapsis con células de los núcleos profundos del cerebelo. Algunos axones de las células de Purkinje eluden estos núcleos y llegan a los núcleos vestibulares del tronco encefálico.

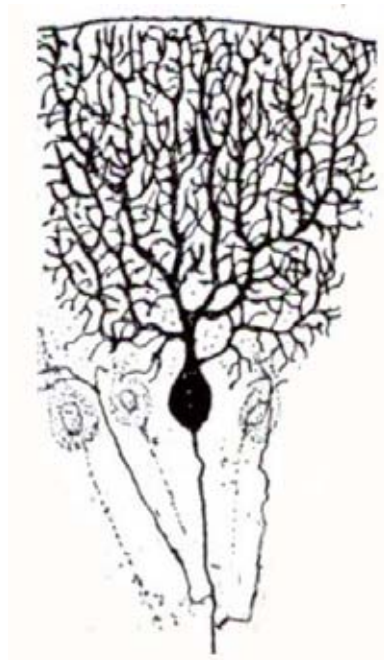


Fig. 19 Célula de Purkinje. Se observa la gran arborización dendrítica hasta la superficie del cerebelo y el axón con colaterales. Dibujo de Ramón y Cajal (1904).

Capa granular

Es la capa más interna de la corteza cerebelosa y la que presenta una mayor densidad celular. Contiene una gran población de neuronas de pequeño tamaño llamadas *células de los granos*, entre las cuales se localizan las *células Golgi* y los *glomérulos cerebelosos*, donde se establecen numerosas sinapsis.

Células de los granos: sus precursores se originan en la capa granular externa y, tras una migración tangencial y radial, se disponen en su localización final en la capa granular interna. Son neuronas de pequeño tamaño que presentan un núcleo esférico que ocupa casi todo el citoplasma celular (Fig. 20A). Del soma surgen 3-5 dendritas que terminan en expansiones en forma de garra las cuales hacen sinapsis con diversos componentes de los glomérulos cerebelosos (Fig. 20B). Poseen un único axón que se dirige hacia la capa molecular donde se dicotomiza en forma de T, formando las *fibras paralelas*. Estas fibras avanzan en direcciones opuestas y establecen contactos sinápticos de tipo excitador con distintos tipos celulares, entre ellos con las espinas dendríticas de un gran número de células de Purkinje.

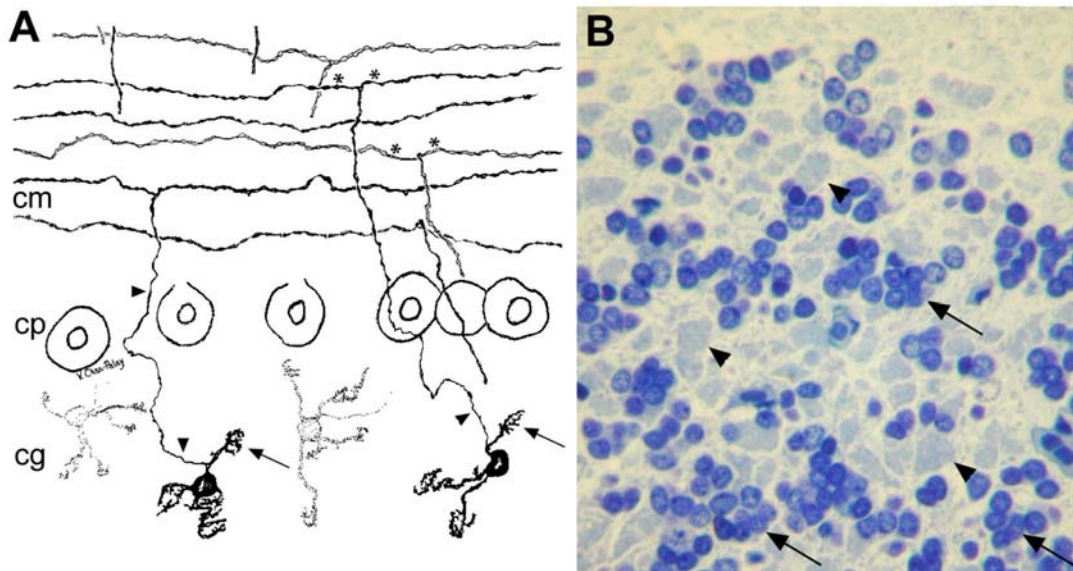


Fig. 20 Capa granular. A, esquema de las células de los granos en la capa granular (Palay y Chan-Palay, 1974). Se observan sus prolongaciones dendríticas con expansiones terminales en garra (flechas) y sus axones (cabezas de flechas) dirigidos hacia la capa molecular donde se ramifican en T (asteriscos). B, capa granular de cerebelo de cerdo teñida con azul de toluidina. Se observan los núcleos de las células de los granos (flechas) y los glomérulos cerebelosos (cabezas de flechas). cm, capa molecular; cp, capa de células de Purkinje; cg, capa granular.

Células Golgi: son interneuronas inhibitorias situadas en la zona más superficial de la capa granular, pero de mayor tamaño y menos numerosas que las células de los granos. Emiten grandes dendritas, algunas de las cuales llegan a la capa molecular, donde se arborizan, y otras se dividen en la propia capa granular. Poseen un único axón que surge de la porción ventral del soma y que forma parte también de los glomérulos cerebelosos.

CIRCUITOS DE INTEGRACIÓN Y SINAPSI CEREBELOSAS

Aferencias al cerebelo

Existen dos líneas principales de entrada de información a la corteza cerebelosa: las *fibras trepadoras* y las *fibras musgosas*.

Terminales de las fibras trepadoras: procedentes de los núcleos de la oliva inferior (situados en el rombencéfalo), estas fibras atraviesan la capa granular sin ramificarse hasta llegar al soma y tronco dendrítico de las células de Purkinje (Fig. 21A). Una fibra trepadora establece contacto sináptico de tipo excitatorio únicamente con una de estas células en las regiones lisas que existen entre las espinas dendríticas.

Terminales de las fibras musgosas: las fibras musgosas procedentes de los núcleos vestibulares y precerebelosos del rombencéfalo (excepto la oliva inferior), atraviesan la sustancia blanca del cerebelo y se ramifican al llegar a la capa granular, expandiéndose en terminales sinápticas excitatorias a modo de roseta (Fig. 21B) que ocupan el centro del glomérulo cerebeloso.

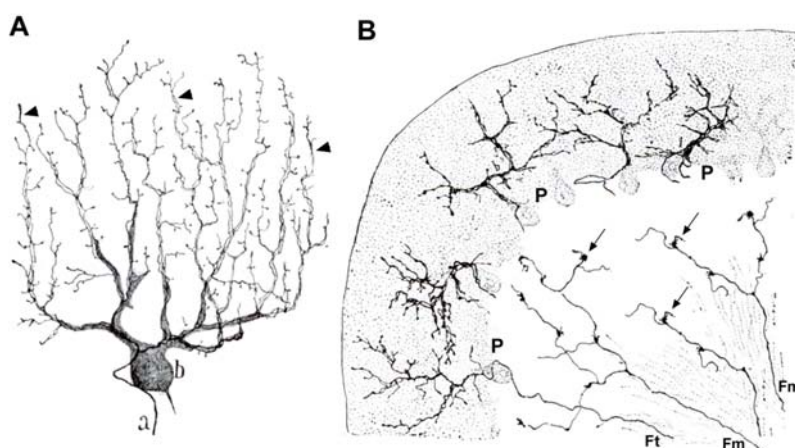


Fig. 21 Aferencias: fibras trepadoras y musgosas. A, esquema de una fibra trepadora (a) que se ramifica y extiende por el tronco y ramas dendríticas de una célula de Purkinje (b), donde establecen sinapsis. B, esquema en el que se muestran fibras musgosas (Fm) que se ramifican en la capa granular, emitiendo expansiones (flechas) pertenecientes a los glomérulos cerebelosos. Además, se observan fibras trepadoras (Ft) llegando a las células de Purkinje (P). Dibujos de Ramón y Cajal (1904).

Circuitos internos

En la corteza cerebelosa existen áreas donde confluyen numerosas sinapsis. Entre ellas, destacan las que se dan sobre las células de Purkinje y los glomérulos cerebelosos.

Sinapsis sobre las células de Purkinje: los circuitos de integración giran alrededor de las células de Purkinje, estableciéndose numerosas sinapsis sobre estas células que dan como resultado final la recepción, integración y emisión de la señal. Los principales contactos sinápticos son: las fibras paralelas que hacen sinapsis excitatorias con las espinas dendríticas, las fibras trepadoras que hacen contacto mediante sinapsis excitatorias en las zonas interespinosas de las ramas dendríticas terciarias, los axones de las células estrelladas que hacen sinapsis inhibitorias en zonas lisas de las ramas primarias y secundarias, y los axones de las células de los cestos que establecen sinapsis inhibitorias en el soma (Fig. 22A y C).

Glomérulos cerebelosos: en la capa granular, entre los núcleos de las células de los granos, se localizan complejos sinápticos denominados glomérulos cerebelosos (Fig. 22B y C). Están constituidos por los terminales de las fibras musgosas que estimulan a las dendritas de las células de los granos y de las células Golgi. Recíprocamente, las células Golgi, que son interneuronas inhibitorias, pueden inhibir a las células de los granos por sus contactos axo-dendríticos.

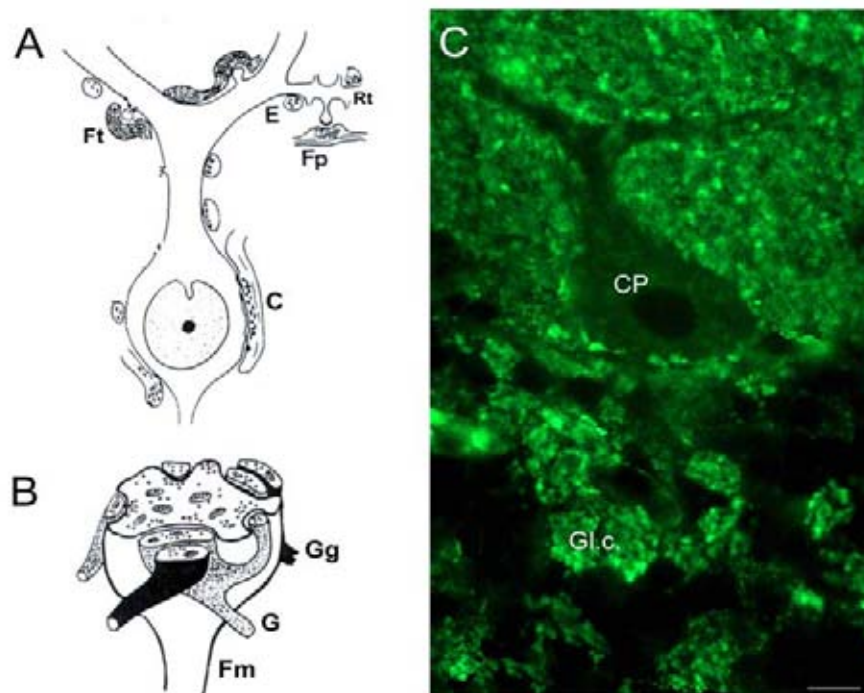


Fig. 22 Sinapsis cerebelosas. Representación esquemática de sinapsis sobre las células de Purkinje (A) y de los elementos más importantes de un glomérulo cerebeloso (B), adaptaciones de dibujos de Chedotal (1995). C, inmunohistoquímica en una sección sagital de cerebelo de cerdo con el anticuerpo anti-sinaptofisina, marcador de sinapsis. Ft, fibra trepadora; Fp, fibra paralela; Rt, ramas terminales; C, célula de los cestos; E, célula estrellada; Fm, fibra musgosa; G, célula de los granos; Gg, célula Golgi; CP, célula de Purkinje; Gl.c, glomérulo cerebeloso. Barra de escala, 10 μ m.

Emisión de información

La señal integrada en el cerebelo (Fig. 23) sale de la corteza cerebelosa a través de los axones de Purkinje, estableciendo contacto con los núcleos profundos.

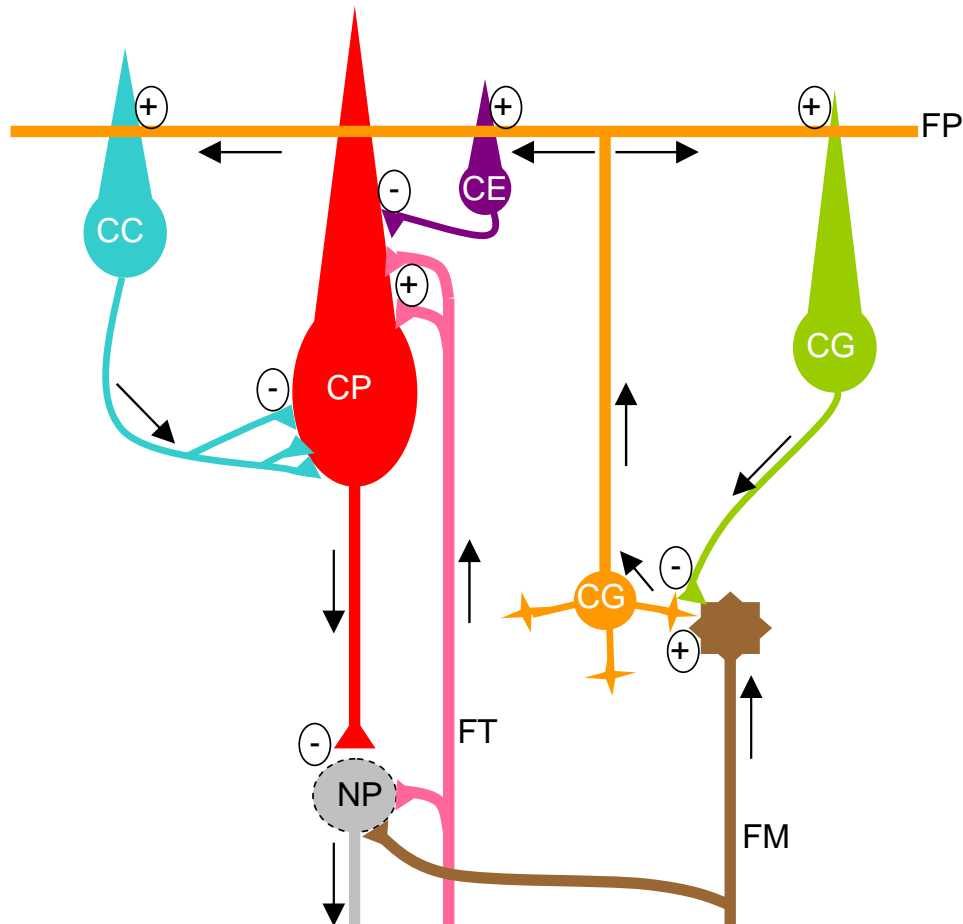


Fig. 23 Esquema del circuito cerebeloso. Se muestran los distintos tipos celulares y fibras aferentes y eferentes, así como las sinapsis excitatorias (+) e inhibitorias (-). CP, célula de Purkinje, CC, célula de los cestos; CE, célula estrellada, CG, célula Golgi; CG, célula de los granos, FP, fibra paralela; FT, fibra trepadora; FM, fibra musgosa; NP, núcleo profundo.

NÚCLEOS PROFUNDOS DEL CEREBELO

Los núcleos profundos del cerebelo (Fig. 13E) son centros donde se concentran somas de neuronas motoras que reciben sinapsis de fibras procedentes de la médula espinal, del tronco encefálico y de la propia corteza cerebelosa, y emiten a su vez axones de conexión larga que contactan con neuronas motoras del prosencéfalo o del mesencéfalo. Estas neuronas son las primeras que se originan en la zona ventricular del cerebelo.

EL IV VENTRÍCULO Y LOS PLEXOS COROIDEOS

El sistema nervioso central, originado a partir del tubo neural embrionario, mantiene en el adulto un canal central con cuatro dilataciones a modo de cavidades denominadas ventrículos, uno de los cuales se sitúa ventral al cerebelo y se denomina *IV ventrículo* (Fig. 13D).

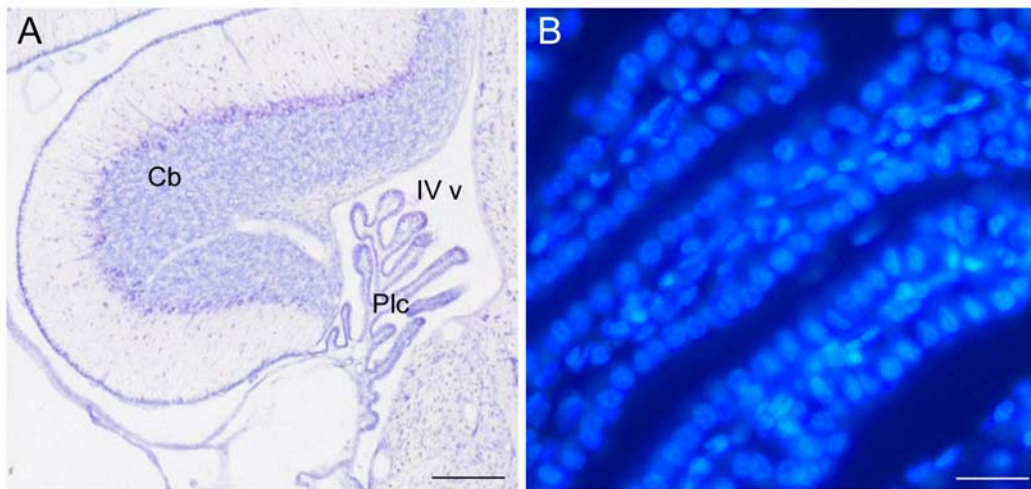


Fig. 24 Plexos coroideos. A, imagen de un lóbulo de cerebelo (Cb) de pollo teñido con cresil violeta donde se observan los plexos coroideos (Plc) del IV ventrículo (IV v). B, micrografía de fluorescencia del mismo plexo coroideo teñido con DAPI en el que se aprecia el epitelio simple de células cuboideas. Barras de escala: A, 350 μm ; B, 35 μm .

Determinadas regiones de la pared de los ventrículos presentan características epiteliales, no neurales, que están muy vascularizadas y hacen prominencia dentro de los ventrículos constituyendo los *plexos coroideos* (Fig. 24A), encargados de la síntesis y secreción del *líquido cefalorraquídeo*. Este líquido fluye por el interior del canal central encefálico y de sus ventrículos manteniendo las características del medio líquido en el que se encuentra el tejido nervioso, participando en funciones metabólicas y proporcionando protección frente a lesiones leves. Las células que constituyen este epitelio secretor (Fig. 24B) tienen forma cúbica con vellosidades en su porción apical, un núcleo esférico, numerosas mitocondrias y una cantidad importante de retículo endoplásmico y aparato de Golgi.

OBJETIVOS

Las *bombas de Ca^{2+}* están en muy baja concentración en el sistema nervioso pero son fundamentales en numerosos procesos neuronales regulados por Ca^{2+} . Por ello, el estudio de su distribución en el tejido nervioso es muy importante para poder asignar una función específica acorde a su localización. La mayoría de los estudios existentes se centran en un tipo específico de bombas de Ca^{2+} . Sin embargo, el análisis conjunto de las distintas familias de Ca^{2+} -ATPasas es de gran interés para obtener una visión global del papel de estas proteínas en la homeostasis de Ca^{2+} .

Dentro del sistema nervioso central, el *cerebelo* es una de las regiones más empleadas en estudios de neurociencia por el buen conocimiento que se tiene de sus poblaciones celulares y de sus circuitos de integración. Por ello, constituye un buen sistema modelo para profundizar en el funcionamiento y la distribución de las bombas de Ca^{2+} . Además, el estudio de la expresión y función de estas proteínas durante el desarrollo del sistema nervioso tiene un especial atractivo por la posible relación entre sistemas reguladores de la concentración intracelular de Ca^{2+} y la maduración y migración de precursores neuronales hasta su localización final y funcional.

Por ello, en esta Tesis se ha planteado como *objetivo general* **“el estudio de la función y la localización espacio-temporal de las distintas bombas de Ca^{2+} en cerebelo”**.

Los *objetivos concretos* a conseguir son los siguientes:

1. Investigar la distribución de las Ca^{2+} -ATPasas de retículo endoplásmico (SERCA) y de membrana plasmática (PMCA) en cerebelo de cerdo. El análisis conjunto de ambas bombas permitirá dilucidar las funciones que desempeñan en los distintos compartimentos celulares asociadas a específicos requerimientos de Ca^{2+} en tipos neuronales concretos.
2. Analizar la expresión funcional y la localización de SERCA y PMCA en cerebelo en desarrollo. Para ello, se utilizará el pollo como modelo de estudio por su rápido y bien conocido desarrollo embrionario. De esta forma, se investigará el papel de estas proteínas en procesos de diferenciación celular y establecimiento de contactos sinápticos del cerebelo.
3. Determinar la distribución de isoformas PMCA durante el desarrollo neural. La existencia de una gran diversidad de variantes dentro de las isoformas PMCA, generadas por procesamiento alternativo y con una alta expresión en el sistema nervioso, estimula su estudio en el desarrollo neural. Para ello, se utilizaran dos animales de estudio: el pollo, con un desarrollo predominantemente pre-natal, y el ratón, con un desarrollo fundamentalmente post-natal en las primeras semanas de vida. De esta forma, se analizará su distribución en relación a una específica implicación funcional de cada isoforma en procesos de desarrollo.
4. Analizar la distribución de las isoformas PMCA en microdominios lipídicos de la membrana plasmática. La existencia de dominios lipídicos en la membrana con distintas propiedades físicas y donde se localizan numerosas proteínas implicadas en señalización de Ca^{2+} , e incluso algunas asociadas a neuropatologías, plantea una posible localización de PMCA en estos dominios. Por ello, se aislarán microdominios “*rafts*” a partir de vesículas de membrana plasmática sinaptosomal de cerebelo de cerdo y se analizará la distribución de las distintas isoformas PMCA en estos dominios.

5. Identificar la SPCA1 en cerebelo de cerdo. Muy recientemente se ha mostrado la presencia de SPCA en homogeneizados de cerebro y en neuronas en cultivo, pero no existe un estudio en profundidad sobre su específica distribución celular en tejido nervioso. Por ello, se estudiará la presencia y expresión de esta proteína en fracciones subcelulares aisladas de cerebelo de cerdo y en secciones de tejido.

MÉTODOS GENERALES

1) PREPARACIÓN DE FRACCIONES DE MEMBRANA:

FRACCIONES SUBCELULARES DE CEREBELO DE CERDO

Se han utilizado cerebelos de cerdo (*Sus scrofa*, var. *Large white*) de 3 a 5 meses de edad procedentes del Matadero de Olivenza FRICOSI, S.L. (Badajoz). Tras la muerte de los animales, se cogió toda la masa cefálica para separar posteriormente el cerebelo (15-20 gr) del resto del sistema nervioso central (Fig. 25). Se guardó en una solución con Hepes/KOH 10 mM (pH 7,4), sacarosa 0,32 M, MgSO₄ 0,5 mM, PMSF 0,1 mM y β-mercaptoetanol 2 mM (tampón I) a 4°C hasta el momento de la preparación.



Fig. 25 Encéfalo de cerdo fijado en formol al 4% y seccionado sagitalmente. Se muestra la línea de corte para la separación del cerebelo (Cb). Barra de escala, 1,6 cm.

Preparación de sinaptosomas y de vesículas de membrana plasmática sinaptosomal

Los sinaptosomas y vesículas de membrana plasmática sinaptosomal (MPS) de cerebelo de cerdo se prepararon siguiendo el método de Salvador y Mata (1996) para cerebro de cerdo. El procedimiento se resume en la figura 26.

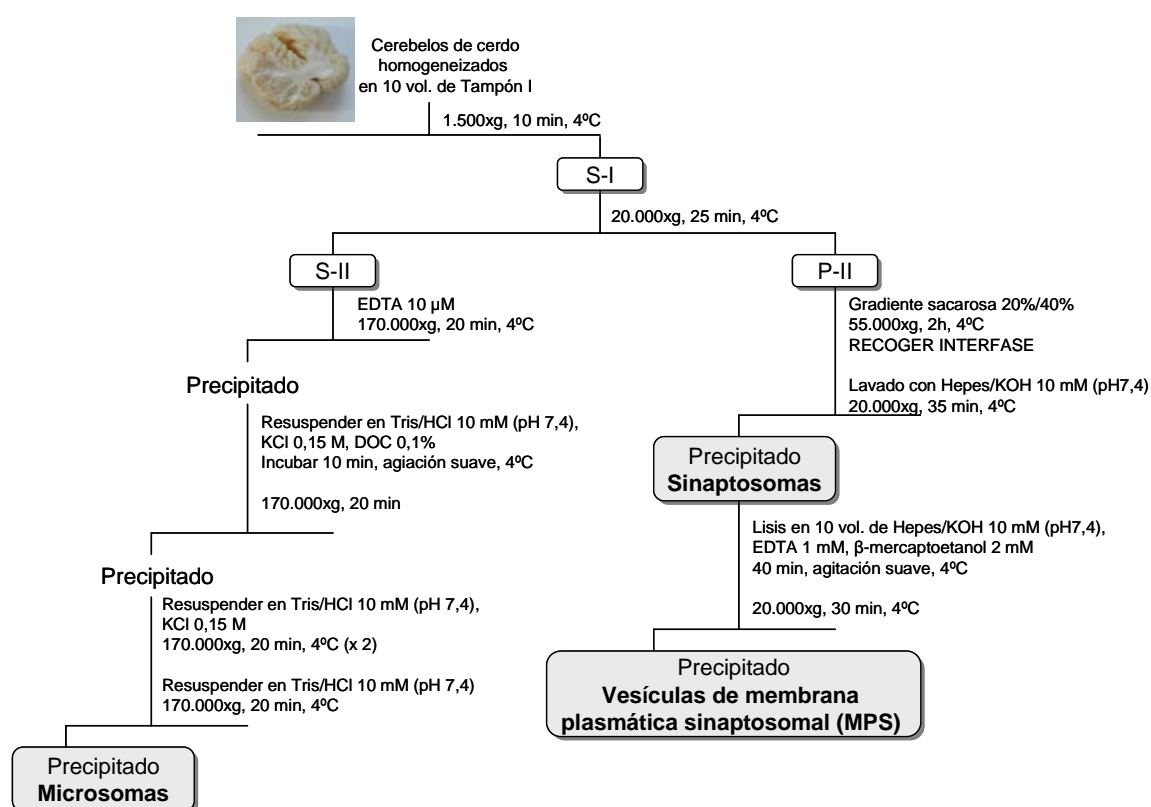


Fig. 26 Procedimiento de aislamiento de sinaptosomas, vesículas de membrana plasmática sinaptosomal y microsomas de cerebelo de cerdo. S: sobrenadante; P: precipitado.

Los cerebelos (3-4) se homogeneizaron en 10 volúmenes de tampón I a 4°C en un homogeneizador potter mediante unos 4 pases a 1.000 revoluciones/min. El homogeneizado se centrifugó a 1.500xg durante 10 min a 4°C, y el sobrenadante obtenido (S-I) se centrifugó a 20.000xg durante 25 min. El precipitado procedente de esta centrifugación (P-II) se resuspendió en tampón I hasta una concentración de proteína de 32 mg/ml. Posteriormente, se sometió a un gradiente discontinuo de sacarosa formado por 19 ml de sacarosa al 40% y 15 ml de sacarosa al 20% (p/v) en HEPES/KOH 10 mM (pH 7,4), poniendo 128 mg de proteína/tubo. Se centrifugó a 55.000xg durante 2 h, obteniéndose los sinaptosomas en la interfase. Se cogieron cuidadosamente y se lavaron en

16 volúmenes de Hepes/KOH 10 mM (pH 7,4) centrifugando a 20.000xg durante 35 min. El precipitado conteniendo los sinaptosomas se resuspendió en Hepes/KOH 10 mM (pH 7,4) y sacarosa 0,32 M (solución A), a una concentración de proteína de 20 mg/ml (170 mg), y se almacenó a -80°C hasta su uso.

Las vesículas de membrana plasmática sinaptosomal (MPS) se obtuvieron por lisis osmótica de los sinaptosomas. Para ello, la fracción sinaptosomal se llevó a 100 volúmenes de Hepes/KOH 10 mM (pH 7,4), EDTA 1 mM y β -mercaptoetanol 2 mM (tampón de lisis) y se incubó durante 40 min a 4°C con agitación suave. El lisado se centrifugó a 20.000xg durante 30 min, obteniendo en el precipitado las MPS. Esta fracción se resuspendió en solución A, a una concentración de proteína de 15 mg/ml (130 mg), y se almacenó a -80°C hasta su uso.

Preparación de microsomas

El aislamiento de la fracción microsomal se realizó mediante una modificación del método de Black *et al.* (1980) a partir de la fracción S-II de la preparación de sinaptosomas (Fig. 26). Se añadió EDTA hasta una concentración final de 10 μ M y se centrifugó a 170.000xg durante 20 min a 4°C. El precipitado se resuspendió en 4 ml de Tris/HCl 10 mM (pH 7,4) y KCl 0,15 M y se adicionó lentamente desoxicolato al 0,1% (p/v), incubando durante 10 min a 4°C con agitación suave. Posteriormente, se centrifugó a 170.000xg durante 20 min a 4°C, resuspendiendo el precipitado en Tris/HCl 10 mM (pH 7,4) y KCl 0,15 M. Esta última etapa se repitió dos veces, eliminando así el exceso de detergente, y resuspendiendo en el último lavado en Tris/HCl 10 mM (pH 7,4). Tras la última centrifugación, el precipitado final se resuspendió en solución A, a una concentración de proteína de 10 mg/ml (30 mg), y se almacenó a -80°C hasta su uso.

PURIFICACIÓN DE LA Ca^{2+} -ATPasa DE MEMBRANA PLASMÁTICA SINAPTOSOMAL DE CEREBELO DE CERDO

La Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática (PMCA) se obtuvo a partir de la solubilización de las MPS y la posterior cromatografía de afinidad en calmodulina-agarosa. Para ello, se siguió el procedimiento descrito en Salvador y Mata (1996) para cerebro de cerdo.

Solubilización de las MPS

Las MPS se diluyeron en Hepes/KOH 20 mM (pH 7,4), KCl 130 mM, MgCl₂ 0,5 mM, CaCl₂ 50 μM, glicerol al 15% y β-mercaptoetanol 2 mM hasta una concentración de 6 mg/ml, y se solubilizaron por la adición de Tritón X-100 al 0,6% (p/v) e incubación durante 15 min a 4°C con agitación suave. Posteriormente, se centrifugaron a 125.000xg durante 30 min a 4°C, obteniéndose las proteínas solubilizadas en el sobrenadante.

Cromatografía de afinidad en calmodulina-agarosa

La purificación se realizó en una columna de calmodulina-agarosa de 6 ml (1,2 cm de diámetro x 6 cm de alto) acoplada a un equipo de cromatografía ÄKTA prime (Amersham Pharmacia Biotech). Todo el proceso se realizó en cámara fría a 4°C y el flujo fue de 1 ml/min. La calmodulina-agarosa se activó previamente, equilibrando la columna con 36 ml de un tampón semejante al de solubilización, pero que contenía MgCl₂ 1 mM y CaCl₂ 100 μM. Se pasó el solubilizado de las MPS a través de la columna, eliminándose las proteínas no retenidas mediante un exhaustivo lavado con 120 ml de un tampón similar al anterior pero con una concentración de Tritón X-100 10 veces menor (0,06%). La PMCA se eluyó con un tampón de iguales características al de lavado, pero que contenía EDTA 2 mM en lugar de CaCl₂ 100 μM. Se recogieron fracciones de 1 ml en las que se determinó el contenido proteico por absorbancia a 280 nm. Las fracciones con mayor concentración de proteína y actividad enzimática se unieron, estando a una concentración de 0,12 mg/ml (0,73 mg), y se dividieron en alícuotas que se almacenaron a -80°C.

PREPARACIÓN DE VESÍCULAS DE MEMBRANA DE RETÍCULO SARCOPLÁSMICO CARDIACO DE CERDO

Las vesículas de membrana de retículo sarcoplásmico cardiaco (RSC) se aislaron de corazón de cerdo adulto, siguiendo el método de Jones y Cala (1981). Brevemente, 2 g de tejido ventricular izquierdo se homogeneizaron en NaHCO₃ 10 mM en un potter. El homogeneizado se centrifugó a 45.000xg durante 30 min a 4°C y el precipitado obtenido se resuspendió en una solución de Histidina 30 mM (pH 7) y KCl 0,6 M. Tras una nueva centrifugación a 45.000xg durante 30 min a 4°C, las vesículas de RSC se resuspendieron en Histidina 30 mM (pH 7,2) y sacarosa 0,25 M, y se guardaron a -80°C hasta su uso.

PREPARACIÓN DE VESÍCULAS DE MEMBRANA DE CEREBELO DE POLLO O RATÓN

Se han utilizado cerebelos de pollo (*Gallus gallus*, var. White Leghorn) y de ratón (*Mus musculus*, var. *Swiss*) de distintos estadios de desarrollo embrionario, recién nacidos o post-natales.

Los huevos fertilizados de pollo procedían del Servicio de Animalario de la Universidad de Extremadura y se incubaron en el laboratorio en una atmósfera humidificada a 37°C hasta los días embrionarios 10 (E10), 12 (E12), 15 (E15) y 18 (E18) y nacimiento (P0).

Los ratones procedían del Servicio de Animalario de la Universidad de Extremadura o del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” de Madrid. Se utilizaron ratones de 18 días de desarrollo embrionario (E18), recién nacidos (P0) y post-natales de 4 (P4), 8 (P8), 12 (P12), 15 (P15), 30 (P30) y 90 (P90) días.

Todos los animales se manipularon, anestesiaron y decapitaron siguiendo las normas descritas en el Real Decreto 223/1988 sobre protección de animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos.

Disección y preparación de vesículas

Tras la decapitación de los animales, se aisló el encéfalo del cráneo y se separó el cerebelo, utilizando la lupa en el caso de los individuos de menores estadios.

Una vez diseccionados, los cerebelos se homogeneizaron inmediatamente en un potter a 4°C en un tampón de homogeneización con Hepes/KOH 10 mM (pH 7,4), sacarosa 0,32 M, MgSO₄ 0,5 mM, PMSF 0,1 mM y β-mercaptoetanol 2 mM y una mezcla de inhibidores de proteasas (Roche). El homogeneizado se centrifugó a 1.500xg durante 10 min a 4°C. El sobrenadante resultante se centrifugó a 100.000xg durante 45 min. El precipitado final se resuspendió en solución A y se guardó a -80°C hasta su uso.

Las etapas realizadas se muestran en la figura 27.

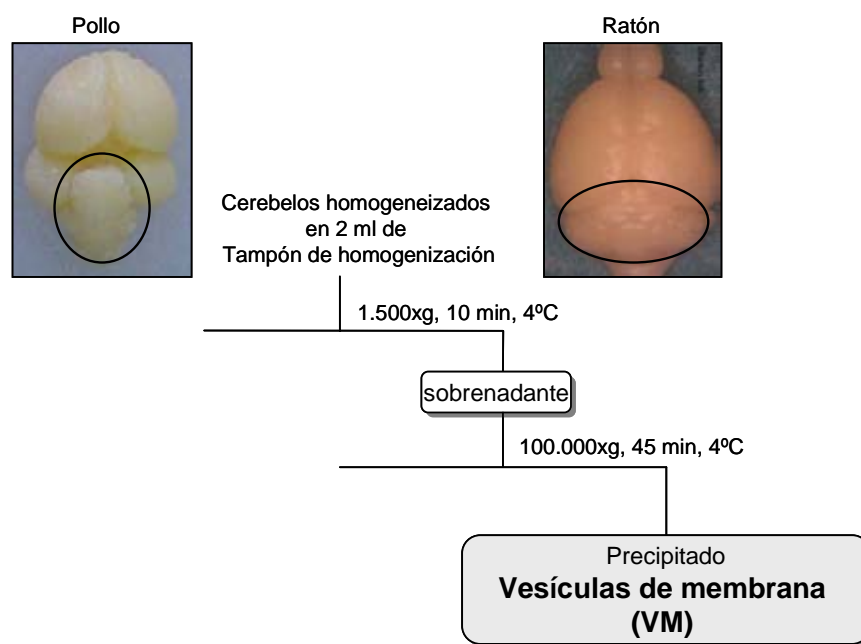


Fig. 27 Procedimiento de aislamiento de vesículas de membrana de cerebelo de pollo o ratón.

2) DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA:

MÉTODO DE BRADFORD

El método de Bradford (1976) se basa en la formación de un complejo de color azul entre el Azul Coomassie G y las proteínas presentes en la muestra, y que absorbe a 595 nm. Este método requiere una recta patrón con distintas concentraciones de albúmina de suero bovino (BSA, 1-10 μ g) en dodecilsulfato sódico (SDS) al 0,1% (p/v) en un volumen final de 10 μ l. La muestra problema también se preparó en SDS al 0,1% en el mismo volumen final. Se añadió a cada muestra 1 ml de la solución de Bradford (azul Coomassie G250 al 0,01%, etanol al 4,7% y H_3PO_4 al 8,5%) y se midió la absorbancia a 595 nm.

MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO DE ABSORBANCIA A 280 nm

Consiste en medir la absorción a 280 nm debida a los residuos de tirosina y triptófano de las proteínas en solución. Se utilizó para determinar el pico de elución en la purificación de la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática sinaptosomal.

3) ANÁLISIS DE FRACCIONES SUBCELULARES E INMUNODETECCIÓN POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN:

PREPARACIÓN DE REJILLAS

Se utilizaron rejillas de níquel de 200 μm de malla (Gilder). Antes del uso, se cubrieron con una película de colodión al 0,5%, se sombrearon en un evaporador de carbono y se ionizaron para facilitar la adsorción de la muestra.

TINCIÓN NEGATIVA DE FRACCIONES SUBCELULARES

Las fracciones subcelulares (5 μg) se dispusieron para su adsorción en rejillas recién preparadas para su uso durante 2 min a temperatura ambiente, y después se lavaron 3 veces durante 1 min con agua milliQ. Posteriormente, se fijaron con glutaraldehído al 2% en tampón Tris salino (TBS: Tris/HCl 25 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM) durante 2 min y se tiñeron con acetato de uranilo al 2% durante 50 seg. Se lavaron con agua destilada y ya estaban listas para su análisis al microscopio electrónico de transmisión (Carl Zeiss).

INMUNODETECCIÓN EN SINAPTOSOMAS

Fijación de sinaptosomas de cerebelo de cerdo

Los sinaptosomas (200 μl) se fijaron inmediatamente por adición de 200 μl de una solución de paraformaldehído EM al 8%, glutaraldehído EM al 0,5%, Hepes/KOH 20 mM (pH 7,4) y sacarosa 0,64 M, e incubación durante 1 h a temperatura ambiente y agitación suave. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con Hepes/KOH 10 mM (pH 7,4) y sacarosa 0,32 M (solución A) mediante centrifugación a 14.000xg durante 10 min para la eliminación del fijador. El precipitado final con los sinaptosomas fijados se resuspendió en paraformaldehído al 2%, Hepes/KOH 10 mM (pH 7,4) y sacarosa 0,32 M (solución de conservación) y se almacenó a 4°C hasta su uso.

Inclusión en bloques de gelatina

Los sinaptosomas, una vez fijados, se lavaron 3 veces con solución A y centrifugación a 12.000xg durante 2 min, para eliminar los restos de la solución de conservación. Tras el último lavado, se resuspendieron en el mínimo volumen de solución A, homogeneizando con la pipeta.

Para su inclusión, los sinaptosomas se atemperaron durante 5 min a 37°C y se les añadió una solución de gelatina tipo B de piel bovina (Sigma) al 10% en PBS previamente atemperada, homogeneizando con la pipeta. Tras centrifugar durante 1 min a 12.000xg, se mantuvieron en hielo durante 2 h hasta endurecerse el bloque. Se añadieron 500 µl de solución A y se dejó a 4°C toda la noche. Tras sacar el bloque, se cortó la parte inferior (donde estaban los sinaptosomas embebidos en la gelatina) en fragmentos cúbicos muy pequeños. Se realizaron varios lavados de 10 min a 4°C con PBS y se almacenaron a 4°C hasta el momento de la inclusión en resina.

Inclusión en resina LRWhite y corte

La resina LRWhite (London Resine C.L.) es una resina acrílica muy utilizada en estudios inmunocitoquímicos por preservar muy bien la antigenicidad de las muestras. Para la inclusión, los sinaptosomas embebidos en el cubo de gelatina se sometieron a un proceso de deshidratación a 4°C con concentraciones crecientes de etanol (etanol al 30%, 10 min; 50%, 10 min; 70%, 20 min; 95%, 2 x 20 min; 100%, 2 x 30 min). Después, el cubo se infiltró en la resina LRWhite, mediante su paso por soluciones con distintas relaciones de resina/etanol a 4°C (1/2, 60 min; 1/1, 60 min; 2/1, 60 min; 1/0, toda la noche; 1/0, 4 h). Finalmente, el cubo en resina se incluyó en cápsulas impermeables de gelatina, dejando polimerizar durante 24 h a 55°C.

Las piezas de resina con los sinaptosomas se cortaron en secciones ultrafinas de 70 nm en un ultramicrotomo (Reichert-Jung) y se recogieron sobre rejillas recién preparadas para su uso (ver descripción anterior).

Inmunogold

Cada rejilla con las secciones de sinaptosomas se lavó durante 1 min en TBS y se bloquearon con TBS-BSA al 5% durante 5 min. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo primario diluido en TBS-BSA al 1% durante 1 h a temperatura ambiente. Tras realizar 3 lavados con TBS durante 7 min, se incubó con el anticuerpo secundario

conjugado a oro coloidal (15 nm, Biocell) diluido 1/40 en TBS-BSA al 1% durante 45 min. Después de 3 lavados con TBS de 7 min, se lavó con agua destilada y se dejó secar sobre papel de filtro.

Para visualizar las muestras de la rejilla, se incubó en primer lugar con acetato de uranilo al 2% (7 min en oscuridad y posterior lavado con agua) y después con citrato de plomo al 0,2% y NaOH al 0,4% (3 min en una campana desecadora con N₂ y lavado con agua), para amplificar la tinción del uranilo. La rejilla se secó sobre papel de filtro, estando así preparada para su análisis en el microscopio electrónico de transmisión (Carl Zeiss).

4) ENSAYOS FUNCIONALES:

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ATPasa: sistema enzimático acoplado

La actividad enzimática se midió con el sistema acoplado de enzimas piruvato quinasa-lactato deshidrogenasa (East y Lee, 1982). Este procedimiento se basa en el acoplamiento de la hidrólisis de ATP por la ATPasa con la oxidación del NADH (en relación estequiométrica molar 1/1), mediante la acción conjunta de la piruvato quinasa y la lactato deshidrogenasa. Como el NADH absorbe a 340 nm, su oxidación puede seguirse midiendo la disminución de esta absorbancia con el tiempo. Las reacciones que tienen lugar se muestran en la figura 28.

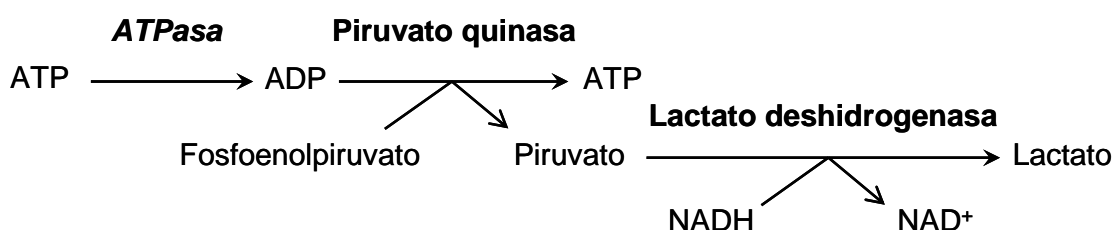


Fig. 28 Reacciones enzimáticas que se producen en el sistema acoplado de enzimas piruvato quinasa-lactato deshidrogenasa.

Las fracciones subcelulares de cerdo (40 µg) o las vesículas de membrana de pollo (40 µg) o ratón (20 µg) se añadieron a una mezcla de reacción que contenía Hepes/KOH 50 mM (pH 7,4), KCl 100 mM, Na₃N 5 mM, MgCl₂ 2 mM, CaCl₂ 100 µM, BAPTA 100 µM (Ca²⁺ libre 3,16 µM), NADH 0,22 mM, fosfoenolpiruvato 0,42 mM, 10 U de piruvato

quinasa (Roche) y 28 U de lactato deshidrogenasa (Roche), en un volumen final de 1 ml. Tras una incubación de 4 min a 37°C, la reacción se inició con ATP 1 mM. La actividad Ca^{2+} -ATPasa se obtuvo al restar la actividad dependiente de Mg^{2+} medida en presencia de EGTA 3 mM, a la actividad inicial $(\text{Ca}^{2+}+\text{Mg}^{2+})$ -ATPasa. La actividad SERCA se calculó restando la actividad PMCA, medida en presencia de tapsigargina, a la actividad total Ca^{2+} -ATPasa medida en ausencia de tapsigargina.

La actividad específica de la Ca^{2+} -ATPasa purificada se determinó incubando previamente 5 μg de proteína con fosfatidilserina (5,3 mg de lípido/mg proteína) durante 4 min a 37°C. Después se añadió a la mezcla de reacción anteriormente descrita, iniciándose la reacción con ATP 1 mM.

Las medidas de actividad se realizaron en un espectrofotómetro UV-visible de doble haz UNICAM UV2, equipado con un sistema de termostatación de cubetas.

DETERMINACIÓN DEL TRANSPORTE DE CALCIO

El transporte de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ se midió mediante la técnica de filtración (Chiesi e Inesi, 1979). Las vesículas de membrana de pollo (40 μg) o ratón (20 μg) se incubaron a 37°C durante 4 min en una mezcla de reacción de transporte estándar que contenía Hepes/KOH 50 mM (pH 7,4), KCl 100 mM, NaN_3 5 mM, MgCl_2 2 mM, CaCl_2 100 μM , BAPTA 100 μM (Ca^{2+} libre 3,16 μM), 0,12 μCi de $^{45}\text{CaCl}_2$ (aproximadamente 20.400 cpm/nmol, American Radiolabeled Chemicals, Inc.) y KH_2PO_4 20 mM, en un volumen final de 1 ml. La reacción de transporte se inició por la adición de ATP 1 mM y se paró 30 min después mediante filtración a través de filtros Millipore (HAWP-045). Los filtros se lavaron 2 veces con 5 ml de Hepes/KOH 20 mM (pH 7,4) y LaCl_3 1mM, se depositaron en viales y se disolvieron en 3 ml de líquido de centelleo (Cytoscint, ICN). El transporte se midió en un contador de centelleo Beckman LS3801. Para determinar el $^{45}\text{Ca}^{2+}$ transportado, se adsorbieron 50 μl de mezcla de reacción sin proteína (5 nmoles de Ca^{2+}) en un filtro seco, se añadieron 3 ml de líquido de centelleo, y se midió el valor de cpm correspondiente a esos nmoles. Además, se filtraron 2 blancos de mezcla de reacción sin proteína para restar el Ca^{2+} inespecífico retenido por los filtros.

El transporte de calcio debido a la proteína PMCA se midió en presencia de tapsigargina. El Ca^{2+} transportado por la SERCA se calculó mediante sustracción del transporte de Ca^{2+} obtenido en presencia de tapsigargina al valor determinado en su ausencia.

5) ELECTROFORESIS Y WESTERN BLOT:

SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

La separación de proteínas se realizó en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes con SDS siguiendo el método de Laemmli (1970), utilizando el sistema Mini-Protean II de Bio-Rad. El procedimiento se basa en la separación de proteínas en función de su peso molecular en un gel separador a pH 8,8, previa concentración de las proteínas en un gel concentrador a pH 6,8. En la Tabla 1 se muestran los reactivos utilizados en la preparación de los geles. La polimerización de los geles se produjo tras la adición de TEMED y persulfato amónico. En primer lugar, se preparó el gel separador y tras su polimerización, se preparó encima el gel concentrador, colocando en éste el peine adecuado para formar los pocillos tras la polimerización.

Las muestras (30 µg para fracciones subcelulares de cerdo y VM de pollo y 20 µg para VM de ratón) se prepararon en Tris/HCl 62,5 mM (pH 6,8), azul de bromofenol al 0,002% (p/v), SDS al 2%, β-mercaptoetanol al 5% y glicerol al 10% (tampón de muestra), en un volumen máximo de 12 µl. Después se hirvieron durante 2 minutos y se cargaron en los pocillos.

La electroforesis se realizó en un que contenía Tris 25 mM, glicina 0,2 M y SDS al 0,1%, a 200 V durante 45 min y a temperatura ambiente.

Gel separador	6,5%	13,5%
H ₂ O destilada	5,19 ml	2,84 ml
Tris/HCl 1,5 M (pH 8,8)	2,50 ml	2,50 ml
Archilamida/Bisacrilamida (30%/0,8%)	2,16 ml	4,50 ml
SDS al 10%	100 µl	100 µl
Persulfato amónico al 10%	70 µl	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl
Volumen final	10 ml	10 ml
Gel concentrador	4%	
H ₂ O destilada	3,05 ml	
Tris/HCl 1,5 M (pH 8,8)	1,25 ml	
Archilamida/Bisacrilamida (30%/0,8%)	0,65 ml	
SDS al 10%	50 µl	
Persulfato amónico al 10%	30 µl	
TEMED	10 µl	
Volumen final	5 ml	

Tabla 1 Reactivos utilizados para la preparación de los geles separador y concentrador de poliacrilamida para electroforesis en condiciones desnaturizantes.

TINCIÓN Y SECADO DE GELES

Tinción de azul Coomassie

Tras la electroforesis, el gel se sumergió en una solución de azul Coomassie R-250 al 0,2% (p/v), metanol al 45% y ácido acético al 10% durante un mínimo de 30 min, y posteriormente en una solución de metanol al 20%, ácido acético al 10% y glicerol al 1% hasta decoloración y visualización de las bandas de proteína. El proceso se realizó a temperatura ambiente y agitación.

Tinción con plata

Este método es más sensible que la tinción convencional de azul Coomassie. En la tinción con plata, el gel se fijó, en primer lugar, con una solución de metanol al 40% y ácido acético al 10% durante 30 min y después se realizó una fijación más suave con una solución de metanol al 10% y ácido acético al 7,5% en dos pasos de 15 min. Tras exhaustivos lavados con agua destilada, el gel se incubó con ditioneitol (5 µg/ml) durante 30 min, después con AgNO_3 2 µg/ml durante 30 min, y posteriormente se lavó dos veces con agua. Por último, el gel se sumergió en una solución de revelado de Na_2CO_3 al 3% y formaldehído al 0,11%, y la reacción se paró por eliminación del revelador y adición de ácido acético al 5%. Todas las etapas se realizaron a temperatura ambiente y agitación.

Secado de geles

Los geles, tras la tinción, se conservaron mediante secado. Para ello, se incubaron en una solución de fijación de glicerol al 6% y ácido acético al 4%, durante toda la noche a temperatura ambiente. Después se sumergieron en etanol al 40%, ácido acético al 10% y glicerol al 4,4% durante 15 min y se colocaron entre dos láminas de celofán previamente sumergidas en glicerol al 10%, que se fijaron en un soporte, dejando secar varios días.

WESTERN BLOT

El ensayo de Western blot nos permite la detección e identificación de las proteínas separadas por electroforesis mediante anticuerpos específicos. Incluye las etapas de electrotransferencia e inmunodetección.

Electrotransferencia

Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron del gel a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF, Millipore), utilizando el sistema Trans-Blot SD Semi-Dry de Bio-Rad. Para ello, una membrana de PVDF (hidrofóbica) del mismo tamaño del gel se sumergió previamente unos segundos en metanol, y después se incubó junto con el gel y dos almohadillas de fibra del tamaño del gel en Tris 48 mM, glicina 39 mM, SDS al 0,0375% y metanol al 20% (solución de transferencia) durante 10 min. Posteriormente, se colocaron sobre el ánodo del sistema Trans-Blot SD (en orden: una de las almohadillas, la membrana de PVDF, el gel de electroforesis y la otra almohadilla). Las posibles burbujas de aire formadas se eliminaron con una varilla para evitar la resistencia al campo eléctrico. La transferencia de proteínas se realizó a 15 V durante 30 min y a temperatura ambiente.

La eficiencia de la transferencia en la membrana se comprobó mediante la tinción de proteínas de Ponceau S (Ponceau S al 0,1% (p/v), ácido acético al 5%) durante 5 min, observando las proteínas en color rojo. Posteriormente, se eliminó la tinción con varios lavados en TBS.

Inmunodetección

La membrana de PVDF con las proteínas transferidas, se incubó con leche desnatada en polvo al 2% en TBS (TBS-leche) durante 30 min a temperatura ambiente y en agitación, para bloquear los sitios de unión inespecíficos para los anticuerpos. Tras realizar 3 lavados de 5 min con TBS-Tween 20 al 0,05% para eliminar los restos de la solución de bloqueo, la membrana se incubó con el anticuerpo primario diluido en TBS-Tween 20 al 0,05% durante 2 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C, con agitación suave. Después, se realizaron 3 lavados de 5 min con TBS-leche y se incubó con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (anti-IgG de ratón o anti-IgG de conejo, según el anticuerpo primario fuera monoclonal o policlonal, respectivamente, de BioRad), a una dilución 1/3.000 en TBS-leche a temperatura ambiente durante 1 h. Tras 2 lavados con TBS-leche y 1 con TBS de 5 min, la inmunodetección se reveló con 4-metoxi-1-naftol (12,5 mg de 4-metoxi-1-naftol en 2,5 ml de metanol frío, se añadieron a 22,5 ml de TBS frío y 22,5 µl de H₂O₂ al 30%), manteniéndose en agitación hasta la aparición de color azul. La reacción de revelado se paró mediante sucesivos lavados con agua.

6) ENSAYOS HISTOQUÍMICOS:

PREPARACIÓN DE TEJIDOS PARA ESTUDIOS HISTOLÓGICOS

Fijación de los tejidos

La solución de fijación estaba compuesta por paraformaldehído al 4% en tampón fosfato salino pH 7,4 (PBS: NaCl 0,14 M, KCl 2,7 mM, KH_2PO_4 1,5 mM y Na_2HPO_4 8,1 mM). Esta solución se preparó añadiendo 40 gr de paraformaldehído a 800 ml de agua a 60°C. Para facilitar su disolución, se añadieron 3-4 gotas de NaOH 1N a la solución en agitación. Una vez fría y filtrada la solución, se añadieron 100 ml de PBS 10X, se llevó el volumen final a 1 litro con agua destilada.

Los cerebelos de cerdo adulto utilizados en los estudios histoquímicos, tras su separación del resto del encéfalo, se fragmentaron en piezas de 1 cm³ y se fijaron inmediatamente por inmersión en la solución de fijación durante 24 h a 4°C. Para una fijación óptima, el volumen del fijador era al menos 10 veces superior al de las piezas. Tras la fijación, se lavaron con PBS durante 48 h a 4°C, realizando varios cambios.

Los pollos se fijaron por perfusión transcardiaca. Para ello, primero se anestesiaron con éter y se colocaron en posición cúbito-supino sobre un corcho, sujetando debidamente sus miembros. Tras una sección en el abdomen, se accedió al corazón eliminando parte de la caja torácica. Se realizaron dos incisiones en el corazón: en la aurícula derecha y en el ventrículo izquierdo. Con una aguja de punta roma unida a un sistema de flujo controlado, se le inyectaron unos 40 ml de solución de fijación por la incisión realizada en el ventrículo izquierdo a una velocidad suave y continua. La sangre y la el fijador inyectado abandonaron el torrente sanguíneo por la incisión en la aurícula derecha. Tras la perfusión, los animales se decapitaron y se aisló el encéfalo, continuando con la fijación por inmersión en la misma solución de fijación durante 24 h a 4°C. Después, se lavaron con PBS como en cerdo.

Microtomía en criostato

Tras los lavados en PBS, cada pieza de cerebelo de cerdo o de encéfalo de pollo se llevó a sacarosa al 10%, Na_3N al 0,1% en PBS durante 2-3 días a 4°C, con varios cambios diarios. A continuación, se sumergió en una solución de sacarosa al 10%, gelatina al 10% en PBS durante 20-30 minutos a 37°C. De esta manera se consiguió que la gelatina rodease por completo la pieza.

Por otra parte, en un molde de 5 cm² se añadieron 2 ml de solución de sacarosa/gelatina que solidificó a 4°C. Sobre esta base se colocó la pieza y se cubrió completamente con más solución de sacarosa/gelatina hasta cubrirla por completo. Mientras se solidificaba el bloque, se procedió a la orientación de la pieza según el plano de corte deseado. Después, se dejó a 4°C durante 10 min, con el fin de que solidificase aún más la gelatina. A continuación, se cortó con una cuchilla un bloque cúbico que contenía en el centro la pieza de tejido debidamente orientada. Para la manipulación del bloque fue preciso pegarlo a una lámina de corcho de 2 cm² de superficie y 3 mm de espesor, utilizando para ello unas gotas de Tissue-Tek (Sakura), que solidifica a bajas temperaturas.

La congelación del material se realizó sumergiendo el conjunto corcho/Tissue-Tek/bloque en alcohol isopropílico a -70°C durante 2 min. Esta temperatura se alcanzó añadiendo hielo seco al isopropílico. Después, se sacó el conjunto, se eliminó el exceso de alcohol con papel secante y se envolvió con papel de aluminio debidamente etiquetado con los datos de la pieza. Se almacenó a -80°C hasta el momento de ser cortada.

Los cortes se realizaron en un microtomo de congelación o criostato (Leica CM 1900) con un grosor de 20 µm. Se obtuvieron secciones seriadas que se recogieron en portaobjetos superfrost, se dejaron secar durante 30 min y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Microtomía en “gloop”

El *gloop* es una solución compuesta de albúmina de huevo, gelatina y sacarosa donde se quedan embebidas las piezas de tejido formando un bloque sólido. Para su preparación, se añadieron gradualmente 100 ml de PBS a 56 gr de albúmina de huevo, removiendo cada 10 minutos y evitando formar espuma. Se dejó reposar unas horas a 4°C. La gelatina se disolvió en 50 ml de PBS, por agitación y con ayuda de calor. Después se dejó enfriar y se añadió la sacarosa agitando hasta su disolución. Esta solución gelatina/sacarosa se añadió a la albúmina, removiendo suavemente. La mezcla se filtró con una gasa y se guardó a -20°C. Antes de su uso, el *gloop* se licuaba en el microondas.

La formación del bloque se realizó mezclando rápidamente y hasta homogeneidad 10 ml de *gloop* con 1 ml de glutaraldehído al 25%. La mezcla se llevó a un molde de plástico donde polimerizó inmediatamente. Sobre esta base, se depositó la pieza de tejido a incluir y sobre ella se vertió una nueva mezcla de *gloop*/glutaraldehído recién preparada. Una vez solidificada, la pieza se sumergió en PBS a 4°C hasta su corte en secciones.

Se realizaron secciones para-sagitales de 150 μm de grosor en un vibrotomo (Microcut H-1200). Tras eliminar los residuos de *gloop* bajo la lupa, se sumergieron en paraformaldehído al 4% en PBS, para fijar mejor las secciones de tejido. Finalmente, se mantuvieron en PBS a 4°C hasta su uso.

TINCIÓN DE TEJIDOS

Tinción de cresil violeta

Esta tinción permite visualizar los núcleos y los acúmulos de retículo endoplásmico rugoso (grupos de Nissl) en las neuronas. Para ello, los portaobjetos conteniendo las secciones se sumergieron en una solución colorante compuesta por cresil violeta al 0,01% (p/v), tionina al 0,01% (p/v), ácido acético al 0,05% y acetato sódico al 0,12%, atemperada a 37°C durante 5 min. Se lavaron con agua destilada durante 2 min. Para eliminar el exceso de colorante y aumentar el contraste, se utilizó etanol al 90% y 3 gotas de ácido acético glacial durante 1 min. Tras la tinción se montaron los portaobjetos con cubreobjetos.

Tinción con azul de toluidina

Las secciones se tiñeron alternativamente con azul de toluidina para la localización de diferentes estructuras. Para ello, los cortes se tiñeron con azul de toluidina al 1% (p/v) y tetraborato sódico al 2% durante 1 min. Después, se lavaron con agua, se dejaron secar y se montaron los portaobjetos con cubreobjetos.

MONTAJE DE LOS PORTAOBJETOS

El montaje de los portaobjetos con las secciones se realizó con el medio de montaje Eukitt (O. Kindler GMBH & CO), que requiere una etapa previa de deshidratación de las secciones. Los portaobjetos se sumergieron sucesivamente durante 3 min en soluciones de etanol al 70%, 80%, 90%, 2 veces en etanol absoluto y 2 veces en xilol. En un cubreobjetos se aplicó una tira de Eukitt y se depositó con cuidado sobre las secciones sin que se formaran burbujas. Una vez secas, las secciones estaban listas para su observación al microscopio óptico (Nikon E600).

INMUNOHISTOQUÍMICA EN SECCIONES DE TEJIDO

Las reacciones inmunohistoquímicas se realizaron generalmente sobre secciones de criostato depositadas en portaobjetos, que se dejaron secar durante al menos una hora. Antes de comenzar el tratamiento, se bordearon las zonas ocupadas por las secciones con un esmalte, actuando de embalse para las soluciones utilizadas. Alternativamente, también se realizaron sobre secciones en flotación de piezas incluidas en *gloop* en placas multipocillos.

Las secciones se permeabilizaron con PBS-Tritón X-100 al 0,05% (PBS-T) durante 15 min. Después, la peroxidasa endógena se inactivó mediante la incubación con H₂O₂ al 0,2% en PBS-T durante 45 min. Se realizaron dos lavados de 15 min con gelatina al 0,2%, Tritón X-100 al 0,25% en PBS (PBS-G-T) y las uniones inespecíficas se bloquearon mediante la incubación de las secciones con lisina 0,1 M en PBS-G-T. Esta incubación se realizó durante 1 h en cámara húmeda a temperatura ambiente. A continuación se añadió el anticuerpo primario diluido en PBS-G-T, realizándose la incubación en cámara húmeda y a temperatura ambiente durante toda la noche. Tras 3 lavados de 10 min con PBS-T y uno en PBS-G-T, se añadió un anticuerpo secundario conjugado con biotina (Sigma), diluido 1/300-600 en PBS-G-T, durante 2 h en la cámara húmeda y a temperatura ambiente. Después, se realizaron 3 lavados de 10 min en PBS-T y uno en PBS-G-T, y se incubó con ExtrAvidin-peroxidasa (Sigma) diluida 1/200 en PBS-G-T durante 2 h en cámara húmeda y a temperatura ambiente. La ExtrAvidin-peroxidasa se une a biotina y permite amplificar el efecto de la peroxidasa. Posteriormente, se hicieron 3 lavados de 10 min con PBS-T y se aplicó una solución con 3,3'-diaminobencidina tetrahidroclorada (DAB, 5 mg de DAB en 20 ml de PBS y 40 µl de H₂O₂ al 35%), como sustrato para el revelado. Esta solución se preparó inmediatamente antes de su utilización, parándose la reacción mediante varios lavados con PBS-T.

INMUNOFLUORESCENCIA EN SECCIONES DE TEJIDO

Alternativamente, se hicieron ensayos de doble inmunofluorescencia para realizar co-localización de proteínas, para lo cual las secciones se incubaron sucesivamente con dos anticuerpos primarios (monoclonal y policlonal) y después con dos anticuerpos secundarios

unidos a moléculas fluorescentes (anti-conejo Alexa 594 y anti-ratón Alexa 488, de Molecular Probes) diluidos 1/500 en PBS-G-T durante 2 h en cámara húmeda, a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente, tras lavar 3 veces con PBS durante 5 min y una vez con agua, se montaron los portaobjetos con las secciones aplicando a los cubreobjetos el medio de montaje FluorSave™ Reagent (Calbiochem) y dejando secar durante 5 h en oscuridad. Para conservar la fluorescencia, los portaobjetos se almacenaron a 4°C en oscuridad hasta su visualización en el microscopio de fluorescencia (Nikon E600).

7) ENSAYOS DE RT-PCR:

EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE RNA

Extracción de RNA con Trizol

Para la extracción del RNA total de tejidos se utilizó Trizol (Invitrogen) siguiendo el protocolo especificado por el fabricante. Todas las etapas se realizaron en una zona muy limpia y con el material estéril o limpiado previamente con etanol al 70% y con una solución autoclavada de dietilpirocarbonato al 0,1% (H₂O-DEPC) para eliminar RNasas.

Se partió de cerebelos de ratón a distintos estadios de desarrollo (embrionario, postnatal y adulto). El cerebelo se homogeneizó en un potter con 1 ml de Trizol por cada 100 mg de tejido, y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente para la completa disociación de complejos de nucleoproteína. Después, el RNA se separó por adición de 0,2 ml de cloroformo por cada ml de homogeneizado, mezclando vigorosamente durante 15 seg. Tras incubar a temperatura ambiente durante 2-3 min, se centrifugó a 12.000xg durante 15 min a 4°C, obteniéndose 3 fases: una fase fenólica (de color rosa del Trizol, en el fondo del tubo), otra fase conteniendo proteínas y DNA (blanca, en la mitad del tubo), y una tercera fase acuosa en la que se obtuvo el RNA (incolora, en la parte superior). Para precipitar el RNA, esta fase acuosa se transfirió a un nuevo vial y se añadieron 0,5 ml de alcohol isopropílico por cada ml de homogeneizado inicial, mezclando por inversión del tubo e incubando a temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente, se centrifugó a 12.000xg durante 10 min a 4°C. El RNA presente en el precipitado se lavó con 1 ml de etanol al 75% en H₂O-DEPC por cada ml de homogeneizado inicial y se mezcló en vórtex. Se centrifugó a 7.500xg durante 5 min a 4°C y el sobrenadante se eliminó con mucho

cuidado, dejando secar el precipitado de RNA al aire. El RNA se disolvió en 50 μ l de H₂O-DEPC por cada ml de homogeneizado inicial, se incubó durante 10 min a 55°C y se almacenó rápidamente a -80°C.

Cuantificación de RNA

El RNA extraído se cuantificó espectrofotométricamente por absorbancia a 260 nm, teniendo en cuenta que 1 unidad A_{260} es 40 μ g/ml para RNA. La calidad del RNA se estimó mediante la relación A_{260}/A_{280} , que en todos los casos fue próximo a 2 (alta pureza).

Electroforesis de RNA en gel de agarosa

La calidad e integridad del RNA extraído se analizó también en un gel de agarosa al 2% preparado en tampón de electroforesis (MOPS 0,2 M (pH 7), acetato sódico 20 mM y EDTA 10 mM (pH 8) y formaldehído 2,2 M en H₂O-DEPC). Para ello, la agarosa se disolvió en este tampón calentando hasta su disolución, se le añadió bromuro de etidio al 0,001% y se dejó solidificar a temperatura ambiente en la cubeta de electroforesis con un peine para formar los pocillos. Las muestras de RNA (20 μ g) se prepararon en el mismo tampón de electroforesis pero con formamida al 50%, y se incubaron a 65°C durante 15 min. Tras enfriar las muestras en hielo durante 10 min, se les añadió un tampón de carga con glicerol al 50%, EDTA 10 mM (pH 8), azul de bromofenol al 0,25% (p/v) y cianol xileno al 0,25% (p/v) en H₂O-DEPC. Antes de cargar, el gel se sumergió en tampón de electroforesis y se pre-corrió durante 5 min a 5 V. Después, se cargaron las muestras y se corrieron a 80 V a temperatura ambiente. Al finalizar la electroforesis, el RNA se visualizó mediante su exposición a luz ultravioleta (que excita al bromuro de etidio intercalado en el RNA durante la migración) en un sistema Gel Doc acoplado a Molecular Imager (Bio Rad).

TRANSCRIPCIÓN REVERSA

A partir del RNA total extraído con Trizol, se sintetizó el cDNA utilizando el kit “AMV Reverse Transcriptase” (Roche) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Para ello, se preparó una mezcla de reacción con tampón de reacción (suministrado en el kit), MgCl₂ 5 mM, dNTPs mix 1 mM, 1,6 μ gr de oligodT, 50 U de Inhibidor de RNasas y 20 U de la enzima AMV-RT. Tras añadir a esta mezcla 5 μ g de RNA, se incubó a 25°C

durante 10 min (en este tiempo el oligodT se une a la cadena poliA de los RNA mensajeros). Después, se incubó a 42°C durante 60 min (produciéndose la transcripción reversa). Se incubó a 99°C durante 5 min (para desnaturalizar la enzima), se enfrió a 4°C durante 5 min y se guardó a -20°C hasta su uso.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

Para el análisis de la expresión de isoformas PMCA se diseñaron oligonucleótidos o cebadores que amplificaban secuencias no traducidas tras el codón de terminación “atg” cercanas al extremo 3’ y que son las que permiten diferenciar mejor unas isoformas de otras (Zacharias *et al.*, 1997; García *et al.*, 1997). Las secuencias de las PMCA’s utilizadas tienen los siguientes números de acceso del SwissProt: PMCA1, J03753; PMCA2, NM_001683. Los cebadores fueron suministrados por Isogen, se resuspendieron en tampón Tris/HCl 10 mM, EDTA 1 mM (pH 8) hasta una concentración final de 100 µM y se almacenaron a -20°C. También se utilizaron cebadores para la amplificación de β-actina como control. Las secuencias se muestran en la Tabla 2.

ISOFORMA	CEBADORES	Nº pb amplificadas
PMCA1	5’-CACAACTTTATGACACACC-3’ 5’-TGTGTCTTCTGTTGAAGTCC-3’	359 pb
PMCA2	5’-AGGCACCCAACTCACCC-3’ 5’-CAGTCTCGGAAAAG-3’	575 pb
β-actina	5’-TCTACAATGAGCTGCGTGTG-3’ 5’-TACATGGCTGGGGTGTGAA-3	100 pb

Tabla 2 Secuencias de los cebadores utilizados en los ensayos de PCR.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó en un medio que contenía el tampón de la Taq DNApolimerasa (Tris/HCl 10 mM (pH 9), KCl 50 mM y Tritón X100 al 0,1%), la mezcla de dexosirribonucleótidos (dNTPs mix) 5 mM, MgCl₂ 7,5 mM, Oligo sentido 1 µM, Oligo antisentido 1 µM, , 5 µl cDNA y 2 U Taq DNApolimerasa (Promega), en un volumen final de 25 µl.

La reacción transcurrió en las siguientes etapas: 1) desnaturalización a 94°C durante 1 min, 2) hibridación de los cebadores al DNA molde a 55°C durante 1 min, 3) polimerización a 72°C durante 1 min, 4) 30 ciclos desde la etapa 1, 5) final de elongación a 72°C durante 10 min, y 6) mantenimiento de los productos de PCR a 4°C.

ELECTROFORESIS DE DNA EN GEL DE AGAROSA

Los productos de PCR se analizaron mediante su separación por electroforesis en un gel de agarosa al 2% en Tris/acetato 40 mM, EDTA 1 mM (TAE) con bromuro de etidio al 0,004% (v/v). Las muestras se prepararon en un tampón de carga que contenía azul de bromofenol al 0,05% (p/v), azul de xileno al 0,05% (p/v) y glicerol al 6% (v/v) y se cargaron en los pocillos del gel. La electroforesis se realizó en tampón TAE a 60 mA y a temperatura ambiente. La visualización de los productos de PCR se realizó mediante exposición a luz ultravioleta en un Gel Doc acoplado a Molecular Imager (Bio Rad).

8) ENSAYOS EN CULTIVOS NEURONALES PRIMARIOS:

PREPARACIÓN DE CULTIVOS NEURONALES PRIMARIOS DE CEREBELO DE RATÓN

Preparación de discos para el cultivo

Los cultivos primarios se realizaron sobre discos de cristal de 12 mm de diámetro (Deckgläser) dispuestos en una placa de 60 mm de diámetro (p60) para realizar ensayos de inmunolocalización.

Los discos se esterilizaron previamente por inmersión en HNO₃ puro durante 24 h. Tras 3 lavados de 30 min en H₂O milliQ estéril, se dejaron secar toda la noche en una estufa a 120°C y se colocaron en la cabina de flujo laminar bajo luz ultravioleta durante 1 h. Posteriormente, se colocaron 10 de estos discos en una placa p60.

El sustrato utilizado para la adhesión de las células fue poli-lisina y laminina y se aplicó bajo la cabina de flujo laminar. En primer lugar, se añadieron a cada placa p60 500 µl de Poly-L-lysine Hydrobromide (Sigma) en tampón borato (pH 8,9) a una concentración de 100 µg/ml, incubando durante 6 h. Tras 3 lavados de 30 min con H₂O milliQ estéril, se dejaron secar unos minutos. Después, se añadieron 500 µl de una solución de laminina preparada en medio Neurobasal (NB, Gibco) a una concentración de 10 µg/ml, incubando durante toda la noche. Se realizaron 3 lavados de 5 min con medio NB y se añadieron 3 ml de NB con suero de caballo al 10%. Las placas p60 con los discos preparados para el cultivo se guardaron en el incubador a 37°C, 5% CO₂ hasta la siembra de células.

Disección, tripsinización y siembra

El cultivo primario se realizó a partir de cerebelos de fetos de ratón de la variedad Swiss de 18 días de gestación (E18). Para ello, se anestesió con CO₂ una hembra de ratón preñada de ese estadio (Servicio de Animalario del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, Madrid) y se colocó en posición cúbito-supino bajo la cabina de flujo laminar. Tras rociar con etanol al 70%, se realizó un corte en la parte inferior del abdomen y se extrajo el saco embrionario. Los embriones (8-12) se llevaron a una placa p60 con medio Hanks sin Ca²⁺ y sin Mg²⁺ (HBSS, Gibco), se decapitaron y se les extrajo el encéfalo. El cerebelo de cada feto se aisló bajo la lupa, quitando muy bien las meninges, y se cortaron en fragmentos que se llevaron con una pipeta pasteur siliconizada a un tubo estéril en hielo.

Para disgregar el tejido, se incubó con 3 ml de tripsina al 0,25% (sin EDTA) durante 20 min a 37°C. Tras 3 lavados con 3 ml de HBSS de 5 min a temperatura ambiente, el tejido se disgregó totalmente con la ayuda de una pipeta. Para determinar la viabilidad celular y el número de células obtenidas tras la disgregación, se tomó una alícuota de la suspensión celular (10 µl) y se mezcló con el mismo volumen del marcador de células muertas azul tripán. La mezcla se colocó en una cámara de contaje de Neubauer y en un microscopio invertido se contaron las células vivas (no teñidas de azul) presentes en ese volumen, calculando la densidad celular de la suspensión inicial (10⁶ - 5x10⁶ células).

El cultivo se realizó sembrando 250.000 células en una placa p60 con discos preparados para el cultivo, incubando 3 h en un incubador a 37°C y 5% CO₂. Tras este tiempo, los discos con las células adheridas se colocaron boca abajo en placas p60 con 3 ml de medio NB-B27 (B27 al 2%, piruvato al 1%, antibióticos al 0,1%, glutamina al 1% en NB, v/v), manteniéndolos en el incubador a 37°C y 5% CO₂ durante 48 h.

INMUNOCITOQUÍMICA DE CÉLULAS EN CULTIVO

Fijación de las células

Las células adheridas en los discos y dispuestos en las placas p60, se lavaron con PBS estéril tras su cultivo. La fijación se efectuó añadiendo en la placa una solución de 3 ml de paraformaldehído al 4% y sacarosa al 4% en PBS, pasada previamente por un filtro de 0,45 µm, e incubando a 37°C durante 20 min. Tras ese tiempo, se realizaron 3 lavados de 5 min con PBS para eliminar los restos del fijador, y se almacenaron con 3 ml de PBS a 4°C.

Inmunofluorescencia

Las neuronas de cultivos primarios de cerebelo de ratón, sembradas a baja densidad en discos de cristal, fijadas y guardadas a 4°C en PBS, se utilizaron en ensayos de doble inmunolocalización con anticuerpos fluorescentes. Para ello, cada disco se colocó en una cámara húmeda y las células se permeabilizaron con 50 µl de PBS-Tritón X100 al 0,2% durante 5 min. Se realizaron 3 lavados en PBS de 5 min y se bloqueó con 50 µl de PBS-BSA al 5% durante 1 h a temperatura ambiente en cámara húmeda. Posteriormente, se incubó con dos anticuerpos primarios (monoclonal y policlonal) diluidos en PBS-BSA al 1% (25 µl) durante 1 h a temperatura ambiente. Tras 3 lavados en PBS de 5 min, se incubó con los anticuerpos secundarios unidos a moléculas fluorescentes (anti-conejo Alexa 594 y anti-ratón Alexa 488), diluidos 1/500 en PBS-BSA al 1% (25 µl), durante 1 h a temperatura ambiente y en oscuridad. Se realizaron 3 lavados en PBS de 5 min en oscuridad, y uno con agua y se dejó escurrir apoyando sobre papel de filtro. Los discos se depositaron boca abajo sobre una gota de medio de montaje FluorSaveTM Reagent (Calbiochem) en un portaobjetos y dejando secar 5 horas en oscuridad. Se almacenaron a 4°C en oscuridad hasta su visualización en el microscopio de fluorescencia (Nikon E600).

9) PREPARACIÓN DE MEMBRANAS RESISTENTES A DETERGENTES POR FLOTACIÓN

El aislamiento de “rafts” se realizó según el método de Naslavsky *et al.* (1997), pero sustituyendo el Tritón X-100 por Brij 96V (Fluka). Básicamente, 0,75 ml de MPS (7-10,5 mg de proteína) en Tris/HCl 25 mM (pH 7,4) y NaCl 150 mM se incubaron con Brij 96V al 0,5% (p/v) durante 1 h a 4°C en agitación. Después, se mezclaron con 0,75 ml de Nycodenz (Sigma) al 35% (p/v) y se dispusieron en el fondo de un tubo de centrifuga de 5 ml. A continuación se formó un gradiente con 214 µl de soluciones de Nycodenz al 25%, 22,5%, 20%, 18%, 15%, 12% y 8% (v/v) preparadas en Tris/HCl 25 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM y Brij 96V al 0,5%. Se centrifugó a 260.000xg (rotor MLS-50, OptimaMax, Beckman) durante 4 h a 4°C. El gradiente se eluyó de arriba abajo, recogándose 13 fracciones de 230 µl.

10) DETERMINACIÓN DE COMPONENTES DE “RAFTS”:

DETERMINACIÓN DE GM1

La detección del gangliósido GM1 se realizó mediante la técnica de Dot Blot con la subunidad B de la Tóxina del cólera (CTX-B), que se une exclusivamente y con alta afinidad a este gangliósido. Para ello, se depositaron 0,5 µl de cada fracción de muestra en una membrana de nitrocelulosa (PROTRAN®) hasta su total adsorción. Una vez seca, la membrana se lavó con Tris/HCl 25 mM (pH 7,4) y NaCl 500 mM (TBSd) durante 5 min a temperatura ambiente y agitación, y después se añadió cloruro de guanidinio 6 M directamente sobre cada muestra, incubándose durante 5 min a temperatura ambiente. Tras varios lavados de 5 min con TBSd-Tween20 al 0,05% (TBSTd), se bloqueó con TBSTd conteniendo leche desnatada en polvo al 3% durante 2 h a temperatura ambiente y agitación. Posteriormente, la membrana se lavó 3 veces con TBSTd y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente con CTX-B conjugada con peroxidasa (Calbiochem, 1/20.000 en TBSTd). El revelado se realizó en oscuridad incubando con un sustrato quimioluminiscente (BioRad) durante 5 min y, posteriormente, exponiendo la membrana a una película fotográfica (Kodak) durante 1 s. Esta película se sumergió después en revelador fotográfico (Sigma) durante 1 min, se lavó rápidamente con agua y se sumergió en fijador fotográfico (Sigma) durante 5 min. Después, se lavó abundantemente con agua y se dejó secar.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE COLESTEROL

El contenido de colesterol de las fracciones de membrana se determinó colorimétricamente usando la reacción del cloruro férrico con una solución de ácido sulfúrico y ácido acético, según el método de Zlatkis *et al.* (1953). Básicamente, una alícuota (10 µl) de cada fracción se mezcló con 80 µl de una solución de cloroformo/metanol (2/1, v/v). La fase conteniendo los lípidos se transfirió a un tubo de vidrio y se secó con nitrógeno. El colesterol se extrajo por la adición de 0,75 ml de ácido acético y 0,5 ml de reactivo de cloruro férrico (1 ml de FeCl₃ al 2,5% (p/v) en H₃PO₄ al 85% con 11,5 ml de H₂SO₄ concentrado). Tras incubar durante 30 min, la absorbancia se midió a 550 nm. En paralelo, se realizó una recta patrón con distintas concentraciones de colesterol (0-6 µg).

11) ANTICUERPOS:

PREPARACIÓN DE UN ANTICUERPO POLICLONAL

Se ha preparado el anticuerpo policlonal “a-cb” producido en conejo (*Oryctolagus cuniculus*, raza *New Zealand*) utilizando como antígeno la PMCA sinaptosomal purificada de cerebelo de cerdo. Para ello, se han seguido los siguientes pasos:

Inmunización

Se preparó una emulsión con el antígeno (50 µg de PMCA y PBS hasta 500 µl) y Adyuvante Completo de Freund (500 µl), mezclando lentamente hasta total homogeneidad. Esta emulsión se inyectó en dos dosis vía intramuscular a ambos costados del animal. Tres semanas después, se realizó una segunda inmunización preparando una emulsión similar pero con Adyuvante Incompleto de Freund. Una semana después, se extrajo una alícuota de sangre de la oreja del animal para comprobar la producción de anticuerpos mediante ELISA y Western Blot. Se realizaron 6 inmunizaciones más cada dos semanas, con sus respectivos controles de la producción de anticuerpo, hasta obtener el mayor nivel de anticuerpo en sangre.

Obtención del anticuerpo

Se extrajo la mayor cantidad posible de la sangre del animal y se dejó coagular durante 7 horas a temperatura ambiente. Después, se centrifugó a 8.000xg durante 10 min a 4°C, obteniéndose el sobrenadante libre de células (suero), que se almacenó a -80°C hasta su uso, denominándose “anticuerpo a-cb”.

ANTICUERPOS PRIMARIOS UTILIZADOS

Los anticuerpos primarios usados en los ensayos de inmunodetección se describen en las Tablas 3, 4, 5 y 6.

ANTICUERPO	CLASE	PROCEDENCIA	ANTÍGENO	ESPECIFICIDAD
IID8	Monoclonal	Affinity Bioreagents	Retículo sarcoplásmico cardiaco canino	SERCA2a y SERCA2b
Y/1F4	Monoclonal	Dr. Ana M. Mata (Lab. Dr. A.G. Lee, Southampton, Reino Unido)	Retículo sarcoplásmico de conejo	SERCA1 y SERCA2b en cerebro
anti-SERCA2a	Policlonal	Dr. F. Wuytack (KUL, Leuven, Bélgica)	Péptido	SERCA2a
anti-SERCA2b	Policlonal	Dr. F. Wuytack (KUL, Leuven, Bélgica)	Péptido	SERCA2b
anti-SERCA3	Policlonal	Affinity Bioreagents	Péptido V(29)TDARERY GPN(39)	SERCA3

Tabla 3 Relación de anticuerpos primarios anti-SERCA.

ANTICUERPO	CLASE	PROCEDENCIA	ANTÍGENO	ESPECIFICIDAD
5F10	Monoclonal	Affinity Bioreagents	PMCA purificada de eritrocito humano	Todas las isoformas PMCA
pbPMCA	Policlonal	Lab. Dra. Ana M. Mata	PMCA sinaptosomal de cerebro de cerdo	Varias isoformas PMCA
a-cb	Policlonal	Lab. Dra. Ana M. Mata	PMCA sinaptosomal de cerebelo de cerdo	Varias isoformas PMCA
anti-PMCA1	Policlonal	Affinity Bioreagents	Péptido A(5)NNSVAYSGV KNSIKEAN(22)	PMCA1a y PMCA1b
anti-PMCA2	Policlonal	Affinity Bioreagents	Péptido T(5)NSDFYSKNQ RNESS(19)	PMCA2a y PMCA2b
anti-PMCA3	Policlonal	Affinity Bioreagents	Péptido A(5)NSSIEFHPK PQQQREV(22)	PMCA3a y PMCA3b
anti-PMCA4	Monoclonal	Affinity Bioreagents	PMCA purificada de eritrocito humano	PMCA4a y PMCA4b
anti-PMCA4a (CR4a)	policlonal	Dr. E.E. Strehler (Mayo Clinic, Rochester, USA)	Péptido SYSEAVASVRTS PSTSSAVT	PMCA4a
anti-PMCA4b (JA3)	Monoclonal	Dr. E.E. Strehler (Mayo Clinic, Rochester, USA)	PMCA purificada de eritrocito humano	PMCA4b

Tabla 4 Relación de anticuerpos primarios anti-PMCA.

ANTICUERPO	CLASE	PROCEDENCIA	ANTÍGENO	ESPECIFICIDAD
anti-SPCA1	Policlonal	Dr. F. Wuytack (KUL, Leuven, Bélgica)	Péptido	SPCA1

Tabla 5 Anticuerpo primario anti-SPCA.

ANTICUERPO	CLASE	PROCEDENCIA	ANTÍGENO	ESPECIFICIDAD
anti-calbindin D28K	Monoclonal	Sigma	Calbindina-D de riñón bovino	Calbindina
anti-calbindin D28K	Policlonal	Sigma	Péptido (aa 185-199 calbindina de rata)	Calbindina
anti- sinaptofisina	Monoclonal	CRP Inc (USA)	Sinaptosoma de retina de rata	Sinaptofisina
anti- β tubulina	Monoclonal	Sigma	Tubulina de cerebro de rata	β -Tubulina
334	Policlonal	Dr. J. Ávila (CBMSO, Madrid)	Péptido	β -Tubulina
6H4	Monoclonal	Prionics	Proteína prión celular	Prion ^c
anti- γ -adaptina	Monoclonal	Sigma	Adaptina AP-1 de golgi de cerebro bovino	γ -Adaptina

Tabla 6 Relación de otros anticuerpos primarios usados en los ensayos de inmunodetección.

ANTICUERPOS SECUNDARIOS UTILIZADOS

Los anticuerpos secundarios empleados se muestran en la Tabla 7.

ANTICUERPO	ORIGEN	PROCEDENCIA	APLICACIÓN
anti-ratón conjugado a peroxidasa	Conejo	Sigma	Western Blot
anti-conejo conjugado a peroxidasa	Cabra	Sigma	Western Blot
anti-ratón conjugado a biotina	Conejo	Sigma	Inmunohistoquímica
anti-conejo conjugado a biotina	Cabra	Sigma	Inmunohistoquímica
anti-ratón Alexa488	Cabra	Molecular Probes	Inmunofluorescencia (515-535 nm, verde)
anti-conejo Alexa594	Cabra	Molecular Probes	Inmunofluorescencia (600-620 nm, rojo)
anti-ratón conjugado con oro coloidal 10 nm	Cabra	Biocell	Inmunogold
anti-conejo conjugado con oro coloidal 10 nm	Cabra	Biocell	Inmunogold

Tabla 7 Relación de anticuerpos secundarios usados en los ensayos de inmunodetección.

12) SOPORTES INFORMÁTICOS:**Bad 4**

Este programa se utilizó para calcular las concentraciones de BAPTA (quelante de Ca^{2+}) necesarias para obtener una determinada concentración de Ca^{2+} libre en los medios de reacción para los experimentos funcionales.

SigmaPlot 8.02

Utilizado en la construcción de gráficas y en los cálculos estadísticos.

Adobe Photoshop 7.0

Se utilizó en la preparación de figuras con fotografías.

TINA 2.0

Se empleó para la cuantificación de bandas en los ensayos de inmunodetección.

EndNote 6.0

Utilizado para la organización de la bibliografía.

Capítulo 1

LOCALIZACIÓN DE LAS Ca^{2+} -ATPasas DE RETÍCULO ENDOPLÁSMICO Y DE MEMBRANA PLASMÁTICA EN CEREBELO DE CERDO

Resumen

La presencia funcional y la localización de las Ca^{2+} -ATPasas de retículo sarco(endo)plásmico (SERCA) y de membrana plasmática (PMCA) se ha analizado en fracciones subcelulares y secciones de cerebelo de cerdo adulto. Ensayos de Western blot con anticuerpos específicos revelan un mayor contenido de la proteína SERCA en microsomas y de la proteína PMCA en vesículas de membrana plasmática. Esta distribución se corroboró mediante medidas de actividad Ca^{2+} -ATPasa en presencia de inhibidores específicos de SERCA (tapsigargina) o con más afinidad por PMCA (vanadato). La distribución de ambas proteínas se analizó también en secciones de cerebelo. El anticuerpo anti-SERCA IID8 marcó el citoplasma de las células de Purkinje y granulares, y los glomérulos cerebelosos. Otro anticuerpo anti-SERCA, Y/1F4, dió inmunorreacción en células de Purkinje, interneuronas de la capa molecular y en los glomérulos. El anticuerpo anti-PMCA 5F10 marcó las células de Purkinje, incluyendo sus espinas dendríticas, así como los glomérulos cerebelosos, mientras que el anticuerpo pbPMCA marcó numerosos procesos en las tres capas de la corteza cerebelosa, algunos de ellos asociados a interacciones sinápticas. El diferente contenido y localización de ambos tipos de bombas de Ca^{2+} en específicas áreas del cerebelo de cerdo indican requerimientos precisos de Ca^{2+} en específicas regiones celulares.

INTRODUCCIÓN

Las células eucariotas utilizan el Ca^{2+} como catión de señalización para controlar numerosos eventos celulares, manteniendo gradientes de Ca^{2+} a través de las membranas intracelulares y de la membrana plasmática. En la regulación de las concentraciones intracelulares de este ión intervienen dos sistemas importantes de transporte, la Ca^{2+} -ATPasa de retículo sarco(endo)plásmico (SERCA) y la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática (PMCA), que transportan el Ca^{2+} al interior del retículo y al medio extracelular, respectivamente. Estas ATPasas están codificadas por diversos genes, dando lugar a 3 isoformas SERCA, denominadas SERCA1, 2 y 3 (MacLennan *et al.*, 1985; Brandl *et al.*, 1986; Guntjeski-Hamblin *et al.*, 1988; Lytton y MacLennan, 1988; Burk *et al.*, 1989) y a 4 isoformas PMCA denominadas PMCA1, 2, 3 y 4 (Shull y Greb, 1988; Verma *et al.*, 1988; Greb y Shull, 1989; Strehler *et al.*, 1990), que se expresan en diferentes tejidos. Entre ellos se incluye el tejido neuronal, donde el Ca^{2+} participa en procesos como la excitabilidad neuronal, la plasticidad sináptica, la muerte celular y desórdenes neurodegenerativos, entre otros (Mattson *et al.*, 2000).

Dentro del sistema nervioso, el cerebelo se conoce en gran detalle con respecto a las características morfológicas de las distintas poblaciones de neuronas y de sus circuitos de integración (Sotelo, 2004). Así, la corteza cerebelosa constituye un buen modelo en el que investigar el papel de las proteínas SERCA y PMCA en la regulación de Ca^{2+} en estos eventos. Hasta ahora se han realizado algunos estudios en distintas especies enfocados a la localización en el cerebelo de SERCA (Kaprielan *et al.*, 1989; Michelangeli *et al.*, 1991; Plessner *et al.*, 1991; Baba-Aissa *et al.*, 1996a,b) o de PMCA (de Talamoni *et al.*, 1993; Zacharias *et al.*, 1995; Stauffer *et al.*, 1997; Hillman *et al.*, 1996), particularmente en las neuronas de Purkinje. Sin embargo, no se ha analizado en profundidad la presencia de Ca^{2+} -ATPasas en otras poblaciones celulares del cerebelo y que intervienen también en la integración neuronal. Además, no existen estudios simultáneos de la localización de ambos transportadores. En este capítulo, se ha determinado el contenido de SERCA y PMCA en fracciones subcelulares de cerebelo de cerdo mediante ensayos de actividad en presencia de inhibidores de Ca^{2+} -ATPasas y ensayos de Western blot. También se ha analizado su localización en secciones cerebelosas. La distribución particular revelada para estas bombas de calcio, con diferentes propiedades reguladoras, es importante en la asociación de la actividad de cada bomba con los requerimientos de Ca^{2+} en un área específica del cerebelo.

RESULTADOS

Aislamiento de fracciones subcelulares de cerebelo de cerdo y visualización por microscopía electrónica de transmisión

La preparación de fracciones subcelulares (microsomas, sinaptosomas y vesículas de membrana plasmática sinaptosomal ó MPS) de cerebelo de cerdo adulto se realizó como se indica en la sección de “Métodos generales”. La integridad de estas fracciones tras su preparación se analizó mediante tinción negativa y observación por microscopía electrónica de transmisión (Fig. 29). Todas las fracciones de membrana tenían aspecto de vesículas cerradas e íntegras y unas dimensiones de 0,3-1,2 μm .

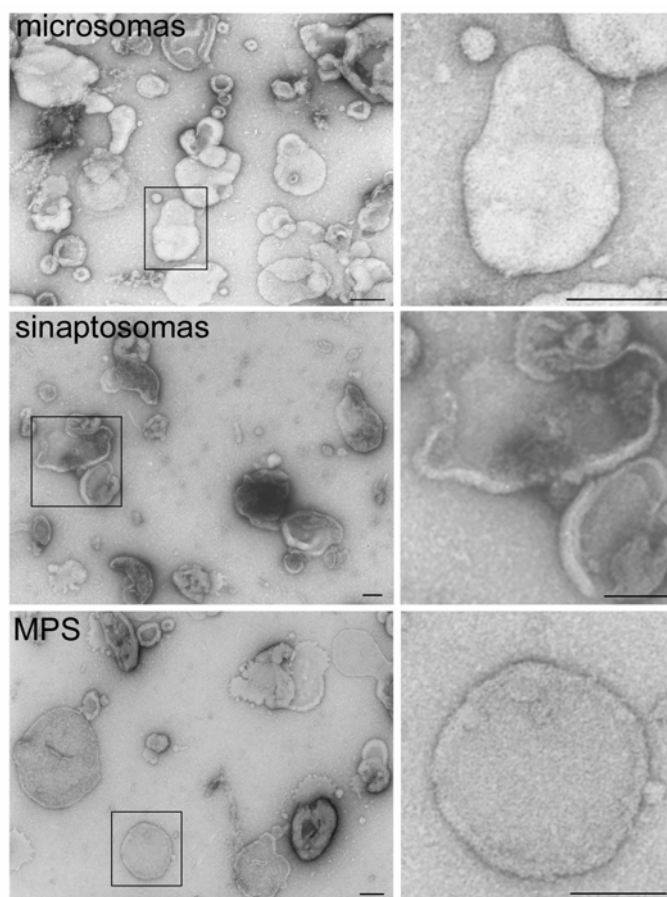


Fig. 29 Micrografías de las fracciones subcelulares aisladas de cerebelo de cerdo. Cinco μg de microsomas, sinaptosomas y vesículas de membrana plasmática sinaptosomal (MPS) se adsorbieron en rejillas de cobre, se fijaron con glutaraldehído al 2% y se tiñeron con acetato de uranilo al 2% para su visualización por microscopía electrónica de transmisión. A la derecha se muestran mayores aumentos de lo remarcado. Barras de escala: 0,25 μm .

Actividad Ca^{2+} -ATPasa en fracciones subcelulares de cerebelo de cerdo

La contribución relativa de las proteínas SERCA y PMCA a la actividad Ca^{2+} -ATPasa total en fracciones subcelulares puede evaluarse fácilmente mediante el uso de inhibidores selectivos de las bombas de calcio. El inhibidor más específico y potente de la actividad SERCA es la tapsigargina (Sagara *et al.*, 1992). La figura 30A muestra el efecto de este inhibidor en la actividad Ca^{2+} -ATPasa de fracciones subcelulares y de la fracción de PMCA sinaptosomal purificada (ver purificación en la sección de “Métodos generales”). En los microsomas, la actividad enzimática disminuyó hasta un 49% respecto a la actividad control, con un valor de $K_{0,5}$ de 40 nM. Los sinaptosomas y las MPS fueron menos sensibles a la inhibición, alcanzando una inhibición máxima del 30% y 13%, respectivamente (valores de $K_{0,5}$ de 42,5 nM y 45 nM, respectivamente). La actividad de la PMCA purificada no se inhibió a ninguna concentración de tapsigargina.

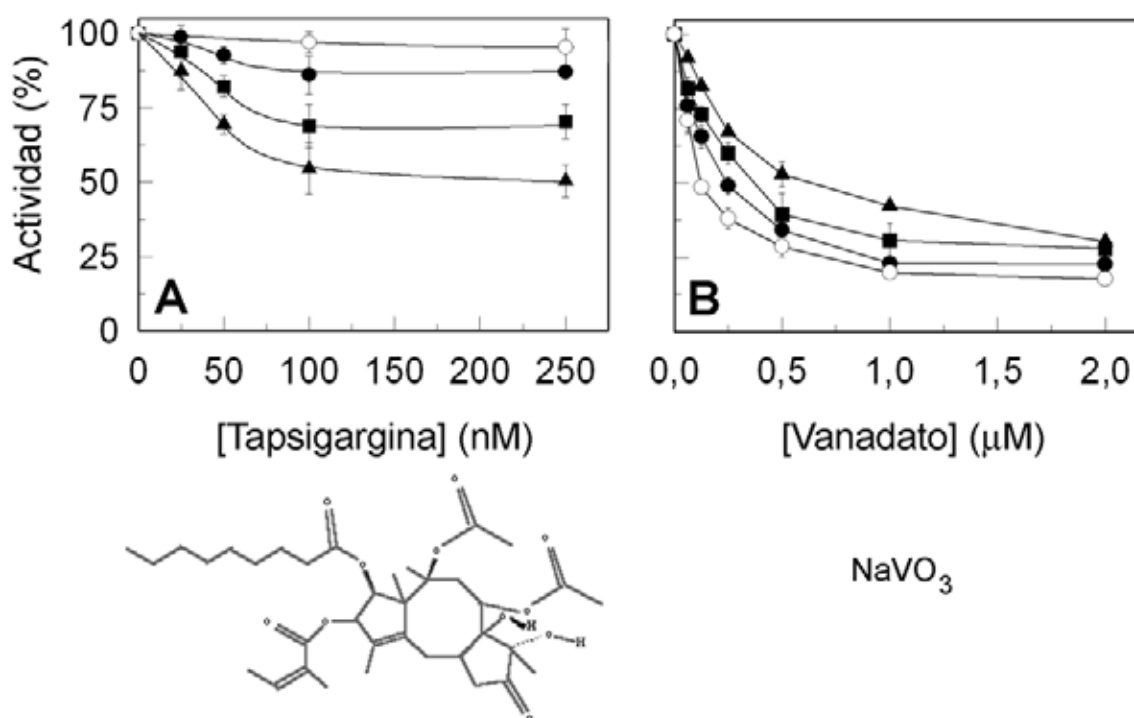


Fig. 30 Efecto de tapsigargina y vanadato en la actividad Ca^{2+} -ATPasa de fracciones subcelulares y PMCA purificada. Cuarenta μg de microsomas (▲), sinaptosomas (■), MPS (●) y 5 μg de PMCA sinaptosomal purificada y reconstituida en presencia de fosfatidilserina (○) se incubaron a 37°C durante 4 min. Tras iniciar la reacción con ATP 1 mM, se añadieron diferentes concentraciones de tapsigargina (A) o vanadato (B). Los valores obtenidos, en porcentaje, representan la media \pm D.E. (barras) de 4 experimentos diferentes, realizados por triplicado. El 100% de actividad corresponde a $0,123 \pm 0,02$, $0,127 \pm 0,01$, $0,08 \pm 0,02$ y $0,5 \pm 0,05$ $\mu\text{g Pi} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína en microsomas, sinaptosomas, MPS y PMCA purificada, respectivamente.

El vanadato es el inhibidor más efectivo de la actividad PMCA que se conoce, aunque no es completamente específico (Caroni y Carafoli, 1981). Sin embargo, la actividad PMCA se inhibe a concentraciones de vanadato inferiores a 10 μM , mientras que la actividad SERCA no se altera bajo esas condiciones. Por ello, el vanadato es particularmente útil para distinguir entre las proteínas SERCA y PMCA en preparaciones que contienen ambas enzimas. Así, la actividad Ca^{2+} -ATPasa de los microsomas se inhibió con una menor afinidad por vanadato que en los sinaptosomas, las MPS o la PMCA purificada (Fig. 30B), obteniéndose valores de $K_{0,5}$ de inhibición de 0,3 μM , 0,2 μM , 0,15 μM y 0,1 μM , respectivamente. El valor máximo de inhibición de la actividad Ca^{2+} -ATPasa (82%) se obtuvo para la fracción de PMCA purificada, en presencia de vanadato 2 μM .

Detección inmunológica de SERCA y PMCA en fracciones aisladas

El contenido y distribución de SERCA y PMCA en las fracciones aisladas de cerebelo de cerdo se determinó mediante la separación de las proteínas por electroforesis y su inmunodetección con anticuerpos específicos. La figura 31 muestra una electroforesis en un gel Laemmli al 6,5% y posterior tinción con plata de las proteínas contenidas en las tres fracciones subcelulares y la fracción de PMCA sinaptosomal purificada.

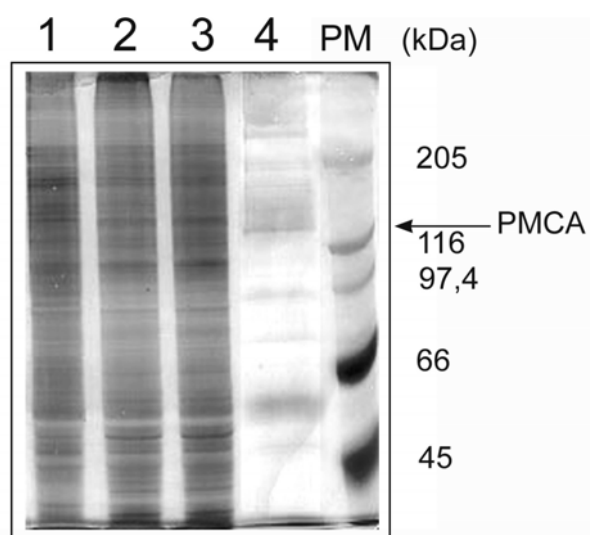


Fig. 31 Electroforesis en gel al 6,5% de poliacrilamida en SDS de fracciones subcelulares y PMCA purificada de cerebelo de cerdo. Treinta μg de microsomas (1), sinaptosomas (2) y MPS (3) y 5 μg de PMCA sinaptosomal purificada (4) se sometieron a separación en electroforesis y tinción con plata. Se indica el patrón de pesos moleculares (PM) y la banda de proteína de PMCA.

La presencia de SERCA en las fracciones subcelulares (Fig. 32A) se analizó con el anticuerpo monoclonal anti-SERCA2 IID8, que no discrimina entre las variantes SERCA2a y 2b. Este anticuerpo reconoció a la SERCA de las fracciones de membranas usadas como control para detección de SERCA2a y SERCA2b, así como a la existente en todas las fracciones cerebelosas, con una intensidad mayor en microsomas que en sinaptosomas o MPS.

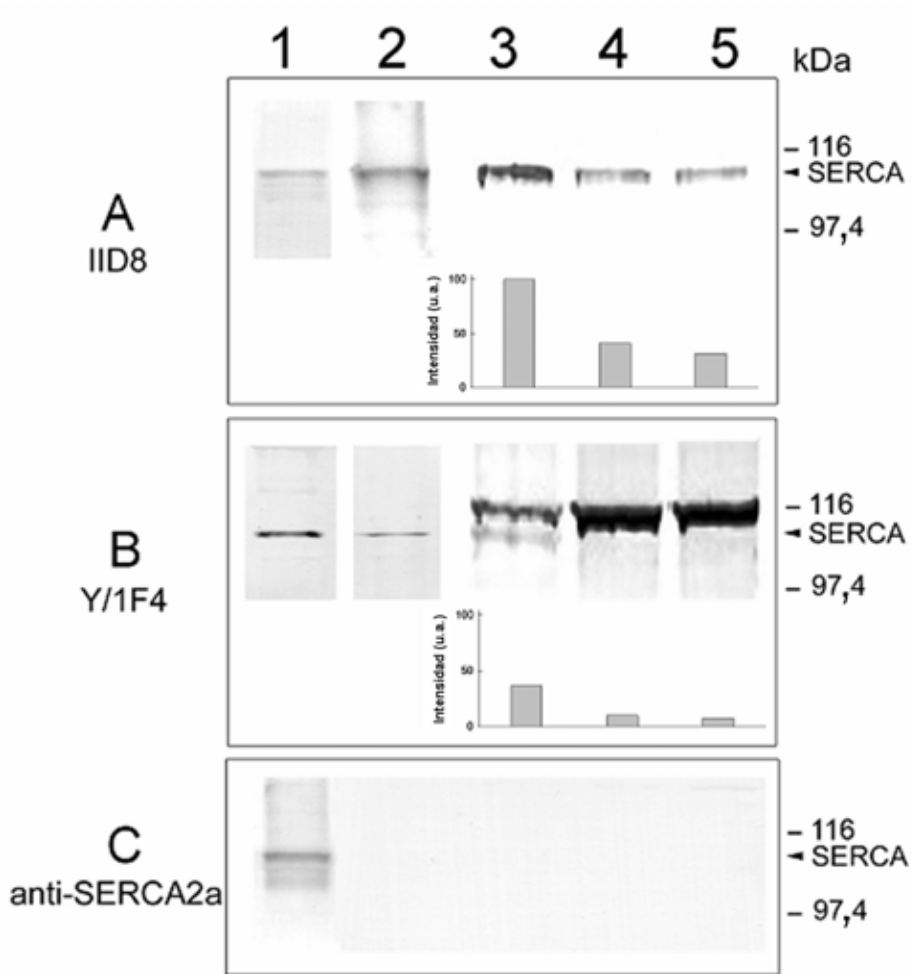


Fig. 32 Inmunorreacción de fracciones subcelulares con los anticuerpos IID8 (A), Y/1F4 (B) y anti-SERCA2a (C). Calle 1, 5 μ g de retículo sarcoplásmico cardiaco de cerdo; calle 2, 10 μ g de microsomas de células COS-1 sobreexpresando SERCA2b; calles 3-5, 30 μ g de microsomas, sinaptosomas y MPS, respectivamente. Las proteínas separadas en geles al 6,5% se transfirieron a PVDF, se incubaron con los anticuerpos IID8 (dilución 1/3.000), Y/1F4 (dil. 1/25) y anti-SERCA2a (dil. 1/200), y se revelaron con 4-metoxi-1-naftol. Se muestra un análisis cuantitativo de las bandas de proteína SERCA para las fracciones de cerebello.

Una membrana de PVDF similar se incubó con otro anticuerpo monoclonal, el Y/1F4 (Fig. 32B), que reconoce la SERCA2b en cerebro (Salvador *et al.*, 2001). Este

La presencia de la proteína PMCA en las distintas fracciones se analizó mediante su inmunorreacción con el anticuerpo monoclonal 5F10, cuyo epitopo está presente en todas las isoformas PMCA (Caride *et al.*, 1996) y con el anticuerpo policlonal pbPMCA, preparado en nuestro laboratorio frente a la PMCA sinaptosomal purificada de cerebro de cerdo (Salvador y Mata, 1996). El Western blot de todas las fracciones incubadas con 5F10 (Fig. 33A) mostró varias bandas mayoritarias en un intervalo de pesos moleculares comprendido entre 127 y 138 kDa, correspondiente a diferentes isoformas PMCA (Filoteo *et al.*, 1997). El antisuero pbPMCA (Fig. 33B) se unió mayoritariamente a una banda de proteína de alrededor de 130 kDa en todas las fracciones subcelulares de cerebelo y en la PMCA purificada, y a una segunda banda de 127 kDa que estaba presente en todas las fracciones excepto en los microsomas. Se determinó la cuantificación de las bandas mayoritarias de PMCA.

Inmunodetección de SERCA y PMCA en secciones de sinaptosomas

La localización de SERCA y PMCA en membranas específicas se realizó mediante otra aproximación experimental, utilizando secciones ultrafinas de sinaptosomas incluidos en resina acrílica del tipo LRWhite, muy adecuada para su posterior uso en ensayos de inmunodetección. Aunque este tipo de resina no permite una alta conservación de la integridad de las vesículas y órganos intracelulares, tiene la ventaja de que no afecta a la integridad de las proteínas para el reconocimiento de los epitopos por los anticuerpos. Las esferas de oro coloidal unidas a anticuerpos secundarios permitían localizar las bombas de Ca^{2+} dentro o en la membrana plasmática del sinaptosoma. Las micrografías electrónicas obtenidas (Fig. 34) muestran el marcaje de los anticuerpos anti-SERCA IID8 e Y/1F4 en las membranas intracelulares. Nótese como Y/1F4 también reconoció una proteína en la membrana plasmática que podría corresponder con la proteína detectada de mayor peso molecular en los ensayos de Western blot. La inmunorreacción de los anticuerpos específicos de PMCA 5F10 y pbPMCA se localizó en la membrana plasmática. El abundante marcaje de 5F10 se observa en la micrografía a distintos niveles de la membrana plasmática expuestos en la sección.

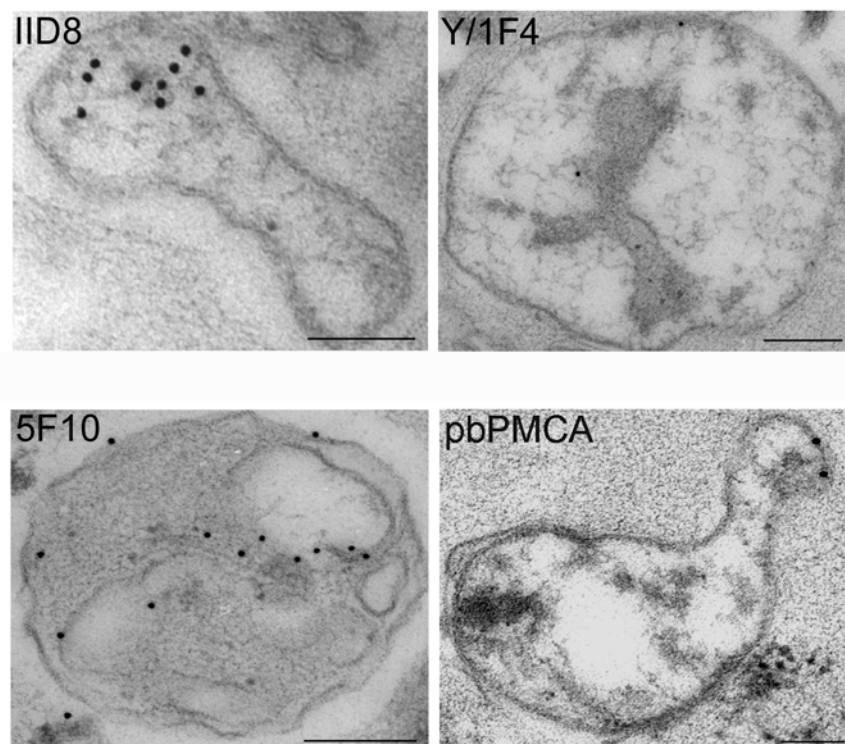


Fig. 34 Inmunodetección de bombas de calcio en secciones ultrafinas de sinaptosomas de cerebelo de cerdo con oro coloidal. La inmunorreacción se realizó como se describe en la sección de Métodos con los anticuerpos anti-SERCA IID8 (dilución 1/50) e Y/1F4 (dil. 1/1) y anti-PMCA 5F10 (dil. 1/50) y pbPMCA (dil. 1/20). Los resultados se visualizaron por microscopía electrónica de transmisión. Barra de escala, 0,2 μm .

Localización de SERCA en secciones de la corteza cerebelosa

Para analizar la localización de la bomba SERCA en la corteza cerebelosa de cerdo se incubaron secciones de criostato para-sagitales con el anticuerpo IID8, específico de SERCA2 (Fig. 35). Se observó una fuerte reacción en los somas de las células de Purkinje y en sus arborizaciones dendríticas, extendiéndose a través de toda la capa molecular. El espacio nuclear del soma de estas células resultó inmunonegativo (Fig. 35A). Las ramificaciones dendríticas se visualizaron claramente desde las dendritas principales hasta las de las espinas dendríticas (Fig. 35B). El anticuerpo también marcó el axón de la célula de Purkinje, especialmente el segmento inicial (Fig. 35C). La capa granular (Fig. 35D) presentó marcaje en los glomérulos cerebelosos y en el reducido pericarion de las células granulares. Algunas de estas células mostraron un fuerte marcaje mientras que otras aparecían débilmente marcadas.

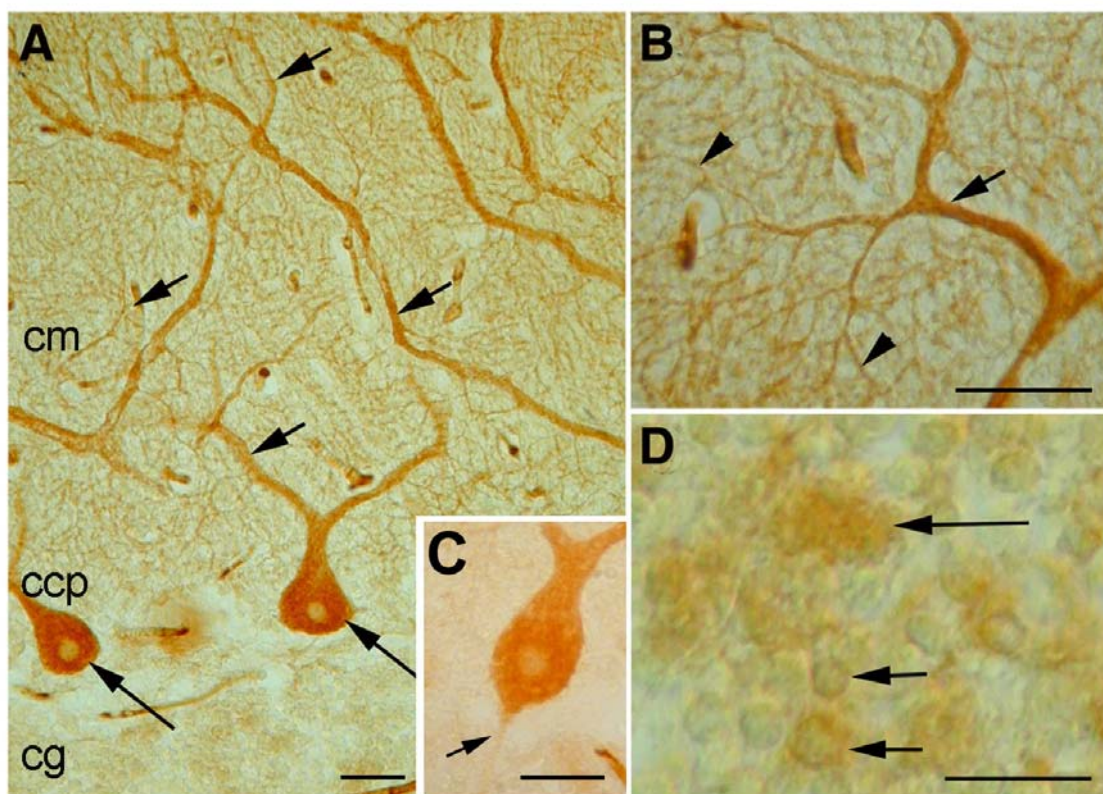


Fig. 35 Localización de SERCA con el anticuerpo IID8 en secciones de criostato. El marcaje de IID8 (dilución 1/500) se observa en el soma (flechas largas en A), árbol dendrítico (flechas cortas en A y B) y segmento inicial del axón (flecha en C) de las células de Purkinje. Nótese el marcaje en las ramillas dendríticas de estas células (cabezas de flecha en B). La capa granular muestra marcaje en los glomérulos cerebelosos (flecha larga en D) y el pericarion de células granulares (flechas cortas en D). cm: capa molecular; ccp: capa células de Purkinje; cg: capa granular. Barra de escala, 30 μ m.

La distribución de la SERCA se analizó también con el anticuerpo Y/1F4 (Fig. 36). Secciones de vibrotomo incubadas con este anticuerpo mostraron un fuerte marcaje en el soma de la célula de Purkinje (Fig. 36A). Un análisis más detallado en secciones de criostato (Fig. 36B) confirmó este marcaje y también mostró una reacción en el tronco y ramas dendríticas principales de estas células. En cambio, el núcleo y el axón fueron inmunonegativos. El anticuerpo también marcó los glomérulos cerebelosos de la capa granular observados, tras teñir las secciones con cresil violeta, en áreas desprovistas de núcleos. Sin embargo, no había reacción en las células de los granos (Fig. 36B,C). En la capa molecular, se observó un débil y uniforme marcaje (Fig. 36B) y una clara reacción en somas neuronales de la mitad inferior de esta capa (Fig. 36D) y también en la parte más externa (Fig. 36E). La posición y el tamaño de estas células corresponden con las células de los cestos y estrelladas, respectivamente. El marcaje distribuido por el pericarion y las dendritas principales fue similar al observado en las células de Purkinje.

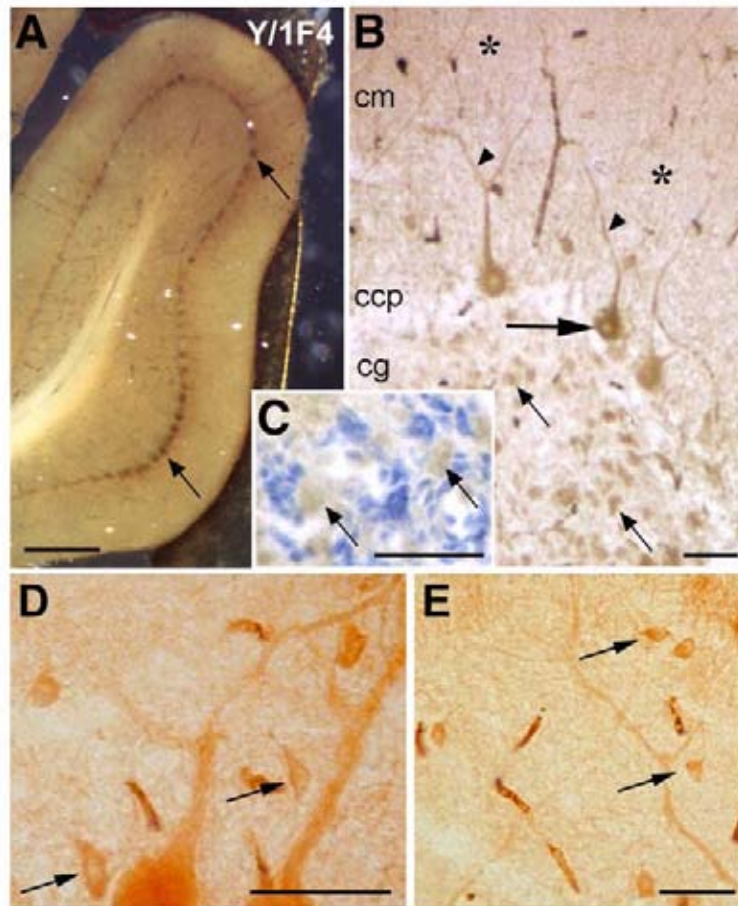


Fig. 36 Inmunohistoquímica de secciones para-sagitales con el anticuerpo Y/1F4 para la localización de SERCA. (A) Sección de vibrotomo que muestra marcaje en el soma de las células de Purkinje (flechas). (B-E) Secciones de criostato mostrando en detalle el marcaje de Y/1F4 en las 3 capas de la corteza cerebelosa. El soma (flecha larga en B) y dendritas principales (cabezas de flecha en B) de las células de Purkinje son marcadas. Nótese una débil tinción localizada por toda la capa molecular (cm, asteriscos en B). Los glomérulos cerebelosos también son marcados (flechas cortas en B), como se muestra en C tras la tinción con cresil violeta (flechas en C). En la capa molecular, el anticuerpo marca el soma y dendritas principales de las células de los cestos (flechas en D) y estrelladas (flechas en E). Dilución anticuerpo: 1/25. ccp: capa células de Purkinje; cg: capa granular. Barra de escala: A, 320 μ m; B-E, 50 μ m.

Localización de PMCA en secciones de la corteza cerebelosa

La distribución de la bomba de Ca^{2+} de membrana plasmática se analizó también en secciones para-sagitales mediante los anticuerpos específicos de PMCA, utilizados en los ensayos anteriores. El anticuerpo 5F10 (Fig. 37A) reaccionó con la periferia del soma y dendritas principales de las células de Purkinje, pero no con el pericarion y el citoplasma de sus dendritas primarias. También reaccionó con prolongaciones neurales por toda la capa molecular. Un ensayo de doble inmunofluorescencia con 5F10 y con el anticuerpo anti-calbindina (anti-CaBP), marcador de células de Purkinje (Fig. 39A-C), mostró co-

localización de estos procesos en las espinas dendríticas de la célula de Purkinje. El anticuerpo también reaccionó en la capa granular con el pericarion de las células de los granos y los glomérulos cerebelosos (Fig. 37A,B). Considerando el tamaño relativo de las rosetas de las fibras musgosas y la tinción de 5F10, este marcaje puede incluir las membranas de las dendritas de las células de los granos o del axón de las células de Golgi.

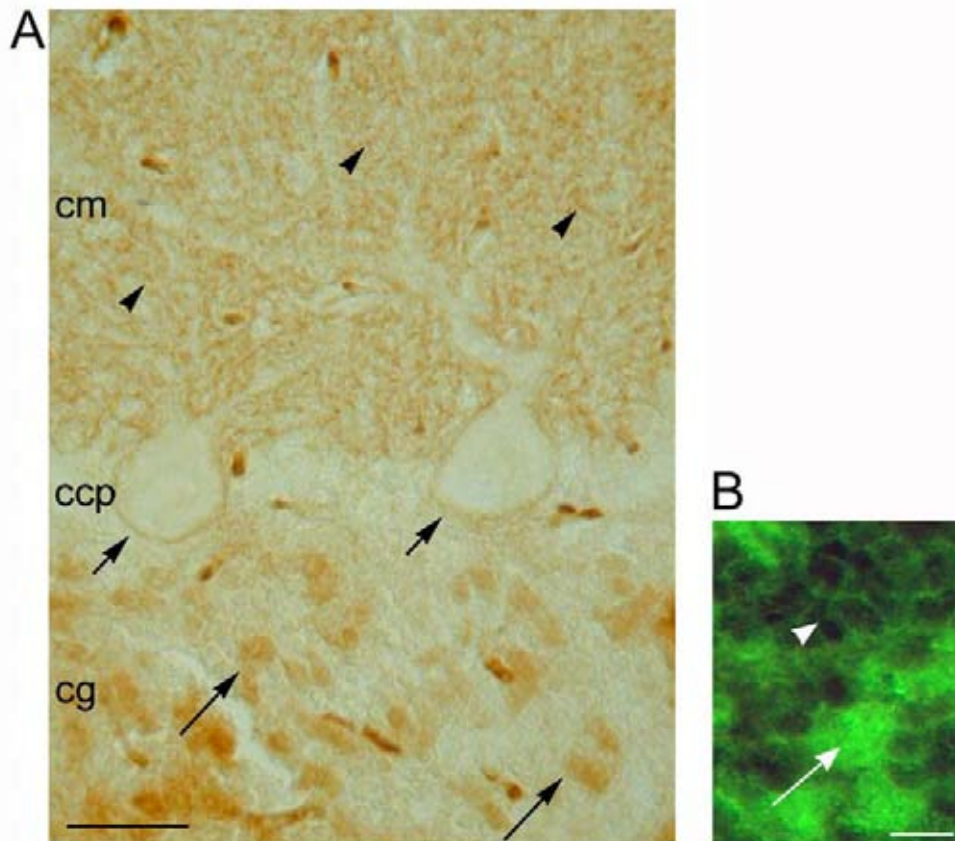


Fig. 37 Localización de la PMCA en secciones usando el anticuerpo 5F10. (A) La PMCA se localiza en la periferia de los cuerpos y dendritas principales de la célula de Purkinje (flechas cortas), en el neuropilo de los árboles dendríticos de las células de Purkinje (cabezas de flecha) y en los glomérulos cerebelosos (flechas largas). (B) Inmunofluorescencia con 5F10 en la capa granular mostrando marcaje en los glomérulos (flecha) y también en el pericarion de las células de los granos (cabeza de flecha). Dilución anticuerpo: 1/500. cm: capa molecular; ccp: capa células de Purkinje; cg: capa granular. Barras de escala: A, 40 μm ; B, 10 μm .

Un marcaje diferente al de 5F10 se observó con el anticuerpo pbPMCA (Fig. 38). La inmunoreacción se localizó en prolongaciones horizontales y descendentes de la mitad inferior de la capa molecular (Fig. 38A,B) y muy próxima a los troncos dendríticos y soma de las células de Purkinje (Fig. 38C). Mediante ensayos de doble inmunofluorescencia de pbPMCA (Fig. 39D) y el anticuerpo anti-sinaptofisina, un marcador de sinapsis (Fig. 39E), se observó co-localización de estas proteínas en algunas sinapsis adyacentes a las células de Purkinje (Fig. 39F). Además, pbPMCA marcó prolongaciones por debajo del soma de la

célula de Purkinje y por toda la capa granular (Fig. 38A,D). Para determinar si estos procesos corresponden con axones colaterales recurrentes de las células de Purkinje, se realizó una doble inmunofluorescencia de pbPMCA (Fig. 39G) con el anticuerpo monoclonal anti-CaBP (Fig. 39H). Las imágenes superpuestas (Fig. 39I) mostraron marcaje de estos axones con el anticuerpo anti-CaBP pero no con el pbPMCA. Estos resultados descartan la posibilidad de una inmunoreactividad de pbPMCA con los axones de las células de Purkinje y sus colaterales.

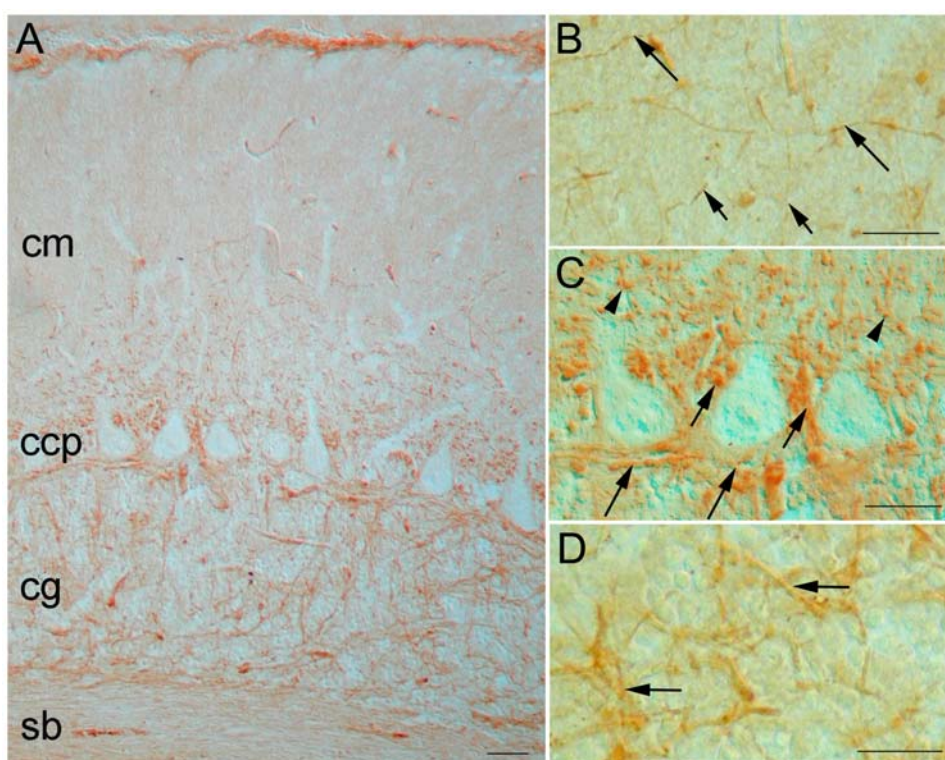


Fig. 38 Localización de PMCA en secciones para-sagitales usando el anticuerpo pbPMCA. (A) El marcaje de pbPMCA (dilución 1/200) aparece en toda la corteza cerebelosa. Se muestran grandes aumentos en B, C y D. La capa molecular (cm, B) presenta reacción en prolongaciones horizontales (flechas largas) y descendentes (flechas cortas). En la capa de las células de Purkinje (ccp, C), el marcaje se detecta entre los troncos dendríticos (cabezas de flecha), alrededor del soma (flechas cortas) y bajo los somas (flechas largas) de las células de Purkinje. En la capa granular (cg, D), el anticuerpo marca prolongaciones neurales (flechas). sb: sustancia blanca. Barras de escala, 50 μ m.

Los resultados de las figuras 35 y 38 sugieren que no existe co-localización de las proteínas SERCA y PMCA en la corteza cerebelosa. Mediante un doble inmunoensayo con los anticuerpos IID8 y pbPMCA, específicos de una u otra proteína (Fig. 39J,K) se observó marcaje de SERCA por IID8 en el soma y los árboles dendríticos de las células de Purkinje (Fig. 39J,L), mientras que la PMCA se expresó en terminaciones neurales próximas a las células de Purkinje marcadas con IID8 (Fig. 39K,L).

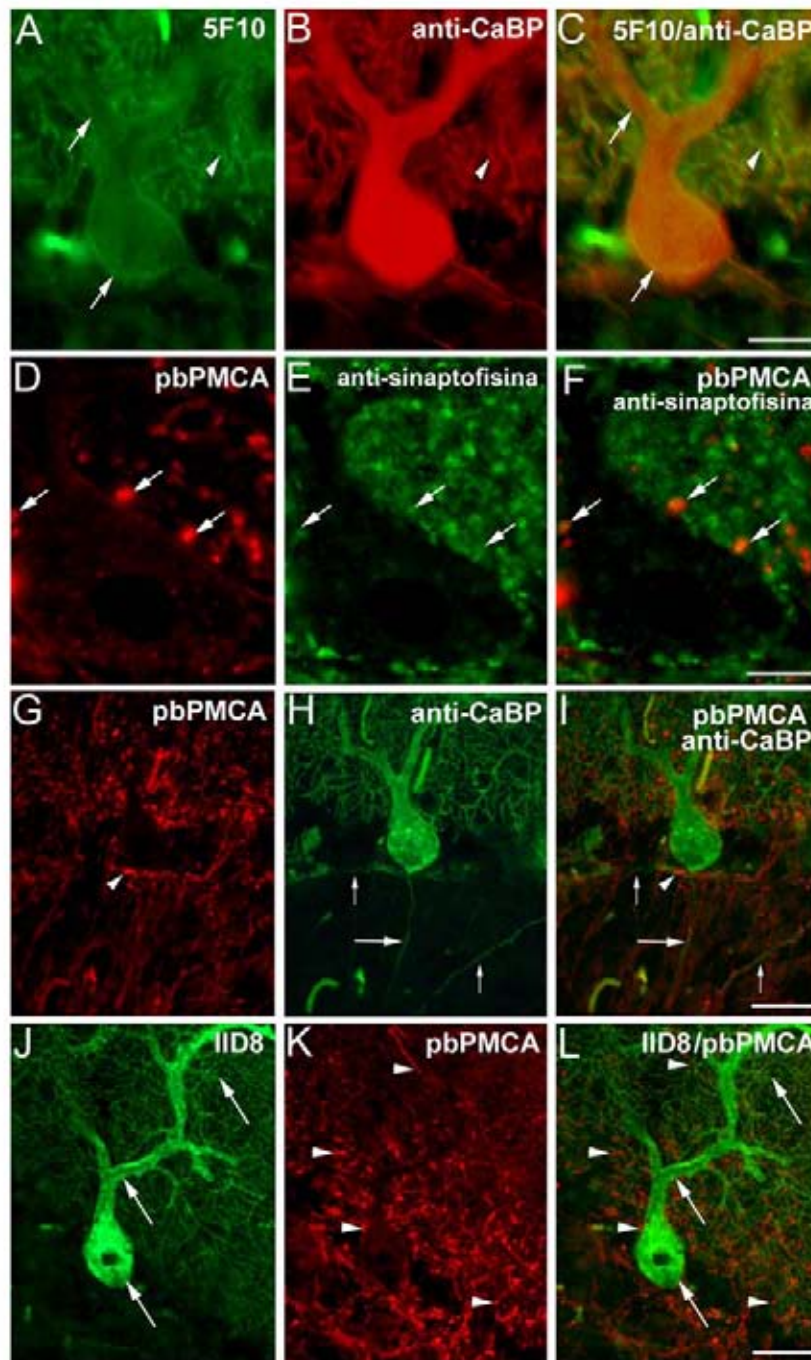


Fig. 39 Localización de SERCA, PMCA, calbindina y sinaptofisina en la corteza cerebelosa por microscopía de fluorescencia. Las proteínas se visualizaron mediante un doble inmunoensayo. Marcaje de los anticuerpos 5F10 (A, dilución 1/500) y anti-CaBP (B, dil. 1/500) en las células de Purkinje. (C) Imágenes superpuestas mostrando co-localización en las células de Purkinje (flechas) y en sus espinas dendríticas (cabezas de flecha). (D) Inmunorreacción con el anticuerpo pbPMCA (dil. 1/200). (E) Marcaje de sinapsis con el anticuerpo anti-sinaptofisina (dil. 1/500). (F) Co-localización en algunas sinapsis de las células de Purkinje (flechas). (G) Marcaje de pbPMCA en prolongaciones neurales debajo de las células de Purkinje (cabeza de flecha). (H) Reacción de anti-CaBP en las células de Purkinje incluyendo axones (flecha larga) y sus colaterales (flechas cortas). (I) Montaje de ambas micrografías no mostrando co-localización de las proteínas CaBP y PMCA. (J) La SERCA es visualizada en las células de Purkinje (flechas) por IID8, mientras que la PMCA (K) es localizada en numerosas terminaciones neurales (cabezas de flecha) por pbPMCA. (L) Superposición mostrando la diferente localización de ambas proteínas. Barra de escala: C, 23 μm ; F, 11 μm ; I y L, 43 μm .

DISCUSIÓN

El objetivo de este capítulo ha sido identificar la presencia y el contenido de las bombas de Ca^{2+} SERCA y PMCA en fracciones subcelulares y su localización en secciones en cerebelo de cerdo adulto.

Para distinguir funcionalmente entre las proteínas SERCA y PMCA en fracciones aisladas de cerebelo, se midió la actividad Ca^{2+} -ATPasa en presencia de inhibidores específicos de ambas bombas. La inhibición de la actividad producida por tapsigargina (inhibidor de SERCA) fue mayor en microsomas que en sinaptosomas o MPS (Fig. 30), lo que sugiere un mayor contenido en SERCA en los microsomas con respecto a las otras fracciones. Sin embargo, la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la fracción microsomal no se inhibió completamente por tapsigargina, mientras que la SERCA de retículo sarcoplásmico si se inhibe completamente por concentraciones nM de tapsigargina (Sagara e Inesi, 1991). Esta diferencia puede deberse a la existencia de alguna contaminación de PMCA en los microsomas cerebelares, como ocurre en los microsomas de cerebro de cerdo (Salvador y Mata, 1998). El hecho de que la fracción de PMCA purificada no se inhiba por tapsigargina indica la ausencia total de SERCA en esa fracción. Los patrones de inhibición fueron inversos en presencia de vanadato (un inhibidor de alta afinidad por PMCA) revelando un mayor contenido en PMCA en la fracción enriquecida en membrana plasmática que en las otras fracciones.

Alternativamente, se usaron anticuerpos específicos de SERCA y PMCA para analizar el contenido de estas proteínas en las fracciones de cerebelo. La reacción del anticuerpo IID8 específico de SERCA2 fue mayor en microsomas con respecto a sinaptosomas y MPS (Fig. 32A), lo que sugiere un mayor contenido de SERCA2 en microsomas y algún remanente de esta proteína en las otras fracciones. Esto es consistente con la distribución mostrada en los estudios cinéticos.

El anticuerpo Y/1F4, que reconoce la isoforma SERCA2b en cerebro (Salvador *et al.*, 2001), también marcó la misma proteína en cerebelo, principalmente en microsomas (Fig. 32B), pero la reacción fue más débil que la mostrada con IID8, como ocurría en cerebro (Salvador *et al.*, 2001). Esto puede ser debido a una menor afinidad de Y/1F4 por SERCA2 con respecto a IID8. Además, Y/1F4 dió en todas las fracciones una fuerte inmunoreacción con una banda de proteína de alrededor de 116 kDa (por encima de la banda de proteína SERCA). El marcaje fue más fuerte en las MPS (Fig. 32B), indicando

que la proteína de 116 kDa está principalmente localizada en la membrana plasmática. Además, por microscopía electrónica de transmisión también se observó marcaje de Y/1F4 en la membrana plasmática (Fig. 34). Salvador *et al.* (2001) mostraron una inmunorreacción similar en cerebro de cerdo, identificando esa banda como una Mg^{2+} -ATPasa, ya que podía fosforilarse en presencia de Mg^{2+} y en ausencia de Ca^{2+} , mientras que la proteína SERCA sólo se fosforilaba si ambos iones estaban presentes. Por otra parte, la inmunorreacción con IID8 no discrimina entre los variantes SERCA2a o 2b. Aunque la presencia de SERCA2a se ha mostrado en cerebelo de diferentes especies (Michelangeli *et al.*, 1991; Campbell *et al.*, 1993; Baba-Aïssa *et al.*, 1998), Plessers *et al.* (1991) describieron que esta isoforma se expresaba sólo a muy bajos niveles en cerebelo de cerdo, ya que no era detectada por Western blot con un antisuero específico de SERCA2a. Sin embargo, encontraron un fuerte marcaje con el antisuero de SERCA2b y el anticuerpo IID8. El hecho de que las tres fracciones de membrana usadas en nuestros ensayos fueran inmunonegativas con el mismo antisuero de SERCA2a (Fig. 32C) también sugiere que en nuestras preparaciones el contenido de la isoforma SERCA2a es demasiado pequeño para ser detectado por Western blot. Por otro lado, Baba-Aïsa *et al.* (1996a) han mostrado la existencia de la isoforma SERCA3 en cerebelo de rata. Sin embargo, un anticuerpo específico de SERCA3 no dio inmunorreacción en cerebelo de cerdo (resultados no mostrados).

El anticuerpo monoclonal 5F10, que reconoce a todas las isoformas PMCA en eritrocitos y otros tejidos (Caride *et al.*, 1996) identificó a la PMCA en todas las fracciones de cerebelo de cerdo (Fig. 33A). El hecho de que este anticuerpo marque un amplio espectro de bandas en un intervalo de pesos moleculares entre 127 y 138 kDa, que es el esperado para isoformas PMCA según Filoteo *et al.* (1997), sugiere la presencia de distintas isoformas PMCA en todas las fracciones. Por tanto, se muestra de nuevo que los microsomas tienen una contaminación de membrana plasmática como ya indicaban los ensayos cinéticos con inhibidores específicos. Por otro lado, la presencia de distintas bandas de PMCA en la fracción purificada sugiere un contenido de distintas isoformas en cerebelo de cerdo. También se ha observado que 5F10 reconoce siempre más de dos bandas correspondientes al tamaño de las isoformas PMCA en cerebelo de pollo (de Talamoni *et al.*, 1993) y en otros tejidos (Borke *et al.*, 1987, 1988, 1990; Caride *et al.*, 1996). Curiosamente, el anticuerpo pbPMCA parece ser más específico de ciertas isoformas (Fig. 33B), y que puede ser explicado por diferencias de epitopo entre ambos anticuerpos. Así, el

epitopo de 5F10 es común a todas las isoformas (Caride *et al.*, 1996), mientras que el antisuero policlonal pbPMCA podría reconocer diferentes epitopos que son específicos de isoformas. Sin embargo, los residuos de aminoácidos de las isoformas PMCA implicados en la unión con el pbPMCA no han sido aún determinados.

Un inmunoanálisis detallado en secciones de la corteza cerebelosa permite localizar la isoforma SERCA2 mayoritariamente en el citoplasma del soma y de las dendritas principales de las células de Purkinje, mediante los anticuerpos IID8 e Y/1F4 (Figs. 35 y 36). La distribución de esta proteína está asociada a la gran cantidad de retículo endoplásmico que existe en estas células (Palay y Chan-Palay, 1974; Martone *et al.*, 1993) y es similar a la mostrada en cerebelo de otras especies usando IID8 y un antisuero específico de SERCA2b (Plessers *et al.*, 1991; Michelangeli *et al.*, 1991; Sharp *et al.*, 1993; Baba-Aïssa *et al.*, 1996a,b). Sin embargo, con los anticuerpos utilizados en este trabajo se encontraron algunas diferencias. Así, IID8 también marcó el axón y las ramas con espinas dendríticas de las células de Purkinje (Fig. 35A-C). Considerando que estas regiones contienen una alta cantidad de retículo endoplásmico donde se acumula Ca^{2+} tras la despolarización (Sabatini *et al.*, 2001), es muy probable que contengan bombas de Ca^{2+} para mantener la homeostasis. El marcaje uniforme de Y/1F4 en la capa molecular (Fig. 36B) corresponde probablemente a interacciones sinápticas de diferentes neuronas cerebelares, particularmente células de Purkinje o fibras paralelas. Este anticuerpo también marcó células de los cestos y estrelladas (Fig. 36D,E), con un patrón similar al presentado en las células de Purkinje. Esta localización de SERCA no ha sido mostrada antes en la corteza cerebelosa de otras especies utilizando anticuerpos específicos de SERCA. El diferente marcaje encontrado entre IID8 e Y/1F4 podría ser debido a diferencias en los epitopos de estos anticuerpos.

Además, la localización de SERCA mostrada en este trabajo en los glomérulos cerebelosos de la capa granular (Figs. 35D y 36B,C) tampoco se había descrito anteriormente. En estos glomérulos se producen numerosas sinapsis (Palay y Chan-Palay, 1974) lo que requiere un alto control de Ca^{2+} . Por ello, estas regiones podrían tener un gran contenido en bombas de Ca^{2+} .

La localización de IID8 en el reducido citoplasma de algunas células granulares y el débil marcaje en otras (Fig. 35D) es consistente con la presencia de distintas poblaciones de células granulares que podrían tener diferente contenido de la bomba SERCA2. Este marcaje no ha sido mostrado en la corteza cerebelosa de otras especies, tales como rata, gato (Miller *et al.*, 1991; Baba-Aïssa *et al.*, 1996a,b) o cerebelo de pollo (Kaprielian *et al.*,

1989; Michelangeli *et al.*, 1991). Estas diferencias podrían explicarse por una diferente presentación del epitopo a la superficie de la proteína o a diferencias de localización de isoformas SERCA entre especies.

La reactividad del anticuerpo 5F10 en las células de Purkinje, principalmente en las espinas dendríticas (Fig. 37), fue similar al mostrado en otras especies con este anticuerpo (de Talamoni *et al.*, 1993; Hillman *et al.*, 1996) y también con un anticuerpo específico de PMCA2 (Stauffer *et al.*, 1997). Además, el marcaje detectado en la periferia del soma y principales dendritas de las células de Purkinje, pero no en el interior del soma, reveló una localización de esta ATPasa en la membrana plasmática de estas áreas. La reacción de 5F10 en los glomérulos cerebelosos (Fig. 37) reveló una localización de PMCA en regiones enriquecidas en sinapsis. Sin embargo, el anticuerpo pbPMCA (Fig. 38) presentó un patrón de localización diferente al compararlo con 5F10, siendo consistente con la diferente señal dada por esos anticuerpos en Western blot (Fig. 33). Por otra parte, la localización de PMCA en conexiones sinápticas está de acuerdo con la distribución de PMCA mostrada por Juhaszova *et al.* (2000) en los sitios de liberación de neurotransmisores en la membrana plasmática de la terminal nerviosa.

En resumen, las proteínas SERCA y PMCA están presentes en altas cantidades en el cerebelo de cerdo. Su localización específica sugiere que estas bombas de Ca^{2+} juegan un importante papel en la regulación de las concentraciones de Ca^{2+} intracelular en regiones concretas de células neuronales, de acuerdo con los requerimientos de Ca^{2+} de mecanismos en los que interviene este catión.

Capítulo 2

EXPRESIÓN FUNCIONAL Y DISTRIBUCIÓN DE LAS BOMBAS DE CALCIO SERCA Y PMCA EN CEREBELO DE POLLO EN DESARROLLO

Resumen

En este capítulo se han analizado la expresión funcional y la distribución de las Ca^{2+} -ATPasas de retículo sarco(endo)plásmico (SERCA) y de membrana plasmática (PMCA) en el cerebelo de pollo en desarrollo. La actividad enzimática y el transporte de Ca^{2+} aumentan con el desarrollo para las dos ATPasas. Sin embargo, el contenido en proteína aumentó con el estadio de desarrollo sólo para SERCA, permaneciendo constante para PMCA. Ensayos inmunohistoquímicos mostraron que la ontogénesis de estas ATPasas transcurre a lo largo de estadios muy concretos de la histogénesis del cerebelo y es completa al nacimiento. La SERCA se distribuye principalmente en las neuronas de Purkinje, mientras que la PMCA parece expresarse inicialmente en las fibras trepadoras, cambiando al soma y espinas dendríticas de las células de Purkinje en los últimos estadios de desarrollo. Las células granulares expresan ambas ATPasas de acuerdo con su grado de maduración, mientras que en los glomérulos cerebelosos sólo se expresa la PMCA. Estas bombas están presentes en los núcleos profundos y en los plexos coroideos, aunque en este último tejido su expresión disminuye con el desarrollo. La distribución espacio-temporal de SERCA y PMCA parece estar íntimamente relacionada con el desarrollo de tipos celulares específicos y prolongaciones neurales del cerebelo de pollo.

INTRODUCCIÓN

El calcio juega un papel fundamental en las células nerviosas, donde la concentración intracelular de calcio oscila entre 50 y 300 nM (Zacharias y Kappen, 1999). La regulación de esta concentración es esencial en numerosas funciones neuronales, incluyendo el desarrollo neuronal (Ghosh y Greenberg, 1995; Wong y Ghosh, 2002) o la plasticidad sináptica (Zacharias y Strehler, 1996). Así, la viabilidad celular depende de poderosos mecanismos reguladores que controlan espacial y temporalmente las elevaciones transitorias de Ca^{2+} intracelular, evitando una exposición larga en el tiempo a elevadas concentraciones de Ca^{2+} que pueden ser muy dañinas e incluso letales para las neuronas.

Las Ca^{2+} -ATPasas de retículo sarco(endo)plásmico (SERCA) y de membrana plasmática (PMCA) son componentes claves de la regulación de Ca^{2+} . Estudios previos han mostrado una regulación de la expresión génica de PMCA durante el desarrollo (Brandt y Neve, 1992) que dependen además del tejido (Brandt *et al.*, 1992; Stauffer *et al.*, 1993; Zacharias *et al.*, 1995). Sin embargo, no hay estudios con SERCA en tejido nervioso en desarrollo.

El cerebelo es uno de los pocos componentes del sistema nervioso central cuya formación y maduración es conocida en considerable detalle. Durante el desarrollo del cerebelo, sus poblaciones celulares se originan en diferentes zonas germinales y después migran hacia su destino final en un periodo de tiempo que implica la transformación del cerebelo de una estructura curvada a una región con un patrón folial (Goldowitz y Hamre, 1998). Así, el desarrollo del cerebelo puede servir como modelo para analizar cómo proteínas concretas participan en el desarrollo de neuronas en el sistema nervioso central y en la organización de sinapsis para la integración de la información. La mayoría de los estudios sobre SERCA y PMCA se han realizado en tejidos adultos. Sin embargo, la presencia y función de ambas proteínas durante el desarrollo, y específicamente en el tejido nervioso, no ha sido estudiada en detalle. En el trabajo descrito en este capítulo se muestra por primera vez, de forma conjunta, la expresión temporal y espacial de SERCA y PMCA en el cerebelo en desarrollo, en términos de su función y distribución. Los resultados obtenidos sugieren unos patrones de expresión de estas proteínas directamente relacionados con la ontogenia de la homeostasis de Ca^{2+} y con la maduración de neuronas y el establecimiento de conexiones sinápticas en el desarrollo del cerebelo.

RESULTADOS

Expresión funcional de SERCA y PMCA en vesículas de membrana de cerebelo durante el desarrollo

El funcionamiento de las bombas de calcio se midió en vesículas de membrana (VM) de cerebelo de embriones de pollo de distintos estadios y recién nacidos (P0) mediante medidas de la actividad Ca^{2+} -ATPasa y del transporte de Ca^{2+} de estas proteínas. Todos los ensayos se realizaron en ausencia y presencia de tapsigargina 0,1 μM (inhibidor de SERCA) con el fin de cuantificar la actividad y la acumulación de Ca^{2+} de las proteínas SERCA y PMCA, respectivamente (ver la sección de “Métodos generales” para detalles). La acción de otras ATPasas se bloqueó con azida. La figura 40 muestra las actividades Ca^{2+} -ATPasa de las bombas SERCA y PMCA, expresadas en $\mu\text{moles de ATP hidrolizado} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína total, a diferentes estadios de desarrollo y en ausencia y presencia de saponina al 0,01%. Este detergente se usó para permeabilizar las vesículas de membrana, permitiendo que los sustratos accedan a aquellas moléculas de proteína con su sitio catalítico orientado hacia el interior de las vesículas. Como muestra la figura, ambas actividades se incrementaron con el desarrollo. En ausencia de saponina, los datos se ajustaron a las siguientes curvas exponenciales:

$$y=0,009+0,024(1-e^{-0,15x}), R^2=0,57 (P=0,001) \text{ (SERCA)}$$

$$y=0,010+0,044(1-e^{-0,15x}), R^2=0,87 (P=0,004) \text{ (PMCA)}.$$

Las diferencias entre los estadios de desarrollo fueron significativos para ambas proteínas (test de Kruskal-Wallis: $P=0,024$ para SERCA y $P=0,0009$ para PMCA). Estos modelos permiten estimar la actividad ATPasa en cualquier estadio, siendo la variable x el número de días desde el día embrionario 10 (E10). La actividad de la PMCA fue alrededor de 1,6 veces mayor que la de la SERCA en todos los estadios analizados, alcanzando valores de $0,046 \pm 0,004$ y $0,029 \pm 0,003 \mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, respectivamente, en el nacimiento. En presencia de saponina, las actividades SERCA y PMCA también se incrementaron con el desarrollo (test de Kruskal-Wallis: $P=0,013$ para SERCA y $P=0,004$ para PMCA), siendo este aumento unas 3 veces mayor en presencia del detergente que en su ausencia. Este resultado indica la existencia de moléculas de Ca^{2+} -ATPasa orientadas intracelularmente en las preparaciones de membrana.

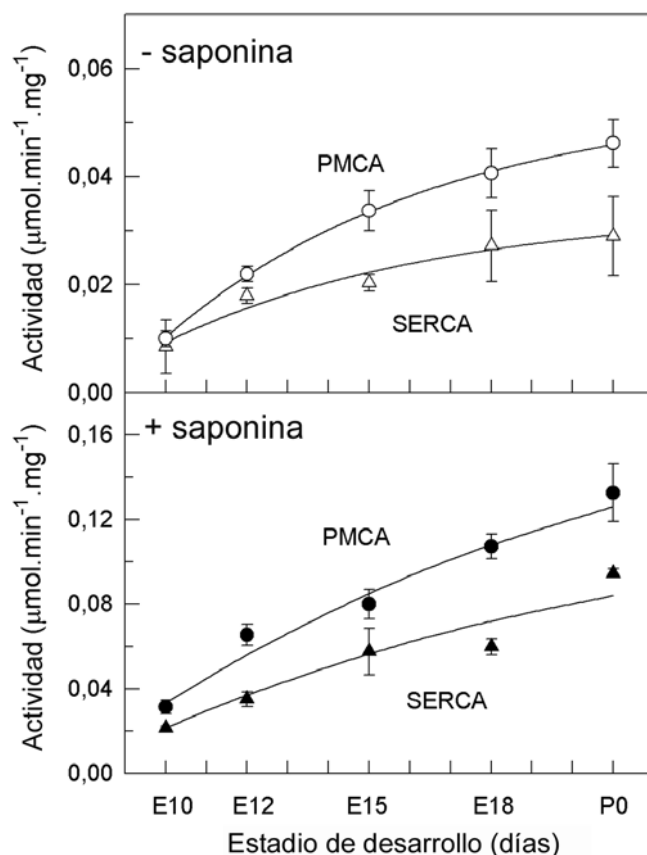


Fig. 40 Actividad Ca^{2+} -ATPasa de SERCA y PMCA a diferentes estadios del desarrollo del cerebelo de pollo. Las actividades ATPasas de SERCA (Δ , \blacktriangle) y PMCA (\circ , \bullet) se midieron en VM de los estadios indicados, en ausencia y presencia de saponina al 0,01%. Los datos son media \pm D.E. (barras) de los valores obtenidos de tres experimentos, realizados por triplicado, y de tres preparaciones diferentes.

El transporte de Ca^{2+} por la acción de SERCA y PMCA, dentro de las VM de cerebelo de pollo, se ensayó en presencia de KH_2PO_4 20 mM. El fosfato precipita con el Ca^{2+} transportado en el lumen de las vesículas, manteniendo una baja concentración luminal de Ca^{2+} libre que previene la inhibición del transporte de Ca^{2+} y también reduce la velocidad de fuga de Ca^{2+} de las vesículas (Palacios *et al.*, 2004). Se realizó un primer ensayo de optimización del transporte de Ca^{2+} por las bombas SERCA y PMCA, usando VM del estadio P0 (Fig. 41A). Se observó un aumento del transporte de Ca^{2+} dentro de las VM con el tiempo, que corresponde con la curva exponencial $y=103,37(1-e^{-0,025x})$, $R^2=0,97$ ($P<0,0001$). Cuando el ensayo se realizó en presencia de un sistema regenerador de ATP, consistente en piruvato quinasa (PK) y fosfoenolpiruvato (PEP) para proveer suficiente sustrato a todos los tiempos de incubación, la acumulación de Ca^{2+} aumentó, ajustándose los datos a la curva exponencial $y=135,14(1-e^{-0,019x})$, $R^2=0,98$ ($P<0,0001$). Un incremento

adicional en la velocidad de acumulación de Ca^{2+} se consiguió mediante la adición al medio anterior, en todos los tiempos ensayados, del ionóforo de protones carbonil cianida p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP). Los valores resultantes se ajustan a la curva $y=170,08(1-e^{-0,022x})$, $R^2=0,97$ ($P<0,0001$). El FCCP incrementa el transporte de Ca^{2+} porque colapsa el gradiente transmembranal de pH que, de por sí, inhibe el transporte y que se produce por el co-transporte de H^+ durante la acumulación de Ca^{2+} (Salvador *et al.*, 1998). A partir de estas curvas puede esperarse un incremento de 1,5 veces en el transporte, tras 30 min de incubación de las VM con el sistema regenerador de ATP y el FCCP. Estas condiciones se utilizaron como óptimas para medir la acumulación de Ca^{2+} , debida a SERCA o PMCA, en VM a diferentes estadios de desarrollo (Fig. 41B).

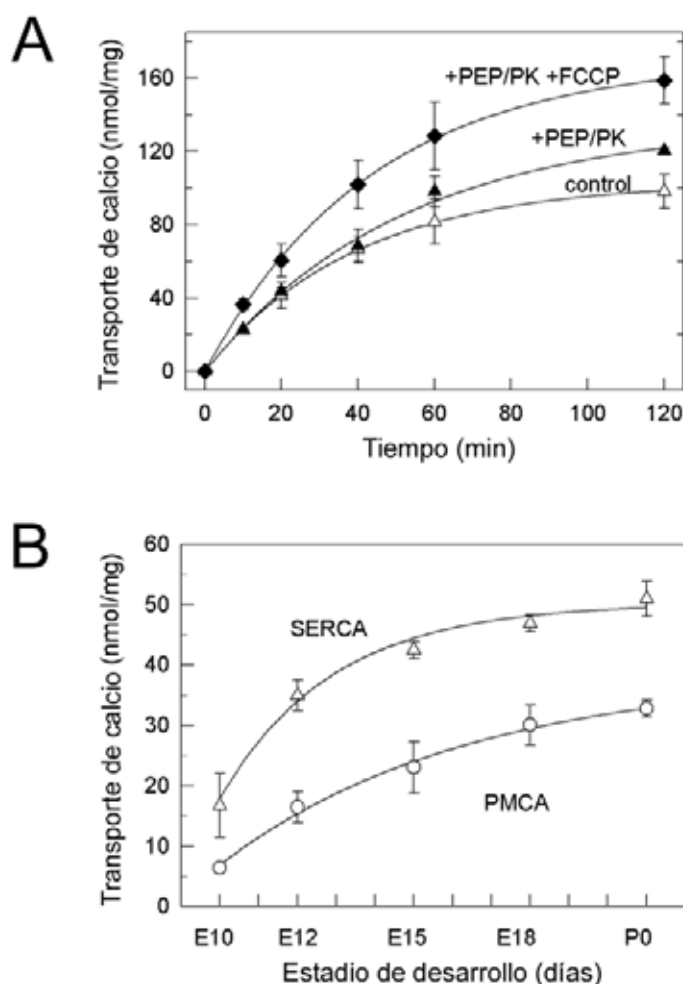


Fig. 41 Transporte de calcio de SERCA y PMCA a diferentes estadios del desarrollo. (A) Cuarenta μg de VM en el estadio postnatal 0 se incubaron en un medio sin (Δ) o con (\blacktriangle) un sistema regenerador de ATP (PEP 1,26 mM y PK 10 U) y con FCCP 5 μM (\blacklozenge). La reacción comenzó por adición de ATP 1 mM y la acumulación de Ca^{2+} se midió a los tiempos indicados. (B) El transporte de Ca^{2+} correspondiente a SERCA (Δ) y PMCA (\circ) se ensayó en VM de los estadios indicados, en presencia de PEP/PK/FCCP. Los datos son media \pm D.E. (barras) de los valores obtenidos de tres experimentos, realizados por triplicado, y de tres preparaciones diferentes.

El transporte de Ca^{2+} por las bombas SERCA y PMCA medido a los 30 min, aumentó con el desarrollo, ajustándose los valores a las siguientes curvas exponenciales:

$$y=17,88+32,32(1-e^{-0,34x}), R^2=0,92 (P<0,0001) \text{ (SERCA)}$$

$$y=6,88+31,63(1-e^{-0,15x}), R^2=0,91 (P=0,006) \text{ (PMCA)}.$$

Se obtuvieron valores máximos de $51 \pm 2,8$ nmoles de Ca^{2+} /mg y $32,8 \pm 1,4$ nmoles de Ca^{2+} /mg, respectivamente, al nacimiento. Los incrementos en el transporte fueron significativos desde E10 al nacimiento (test de Kruskal-Wallis: $P=0,0004$ para SERCA y $P=0,0034$ para PMCA). En contraste con los valores de actividad, el transporte de Ca^{2+} por la bomba SERCA fue aproximadamente dos veces el obtenido con la PMCA.

Expresión de SERCA y PMCA en fracciones de membrana de cerebelo en desarrollo

Para estudiar la aparición y los posibles cambios en la expresión de SERCA y PMCA durante el desarrollo del cerebelo de pollo se han realizado ensayos de Western blot (Fig. 42) con fracciones de membrana y los anticuerpos IID8 (para SERCA) y 5F10 (para PMCA) descritos en el capítulo anterior. El panel superior muestra el aumento de la inmunorreacción de IID8 en las VM con el estadio de desarrollo. Además, el anticuerpo marcó los microsomas de retículo sarcoplásmico cardíaco (RSC), que expresa SERCA2a, y de células COS-1 sobre-expresando SERCA2b, utilizados como controles.

Un blot similar incubado con 5F10 (panel inferior) mostró un grupo de bandas de proteínas desde el primer estadio embrionario analizado en adelante, y cuya intensidad no cambió significativamente con el progreso del desarrollo. Esta inmunorreacción es consistente con el hecho de que el anticuerpo reconoce todas las isoformas y variantes de PMCA generados por procesamiento alternativo. Este marcaje se muestra también para la fracción de PMCA sinaptosomal purificada de cerebelo de cerdo, usada como control para la detección de isoformas PMCA. La inmunodetección de β -tubulina como control de carga de proteína fue homogénea en todos los estadios, confirmando que las diferencias en las intensidades de banda encontradas con el anticuerpo IID8, pero no con 5F10, eran debidas a diferencias en la expresión de proteína durante el desarrollo.

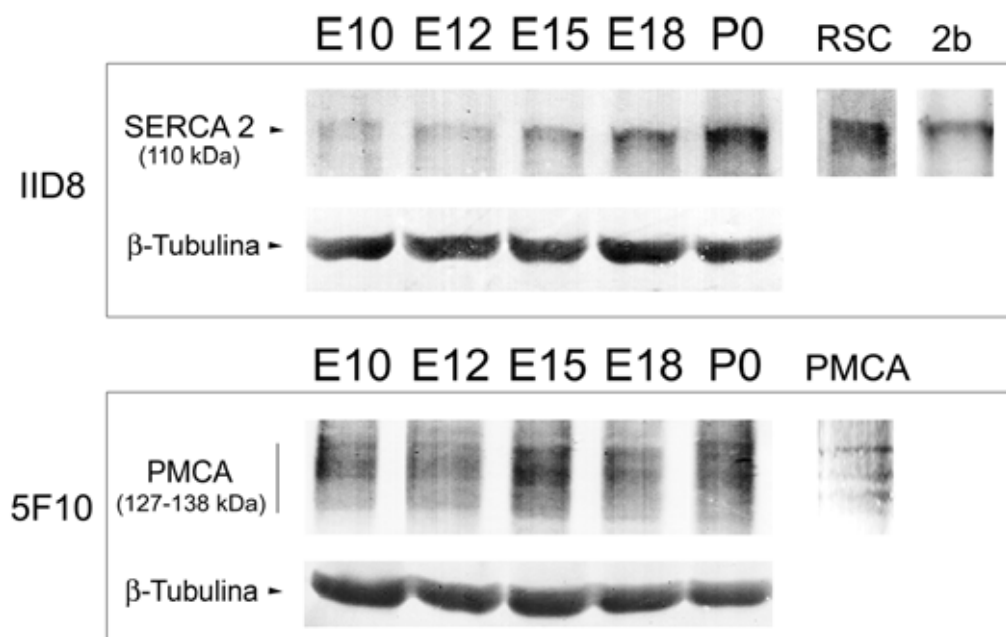


Fig. 42 Inmunorreacción de los anticuerpos IID8 y 5F10 en fracciones de membrana de cerebelo en desarrollo. Vesículas de membrana obtenidas a los distintos estadios (30 µg de proteína) se sometieron a electroforesis en geles al 6,5% de poliacrilamida en SDS, se transfirieron a una membrana de PVDF y se incubaron con los anticuerpos anti-SERCA2 IID8 (dilución 1/500), anti-PMCA 5F10 (dil. 1/3.000), y con un anticuerpo frente a β-tubulina (dil. 1/1.000) para confirmar que el contenido de proteína era igual en todas las calles. Microsomas de retículo sarcoplásmico cardíaco (RSC, 5 µg) y de células COS-1 sobre-expresando la isoforma SERCA2b (2b, 10 µg) se ensayaron con IID8 como controles de SERCA, y la PMCA purificada de cerebelo de cerdo adulto (5 µg) se analizó con 5F10 como control de PMCA. La banda de proteína SERCA apareció alrededor de 110 kDa, mientras las isoformas PMCA aparecían entre 127 kDa y 138 kDa.

La figura 43 resume la cuantificación de las bandas de proteínas de los Western blots, los valores de la actividad ATPasa en ausencia de saponina y el transporte de Ca^{2+} de las proteínas SERCA y PMCA en todos los estadios embrionarios, representado en porcentaje con respecto a los valores obtenidos al nacimiento. El contenido de proteína SERCA se ajustó a una curva de crecimiento exponencial:

$$y=42,16+2,33e^{0,29x} \quad (R^2=0,68; P=0,0004).$$

Para evaluar las diferencias entre estadios se realizaron comparaciones múltiples con el test de Wilcoxon de suma de rangos, estableciendo los incrementos mayores entre E12 y E18 ($P=0,03$). Sin embargo, el contenido de PMCA permaneció constante desde E10 al nacimiento (test de Kruskal-Wallis, $P=0,938$).

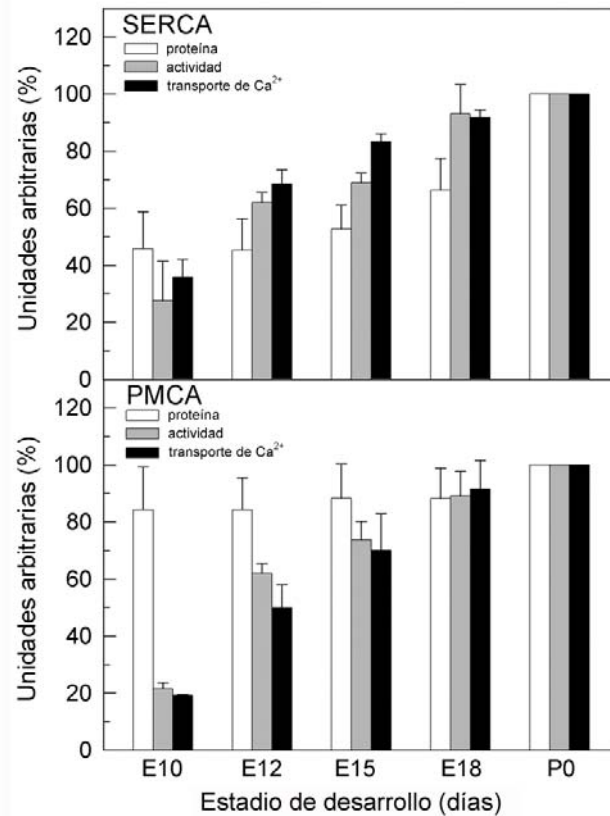


Fig. 43 Resumen de los ensayos cinéticos y de Western blot. Cuantificación de la expresión de proteína durante el desarrollo (obtenida a partir de tres Western blots representativos) y valores de actividad y transporte de Ca²⁺ (obtenidos a partir de las Figs. 40 y 41) de SERCA y PMCA. Los datos se muestran en porcentaje con respecto a los valores obtenidos en el nacimiento.

Localización de SERCA y PMCA en secciones de cerebelo de pollo en desarrollo

La distribución de la proteína SERCA en el cerebelo de pollo en desarrollo se analizó mediante inmunoreacción con el anticuerpo IID8 (Fig. 44A). Se observa como en el día embrionario 10 (E10) el anticuerpo no marcó la capa celular cortical interna, donde las células de Purkinje se diferencian, ni la capa granular externa. Sin embargo, los precursores de las neuronas de los núcleos profundos, localizados en un área más interna, fueron IID8 inmunopositivos desde este estadio en adelante. En E12, el patrón cerebelar en forma de lóbulos está ya definido y el anticuerpo marcó células en la capa cortical interna, siendo este marcaje más intenso en algunos lóbulos. En E15, la capa de células de Purkinje está ya definida y también se marcó con IID8. Esta capa y la capa molecular, que es evidente en E18, se marcaron también con el anticuerpo en estadios posteriores. La capa granular interna, aunque estaba definida tras el estadio E12, se marcó con IID8 desde el

estadio E18 en adelante. Los plexos coroideos mostraron diferentes niveles de inmunorreacción con IID8 desde E10 hasta P0, mientras que la capa granular externa y la sustancia blanca fueron siempre inmunonegativas.

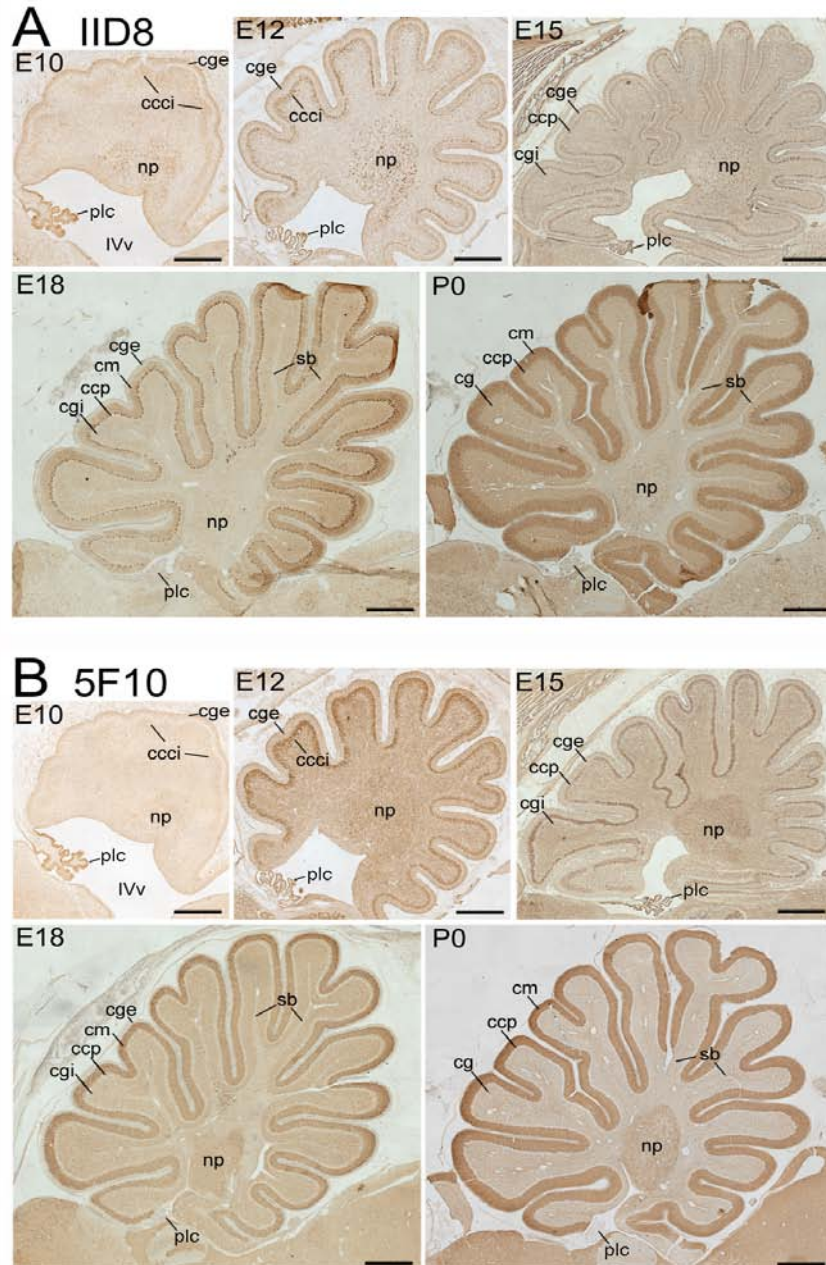


Fig. 44 Localización de SERCA y PMCA en secciones para-sagitales de cerebelo de pollo en desarrollo. (A) Inmunohistoquímicas con el anticuerpo IID8 (dilución 1/500). El marcaje se observa en la capa celular cortical interna (ccci) en E12, y en la capa de las células de Purkinje (ccp) y capa molecular (cm) desde E15 y E18, respectivamente, hasta P0. Los núcleos profundos (np) son siempre inmunopositivos, mientras que los plexos coroideos (plc) muestran diferente intensidad de marcaje con IID8 desde E10 a P0. (B) Inmunohistoquímicas con el anticuerpo 5F10 (dil. 1/500). La reacción se observa en la capa celular cortical interna en E12, en la capa de las células de Purkinje desde E15, y en la capa molecular desde E18. Un evidente marcaje se detecta en los núcleos profundos desde E12, mientras que los plexos coroideos son fuertemente marcados en los estadios E10-E15. cge: capa granular externa; cgi: capa granular interna; IVv: cuarto ventrículo; sb: sustancia blanca. Barras de escala: E10, 500 μm ; E12, 600 μm ; E15, 2.100 μm ; E18, 1.700 μm ; P0, 1.890 μm .

La localización de la proteína PMCA en cerebelo de pollo en desarrollo se analizó con el anticuerpo 5F10 (Fig. 44B). En el estadio E10, el anticuerpo sólo marcó los plexos coroideos, mientras que en E12 se observó un fuerte marcaje en la capa celular cortical interna. Los núcleos profundos presentaron un visible marcaje por 5F10 desde este estadio en adelante. En E15, una fuerte inmunorreacción se observó en la capa de las células de Purkinje, mientras que en los estadios E18 y P0 el marcaje fue más evidente en la capa molecular y en la capa granular interna. De forma similar a IID8, el marcaje de los plexos coroideos con 5F10 cambió con el estadio de desarrollo. La capa granular externa y la sustancia blanca, en cambio, fueron inmunonegativas.

La figura 45A muestra en detalle el marcaje de SERCA en la corteza cerebelosa con el anticuerpo IID8. En E12, la SERCA se detectó en el soma y en las terminaciones cortas y radiales de las células de Purkinje, que muestran un bajo grado de diferenciación a este estadio. Tanto la capa granular externa como la interna fueron inmunonegativas. En E15, las células de Purkinje constituyen una monocapa y el anticuerpo marcó el soma y troncos dendríticos de las células de Purkinje, estando estos últimos localizados en la incipiente capa molecular. En E18, la capa molecular y la capa granular externa aparecen más ancha y más delgada, respectivamente, que en otros estadios más tempranos. En este estadio embrionario, y también en el nacimiento, el anticuerpo IID8 marcó toda la célula de Purkinje, incluyendo las espinas dendríticas y el axón, así como la capa granular interna (a partir de E18) y la capa granular (en P0). El espacio nuclear fue inmunonegativo a todos los estadios analizados.

Una examen detallado de la localización de PMCA con el anticuerpo 5F10 en la corteza cerebelosa (Fig. 45B) mostró un marcaje en E12 que iba disminuyendo desde el borde más profundo de la capa granular externa hasta la porción superficial de la incipiente capa granular interna. Mediante una doble inmunofluorescencia (Fig. 46), con los anticuerpos 5F10 y anti-CaBP (que marca específicamente las células de Purkinje) se localizó la reacción de 5F10 alrededor de las células de Purkinje. Además, ambos anticuerpos no mostraban co-localización. En E15 (Fig. 45B), el marcaje de 5F10 se localizaba alrededor de los somas de las células de Purkinje, y en la capa molecular temprana, reproduciendo la morfología de los árboles dendríticos de Purkinje. Esta localización fue calbindina negativa (resultados no mostrados). En los estadios E18 y P0, el anticuerpo 5F10 claramente marcó el límite externo de los somas y dendritas principales de las células de Purkinje, así como sus espinas dendríticas en toda la arborización.

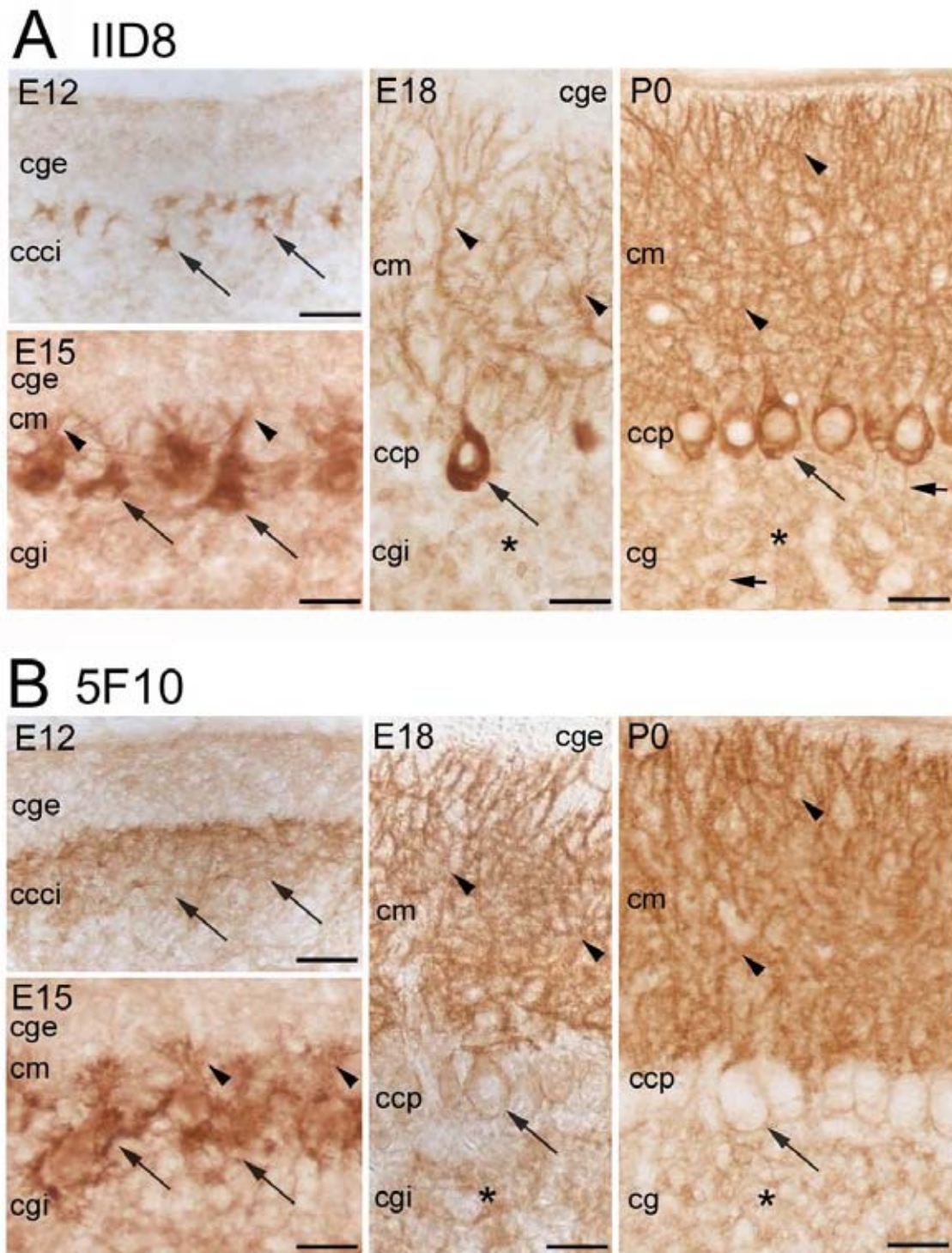


Fig. 45 Inmunodetección de SERCA y PMCA en la corteza cerebelosa de pollo en desarrollo. (A) Localización de SERCA con el anticuerpo IID8 (dilución 1/500) en el soma (flechas largas), dendritas (cabezas de flecha) y el axón (flechas cortas) de las células de Purkinje desde E12 a P0. La capa granular (cg) presenta marcaje en E18 y P0 (asteriscos). (B) Localización de PMCA con el anticuerpo 5F10 (dil. 1/500) alrededor de las células de Purkinje en E12 y siguiendo su superficie en E15 (flechas largas). En E18 y P0, la inmunorreacción se detecta en el límite exterior del soma y en la arborización dendrítica (flechas largas) de las células de Purkinje, y también en sus dendritas (cabezas de flecha), así como en la capa granular (asteriscos). cge: capa granular externa; cgi: capa granular interna. Barras de escala: E12, 45 μm ; E15, 34 μm ; E18, 33 μm ; P0, 37 μm .

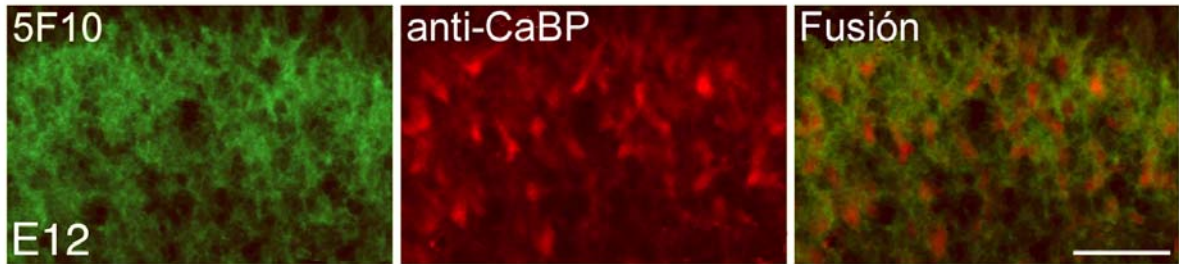


Fig. 46 Inmunofluorescencia de secciones de cerebelo de pollo en E12 con los anticuerpos 5F10 y anti-CaBP. La superposición de imágenes sitúa el marcaje de 5F10 (dilución 1/500) en la región de los precursores de las células de Purkinje marcados con anti-CaBP (dil. 1/500). Barra de escala: 80 μ m.

Para confirmar la localización del marcaje de 5F10 se utilizó el estadio E15 en secciones transversales consecutivas, incubadas con los anticuerpos IID8 (que marcaba células de Purkinje) y 5F10 (Fig. 47). Ambos anticuerpos detectaron las mismas bandas, que sorprendentemente eran interrumpidas a los mismos niveles, correspondiendo a áreas con menor número de células de Purkinje descritas por Feirabend (1990). Esto ponía de manifiesto que el marcaje de PMCA con 5F10 está asociado con el desarrollo de las células de Purkinje.

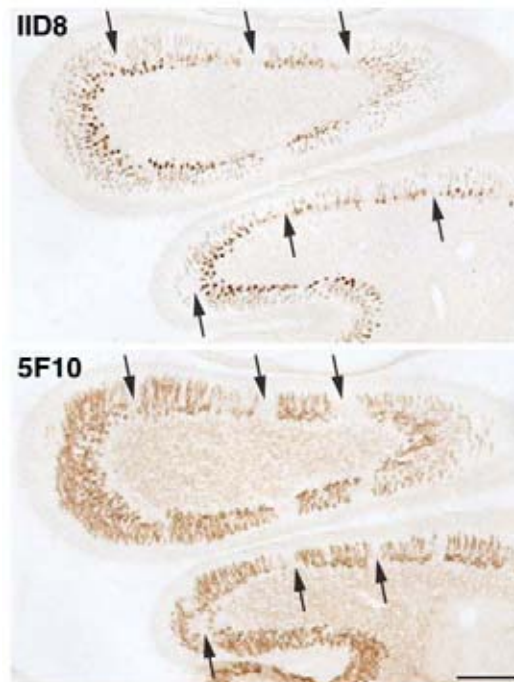


Fig. 47 Inmunohistoquímica con los anticuerpos IID8 y 5F10 en secciones transversales de cerebelo de pollo del estadio E15. Ambos anticuerpos presentan un patrón de marcaje similar en bandas, siendo interrumpidos a los mismos niveles (flechas). Barra de escala, 85 μ m.

La localización de las proteínas SERCA y PMCA en la capa granular se analizó en mayor detalle en el estadio P0, mediante ensayos de inmunofluorescencia y la tinción con DAPI, que permitía situar los núcleos celulares (Fig. 48A). Ambas proteínas estaban presentes en el soma de las células de los granos, mientras que sólo la PMCA se detectó en los glomérulos cerebelosos.

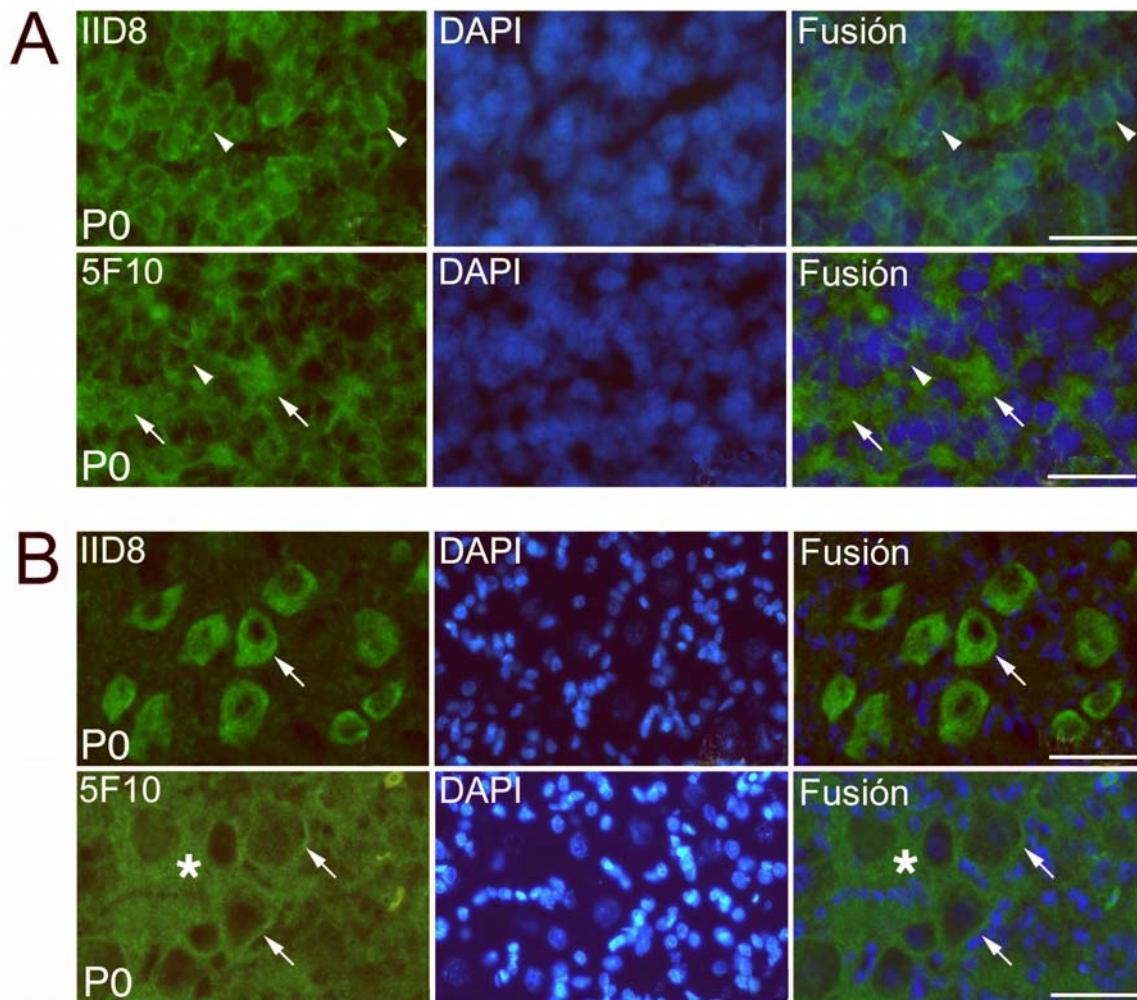


Fig. 48 Identificación de las proteínas SERCA y PMCA en la capa granular y en los núcleos profundos del cerebelo en el estadio P0. Se realizaron inmunofluorescencias en secciones parasagitales con los anticuerpos IID8 y 5F10, y posterior tinción con DAPI. En la capa granular (A), ambos anticuerpos marcan el soma de las células granulares (cabezas de flecha), mientras que los glomérulos cerebelosos (flechas) son solamente marcados con 5F10. En los núcleos profundos (B), el anticuerpo IID8 da reacción en el pericarion de neuronas (flechas), mientras que 5F10 marcó la periferia del soma (flechas) y numerosas prolongaciones entre ellas (asterisco). Barras de escala: A, 18 μ m; B, 45 μ m.

En los núcleos profundos del cerebelo en P0 (Fig. 48B), el anticuerpo IID8 marcó el pericarion de las neuronas de estos núcleos, pero no su arborización dendrítica ni su espacio nuclear. El anticuerpo tampoco detectó otras células presentes en los núcleos profundos y que eran visualizadas con la tinción con DAPI. Por otro lado, el anticuerpo 5F10 marcó la periferia del soma de las neuronas de los núcleos profundos y las terminaciones nerviosas entre ellas.

Los anticuerpos IID8 y 5F10 presentaron particulares inmunorreacciones en los plexos coroideos del IV ventrículo (ver Fig. 44A,B). Un análisis detallado de estos marcajes (Fig. 49) mostró que ambos anticuerpos marcaban fuertemente los plexos coroideos desde el estadio E10 hasta E15. Sin embargo, eran sólo débilmente marcados o inmunonegativos en P0.

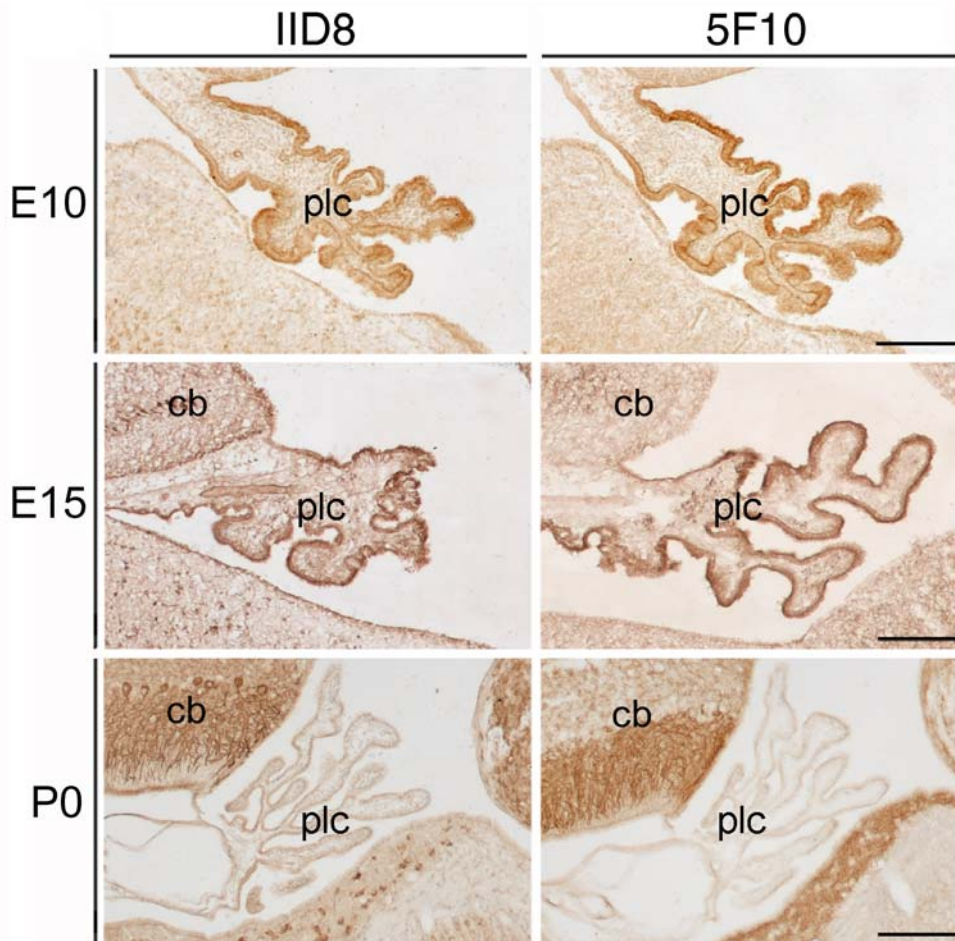


Fig. 49 Localización de proteínas SERCA y PMCA en los plexos coroideos. Las inmunohistoquímicas se realizaron con los anticuerpos IID8 y 5F10 en secciones para-sagitales de los estadios E10, E15 y P0. Ambos anticuerpos marcan fuertemente los plexos coroideos (plc) en los estadios E10 y E15, pero solo débilmente o nada al nacimiento. cb: cerebelo. Barras de escala: E10, 150 μm ; E15, 390 μm ; P0, 370 μm .

DISCUSIÓN

El propósito de este capítulo ha sido determinar cuándo y dónde las bombas de calcio se expresan, en relación al desarrollo del cerebelo de pollo. Ambas ATPasas fueron funcionales desde los estadios de desarrollo más tempranos analizados, aunque la actividad de la PMCA fue siempre mayor que la de SERCA (Figs. 40 y 41). Esto podría explicarse por la expresión paralela de activadores endógenos de PMCA, tales como fosfolípidos ácidos, calmodulina y proteínas quinasas (Caroni y Carafoli, 1981; Salvador y Mata, 1996; Zylinska *et al.*, 1998) durante el desarrollo. De hecho, se ha observado un aumento en el contenido de fosfatidilserina en córneas de pollo durante el desarrollo embrionario (Rintoul *et al.*, 1984) y en proteolípidos purificados de cerebro de rata en desarrollo (Manukian y Kirakosian, 1985). De forma similar, parece existir un progresivo incremento de la expresión de calmodulina en el cerebro de rata y en otros tejidos durante el final del desarrollo fetal y principio del postnatal (Rainteau *et al.*, 1988; Weinman *et al.*, 1991). Un incremento dependiente de la edad también se ha descrito para isoformas de la proteína quinasa C, en cerebro de rata fetal y neonatal, mientras que en otros tejidos se ha observado una disminución (Goldberg y Steinberg, 1996). Las velocidades de transporte de Ca^{2+} , sin embargo, fueron menores para la PMCA que para SERCA en todos los estadios (Fig. 41B), lo que corresponde bien con las estequiometrías 1/1 y 2/1 de transporte de Ca^{2+} y ATP hidrolizado descritos para PMCA (Niggli *et al.*, 1982; Hao *et al.*, 1994; Salvador *et al.*, 1998) y para SERCA (Yu *et al.*, 1993), respectivamente.

El inmunoblot tratado con 5F10 reveló un grupo de bandas de proteína alrededor de 140 kDa en todos los estadios (Fig. 42) que también se ha mostrado en cerebelo adulto de pollo (de Talamoni *et al.*, 1993), rata (Filoteo *et al.*, 1997) y cerdo (en el capítulo anterior). Esto es consistente con la existencia de distintas isoformas PMCA descritas también en otros tejidos (Borke *et al.*, 1987, 1988, 1990; Caride *et al.*, 1996). Considerando tanto el contenido en proteína como los valores cinéticos (resumidos en la Fig. 43), se pueden relacionar los patrones de la actividad ATPasa y el transporte de Ca^{2+} de SERCA con el incremento de su expresión durante todo el desarrollo. Sin embargo, el incremento en los valores cinéticos de PMCA podría ser debido a un aumento en su afinidad por los sustratos durante el desarrollo, además de a su activación por moduladores endógenos como se describió antes, más que a un incremento en la expresión de proteína. Por otro lado, podrían darse cambios en la proporción relativa de isoformas PMCA (que contribuyen al

contenido de proteína total) por isoformas más activas responsables del incremento de actividad durante el desarrollo. Un aumento del transporte de Ca^{2+} , pero no de la expresión de proteína, ha sido también mostrado por otros autores en PMCA de placenta humana durante el último periodo de la gestación (Strid y Powell, 2000) y se ha asociado con un cambio en la expresión de isoformas. Además, un análisis detallado de la expresión de mRNA de PMCA en cerebro de rata durante el desarrollo (Brandt y Neve, 1992) ha revelado la presencia de algunas isoformas concretas a estadios más tempranos, y un cambio de isoformas a diferentes estadios. Esto sugiere, por tanto, que cambios sincronizados en la expresión por disminución/aumento de diferentes isoformas y variantes mantiene la expresión de PMCA constante a lo largo del desarrollo.

Las expresiones iniciales de las proteínas SERCA y PMCA están directamente relacionadas con el desarrollo de tipos celulares particulares o estructuras del cerebelo. La SERCA aparece en las células de Purkinje desde el día embrionario 12, en el cual los precursores de las células de Purkinje alcanzan su localización final, pero están aún poco diferenciados. A estadios más tempranos, la proteína no está presente en los precursores de las células de Purkinje (Fig. 44A y 45A), posiblemente debido a que las cisternas del retículo endoplásmico se forman a partir de E12 en el embrión de pollo (Bertossi *et al.*, 1986). Sin embargo, la proteína es claramente visible en toda la célula de Purkinje en los últimos estadios, incluyendo las espinas dendríticas, que contienen una gran cantidad de retículo endoplásmico (Sabattini *et al.*, 2001). Esta localización está de acuerdo con la observada para SERCA en el cerebelo de pollo adulto (Kaprielian *et al.*, 1989; Michelangeli *et al.*, 1991) y en diversas especies de mamíferos (Plessers *et al.*, 1991; Wu *et al.*, 1995; Baba-Aïssa *et al.*, 1996a, b; resultados del capítulo anterior). El claro y específico marcaje de SERCA2 en las células de Purkinje por IID8 hace de este anticuerpo un excelente marcador de neuronas de Purkinje en desarrollo y maduras.

El marcaje de PMCA en la corteza cerebelosa a estadios tempranos (Fig. 44B y 45B) parece corresponder con el patrón de las fibras trepadoras en desarrollo, cuyas terminales son definidas alrededor de E15 como “en capuchón” y “en nido” según la descripción de Ramón y Cajal (1911). Una expresión espacio-temporal similar se ha observado para la glicoproteína BEN en el pollo (Pourquié *et al.*, 1992), estando relacionada con el crecimiento de las terminales de las fibras trepadoras y el establecimiento de sus sinapsis con los árboles dendríticos de las células de Purkinje. Además, los primeros contactos sinápticos en el cerebelo de pollo comienzan en E12 (Bertossi *et al.*, 1986) y se

han identificado una gran variedad de proteínas moduladas por Ca^{2+} en procesos de este tipo (Nicholls *et al.*, 1992). Teniendo en cuenta estas consideraciones, se puede asociar la presencia de PMCA a estadios iniciales en las fibras trepadoras con una específica regulación del Ca^{2+} intracelular requerido para la elongación de fibras y la sinaptogénesis. La expresión de PMCA en los últimos estadios embrionarios y P0 (Fig. 45B) se relaciona con la membrana plasmática del soma y con una distribución sináptica en espinas de las células de Purkinje, como se ha descrito en pollo adulto (de Talamoni *et al.*, 1993) y en mamíferos (Hillman *et al.*, 1996; Stauffer *et al.*, 1997; Burette *et al.*, 2003; resultados del capítulo anterior).

La diferenciación de las células granulares del cerebelo tiene lugar a distintos estadios que implican migración radial interna, circunferencial y tangencial de estas células (Kuhar *et al.*, 1993; Goldowith y Hamre, 1998). La expresión de SERCA y PMCA observada sólo en células granulares maduras (Figs. 45 y 48A) es consistente con la presencia de huecos en el marcaje en las capas de Purkinje y molecular en E15 (Fig. 47), implicados en la migración tangencial de las células de los granos. Estos huecos han sido descritos como “*raphe*” o franjas de células granulares en pollo (Feirabend, 1990; Lin y Cepko, 1998). La expresión de bombas de Ca^{2+} en células granulares también se ha mostrado en el cerebelo adulto de pollo (Kaprielian *et al.*, 1989; Michelangeli *et al.*, 1991), cerdo (capítulo anterior) y roedores (Miller *et al.*, 1991; Baba-Aïssa *et al.*, 1996a, b; Burette *et al.*, 2003). Por otro lado, sólo hemos observado la expresión de PMCA en los glomérulos cerebelosos de pollo desde E18 en adelante (Fig. 45B), ya identificada en adulto de otras especies (Hillman *et al.*, 1996; Burette *et al.*, 2003). Sin embargo, ambas bombas se han identificado en los glomérulos cerebelosos de cerdo (resultados capítulo anterior).

La localización específica de SERCA y PMCA en las neuronas de los núcleos profundos desde el primer estadio analizado (Figs. 44 y 48B) corresponden bien con la distribución de proteínas de citoplasma y de membrana plasmática, respectivamente. Observaciones similares se han mostrado también en mamíferos adultos para SERCA (Miller *et al.*, 1991; Baba-Aïssa *et al.*, 1996) y PMCA (Hillman *et al.*, 1996; Stauffer *et al.*, 1997). Además, ambas proteínas se han detectado también en los plexos coroideos de pollo, un tejido muy especializado y que está implicado en la generación de líquido cerebroespinal, cuya concentración de Ca^{2+} es altamente regulada (Murphy *et al.*, 1989). Resulta particularmente interesante la disminución de la expresión de bombas de Ca^{2+} en este tejido al final del desarrollo de pollo (Figs. 44 y 49), mientras que en mamíferos se ha

identificado la PMCA tanto durante el desarrollo (Borke *et al.*, 1989; Zacharias y Kappen, 1999) como en adultos (Eakin *et al.*, 1995; Stauffer *et al.*, 1997). La expresión transitoria de Ca^{2+} -ATPasas observada en los plexos de pollo podría estar relacionada con un mayor control de los niveles de Ca^{2+} en el líquido cerebroespinal o en sus células secretoras en los estadios más tempranos del desarrollo.

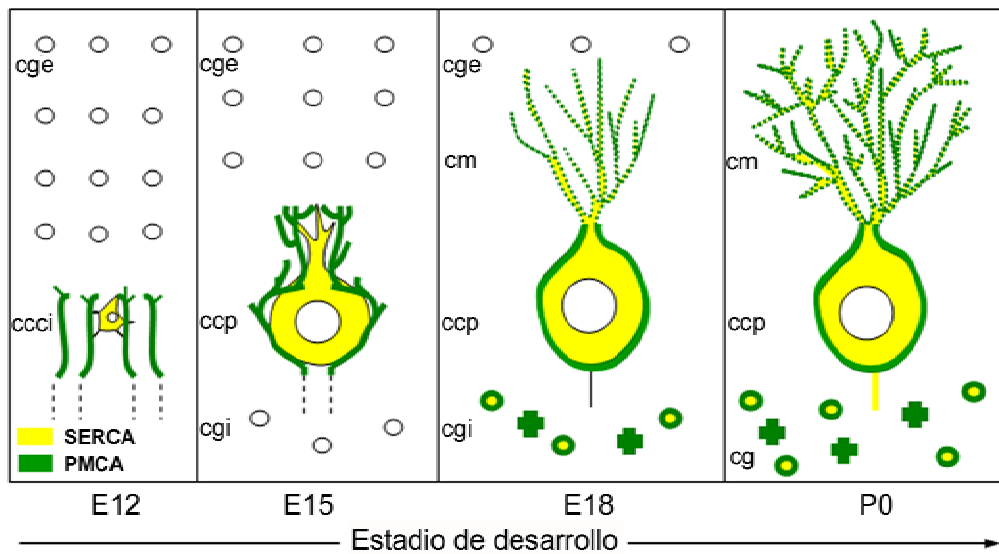


Fig. 50 Representación esquemática de los patrones de expresión temporal y espacial de las proteínas SERCA y PMCA en el desarrollo de la corteza cerebelosa de pollo. cge: capa granular externa; ccci: capa celular cortical interna; cm: capa molecular; ccp: capa de las células de Purkinje; cgi: capa granular interna; cg: capa granular; ○: célula de los granos; +: glómulo cerebeloso.

La figura 50 resume la distribución espacio-temporal de SERCA y PMCA en la corteza cerebelosa de pollo en desarrollo, el cual podría estar asociado con su participación en procesos regulados por Ca^{2+} y relacionados con la organización de la corteza cerebelosa y la maduración de tipos celulares.

Capítulo 3

ISOFORMAS DE LA Ca^{2+} -ATPasa DE MEMBRANA PLASMÁTICA EN CEREBELO EN DESARROLLO

Resumen

En este capítulo se ha analizado la expresión y la distribución de las distintas isoformas de la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática (PMCA) en el cerebelo de dos especies, pollo y ratón, que presentan un desarrollo neural pre-natal y post-natal, respectivamente. En pollo, la expresión de isoformas PMCA está directamente ligada al desarrollo embrionario, con una localización específica asociada a tipos neuronales concretos durante la maduración celular. En ratón, se ha identificado el estadio P12 como un momento crítico a nivel funcional para la PMCA, observándose cambios en la expresión de determinadas isoformas. Por otro lado, ensayos en neuronas aisladas en cultivo han mostrado que los patrones característicos de localización de las isoformas PMCA observados en el tejido cerebeloso no están predeterminados, si no que deberían ser, en gran parte, consecuencia del ambiente celular en los distintos momentos del desarrollo del cerebelo.

INTRODUCCIÓN

La bomba de Ca^{2+} de membrana plasmática (PMCA) transporta Ca^{2+} desde el citoplasma al exterior celular a expensas de la hidrólisis de ATP. Está codificada por 4 genes diferentes que dan lugar a las isoformas PMCA1, PMCA2, PMCA3 y PMCA4. Cada una de ellas, mediante procesamiento alternativo de sus transcritos primarios, da lugar a más de 22 variantes ampliamente distribuidos en la mayoría de las células eucariotas (Strehler y Zacharias, 2001). Estas isoformas realizan la función básica de transporte de Ca^{2+} , pero muestran algunas diferencias en cuanto a sus propiedades cinéticas y mecanismos de regulación (Strehler y Treiman, 2004). La mayor homología entre isoformas se da en los dominios catalítico y de transducción, mientras que la mayor diversidad se da en el dominio de regulación. La existencia de esta gran variedad de isoformas dentro de la familia PMCA podría deberse a especializaciones funcionales de cada una de ellas.

Numerosos estudios han mostrado el importante papel que desempeña el Ca^{2+} en la diferenciación neuronal y el crecimiento dendrítico (Wong y Ghosh, 2002). En el capítulo anterior se puso de manifiesto la implicación de la bomba PMCA en la ontogenia del cerebelo, pero no a nivel de isoformas. Por ello, en este capítulo se ha realizado un estudio de la expresión de isoformas PMCA en dos especies con distinto tipo de desarrollo neuronal. En el pollo, el desarrollo del sistema nervioso central tiene lugar fundamentalmente a nivel pre-natal, naciendo con un cerebelo similar en organización y madurez celular al de un adulto. El ratón, en cambio, tiene un desarrollo nervioso mayoritariamente post-natal que ocurre en los primeros días de vida. La comparación de la expresión de isoformas PMCA en ambos tipos de desarrollo nervioso permitirá profundizar en el papel clave de estas proteínas en momentos críticos del desarrollo del cerebelo.

RESULTADOS

Distribución de isoformas PMCA en fracciones de membranas de cerebelo de pollo en el desarrollo pre-natal

La expresión de las distintas isoformas PMCA se analizó en vesículas de membrana (VM) preparadas a partir de cerebelos de pollo de distintos estadios de desarrollo como se indica en la sección de “Métodos generales”. Para ello, se realizaron ensayos de Western blot con anticuerpos específicos (Fig. 51). En primer lugar, la distribución de PMCA se analizó usando un anticuerpo policlonal preparado en nuestro laboratorio frente a la PMCA sinaptosomal purificada de cerebelo de cerdo, el a-cb (Fig. 51A). Este anticuerpo reconoció varias proteínas correspondientes a PMCA, de diferente intensidad y con pesos moleculares entre 126 y 145 kDa, desde el día embrionario 10 (E10) hasta el nacimiento (P0). El marcaje con un anticuerpo frente a β -tubulina, que se expresa homogéneamente durante el desarrollo, se usó en cada blot como un control del contenido de proteína, para confirmar que las diferencias en las intensidades de las bandas eran debidas a cambios en la expresión de PMCA durante el desarrollo y no a diferencias de contenido proteico.

De forma paralela, se han realizado Western blots similares utilizando anticuerpos específicos de las cuatro isoformas PMCA (Fig. 51B-E). El anticuerpo anti-PMCA1 reconoció dos bandas de proteína alrededor de 134 y 130 kDa, correspondientes a dos variantes de la isoforma PMCA1 (PMCA1b y 1a, de acuerdo con Filoteo *et al.*, 1997). Estas proteínas se detectaron a partir del estadio E15, siendo más evidente la PMCA1b. En ambos casos su expresión se incrementó con el desarrollo, siendo la de PMCA1a mayor que la de PMCA1b, en P0. El anticuerpo anti-PMCA2 reconoció un amplio espectro de proteínas entre 126 y 152 kDa, a partir de E15. Respecto a la PMCA3, su anticuerpo específico detectó una proteína con gran intensidad alrededor de 133 kDa y otra mucho más débil de ~127 kDa que corresponderían con la PMCA3b y 3a, respectivamente según Filoteo *et al.* (1997). Estas proteínas aparecieron desde E10, y su intensidad no cambió significativamente durante el periodo analizado. El anticuerpo monoclonal anti-PMCA4 no reconoció a su isoforma en ningún estadio del desarrollo, ni en las fracciones de membrana ni en secciones de cerebelo analizadas mediante ensayos inmunohistoquímicos (Fig. 51E'), que si eran marcadas con los otros anticuerpos (Fig. 51A'-D').

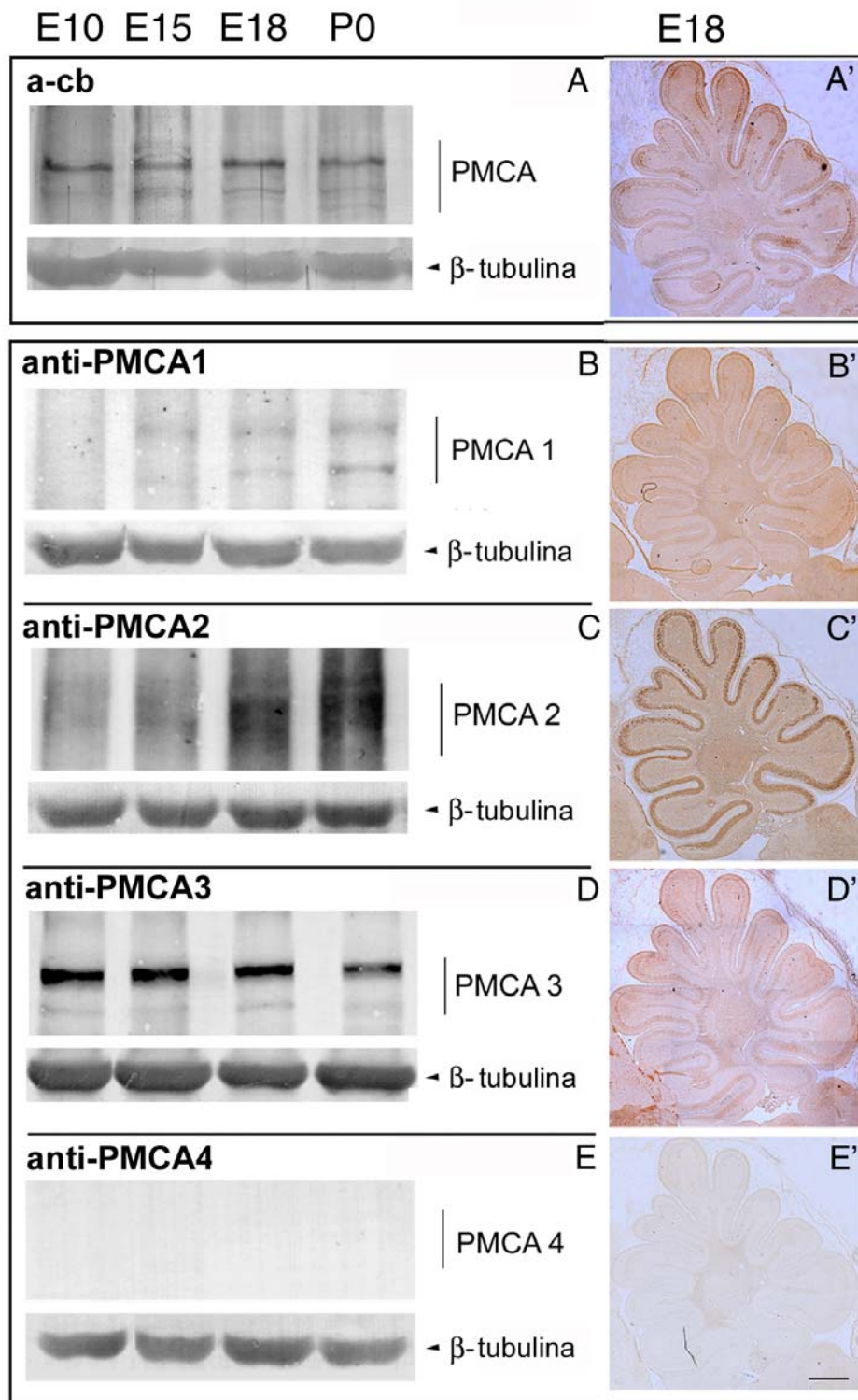


Fig. 51 Inmunodetección de proteínas PMCA en fracciones de membrana y secciones de cerebelo de pollo en desarrollo. Treinta μ g de proteína de VM de los estadios indicados se separaron en un gel al 6,5% de poliacrilamida en SDS, se transfirieron a membranas de PVDF y se incubaron con el anticuerpo a-cb (dilución 1/400, A) y con anticuerpos específicos de isoformas PMCA (dil. 1/500, B-E). Para confirmar que el contenido de proteína era el mismo en todas las calles se usó un anticuerpo frente a β -tubulina (dil. 1/1.000). También se muestran inmunohistoquímicas en secciones de criostato de cerebelo en el estadio E18 con los anticuerpos indicados anteriormente (A': dil. 1/200; B'-E': dil. 1/50). Barra de escala, 2 mm.

Localización de isoformas PMCA en secciones de cerebelo de pollo en desarrollo

La localización de las isoformas PMCA se ha realizado en secciones para-sagitales de criostato de cerebelo de pollo desde el estadio E10 hasta el nacimiento, mediante inmunohistoquímicas con los mismos anticuerpos utilizados en los ensayos de Western blot. En el estadio E10, el anticuerpo a-cb (Fig. 52) mostró un marcaje muy débil en la capa celular cortical interna y en los núcleos profundos (Fig. 52a,a'). Sin embargo, marcó intensamente los plexos coroideos del IV ventrículo (Fig. 52a). En el estadio E15, en el que la capa de las células de Purkinje comienza a ser una monocapa, los precursores de estas células presentaron un claro marcaje en el soma y en los incipientes troncos dendríticos con el anticuerpo a-cb (Fig. 52b,b'). En E18, el marcaje se localizaba principalmente en el soma y en los troncos dendríticos primarios de las neuronas de Purkinje, y también aparecía en la capa granular interna (Fig. 52c,c'). En P0, la inmunorreacción con el a-cb fue muy similar a la mostrada en E18, siendo el marcaje mayor en la capa granular que en estadios más tempranos (Fig. 52d,d'). Las interneuronas de la capa molecular no presentaron inmunorreacción en ninguno de los estadios analizados.

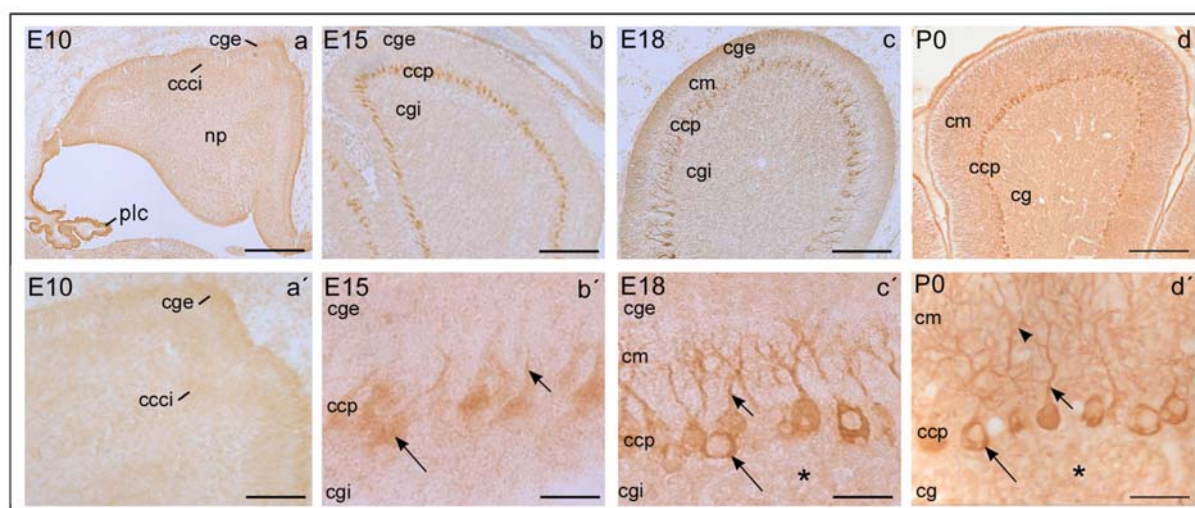


Fig. 52 Inmunorreacción con el anticuerpo a-cb en secciones para-sagitales de cerebelo de pollo en desarrollo. En el estadio E10 (a,a') se observa un marcaje muy débil en la capa celular cortical interna, mientras que los plexos coroideos (plc) son fuertemente marcados. De E15 a P0, se marcan el soma y los troncos dendríticos principales (flechas largas y cortas, respectivamente en b'-d') de las células de Purkinje, y en P0, además, la arborización dendrítica (cabezas de flecha en d'). En E18 y P0, la capa granular (cg) también presenta inmunorreacción (asteriscos). cci: capa celular cortical interna; cge: capa granular externa; cgi: capa granular interna; cm: capa molecular; np: núcleos profundos. Dilución a-cb: 1/200. Barras de escala: E10: a, 480 μm , a', 96 μm ; E15: b, 525 μm , b', 50 μm ; E18: c, 600 μm , c', 58 μm ; P0: d, 620 μm , d', 62 μm .

La figura 53 muestra la distribución específica de las isoformas PMCA1, PMCA2 y PMCA3 durante el desarrollo del cerebelo en secciones similares. En el estadio embrionario E10, todos los anticuerpos anti-isoformas marcaron muy débilmente la capa celular cortical interna y los precursores de las neuronas de los núcleos profundos (Fig. 53A-C). En cambio, mostraron un fuerte marcaje en los plexos coroideos, de forma semejante al anticuerpo a-cb. En la corteza cerebelosa en el estadio E15, los anticuerpos frente a PMCA1 (Fig. 53D) y PMCA3 (Fig. 53F) marcaron el soma de los precursores de las células de Purkinje, mientras que el anticuerpo anti-PMCA2 (Fig. 53E) marcó alrededor de estos precursores. En E18, la expresión de las isoformas analizadas se detectó ya claramente en el soma de las células de Purkinje (Fig. 53G-I), con un marcaje definido para la PMCA2 en la periferia del soma (Fig. 53H). Es interesante resaltar la distribución específica de estas isoformas en los árboles dendríticos de las células de Purkinje. Así, las PMCA1 y 3 se localizaron en los troncos dendríticos primarios (Fig. 53G,I), mientras que la PMCA2 marcó completamente la arborización dendrítica de estas neuronas, incluyendo troncos y espinas dendríticas (Fig. 53H). En el nacimiento (P0), el marcaje de estos anticuerpos fue muy similar a E18, pero mucho más definido, de acuerdo con el mayor grado de maduración de la corteza cerebelosa (Fig. 53J-L). Además, las PMCA1 y 3 también se localizaron en el soma de interneuronas de la capa molecular (células estrelladas y de los cestos, Fig. 53J,L). El marcaje en la capa granular con todos los anticuerpos fue de mayor intensidad que en estadios más tempranos, como ocurría con el anticuerpo a-cb.

El estadio P0 se utilizó para analizar la expresión de isoformas en la capa granular. Mediante ensayos de inmunofluorescencia y tinción con DAPI, para localizar los núcleos celulares, se observó que el anticuerpo a-cb marcaba estructuras concretas en los glomérulos cerebelosos (Fig. 54A) y que las 3 isoformas PMCA se localizaban también en los glomérulos, pero de forma menos definida (Fig. 54B). La isoforma PMCA2 aparecía además en la membrana plasmática del soma de las células de los granos.

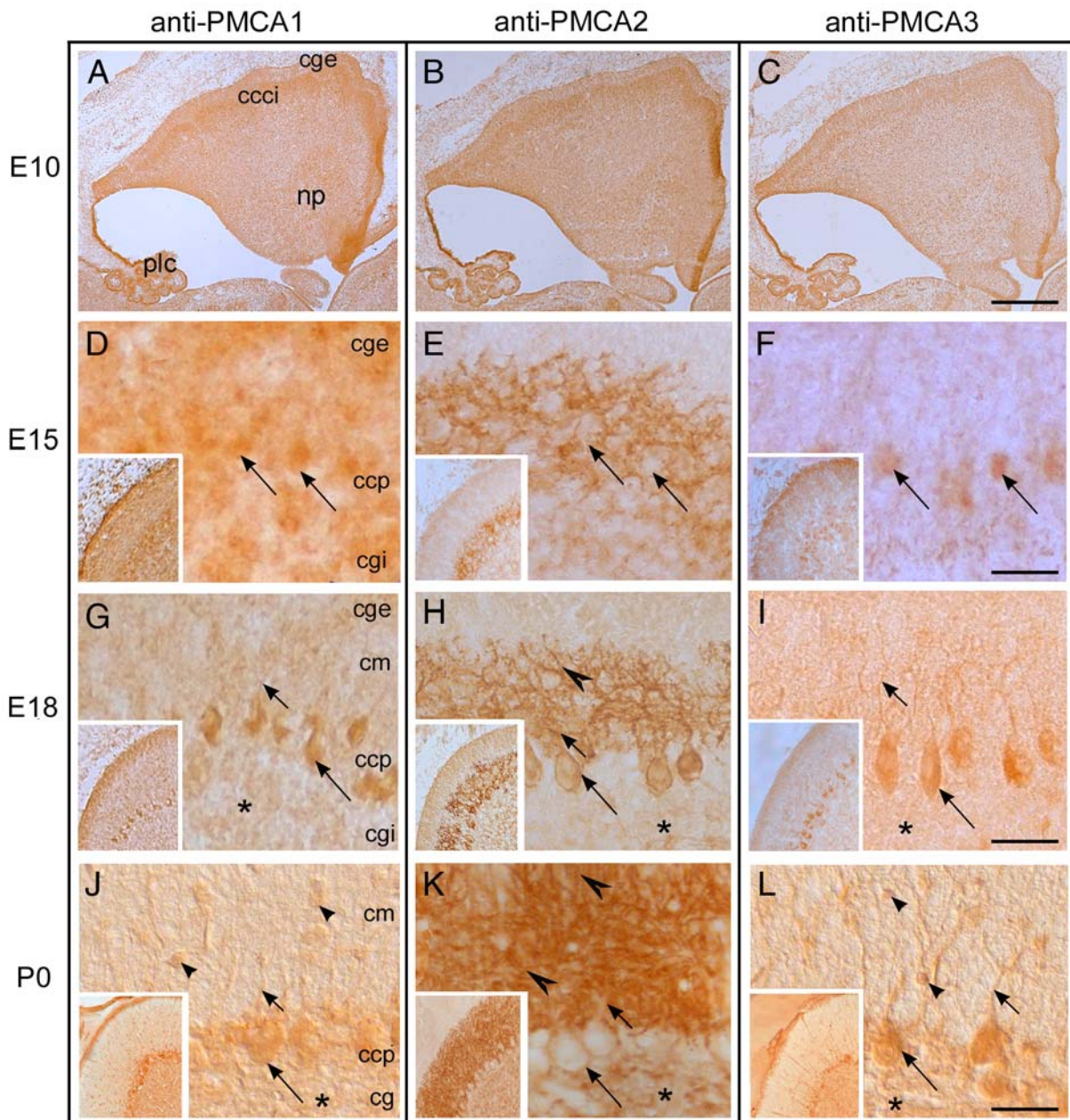


Fig. 53 Inmunodetección de las isoformas PMCA1, PMCA2 y PMCA3 en secciones de cerebelo de pollo en desarrollo. En el estadio E10, los anticuerpos frente a PMCA1 (A), 2 (B) y 3 (C) marcaron débilmente la capa celular cortical interna (ccci) y con mayor intensidad los plexos coroideos (plc). En E15, el marcaje de anti-PMCA1 y anti-PMCA3 se detectó en el soma de los precursores de Purkinje (flechas en D y F), mientras que el de anti-PMCA2 se localizó en fibras en torno a estos precursores (flechas en E). En E18, las PMCA1 y 3 se localizaron en el soma y troncos dendríticos de las células de Purkinje (flechas largas y cortas, respectivamente, en G-I), mientras que el anti-PMCA2 también marcó las espinas dendríticas (cabeza de flecha aguda en H). En P0, el marcaje de PMCA1 y 3 se observó además en el soma de interneuronas de la capa molecular (cm, cabezas de flecha en J y L). Todas estas isoformas se expresaron también en la capa granular (cg, asteriscos en J-L). Los insertos en D-L muestran a bajos aumentos la evolución de la localización de las isoformas PMCA en el desarrollo de la corteza cerebelosa. cge: capa granular externa; np: núcleos profundos; cgi: capa granular interna. Barras de escala: E10, 500 μ m; E15, 50 μ m; E18, 58 μ m; P0 62 μ m.

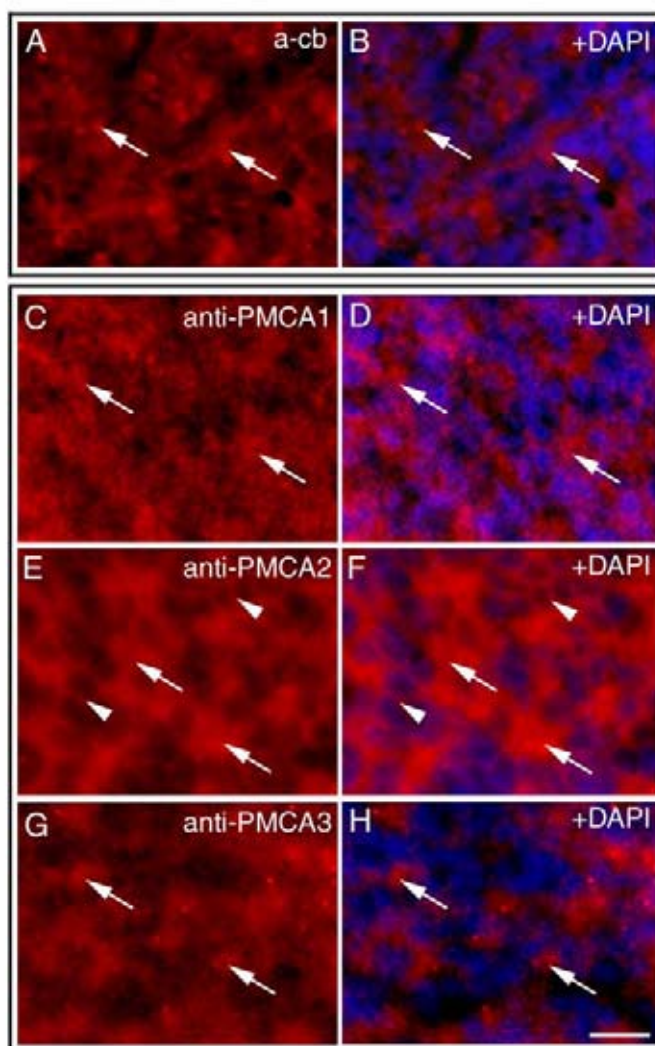


Fig. 54 Localización de proteínas PMCA en la capa granular de cerebelo de pollo en P0 mediante ensayos de inmunofluorescencia. Secciones para-sagitales de cerebelo se tiñeron con DAPI tras el inmunoensayo, para localizar los núcleos de las células de los granos (azul en B, D, F, H). Los anticuerpos a-cb (A-B), anti-PMCA1 (C-D), anti-PMCA2 (E-F) y anti-PMCA3 (G-H) marcaron los glomérulos cerebelosos (flechas). La PMCA2 también se localizó en la periferia de los somas de las células granulares (cabezas de flecha en E-F). Barra de escala: 12 μ m.

La expresión de proteínas PMCA en los núcleos profundos del cerebelo se observó desde los primeros estadios analizados (Figs. 52a y 53A-C), incrementándose su expresión en estadios más avanzados (Fig. 55). En E15, el anticuerpo a-cb marcó el pericarion de las células de los núcleos profundos, mientras que en P0 la inmunorreacción se detectó en las prolongaciones nerviosas entre estas células (Fig. 55A,B). Las isoformas PMCA1 y PMCA3 se detectaron en el soma de las células de los núcleos profundos, reduciéndose su marcaje en P0 (Fig. 55C,D,G,H). La inmunorreacción correspondiente a PMCA2 se localizó en la periferia del soma de estas células y en prolongaciones nerviosas entre ellas en todos los estadios analizados (Fig. 55E,F).

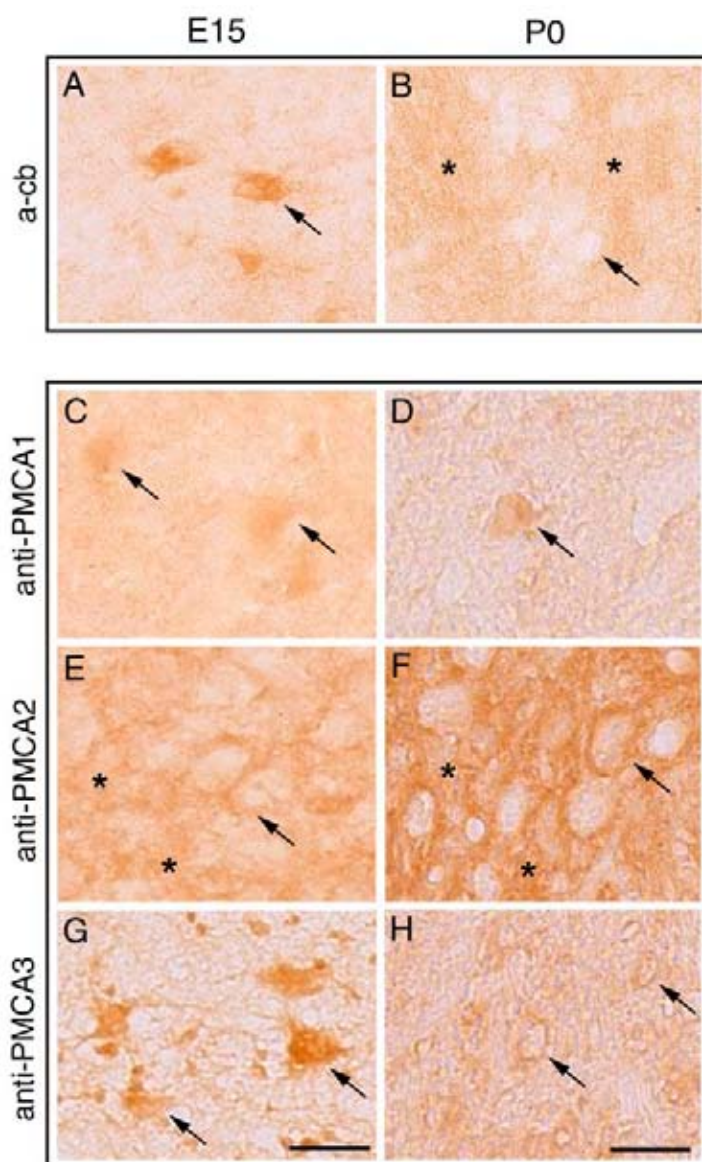


Fig. 55 Localización de isoformas PMCA en los núcleos profundos del cerebelo de pollo durante el desarrollo. El anticuerpo a-cb marcó el soma de células de los núcleos profundos en E15 (flechas en A) y prolongaciones nerviosas entre ellas en P0 (asteriscos en B). La expresión de PMCA1 y PMCA3 se detectó en el soma de neuronas de estos núcleos en E15 y P0 (flechas en C, D, G y H), mientras que la proteína PMCA2 se observó en la periferia del soma de estas neuronas y en prolongaciones entre ellas (flechas y asteriscos en E y F, respectivamente). Barras de escala: E15, 38 μ m; P0, 42 μ m.

En los plexos coroideos del IV ventrículo, todos los anticuerpos mostraron un fuerte y definido marcaje desde el primer estadio de pollo analizado (Figs. 52a y 53A-C). Al realizar un análisis más detallado (Fig. 56), se observó que en el estadio embrionario E10 el marcaje se localizaba en las células epiteliales de los plexos coroideos. El marcaje disminuía en P0 respecto a los estadios de desarrollo más tempranos y se concentraba en el polo apical de estas células.

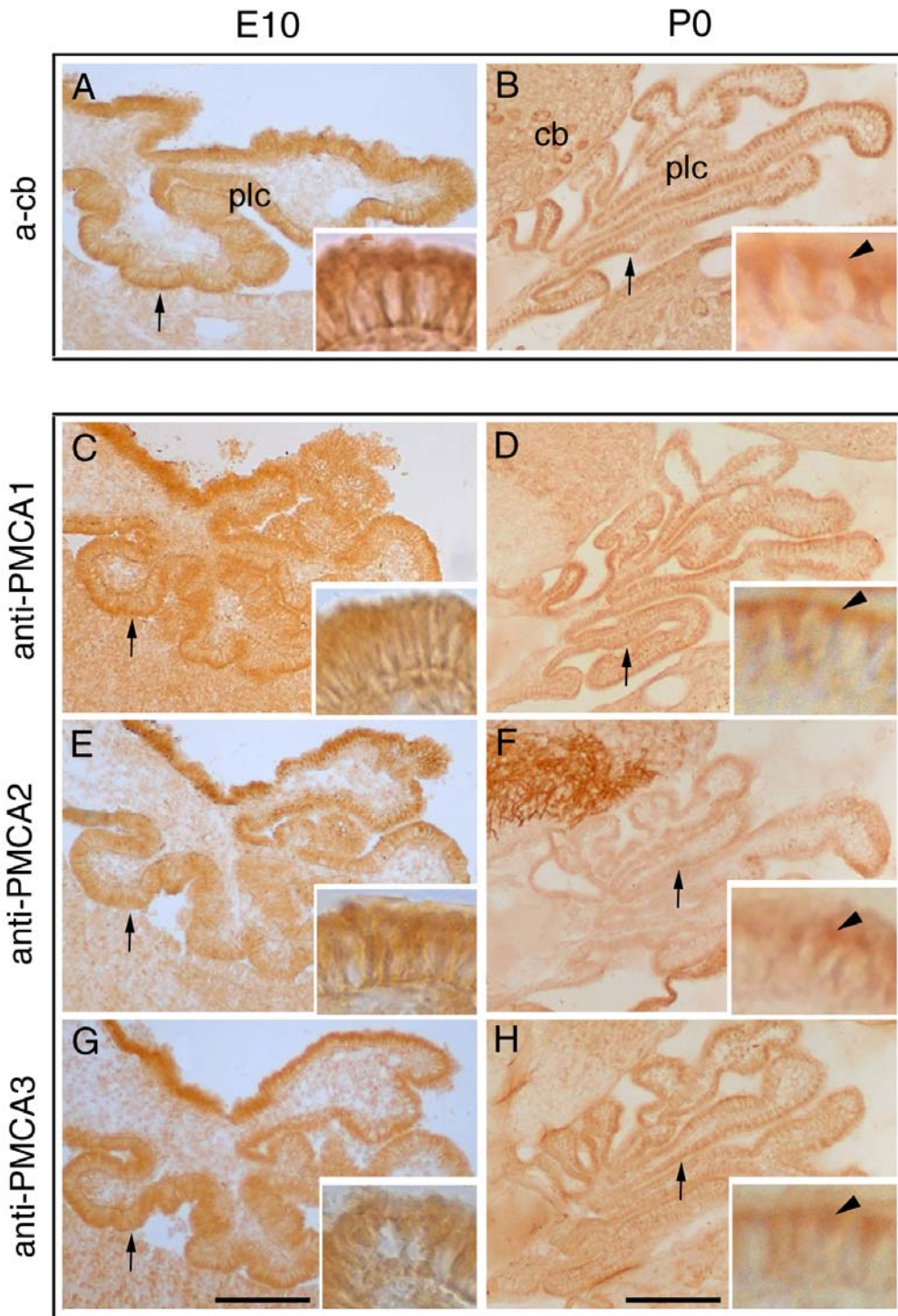


Fig. 56 Inmunodetección de PMCA en los plexos coroideos del IV ventrículo en pollos de los estadios E10 y P0. Los anticuerpos indicados marcaron los plexos coroideos (plc) desde el estadio E10, localizándose el marcaje intensamente en la membrana plasmática de las células epiteliales (detalle en insertos). En P0, el marcaje general fue menor, y se concentraba en la membrana apical de estas células (detalle en insertos). cb: cerebelo. Barras de escala: E10, 110 μm ; P0, 280 μm .

Expresión funcional de PMCA en vesículas de membrana de cerebelo de ratón en el desarrollo post-natal

El análisis de las isoformas PMCA durante el desarrollo en ratón se ha realizado en cerebelos obtenidos al final de la gestación, en el nacimiento, post-natales y adultos. En primer lugar, se ha realizado un análisis funcional en vesículas de membranas.

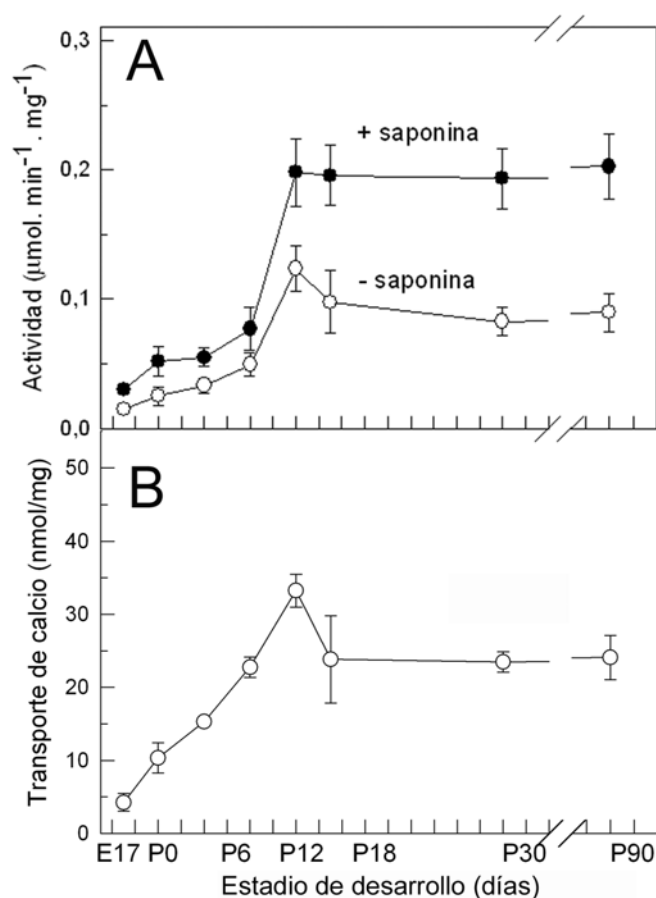


Fig. 57 Actividad Ca^{2+} -ATPasa y transporte de Ca^{2+} de PMCA a diferentes estadios de desarrollo del cerebelo de ratón. (A) La actividad ATPasa de PMCA en ausencia (○) y presencia de saponina al 0,01% (●) se midió en VM a los estadios de desarrollo indicados. (B) El transporte de Ca^{2+} correspondiente a PMCA se midió en presencia de KH_2PO_4 20 mM a los 30 min en los estadios indicados. Los datos son media \pm D.E. (barras) de los valores obtenidos en cuatro experimentos, realizados por duplicado y de tres preparaciones distintas.

La figura 57 muestra los valores de la actividad Ca^{2+} -ATPasa y del transporte de Ca^{2+} correspondiente a la PMCA, obtenidos en presencia de tapsigargina 0,1 μM y azida 5 mM, para inhibir la SERCA y otras ATPasas, respectivamente (como se describe en "Métodos generales"). La actividad Ca^{2+} -ATPasa de PMCA (Fig. 57A) se midió en ausencia y presencia de saponina al 0,01%, como en los ensayos realizados en cerebelo de pollo

(capítulo 2). En ausencia del detergente, la actividad PMCA se incrementaba desde E18 hasta P12. A partir de este estadio, disminuyó y se estabilizó, alcanzando valores de $0,09 \pm 0,01 \mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ en el adulto. En presencia de saponina, la actividad PMCA también aumentaba con el desarrollo, siendo este incremento unas dos veces mayor en presencia que en ausencia del detergente, indicando la existencia de moléculas de PMCA orientadas intracelularmente en estas preparaciones de membranas.

La acumulación de Ca^{2+} debida a PMCA, dentro de las VM de cerebelo de ratón, se midió tras 30 min de transporte y en presencia de KH_2PO_4 20 mM (Fig. 57B). El transporte de Ca^{2+} aumentó con el desarrollo, alcanzando un máximo en P12, a partir del cual disminuyó y se estabilizó. El transporte de Ca^{2+} en las VM de cerebelo de ratón adulto fue de $24,1 \pm 3$ nmoles de Ca^{2+} /mg de proteína.

Distribución de isoformas PMCA en fracciones de cerebelo de ratón en desarrollo

Ensayos de Western blot con los anticuerpos específicos ya utilizados permitieron analizar la presencia de las distintas isoformas PMCA en VM de cerebelo de ratones de distintos estadios de desarrollo. La figura 58 muestra la presencia de las cuatro isoformas PMCA en el cerebelo de ratón, aunque con distinta distribución durante el desarrollo. El anticuerpo anti-PMCA1 se unió a dos proteínas que podrían corresponder con las isoformas PMCA1b (~ 134 kDa) y PMCA1a (~ 130 kDa) según Filoteo *et al.* (1997), y que se iban incrementando durante el desarrollo hasta el estadio P30, a partir del cual disminuía levemente su expresión. El anticuerpo anti-PMCA2 reconoció un grupo de proteínas alrededor del peso molecular esperado para la PMCA y correspondiente a distintas variantes de esta isoforma generadas por procesamiento alternativo. La intensidad de estas proteínas iba incrementándose desde el primer estadio analizado hasta P12, para después mantenerse constante. El anti-PMCA3 reconoció 3 proteínas mayoritarias, cuya inmunorreacción aumentaba con el desarrollo, con un máximo en P15, para después mantenerse. El anticuerpo anti-PMCA4 se unió a dos proteínas, posiblemente las PMCA4a (~ 129 kDa) y PMCA4b (~ 133 kDa) según Filoteo *et al.* (1997), cuya expresión aumentó suavemente hasta P30. Se utilizó un anticuerpo frente a β -tubulina en cada blot para confirmar que las diferencias en las intensidades de banda eran debidas a cambios en la expresión de esa proteína y no a diferencias en su contenido durante el desarrollo.

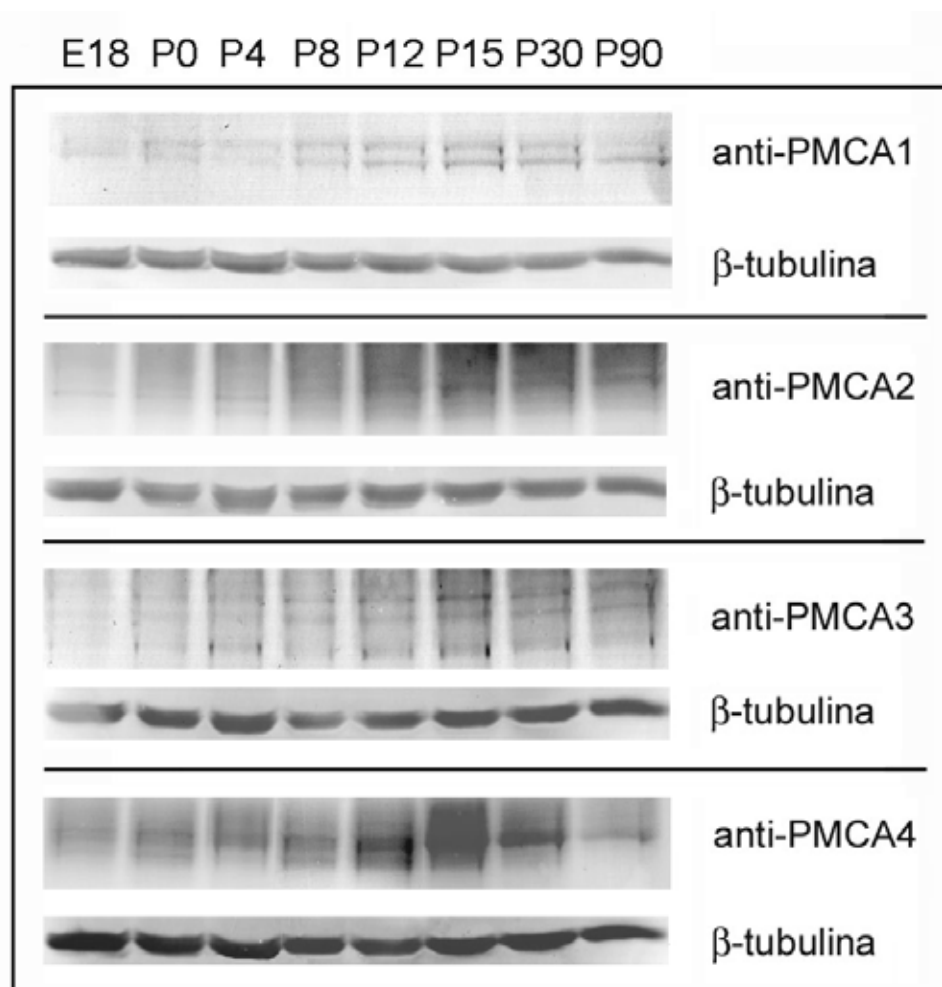


Fig. 58 Inmunodetección de isoformas PMCA en VM de cerebelo de ratón en desarrollo. Veinte μ g de proteína se separaron mediante electroforesis en un gel al 6,5%, se transfirieron a membranas de PVDF y se incubaron con los anticuerpos anti-PMCA1, anti-PMCA2, anti-PMCA3 y anti-PMCA4 (dilución 1/1.000). La incubación con un anti- β -tubulina (dil. 1.000) se utilizó como control del contenido de proteína en todas las calles. La detección se realizó mediante 4-metoxi-1-naftol.

Análisis de la expresión génica de isoformas PMCA en cerebelo de ratón en desarrollo

Para estudiar si las diferencias en la expresión de las isoformas PMCA durante el desarrollo, observadas por Western blot, se producían también a nivel de RNA mensajero, se analizó la expresión de PMCA1 y PMCA2, dos de las isoformas que mostraron en Western blots distintos patrones de expresión (tras P12-P15: disminución de la expresión de proteína en el caso de la PMCA1, o permanencia constante para la PMCA2). Para ello,

se extrajo el RNA total de los cerebelos con Trizol (ver “Métodos generales”), obteniéndose siempre un RNA de alta pureza ($A_{260}/A_{280} \approx 2$). Al someter el RNA extraído a electroforesis, se observaron las bandas del RNA ribosomal de 28S y 18S, sin evidencias de degradación (Fig. 59A).

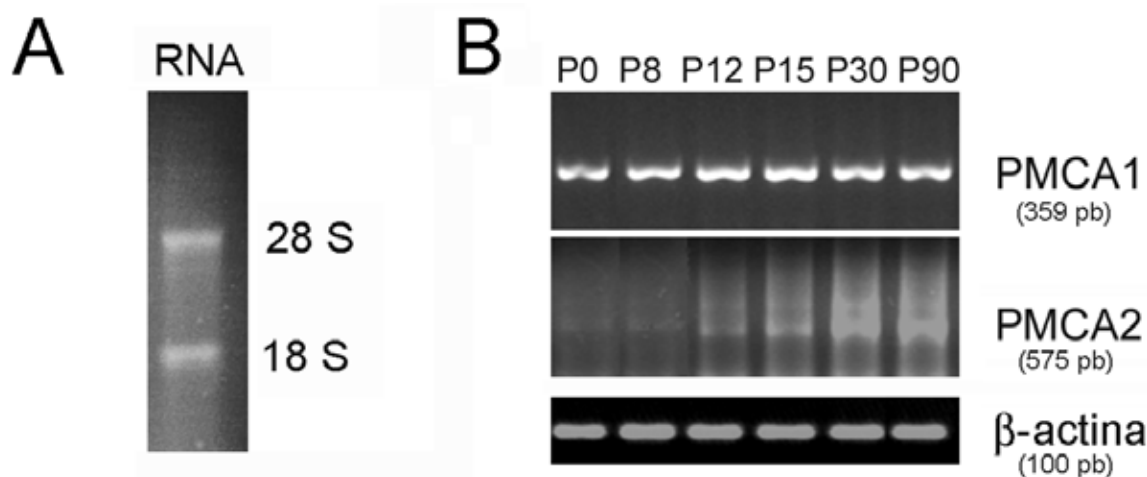


Fig. 59 Análisis de expresión de transcritos de las isoformas PMCA1 y 2 en cerebelo de ratón en desarrollo. (A) Gel de RNA (15 μ g) extraído con Trizol de cerebelo de ratón adulto (P90), mostrando los RNA ribosomal de 28S y 18S. (B) Gel de agarosa al 2% mostrando los productos de la RT-PCR con cebadores específicos de las isoformas PMCA1 y 2 y de β -actina, a partir de RNA extraído de cerebelos de ratón de los estadios de desarrollo indicados.

A partir del RNA extraído se sintetizaron los cDNA correspondientes a los RNA mensajeros mediante transcripción reversa y se realizaron PCRs con cebadores específicos para las isoformas PMCA1 y PMCA2. Los cebadores utilizados se diseñaron para amplificar regiones no traducidas de las secuencias génicas de las PMCA, por ser las que presentan una mayor diferenciación entre isoformas (ver “Métodos generales” para la descripción de los cebadores). La predicción del tamaño de los fragmentos amplificados, incluida la longitud de los cebadores, a partir de las secuencias de cada isoforma corresponde a 359 pares de bases (pb) para la PMCA1 y 575 pb para la PMCA2. La figura 59B muestra un gel con los productos de PCR resultantes. Mientras que no parecen existir grandes cambios en los niveles de expresión de RNA mensajero de la PMCA1 en el desarrollo del cerebelo de ratón, la PMCA2 sí incrementa su expresión con el desarrollo. Se realizó una PCR con cebadores para β -actina para indicar que se utilizó igual cantidad de cDNA molde en todos los ensayos.

Localización de isoformas PMCA en cultivos primarios de cerebelo de ratón

La distribución espacial específica de las distintas isoformas PMCA en secciones de cerebelo mostrada en los ensayos inmunohistoquímicos, realizados en distintas especies, sugiere un patrón predeterminado de localización en cada tipo celular que evoluciona con el desarrollo de la célula en el tejido. Para ver si existe una distribución similar en células aisladas, se realizaron cultivos neuronales primarios a partir de cerebelo de ratón en el estadio E18. En estos cultivos todas las células pasan por distintos estados de diferenciación, presentando un aspecto redondeado en el momento de la siembra. Posteriormente emiten pequeños lamelipodios y neuritas, y por último proyectan largos axones y establecen sinapsis. Este último estado se consiguió tras 48 h de cultivo en las condiciones indicadas en la sección de “Métodos generales”.

Se realizaron ensayos de doble inmunofluorescencia en estos cultivos con los anticuerpos anti-PMCA específicos de isoformas y un anticuerpo frente a β -tubulina, que permitían visualizar completamente la fisionomía de la célula (Fig. 60). Las células presentes en estos cultivos primarios mostraron la presencia de las cuatro isoformas PMCA. La mayoría de las células del cultivo correspondían con células de los granos, mayoritarias en el cerebelo, e identificadas por el aspecto que tienen en cultivo, con un soma pequeño y la emisión de dos axones opuestos. Las PMCA 1, 2 y 3 se expresaron principalmente en el soma de estas células (Fig. 60a,b,c), mientras que la PMCA4 se localizaba además en las prolongaciones nerviosas (Fig. 60d). En los cultivos se encontraron también otros tipos celulares, aunque de forma minoritaria, que también presentaron inmunorreacción con los anticuerpos anti-PMCA (Fig. 60a', b', c', d'). Es interesante señalar que la PMCA2 estaba presente en células gliales y que las PMCA 3 y 4 se localizaban en el soma y las prolongaciones nerviosas de otras células distintas a las de los granos. Por otra parte, ensayos con un anticuerpo frente a calbindina (marcador de células de Purkinje) no daban ninguna inmunorreacción, descartando la existencia de células de Purkinje, dada su difícil supervivencia en cultivo (resultados no mostrados).

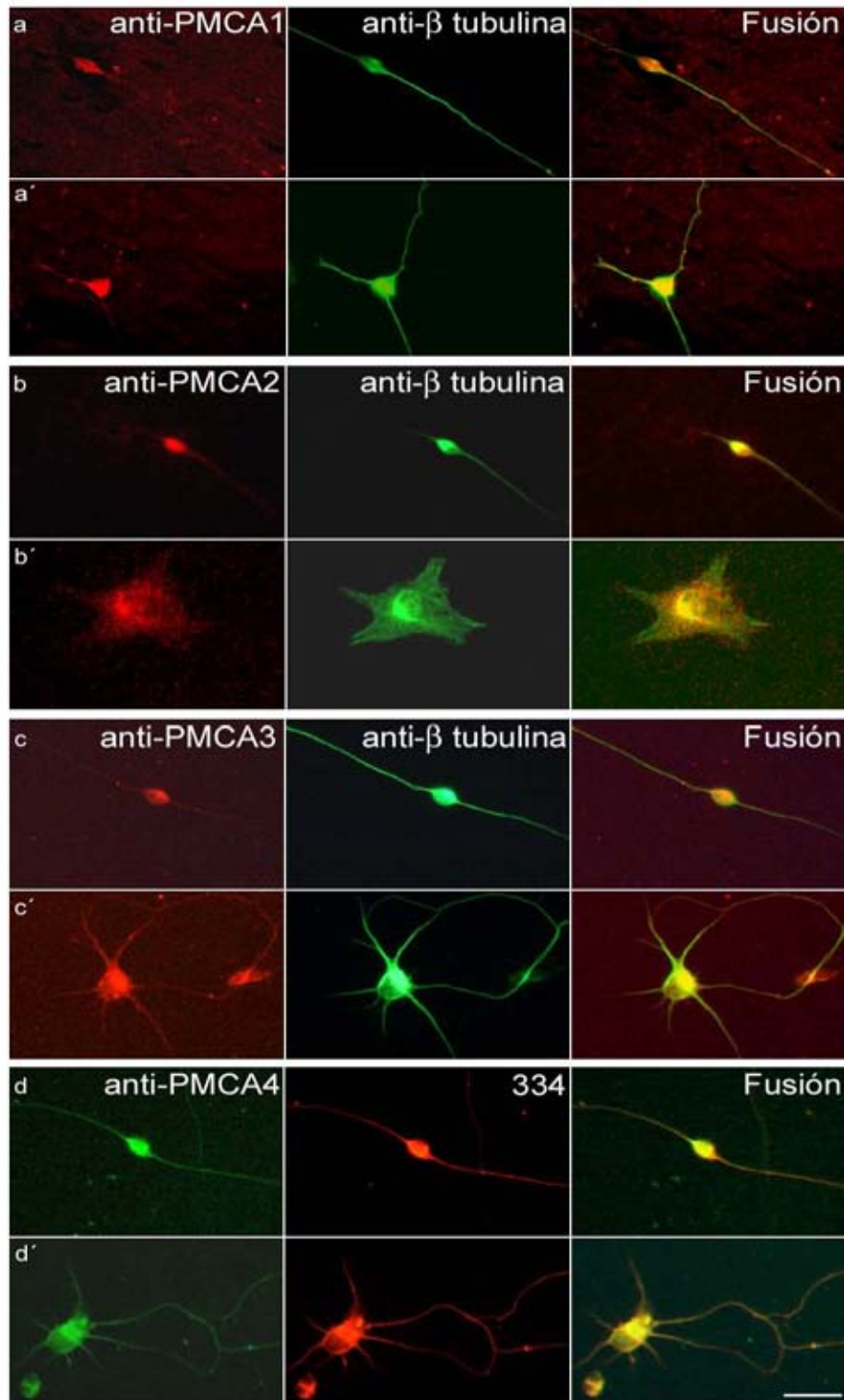


Fig. 60 Inmunodetección de isoformas PMCA en cultivos primarios de cerebelo de ratón. Dobles inmunocitoquímicas tras 48 h de cultivo con los distintos anticuerpos anti-PMCA1, anti-PMCA2, anti-PMCA3 y anti-PMCA4 (dilución 1/500), y los anticuerpos β -tubulina (dil. 1/1.000) o 334 (dil. 1/500), usando estos últimos como marcadores del citoesqueleto celular. Los paneles de la tercera columna (Fusión) corresponden a la superposición de las figuras precedentes. Barra de escala, 14 μ m.

DISCUSIÓN

En este capítulo se ha analizado la expresión de las isoformas PMCA durante el desarrollo del cerebelo en dos especies con distinto patrón de desarrollo, revelando una distribución temporal y espacial que varía entre isoformas.

Los ensayos de Western blot reflejan una amplia expresión de isoformas PMCA y variantes, tanto en pollo como en ratón, con distintos patrones de expresión entre sí (Figs. 51 y 58). Se observó que la PMCA1 era poco abundante en los cerebelos de ambas especies en relación a otras isoformas, como también ocurre en el cerebelo de rata adulta (Filoteo *et al.*, 1997; Stahl *et al.*, 1992; Burette *et al.*, 2003). En el pollo, la expresión de proteína se incrementaba con los estadios de desarrollo, aunque había diferencia entre las distintas variantes identificadas, con una expresión más temprana de la PMCA1b con respecto a la PMCA1a, que estaría de acuerdo con resultados obtenidos por Brandt y Neve (1992) en el desarrollo de rata. Estos autores sugieren que la PMCA1a es una isoforma que inicia su expresión en relación a la maduración sináptica. Un fenómeno similar parece darse en pollo, ya que como se mencionó en el capítulo anterior, los primeros contactos sinápticos no se inician hasta el estadio E12 en el desarrollo de pollo y, a diferencia de la rata, en P0 ya están casi todas las conexiones sinápticas formadas. Respecto a la PMCA2, el incremento en la expresión observado desde E10 a P0 en cerebelo de pollo coincide con un incremento observado para esta isoforma desde P2 a P30 en el desarrollo del cerebelo de rata (Brandt y Neve, 1992), mientras que en ratón parece mantenerse constante tras P12. El alto contenido en la isoforma PMCA2 y en variantes adicionales en los estadios finales del desarrollo para pollo y ratón, coincide con la alta expresión observada en el cerebelo de rata adulta para esta isoforma (Stahl *et al.*, 1992; Stauffer *et al.*, 1997; Filoteo *et al.*, 1997). En pollo, las isoformas PMCA3a y 3b, aunque variaban en su contenido, no parecían sufrir cambios en su expresión durante el desarrollo, mientras que en ratón tenían un patrón similar a la PMCA2. Por otro lado, el hecho de que en pollo el anticuerpo anti-PMCA4 no diese ninguna inmunorreacción en los ensayos de Western blot ni en los inmunohistoquímicos, no permiten afirmar la inexistencia de esta isoforma en el cerebelo de pollo. Podría deberse a que la isoforma de pollo no presente el epitopo para este anticuerpo, ya que sí reconoce a la PMCA4 en cerebelo de ratón, y también de rata (Filoteo *et al.*, 1997).

Los patrones de expresión observados en los distintos momentos del desarrollo del cerebelo de pollo para las isoformas PMCA1, 2 y 3 se vieron también reflejados en su distribución en el tejido, como se resume en la figura 61, mostrando una específica localización en tipos celulares y estructuras. La alta cantidad de PMCA2 y su distribución en el soma y en la arborización dendrítica de toda la célula de Purkinje ha sido mostrada también en rata adulta (Stahl *et al.*, 1992; Stauffer *et al.*, 1997; Burette *et al.*, 2003). Estas células son neuronas GABAérgicas, de tipo inhibitor, que poseen el único punto de salida de información del cerebelo y que además están enriquecidas en numerosas proteínas, distribuidas por toda la célula, que intervienen en la regulación del Ca^{2+} intracelular como son la calbindina y la SERCA2, mostrado en capítulos anteriores. En cambio, la distribución de las isoformas PMCA1 y 3 fue más restringida en las células de Purkinje, asociándose prácticamente a los cuerpos neuronales de estas células desde los momentos más iniciales de su desarrollo. De esta forma, se puede deducir que la fuerte inmunorreacción observada en la capa molecular con los anticuerpos 5F10 (véase el capítulo 2) y a-cb, que reconocían distintas isoformas PMCA, era debida en mayor grado a la presencia de la isoforma PMCA2, ya que las isoformas 1 y 3 se expresan débilmente en la arborización dendrítica de Purkinje. Así, la PMCA2 se convierte en prácticamente la única isoforma PMCA presente en las espinas dendríticas de las células de Purkinje, compartimentos donde la regulación del Ca^{2+} es prácticamente independiente del resto de la célula (Johnson *et al.*, 1993), influyendo de forma determinante en la función celular mediante la generación y transporte de señales excitatorias o inhibitorias al soma y en la plasticidad sináptica (Berridge, 1993).

La expresión de las proteínas PMCA1 y 3 en los somas de las células estrelladas y de los cestos, sólo en momentos próximos al nacimiento del pollo, se ha mostrado también en rata adulta para la PMCA1 (Stauffer *et al.*, 1997) y para la PMCA3 (Burette *et al.*, 2003), utilizando distintos anticuerpos. Estas interneuronas establecen sinapsis de tipo inhibitor a distintas alturas de la célula de Purkinje, pudiendo jugar diversos papeles en la regulación del Ca^{2+} , que repercutan en la integración final de la información que sale del cerebelo vía célula de Purkinje. La carencia de PMCA2 en estas neuronas sugiere que cada tipo celular podría utilizar una única combinación de proteínas reguladoras para mantener el control intracelular de Ca^{2+} . Esto mismo se refleja en la distribución de las distintas isoformas en la capa granular. Todas se expresaban en los glomérulos cerebelosos, regiones muy enriquecidas en sinapsis, y donde el tamaño del marcaje nos impide localizar claramente la

estructura a la que se asocia cada isoforma dentro del glomérulo. Sin embargo, la isoforma PMCA2 fue la única que se identificó en las células de los granos de cerebelo de pollo, aunque otros autores si localizaron PMCA1 y 3, e incluso PMCA4, en las células granulares de rata (Stahl *et al.*, 1992; Stauffer *et al.*, 1997; Burette *et al.*, 2003).

Estudios previos han mostraban una mayor abundancia de la PMCA3 en los plexos coroideos respecto a las otras isoformas en el cerebelo de rata adulta (Stahl *et al.*, 1992; Stauffer *et al.*, 1997). Sin embargo, en los plexos de pollo no se observaron diferencias en la expresión de proteína entre isoformas (Fig. 56). Pero lo más interesante, es que se observó una disminución en el marcaje conforme progresaba el desarrollo del cerebelo, como se describió en el capítulo anterior para PMCA con el anticuerpo 5F10.

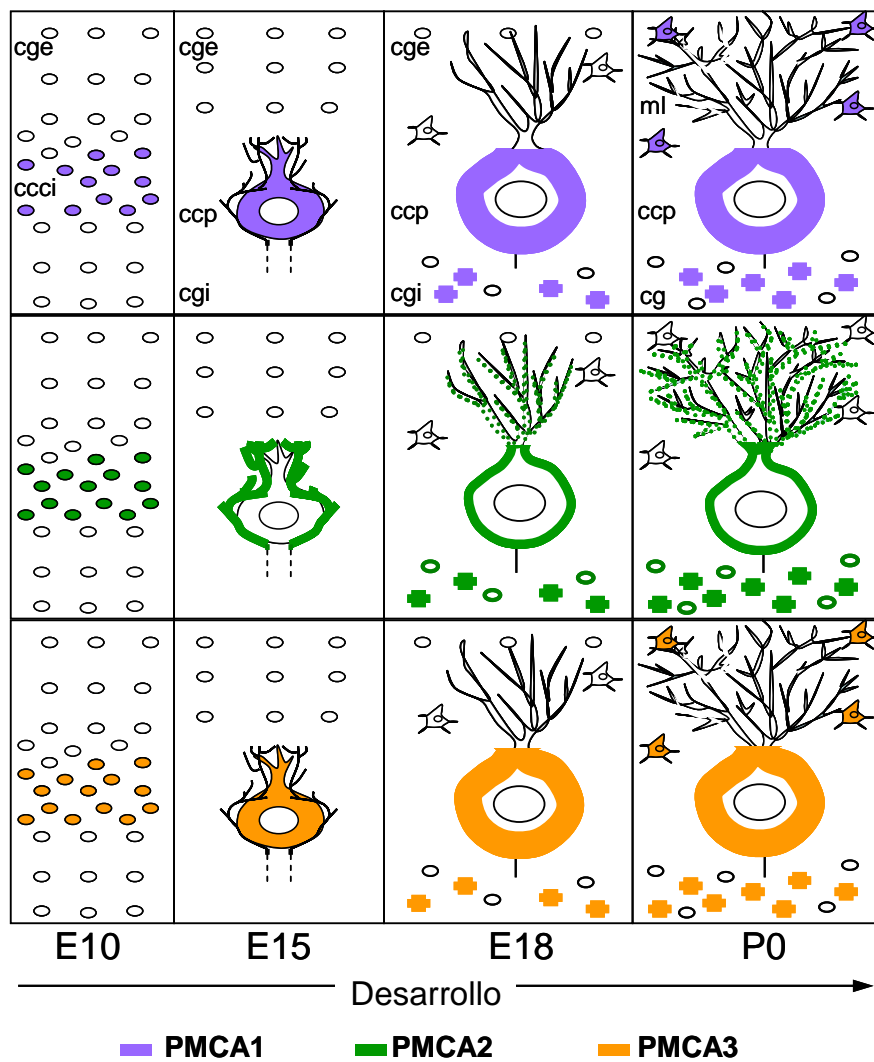


Fig. 61 Representación de los patrones de expresión temporal y espacial de las isoformas PMCA en el desarrollo de la corteza cerebelosa de pollo. cge: capa granular externa; ccci: capa celular cortical interna; cm: capa molecular; ccp: capa de las células de Purkinje; cgi: capa granular interna; cg: capa granular; O: células de los granos; +: glomérulo cerebeloso.

Los ensayos funcionales en vesículas de membrana de cerebelo de ratón en desarrollo han puesto de manifiesto un incremento en los valores de actividad y transporte de la PMCA a partir del estadio P0 (Fig. 57), como ocurría con el cerebelo de pollo a partir de E12. Ensayos de Southern blot y de hibridación *in situ* en el cerebelo de roedores han mostrado que el inicio de la expresión de PMCA ocurre próximo al nacimiento (Brandt y Neve, 1992; Zacharias y Kappen, 1999), pero no existen evidencias anteriores de cuándo comienza a tener actividad esta bomba de Ca^{2+} . Teniendo en cuenta que los estadios embrionarios de pollo desde E7 a E12 corresponden a estadios embrionarios en roedores desde E15 a P2 (Millen *et al.*, 1995), se puede sugerir que el tiempo para la expresión inicial y funcional de PMCA es similar en estos animales, y que estos estadios podrían constituir un periodo crítico en el desarrollo del cerebelo.

El incremento funcional de la PMCA en pollo es gradual. Sin embargo, en ratón se pueden observar de forma general dos fases separadas por el estadio P12: una primera desde un estadio próximo al nacimiento hasta P12 (donde se producen los valores máximos de actividad y transporte con respecto al resto de estadios) y una segunda fase a partir de P12 y hasta el estado adulto (en la que se mantienen los valores cinéticos). Este comportamiento se ve reflejado también en los resultados de Western blot. Diversos estudios han mostrado la importancia del estadio P12 en el desarrollo del sistema nervioso de ratón, momento en que se han observado cambios en la expresión de diferentes proteínas. Así, Seifert *et al.* (1997) observaron un incremento en la funcionalidad de los receptores AMPA hasta P12, para después mantenerse constante. de Bilbao *et al.* (1999) mostraron un cambio en la expresión de la caspasa 3 tras el estadio post-natal P12, asociado a una disminución de la muerte celular en el desarrollo embrionario tras este estadio, debido a una menor neurogenesis. Durante el desarrollo del sistema endocrino de ratón, en P12 se producen cambios en la expresión génica de reguladores de la función hipotalámica-pituitaria-adrenal (Schmidt *et al.*, 2003). Todas estas observaciones sugieren que este estadio constituye un momento muy crítico en el desarrollo del ratón, con un cambio importante en la actividad PMCA debido probablemente a cambios en la homeostasis de Ca^{2+} en ese estadio. Sin embargo, los productos de RT-PCR de la PMCA1 en el cerebelo de ratón durante el desarrollo no mostraron ningún cambio significativo en P12 (Fig. 59), por lo que deben existir mecanismos reguladores a nivel de traducción que repercutan en los niveles finales de isoformas.

Con respecto a los ensayos en cultivos primarios de ratón, todas las isoformas PMCA presentaron una localización bastante similar en las células de los granos, salvo la PMCA4 que se localizaba además en sus prolongaciones nerviosas (Fig. 60). Es interesante señalar que la PMCA2 estaba también presente en células gliales. Fresu *et al.* (1999) fueron los primeros en mostrar en cultivos de células gliales que la bomba PMCA no sólo se localizaba en neuronas. La distribución general y poco específica de las isoformas PMCA observada en células en cultivo (a diferencia de lo observado en tejido cerebeloso), implicaría una redundancia funcional de las distintas isoformas. Sin embargo, estudios recientes comienzan a mostrar una especialización funcional que trasciende de la regulación de los niveles intracelulares de Ca^{2+} . Así, en ratones knockout de la PMCA2 se ha observado que, aunque eran viables, la deficiencia en esta isoforma ocasionaba la pérdida de audición y de equilibrio (Kozel *et al.*, 1998; Ueno *et al.*, 2002). El resto de isoformas PMCA, aparentemente, eran incapaces de compensar la pérdida en la expresión de la PMCA2 en la cóclea del ratón knockout. Además, la reducción en la expresión de PMCA2 (en animales heterocigotos) resultaba en una pérdida importante de la función auditiva. Estos resultados constituyen los soportes más definitivos de la idea de que diferentes isoformas PMCA realizan funciones específicas y especializadas en diferentes células. Así, la existencia de patrones de localización más específicos en tejidos diferenciados, sugiere que la expresión de las isoformas PMCA se va haciendo más restringida conforme progresa la diferenciación celular. Así, serían otros factores intrínsecos a la matriz cerebelosa, como sustancias moduladoras secretadas al medio extracelular por células vecinas, o propias de la maduración de un concreto tipo celular, los que hacen que en el tejido cerebeloso observemos una localización mucho más específica de isoformas PMCA que en cultivo, asociada a tipos celulares concretos y áreas específicas de las células.

Por otro lado, aunque algunos de estos patrones se solapan, sin embargo podría existir una diferente distribución subcelular dentro de la membrana plasmática que les permita interactuar con distintas proteínas y moléculas para desempeñar una función mucho más específica, lo cual se analizará en el próximo capítulo.

Capítulo 4

ASOCIACIÓN DE ISOFORMAS DE LA Ca^{2+} -ATPasa DE MEMBRANA PLASMÁTICA EN DOMINIOS LIPÍDICOS DE MEMBRANAS DE CEREBELO

Resumen

La isoforma PMCA4 de cerebelo de cerdo se localizó en microdominios lipídicos de membranas o “rafts”, extraídos con Brij 96V frío y aislados por flotación en gradientes de densidad de Nycodenz. Su co-localización con colesterol, el gangliósido GM1 y la proteína PrP^C, que se asocian típicamente a estos dominios, confirman su distribución en rafts. Las otras isoformas PMCA se situaron en las fracciones solubles en detergente, junto a la mayoría de las proteínas de membranas. Medidas de actividad enzimática confirman la distribución bimodal de las isoformas PMCA en el gradiente de densidad. Además, la PMCA aislada en rafts presenta características cinéticas típicas de la isoforma 4 (menor actividad ATPasa y mayor estimulación por calmodulina). Los rafts lipídicos podrían contribuir a la interacción de la PMCA4 con proteínas implicadas en la señalización por Ca^{2+} en áreas funcionales discretas de las terminales nerviosas sinápticas.

INTRODUCCIÓN

El estudio de la organización de las membranas biológicas en subdominios especializados, conocidos como “*rafts*” o balsas lipídicas, es una fuente emergente de investigación, dada su implicación en procesos esenciales en la célula entre los que se incluye la transducción de señales (Brown y London, 2000; Simons y Toomre, 2000; Pike, 2003). Los *rafts* lipídicos se caracterizan por su alto contenido en colesterol y esfingolípidos y parecen servir como plataformas para la asociación espacial de complejos de proteínas implicados en vías de señalización (Simons y Toomre, 2000). En las neuronas, se han encontrado estos microdominios lipídicos en las dendritas, donde sostienen a numerosos complejos de proteínas post-sinápticas. De hecho, su desintegración lleva a la reducción de sinapsis excitatorias e inhibitorias y a la pérdida de espinas dendríticas, entre otros procesos (Hering *et al.*, 2003). Por otro lado, existen numerosas evidencias de proteínas implicadas en enfermedades neurodegenerativas y que están asociadas a *rafts*, como son las causadas por priones y la ataxia cerebelosa (Vey, *et al.*, 1996; Legname, *et al.*, 2002), y las proteínas beta-amiloide y presenilinas (Lee *et al.*, 1998; Parkin *et al.*, 1999; Mahfoud, *et al.*, 2002; Molander-Melin *et al.*, 2005) y la parkina (Fallon *et al.*, 2002) involucradas en Alzheimer y Parkinson.

Dentro de los dominios *rafts*, existen subtipos como las denominadas “caveolas”, caracterizadas por la presencia de caveolina-1, que pueden compartir o no una respuesta similar a la solubilidad en detergente que los *rafts* (Brown y London, 2000; Sowa, *et al.*, 2001; Balbis, *et al.*, 2004). En este sentido, estudios inmunocitoquímicos en cultivos de fibroblastos humanos (Fujimoto, 1993) y Western blots de caveolas aisladas de la superficie endotelial de células de pulmón de rata (Schnitzer, *et al.*, 1995) han mostrado la presencia de PMCA en caveolas. Sin embargo, no se han observado caveolas en células nerviosas.

En este capítulo, se ha investigado la asociación de las isoformas PMCA de membrana plasmática sinaptosomal (MPS) de cerebelo de cerdo con *rafts* lipídicos. Las diferencias observadas en la distribución específica de isoformas en dominios de membrana permiten relacionar la isoforma PMCA4 con una posible función más específica en la señalización celular y en otros procesos moleculares.

RESULTADOS

Distribución de lípidos y proteínas característicos de *rafts* en el gradiente de densidad

Los microdominios lipídicos *rafts* se aislaron a partir de la fracción MPS de cerebelo de cerdo (Fig. 62) por extracción con Brij 96V en frío y posterior fraccionamiento utilizando un gradiente de Nycodenz. El detergente Brij 96V se utilizó con preferencia al Tritón X-100, muy utilizado para la extracción en frío de los *rafts*, en base a la mejor conservación por Brij 96V de los complejos de proteína en estos dominios (Naslavsky *et al.*, 1997; Radeva y Sharom, 2004). El gradiente de densidad para el fraccionamiento por flotación se ha realizado con Nycodenz en lugar de sacarosa para así reducir considerablemente el tiempo de centrifugación necesario para alcanzar el equilibrio de densidad, y favorecer la preservación de la integridad funcional de las proteínas de membrana.

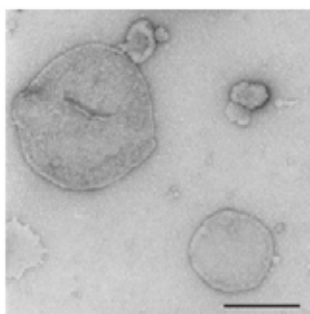


Fig. 62 Micrografía de vesículas de membrana plasmática sinaptosomal de cerebelo de cerdo. Las MPS (5 μg) se visualizaron por tinción negativa y microscopía electrónica de transmisión, como se describe en la sección de “Métodos generales”. Barra: 0,2 μm .

En primer lugar se determinó el contenido del esfingolípidido GM1 y de colesterol, como marcadores de *rafts* lipídicos, en las fracciones de MPS extraídas con Brij 96V (Fig. 63). Los niveles más altos de GM1 (Fig. 63A) se observaron en la parte superior del gradiente (fracciones 1-4), indicando un enriquecimiento en *rafts* similar al descrito por otros autores (Naslavsky, *et al.*, 1997; Madore, *et al.*, 1999). De forma similar, el colesterol se encontró principalmente en las fracciones de baja densidad 2-4 de la parte superior del gradiente, con muy bajos niveles en las fracciones restantes (Fig. 63B).

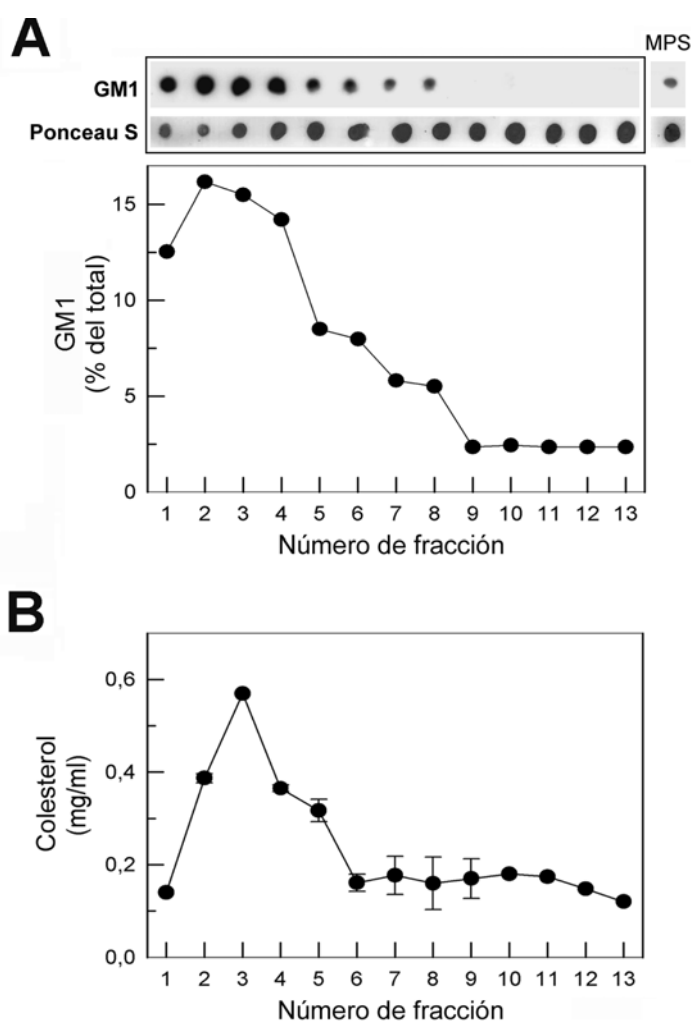


Fig. 63 Distribución del gangliósido GM1 y de colesterol en las fracciones de MPS extraídas con Brij 96V y sometidas a ultracentrifugación en gradiente de densidad de Nycodenz. El gangliósido GM1 (A) se determinó por Dot blot (0,5 μ l de cada fracción, ver “Métodos generales”) usando la toxina del cólera B-HRP (dilución 1/20.000) y visualizado por quimioluminiscencia. Vesículas de MPS no tratadas se usaron como control. El panel A muestra un blot representativo de experimentos independientes con resultados similares. El contenido en proteína total cargado en cada calle se observó con la tinción de proteínas Ponceau S. La intensidad de la reacción de GM1 se cuantificó y representó en porcentaje de la intensidad de GM1 en cada fracción relativa a la intensidad total de GM1. El colesterol (B) se cuantificó en las fracciones obtenidas del gradiente (10 μ l) mediante un ensayo colorimétrico (ver “Métodos generales”). Los datos son media \pm D.E. (barras) de los valores obtenidos de tres experimentos con tres preparaciones diferentes.

Otro marcador de *rafts* utilizado como control ha sido la Proteína Prión Celular (PrP^C) (Taraboulos *et al.*, 1995). La figura 64A muestra que el mayor contenido de PrP^C apareció en las fracciones de baja densidad 2-6, separadas de la mayoría de las proteínas de membrana (Fig. 64C). Esta distribución de marcadores se preservó en las extracciones realizadas con detergente frío de las MPS para concentraciones de proteína comprendidas entre 9 y 14 mg/ml.

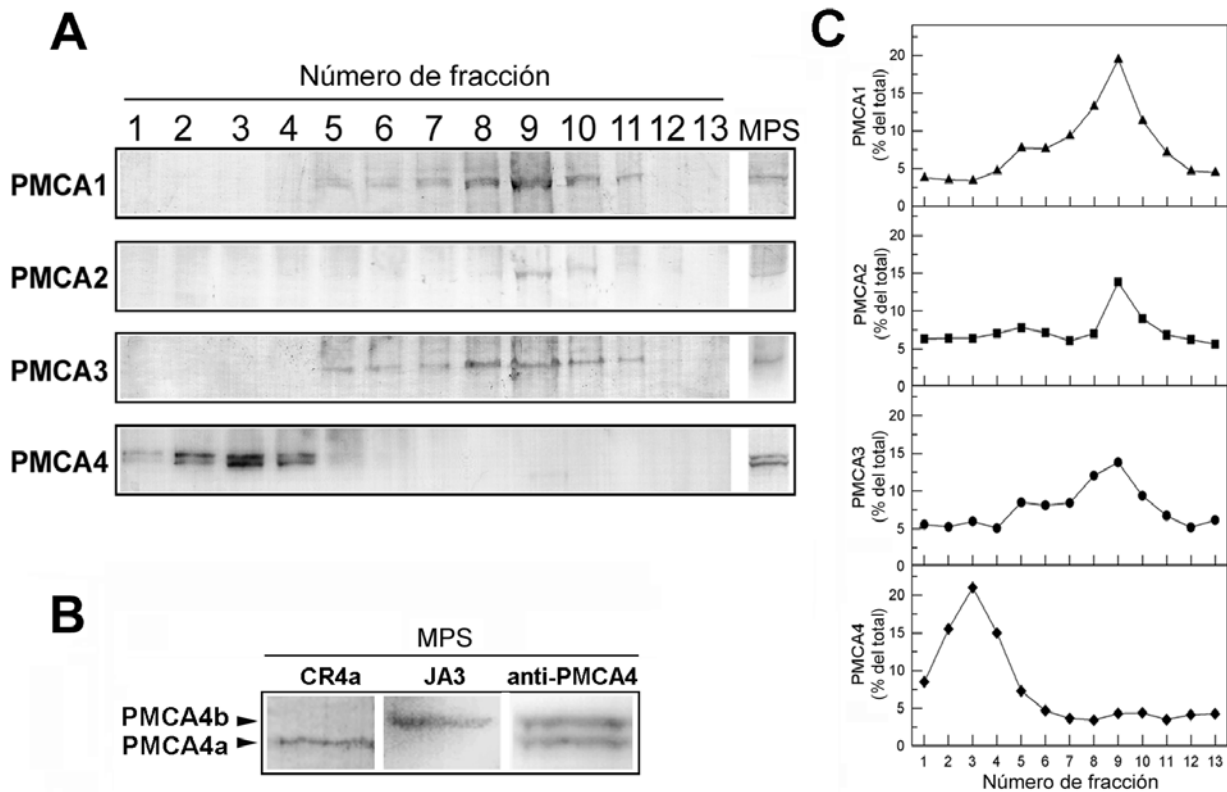


Fig. 65 Distribución de las isoformas PMCA en las fracciones obtenidas del gradiente de densidad de Nycodenz. (A) Cada una de las trece fracciones (11 μ l) y MPS no tratadas (30 μ g) se sometieron a electroforesis en geles al 6,5% de poliacrilamida en SDS y Western blot con los anticuerpos anti-PMCA1 (dilución 1/500), anti-PMCA2 (dil. 1/1.000), anti-PMCA3 (dil. 1/500) y anti-PMCA4 (dil. 1/1.000). Los blots son representativos de seis experimentos independientes de diferentes preparaciones. (B) Cuarenta μ g de MPS se incubaron con los anticuerpos anti-PMCA4a (CR4a), anti-PMCA4b (JA3) y el anti-PMCA4(a/b). (C) Cuantificación de las bandas de PMCA1, 2, 3 y 4 en cada fracción relativa al total de la cuantificación de bandas.

La cuantificación de las bandas correspondientes a las cuatro isoformas PMCA (Fig. 65C) permitió precisar la distribución bimodal de las isoformas PMCA a lo largo del gradiente. Se obtuvo un máximo de señal para la PMCA4 en la fracción 3 de baja densidad (*rafts*) y otro máximo para las tres isoformas restantes en la fracción 9 de alta densidad (no *rafts*). Además, se obtuvo una distribución bimodal similar, si no idéntica, para MPS aisladas de cerebro de cerdo (resultados no mostrados).

Se realizaron medidas de la actividad Ca^{2+} -ATPasa en todas las fracciones (Fig. 66) obteniéndose dos máximos de actividad PMCA que solapaban con los encontrados mediante inmunorreacción. Las membranas de cada fracción, previamente incubadas con calmodulina 0,32 μ g/ml, mostraron una estimulación de la actividad ATPasa solamente alrededor de la fracción 3.

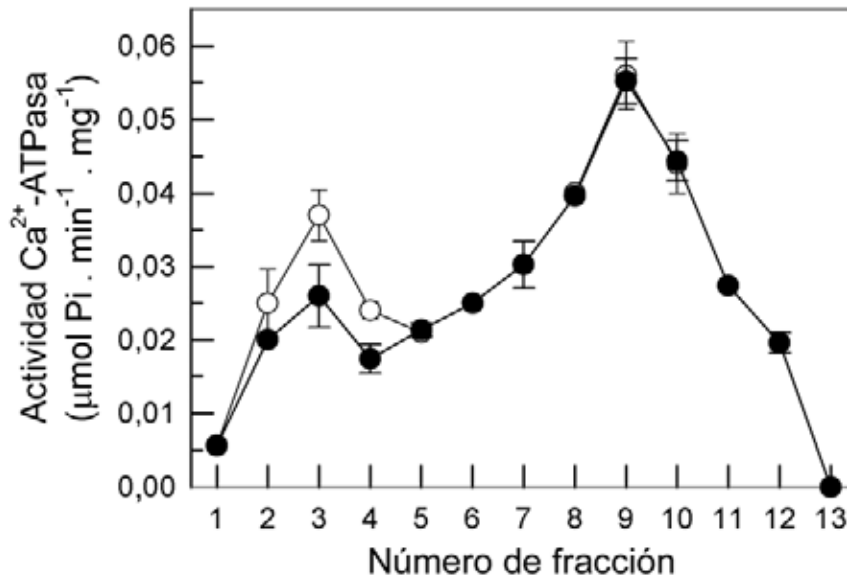


Fig. 66 Actividad Ca^{2+} -ATPasa de PMCA en fracciones del gradiente de densidad. La actividad se midió en la ausencia (●) y presencia (○) de calmodulina $0,32 \mu\text{g}/\text{ml}$ mediante un ensayo acoplado a 37°C usando $7,5 \mu\text{l}$ de cada fracción. Los datos son media \pm D.E. (barras) de los valores obtenidos de tres experimentos independientes en diferentes preparaciones.

Análisis de la asociación PMCA-rafts

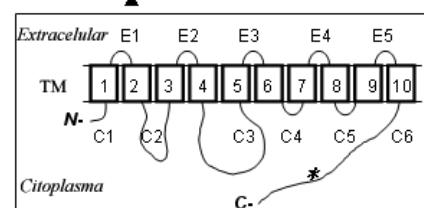
La capacidad preferente de la PMCA4, con respecto a las otras isoformas, de asociarse a *rafts* lipídicos podría ser resultado de una propiedad intrínseca de la proteína o de la existencia de moduladores que indirectamente podrían promover esta asociación, en el caso de la PMCA4, y excluirlo en el caso de las restantes isoformas. En este sentido, el hecho de que la PMCA4b se una a varias proteínas PDZ (PSD-95/Dig/ZO-1) de la familia MAGUK (*Membrane-Associated Guanylate Kinase*) (Kim *et al.*, 1998; DeMarco y Strehler, 2001), algunas de las cuales se asocian a *rafts* (Perez *et al.*, 1998; Bruckner *et al.*, 1999; Fallon *et al.*, 2002; Gaide *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2003) podría apoyar una asociación indirecta de esta isoforma a los dominios *rafts*. Las MAGUKs son proteínas de andamiaje implicadas en procesos de señalización (Kim, 1995; Anderson, 1996), que se unen a la región terminal citoplásmica de diversas proteínas de membrana (Gaide *et al.*, 2002) a través de la secuencia de aminoácidos ETSX (para la unión a PDZ de la clase I), siendo X un aminoácido cualquiera. Así, un cambio en la secuencia de ETSV (existente en PMCA4b) a ETSL (en PMCA1b, 2b y 3b) podría explicar la distinta distribución en *rafts* de las variantes PMCA b

(Kim *et al.*, 1998; Hung y Sheng, 2002). Sin embargo, la asociación de PMCA4 con *rafts* lipídicos no puede explicarse solamente a través del dominio PDZ, ya que en este caso no se podría entender la capacidad de asociación de la variante PMCA4a, ni la falta de asociación de la PMCA2b. De hecho, la PMCA4a tiene un extremo C-terminal más corto que no contiene la secuencia de unión a PDZ (Enyedi *et al.*, 1994). Por otra parte, se ha descrito que la PMCA2b interacciona con proteínas MAGUK (DeMarco y Strehler, 2001) y, en cambio, no aparece en este estudio como una proteína asociada a *rafts*.

Para explicar esta controversia, se ha considerado la posibilidad de la asociación a *rafts* como una propiedad intrínseca de la isoforma PMCA4. Si este fuese el caso, entonces la PMCA4 debería contener diferencias en su secuencia de aminoácidos en relación al resto de las isoformas PMCA. La figura 67 muestra el alineamiento de las secuencias de las distintas isoformas PMCA para un análisis comparativo. Las secuencias de las cuatro isoformas manifiestan una gran homología en los dominios transmembrana (TM). Sin embargo, la PMCA4 difiere de las otras isoformas en un 10% del total de residuos implicados en el TM2, un 16% en el TM3, un 6% en el TM4 y un 14% en el TM9 (Tabla 8). Otra posible diana de interacción con *rafts* son los dominios exoplásmicos pequeños de la proteína que también contienen diversos residuos comunes para las PMCA 1, 2 y 3, pero no para la PMCA4. Según Scheiffle *et al.* (1997), los mejores candidatos para la interacción proteína-*rafts* son los residuos hidrofóbicos localizados en la mitad exoplásmica de los dominios TM de la proteína y también los aminoácidos en contacto con la cara exoplásmica de la membrana. Sin embargo, los pequeños dominios citoplásmicos C4 y C5 y la región C6 (C-terminal) de PMCA4 difieren de los de las PMCA 1, 2 y 3 en un número significativo de residuos (10,5%, 17% y 13,5% de sus residuos, respectivamente), mientras que el mayor dominio citoplasmático C3 (el dominio catalítico) de las tres isoformas sólo difieren en un 3,4% de sus residuos.

Fig. 67 Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las cuatro isoformas PMCA. Las secuencias de las isoformas PMCA (Swiss-Prot: P20020, Q01814, P16720 y P23634 de hPMCA1, 2, 3 y 4, respectivamente) se analizaron mediante Blast. Se introdujeron huecos en las secuencias para mantener el alineamiento. Los aminoácidos conservados en las PMCA 1, 2 y 3, pero no en la PMCA4, se señalaron en negrita y en sombreado gris. Los dominios transmembrana (TM) son subrayados y los dominios citosólicos (C) y extracelulares (E) se limitan con flechas. La región C-terminal de hPMCA4a se detalla en cursiva y es señalada con un asterisco. El motivo de unión a PDZ y las Cys potencialmente palmitoiladas (▲) también se indican. El cuadro inserto representa esquemáticamente los dominios de la PMCA.

hPMCA1	MGDMANNSVAYSGVKNSLKEANHDGDFGITLAELRALMELRSTDAFKIKQESYGDVYGICTRLKTS PNEGLSGNPADLERREAVFGKNEIPPKPKPT	97
hPMCA2	MGDMTN-SDFYS--KNQRNES SHGGFEGCTMEELRSLMELRGTEAVVKKIEKTYGDTAICRRLKTS PVEGLP GTA PDLEKRRQIFGQNEIPPKPKPT	94
hPMCA3	MGDMANSSIEFHKPPQQRDVPAAGGFCTLAELRTLMEELRGAALQKIEEAYGDVSLCRRRLKTS PTEGLADNTNDLEKRRQYVGGNEIPPKPKPT	97
hPMCA4	---MTNPSDRVLPAN-SMAESR-EGDFGCTVMEELRKLMEELRSRDLAQIIVHYGGVQNLCSRRLKTS PVEGLSGNPADLEKRRQVFGHNVIPPKPKPT	92
	← C1 →	
hPMCA1	FLQLVWEALQDVTLLIIEIAAIVSLGLSFYQPEEDNALC GEVSVG-EEEGEGETGWIEGAAILLSVVQVVLVTA FNDWSKEKQFRGLQSRIEQEOK	193
hPMCA2	FLQLVWEALQDVTLLIIEIAAII SLGLSFYHPPGEGNEGCATAQGGAEDEGEAEAGWIEGAAILLSVI QVVLVTA FNDWSKEKQFRGLQSRIEQEOK	191
hPMCA3	FLQLVWEALQDVTLLIIEVAIVSLGLSFYAPPEEGE SEACGNVSGGAEDGEAEAGWIEGAAILLSVI QVVLVTA FNDWSKEKQFRGLQSRIEQEOK	194
hPMCA4	FLQLVWEALQDVTLLIIEIAAII SLVLSFYRPAEGEELCGQVATT PEDENEAQAGWIEGAAILLSEVIVVLVTA FNDWSKEKQFRGLQSRIEQEOK	189
	TM 1 ← E1 → TM 2 ← C2 ▲	
hPMCA1	FTVIRGGQVIQIPVADITVGDIAQVKYGDLLPADGLI IQGNDLKIDESSLTGE SDHVKKS LDKDPLLLSGTHVME GSGRMVVTAVGVNSQTGIIFTL	290
hPMCA2	FTVVRAGQVVIQIPVAEIVVGDIAQVKYGDLLPADGLFI QGNDLKIDESSLTGE SDQVRKSDKDPMLLSGTHVME GSGRMLVTAVGVNSQTGIIFTL	288
hPMCA3	FTVIRNGQLIQVVAALVVGDIQVKYGDLLPADGVLLI QANDLKIDESSLTGE SDHVRSADKDPMLLSGTHVME GSGRMVVTAVGVNSQTGIIFTL	291
hPMCA4	FSIIRNGQLIQLPVAEIVVGDIAQVKYGDLLPADGLI IQGNDLKIDESSLTGE SDHVKKS LDKDPLLLSGTHVME GSGRMVVTAVGVNSQTGIIFTL	286
hPMCA1	LGAGGEEEEKKDEKKKKEKKKQDGA-----IEMRNKAKAQDGA- AAMENQPLKSEEGGDGDEKDKKANLP	355
hPMCA2	LGAGGEEEEKKDKK-KG---VKKGDGLQLPAADGAAA SNAADSANASLVNGKMGDGNVDA SSKAKAQDGA AAMENQPLKSAEGGDADDR-K-KASHH	379
hPMCA3	LGAGGEEEEKKDKK-KG---KQDGA-----MESQTKAKKQD GAVAMENQPLKSAEGGEMEEREKKKANAP	353
hPMCA4	LGVNEDDEGEKK-KK-G---KKQ-G-----VPEMRNKAKTQD G-VALEI QPLNSQEGEDNEEKDK-KAVKV	344
hPMCA1	KKEKSVLQGKLT LKLA VQIGKAGLMSAITVILVLYFVIDTFVWQKRPLAECTPIYIQYFVKFFIIGVTVLVVAVPEGLPLAVTISLAYSVKKMMK	452
hPMCA2	KKEKSVLQGKLT LKLA VQIGKAGLMSAITVILVLYFTVDTFVVMKKPWLPECTPVYVQYFVKFFIIGVTVLVVAVPEGLPLAVTISLAYSVKKMMK	476
hPMCA3	KKEKSVLQGKLT LKLA VQIGKAGLMSAITVILVLYFVIDTFVVEGRTWLAECTPVYVQYFVKFFIIGVTVLVVAVPEGLPLAVTISLAYSVKKMMK	450
hPMCA4	KKEKSVLQGKLT LKLA VQIGKAGLMSAITVILVLYFVIDTFVFNRRPWLPECTPIYIQYFVKFFIIGVTVLVVAVPEGLPLAVTISLAYSVKKMMK	442
	← TM 3 → E2 → TM 4 ← C3	
hPMCA1	DNNLVRHLDAEC TMGNATAICSDKTGTLTNRMTVVQAYINEKHYKVPPEEAI PPNILSYLVTGIVSNCAYTSKILPPEKEGGLPRHVGNKTECAL	549
hPMCA2	DNNLVRHLDAEC TMGNATAICSDKTGTLTNRMTVVQAYVGDVHYKEIPDPSSINTKTMELLINATAINSAYTTKILPPEKEGALPRQVGNKTECAL	573
hPMCA3	DNNLVRHLDAEC TMGNATAICSDKTGTLTNRMTVVQSYLGDTHYKEIPAP SALT PKIILDLLVHAI SINSAYTTKILPPEKEGALPRQVGNKTECAL	547
hPMCA4	DNNLVRHLDAEC TMGNATAICSDKTGTLTNRMTVVQAYIGGIHYRQIPSPDVF LPKVLDLIVNGISINSAYTSKILPPEKEGGLPRQVGNKTECAL	539
hPMCA1	LGLLGLL D LKRDYQDVRNEIPEEALYKVT FNSVRKSMSTV LKNSDGSYRIFSKGASE ILLKCKFKI L SANGEAKVFRPRDRDDIVKTVIEPMASE	643
hPMCA2	LGLLGFVLD LKQDYEPVRSOMP EEKLYKVT FNSVRKSMSTV IRLPDESFRMYSKGASE IVLKCKCKI L NGAGEPRVFRPRDRDENVKVIEPMACD	667
hPMCA3	LGLLGFVLD LKRDYQDVRNEIPEEALYKVT FNSVRKSMSTV VRMPDGGFRLFSKGASE ILLKCKTNI LNSNGELRGFRPRDRDDHVRKIEPMACD	641
hPMCA4	LGLLGFVLD LKQDYQAVRNEVPEEKLYKVT FNSVRKSMSTV IRNPPGGFRMYSKGASE ILLKCKMRI LDRRGEAVPFRPRDRDDMVRTVIEPMACD	633
hPMCA1	GLRGLRTICLAFRD FPAGEPEPEWDMENDIVTGLTCIAVVGIEDPVRPEVPDAIKKORAGITVRMVTGDNINTARA IATKCGILHPGEDFLCLEGK	737
hPMCA2	GLRGLRTICVAYRDFPSS-PEPDWDMENDILNELTICVVGIEDPVRPEVPEAIRKORAGITVRMVTGDNINTARA IATKCGIIPHGEDFLCLEGK	760
hPMCA3	GLRGLRTICLAYSDFYAG-QE PDWDMENEVVDLTCIAVVGIEDPVRPEVPEAIRKORAGITVRMVTGDNINTARA IATKCGIIPHGEDFLCLEGK	734
hPMCA4	GLRGLRTICLAYSDFD---DTEPSWDMENEILTELTCIAVVGIEDPVRPEVPDAIAKCKQAGITVRMVTGDNINTARA IATKCGILTPGEDFLCLEGK	725
hPMCA1	DFNRRIRNEKGEIEQERIDKI WPKLRVLARS SPTDKHTLVKGIIDSTVSDQRQVAVTGDGTNDGPALKKADVGFAMGIAGTDVAKEASDII LTDDN	834
hPMCA2	EFNRRIRNEKGEIEQERIDKI WPKLRVLARS SPTDKHTLVKGIIDSTHTEQRQVAVTGDGTNDGPALKKADVGFAMGIAGTDVAKEASDII LTDDN	857
hPMCA3	EFNRRIRNEKGEIEQERLDKVPKLRVLARS SPTDKHTLVKGIIDSTTGEQRQVAVTGDGTNDGPALKKADVGFAMGIAGTDVAKEASDII LTDDN	831
hPMCA4	EFNRLIRNEKGEVEQEKLDKI WPKLRVLARS SPTDKHTLVKGIIDSTVGEHRQVAVTGDGTNDGPALKKADVGFAMGIAGTDVAKEASDII LTDDN	822
hPMCA1	FTSIVKAVMGRNVYDSISKFLQFQLTVNVVAIVAFVTGACITQD SPLKAVQMLWVNLIMDTFASLALATEP PTE SL LKRRPYGRNKPLISRTMMKN	931
hPMCA2	FSSIVKAVMGRNVYDSISKFLQFQLTVNVVAIVAFVTGACITQD SPLKAVQMLWVNLIMDTFASLALATEP PTE TL LKRRPYGRNKPLISRTMMKN	954
hPMCA3	FTSIVKAVMGRNVYDSISKFLQFQLTVNVVAIVAFVTGACITQD SPLKAVQMLWVNLIMDTFASLALATEP PTE SL LKRRPYGRNKPLISRTMMKN	928
hPMCA4	FTSIVKAVMGRNVYDSISKFLQFQLTVNVVAIVAFVTGACITQD SPLKAVQMLWVNLIMDTFASLALATEP PTE SL LKRRPYGRNKPLISRTMMKN	919
	TM 5 ← E3 → TM 6 ← C4 → TM 7	
hPMCA1	ILGHAFYQLVVFLL FAGEKFFDIDSGRNA PLHAPPSEHYTIVFNTFVLMQL FNEINARKIHGERNV FEGLENNAI FCTIIVLGTFFVQI IIVQFGG	1028
hPMCA2	ILGHAVYQLALIFLL FVGEKMFQIDSGRNA PLHSPSEHYTII FNTFVMMQL FNEINARKIHGERNV FEGLENNAI FCTIIVLGTFFAIQVI IIVQFGG	1051
hPMCA3	ILGHAVYQLALIFLL FVGEKFFDIDSGRNA PLHSPSEHYTII FNTFVMMQL FNEINARKIHGERNV FEGLENNAI FCTIIVLGTFFAIQVI IIVQFGG	1025
hPMCA4	ILGHAFYQLVVI FLL FVFAEKFFDIDSGRNA PLHSPPSQHYTIVFNTFVLMQL FNEINARKIHGERNV FEGLENNAI FCSVVLGTFFIQLI FIVQFGG	1016
	← E4 → TM 8 ← C5 → TM 9	
hPMCA1	KPFSCSEL SIEQLW SIFLGMGTLWGQLISTIPT SRLKFLKEAGHTQKEEIP EEE LAEDVEE IDHAERELRRGQILWFRGLNRIQTQIRVVVAFR	1125
hPMCA2	KPFSCS PLQLDQWMCIFIGLGE LVWGQVIATIPT SRLKFLKEAGR LQKEEIP EEE LNEDVEE IDHAERELRRGQILWFRGLNRIQTQIRVVVAFR	1148
hPMCA3	KPFSCS PLSTEQLWCLFVGVGELVWGQVIATIPT S LKFLKEAGHGPQKDEMTDEE LAEGEEE IDHAERELRRGQILWFRGLNRIQTQIRVVVAFR	1122
hPMCA4	KPFSCSLSLSQLWCLFIGIGELLWGQFISAIPT SRLKFLKEAGHTTKEETKD--AEGLDE IDHAERELRRGQILWFRGLNRIQTQIRVVVAFR	1111
	E5 → TM 10 ← C6 → IDVINTFQ	
hPMCA1	SSLVEGLEKPEPSSSIHNFMTHPFRIEDSEPHIPLIDDDTDAEDDAPT KR-----NSSPPSPNKNNAVDSGILHTIEMNKSAT----SSSPG	1210
hPMCA2	SSLVEGLEKPEPRTSIHNFMAHPFRIEDSQPHIPLIDDDTLEEDAALKQ-----NSSPPS LNKNNSAIDS GILHTIEMNKSAT----SSSPG	1233
hPMCA3	SSLVEGLEKPEPRTSIHNFMAHPFRIEDYTHNIPLIDDDTVD--DENEER-----LRAPPSPNQNNAIDS GILYLTTHVTKSATSSSSSPG	1210
hPMCA4	SSLHESIQKPYNQSISIHNFMTHPFAIEEELPRTLPLEDEEENPDKASKFGRVLLLDGEVTPYANTNNNAVD CNOVQLPQSD-----	1195
	TGASFKVLRQNMGGHLDVVKLVPS SSVYAVAPVKS SPTT SVPAVS EBMGNQSGQSV P*	
hPMCA1	SPLHSLETSL 1220	
hPMCA2	SPLMSLETSL 1243	
hPMCA3	SPLHSVETSL 1220	
hPMCA4	SSLQSLETSL 1205	
	PDZ	



Alternativamente, también se ha descrito que la asociación a *rafts* puede ocurrir a través de los aminoácidos de la cara citosólica de la membrana plasmática (DeMarco y Strehler, 2001; Ma *et al.*, 2003).

Dominio	Nº aminoácidos	Aminoácidos diferentes en la PMCA4 con respecto a las PMCA 1, 2 y 3	
		Nº	%
TM1	20	1	5
TM2	20	2	10
TM3	19	3	16
TM4	17	1	6
TM5	19	0	0
TM6	20	0	0
TM7	22	1	4,5
TM8	21	1	4,8
TM9	21	3	14
TM10	21	0	0
E1	36	5	13,8
E2	32	3	9,4
E3	9	0	0
E4	17	2	11,8
E5	9	1	11,1
C1	92	4	4,3
C2	184	16	8,7
C3	412	14	3,4
C4	19	2	10,5
C5	18	3	17
C6	193	26	13,5

Tabla 8 Comparación de secuencias de isoformas PMCA: residuos diferentes en la PMCA4 y comunes para las PMCA 1, 2 y 3. Para el cálculo se utilizaron las secuencias de la Fig. 64.

Sensibilidad a hidroxilamina de las isoformas PMCA

Además de las diferencias encontradas en las secuencias, se pueden identificar dos regiones en las cuales la PMCA4 contiene diferencialmente un residuo de Cys (GLQCRIEQ en el dominio C2 de PMCA4a/b y VDCNQ en el dominio C6 de PMCA4b; Fig. 67) comparado con una Ser en las restantes isoformas. Estos residuos de Cys podrían ser susceptibles de una modificación covalente como la palmitoilación, que parece ser esencial para la localización de diversas proteínas de membrana en dominios *rafts* (Zhang *et al.*, 1998; Arni *et al.*, 1998; Fragoso *et al.*, 2003). Para analizar esta posibilidad, se estudió la sensibilidad de la flotación de la PMCA4 a hidroxilamina 1M, que rompe la interacción

Cys-palmitico (Gubitosi-Klug *et al.*, 2005). La figura 68 muestra la presencia de las isoformas en las fracciones 3 y 9 de baja y alta densidad, respectivamente, obtenidas al solubilizar MPS previamente incubadas con hidroxilamina 1M, respecto a un control con Tris 1M. Se observa como, tras el tratamiento, la intensidad de las bandas correspondientes a PMCA4 disminuye notablemente en la fracción 3 y aumenta en la fracción 9, indicando la destrucción de una posible interacción de ácido palmítico con esta isoforma en la fracción de *rafts* y consecuentemente su migración a las fracciones de alta densidad. Las otras isoformas permanecen inalteradas.

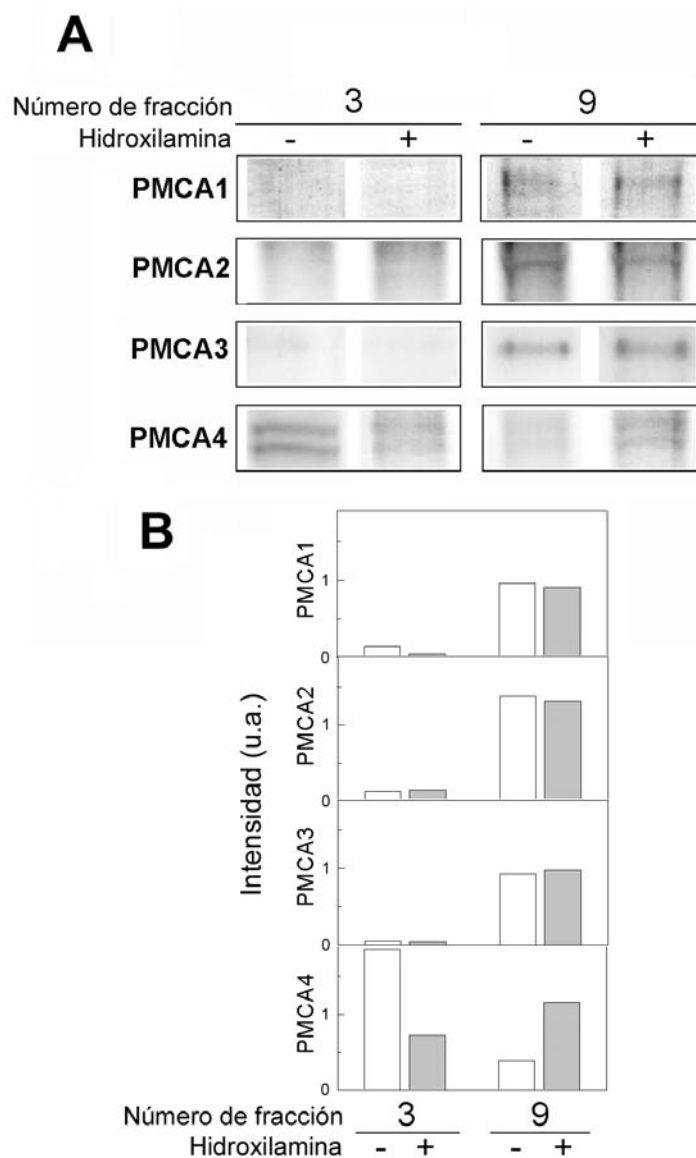


Fig. 68 Sensibilidad a hidroxilamina de las isoformas PMCA. (A) Inmunoblots de las fracciones 3 y 9 (11 μ l) de MPS pre-tratadas con Tris 1M o hidroxilamina 1M, incubados con los diferentes anticuerpos anti-PMCA específicos de isoformas. (B) Abundancia relativa de las isoformas PMCA1, 2, 3 y 4 en las fracciones 3 y 9. Las barras vacías y grises corresponden con los pre-tratamientos con Tris 1M e hidroxilamina 1M, respectivamente.

DISCUSIÓN

Este estudio muestra por primera vez que la isoforma PMCA4 de cerebelo, pero no las otras isoformas PMCA, se asocia específicamente con los dominios de membrana de baja densidad de las MPS, los cuales exhiben un alto contenido en colesterol y GM1, y propiedades similares de flotación a la proteína PrP^C asociada a *rafts*. Además, esta asociación es sensible a hidroxilamina, indicando que la palmitoilación de la proteína actúa como una fuerza de interacción (el-Husseini Ael y Bredt, 2002).

Los microdominios de membrana denominados *rafts* lipídicos, se encuentran mayoritariamente en la membrana plasmática y funcionan como plataformas para concentrar diferentes moléculas y reunirlos en eficientes maquinarias de transducción de señales (Simons e Ikonen, 1997; Brown y London, 2000; Zajchowski y Robbins, 2002). Un alto y creciente número de quinasas y otras proteínas parecen utilizar esta estrategia para aumentar la eficacia de la cascada de señales (Foster *et al.*, 2003). En las neuronas, se pensó en primer lugar que los *rafts* lipídicos estaban restringidos al compartimento axonal (Ledesma *et al.*, 1998), aunque posteriormente se observó que varias proteínas post-sinápticas localizadas en dendritas también se asociaban a *rafts* (Hering *et al.*, 2003). Como se describió en el capítulo 1, la PMCA de cerebelo de cerdo está presente en la membrana plasmática del soma de las células de Purkinje así como en áreas que engloban numerosas sinapsis, como los glomérulos cerebelosos y las espinas dendríticas de la arborización de las células de Purkinje. Sin embargo, este patrón no discriminaba entre isoformas, ya que el análisis estaba realizado con un anticuerpo que reconocía todas las isoformas.

La presencia de rafts lipídicos en MPS de cerebelo de cerdo se puso de manifiesto al solubilizar MPS con Brij 96V frío y someter las membranas a un gradiente y ultracentrifugación. Se basó en el alto contenido en las fracciones de baja densidad de marcadores lipídicos, como el colesterol y el esfingolípido GM1, y de la proteína marcadora de *rafts* PrP^C (Madore *et al.*, 1999; Radeva y Sharom, 2004). La inmunodetección de proteínas PMCA usando anticuerpos específicos mostró que sólo la isoforma PMCA4 se asocia a *rafts*. En cambio, las isoformas PMCA1, 2 y 3 aparecían en las fracciones de alta densidad, localizadas cerca de la parte inferior del gradiente (carentes de *rafts*), donde se encuentran la mayoría de las proteínas. La distribución de isoformas PMCA en dos porciones diferentes del gradiente se corroboró con los ensayos funcionales. La menor actividad PMCA encontrada en la fracción 3 con respecto a la fracción 9 y su mayor

estimulación por calmodulina apoya la presencia de PMCA4 en esa fracción, ya que esta isoforma tiene la menor actividad basal y la mayor estimulación por calmodulina entre las isoformas (Elwess *et al.*, 1997; Padanyi *et al.*, 2003). La baja, o incluso la falta de estimulación por calmodulina encontrada en las fracciones 3 y 9, respectivamente, podría deberse a que las isoformas PMCA están ya activadas por la presencia de un alto contenido en fosfatidilserina en las MPS de cerebelo, como ya se ha mostrado en cerebro (Salvador y Mata, 1996). Estudios recientes señalan que la actividad de la PMCA sinaptosomal de cerebro de cerdo es dependiente de gangliósidos (Zhao *et al.*, 2004) y que disminuye por GM1 y en mayor extensión por GM2 y GM3. Así, el alto contenido de gangliósidos en la misma fracción que PMCA4 (Figs. 63 y 65) puede también contribuir a la menor actividad encontrada en la fracción 3 con respecto a la fracción 9. Por otra parte, Pang *et al.* (2005) han mostrado que la actividad PMCA disminuye al aumentar el contenido de esfingomielina y colesterol en ensayos con PMCA reconstituída de cerebro de cerdo. El patrón de distribución de las isoformas PMCA se observó en MPS no sólo preparadas de cerebelo si no también de cerebro, dando una visión más general que regional en el proceso.

La búsqueda de determinantes moleculares responsables de la asociación PMCA4-*rafts* reveló la presencia de residuos específicos de Cys en los dominios citosólicos C2 y C6, que podrían ser, en principio, susceptibles de palmitoilarse. El papel clave de esta modificación covalente se puso de manifiesto en la reducción de la flotación de la PMCA4 tras el pre-tratamiento con hidroxilamina 1M. Sin embargo, además de la palmitoilación, habría que tener en cuenta otros mecanismos aún no identificados y que requieren una experimentación adicional.

La relevancia fisiológica de la localización de la PMCA4 en *rafts* aún no se ha establecido. Considerando que la PMCA4b presenta la menor actividad basal y mayor estimulación por calmodulina que las otras isoformas (Caride *et al.*, 2001), se ha sugerido que podría estar activamente implicada en el desarrollo, formación y duración de la señal de Ca^{2+} (Padanyi *et al.*, 2003). La localización preferencial de esta isoforma en dominios *rafts* de membranas (ver Figura 69) podría indicar su participación en eventos de señalización por Ca^{2+} con un gran ajuste en su regulación.

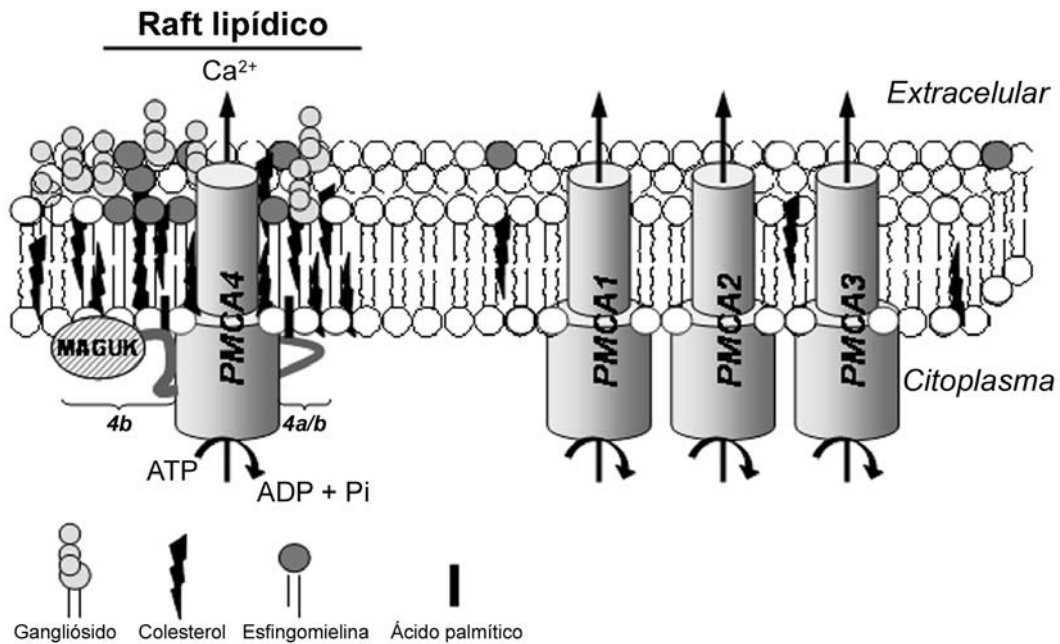


Fig. 69 Distribución de isoformas PMCA en la membrana plasmática sinaptosomal. El esquema representa la asociación de la PMCA4 con microdominios de membrana ricos en colesterol y esfingomielina, a través de posibles interacciones con proteínas MAGUK (para PMCA4b) y/o palmitoilación de residuos de Cys (para PMCA4a/b en C2 y para PMCA4b en C6). Las restantes isoformas PMCA se localizan en otros dominios de la membrana.

Capítulo 5

IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE SPCA1 EN CEREBELO DE CERDO

Resumen

En este capítulo se ha identificado una isoforma de la tercera familia de bombas de Ca^{2+} , la Ca^{2+} -ATPasa de vías secretoras (SPCA1), en cerebelo de cerdo adulto. La SPCA1 se ha observado en las distintas fracciones subcelulares aisladas de cerebelo. En secciones para-sagitales del tejido, la SPCA1 se localiza en el soma de las células de Purkinje, estrelladas y cestos, así como en el soma de las células de los granos y en estructuras de los glomérulos cerebelosos de la capa granular. Esta distribución en tipos celulares específicos implica un mecanismo adicional en la homeostasis intracelular de Ca^{2+} al de las otras bombas de calcio presentes en el cerebelo, asociado a requerimientos específicos en determinadas áreas.

INTRODUCCIÓN

La Ca^{2+} -ATPasa de vías secretoras (SPCA) constituye la tercera clase de bombas de calcio. Se localiza en el complejo de Golgi y en vías de secreción de las células de mamíferos, y transporta Ca^{2+} como las otras familias de Ca^{2+} -ATPasas, SERCA y PMCA, pero además puede transportar Mn^{2+} con una afinidad semejante al Ca^{2+} (Van Baelen *et al.*, 2001).

Se han identificado dos genes que codifican para las isoformas SPCA1 y SPCA2 (Wuytack *et al.*, 2002). La SPCA1 se localiza en muchos tipos celulares y su papel funcional tiene una especial relevancia debido a que mutaciones en el gen de esta isoforma en humanos se asocia con una enfermedad de la piel denominada de Hailey-Hailey (Hu *et al.*, 2000). La isoforma SPCA2 parece tener una distribución más restringida que la SPCA1 y aún no existen evidencias claras de su función biológica (Vanoevelen *et al.*, 2005).

Recientemente, se ha mostrado la presencia de SPCA1 en homogeneizados de cerebro (Wootton *et al.*, 2004), pero no existen estudios previos sobre su distribución asociada a específicos tipos celulares en el tejido neuronal. En este capítulo se muestra por primera vez la presencia y la localización de la isoforma SPCA1 en cerebelo de cerdo. Los resultados obtenidos permitirán investigar la relación entre su distribución y su posible papel en la homeostasis intracelular de Ca^{2+} y Mn^{2+} en el sistema nervioso.

RESULTADOS

Identificación de SPCA1 en fracciones subcelulares de cerebelo de cerdo

La presencia de la proteína SPCA1 en cerebelo de cerdo adulto se detectó mediante Western blots en diferentes fracciones subcelulares de membrana (Fig. 70A). El anticuerpo específico de SPCA1 reaccionó con una banda de proteína de unos 100 kDa en todas las fracciones aisladas y con similar intensidad. Estas fracciones contenían también γ -adaptina, un marcador de las últimas cisternas del Golgi y de la ruta trans-Golgi. La inmunorreacción de un anticuerpo frente a β -tubulina mostró un contenido similar de proteína total en cada calle. Las proteínas γ -adaptina y SPCA1 también se observaron mediante el sistema

“Odyssey” (Fig. 70B) de Western blot que permite identificar dos proteínas simultáneamente, usando dos anticuerpos secundarios fluorescentes diferentes.

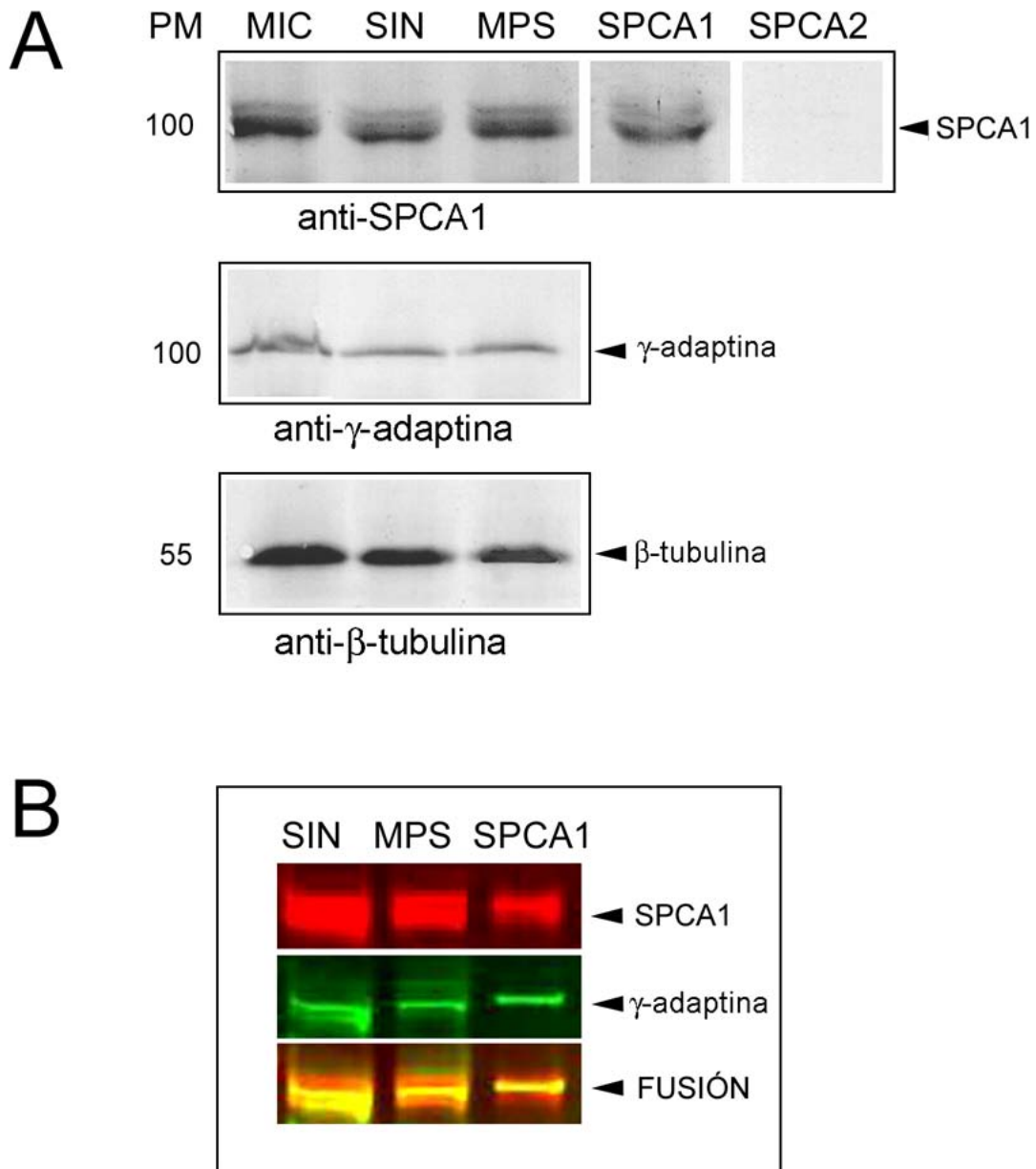


Fig. 70 Inmunoreacción con los anticuerpos anti-SPCA1 y anti- γ -adaptina en fracciones subcelulares de cerebelo de cerdo. (A) Cuarenta μ g de microsomas (MIC), sinaptosomas (SIN) y vesículas de membrana plasmática sinaptosomal (MPS) y 5 μ g de microsomas de células COS sobreexpresando SPCA1 ó SPCA2. Las membranas de PVDF se incubaron con los anticuerpos anti-SPCA1 (dilución 1/1.000), anti- γ adaptina (1/100) y anti- β tubulina (1/1.000) y se revelaron con 4-metoxi-1-naftol. (B) Inmunoreacción similar usando el sistema Odyssey para la visualización simultánea de ambas proteínas usando inmunofluorescencia.

Localización de SPCA1 en secciones de cerebelo. Comparación con la distribución de otras bombas de calcio

La distribución de SPCA1 en cerebelo de cerdo se analizó mediante ensayos inmunohistoquímicos en secciones para-sagitales de criostato (Fig. 71).

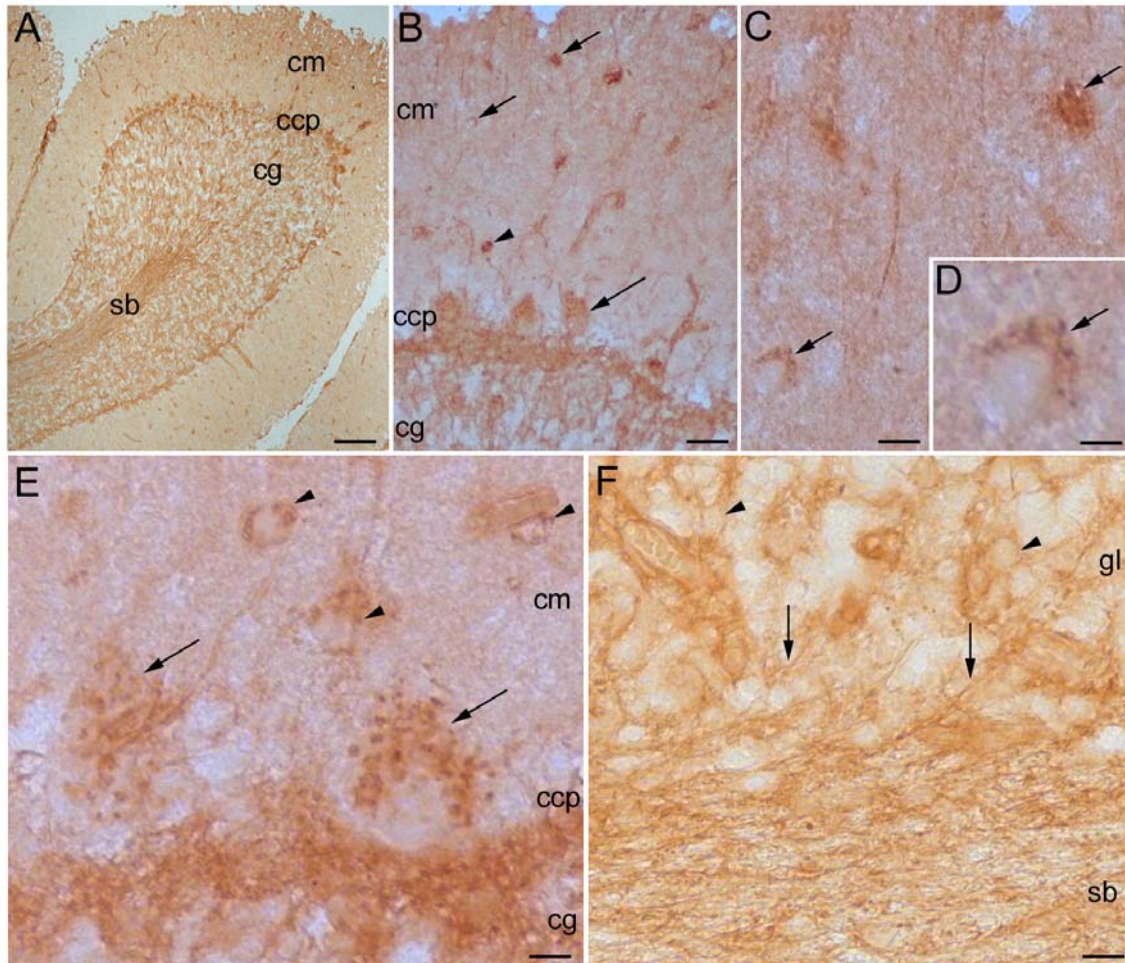


Fig. 71 Localización de SPCA1 en secciones para-sagitales de cerebelo de cerdo. La inmunodetección con el anticuerpo anti-SPCA1 (dilución 1/250) se extiende por las tres capas de la corteza cerebelosa (A), en los somas de las células de Purkinje (B, flecha larga) y de interneuronas localizadas a todos los niveles de la capa molecular (B, flechas cortas y cabezas de flecha), y en la capa granular (cg). Una ampliación de la parte superior de la capa molecular muestra el marcaje de SPCA1 en las células estrelladas (C-D, flechas), en acúmulos definidos del citoplasma de estas células (D). La mitad inferior de la capa molecular (E) presenta un marcaje similar en el soma de las células de los cestos (cabezas de flecha) y en el de las células de Purkinje (flechas). La SPCA1 también se localiza en algunas células de los granos (F, cabezas de flecha) y en numerosas fibras de la capa granular (F, flechas). cm, capa molecular; ccp, capa de las células de Purkinje; sb, sustancia blanca. Barras de escala: A, 140 μ m; B, 40 μ m; C, 20 μ m; D, 4,5 μ m; E, 9 μ m; F, 25 μ m.

El anticuerpo anti-SPCA1 dio señal en las tres capas de la corteza cerebelosa (Fig. 71A), principalmente en los somas de las células de Purkinje y de interneuronas situadas a distintos niveles de la capa molecular, y en la capa granular (Fig. 71B). Un análisis de la parte más superficial de la capa molecular muestra el marcaje de SPCA1 en las células estrelladas (Fig. 71C-D), concretamente en acúmulos definidos del citoplasma de estas células. En la mitad inferior de la capa molecular (Fig. 71E) se observó una inmunorreacción similar en el soma de las células de los cestos y de Purkinje. La arborización dendrítica, el axón y el núcleo de todas estas células fueron inmunonegativos. En la capa granular (Fig. 71F), también se observó expresión de SPCA1 en algunas células de los granos y en numerosas fibras de la capa granular que proceden o se dirigen a la sustancia blanca.

Para analizar con más detalle la localización específica de SPCA1 en las capas molecular y de Purkinje se utilizaron ensayos de doble inmunofluorescencia. La figura 72 muestra el marcaje del anticuerpo anti-SPCA1 en acúmulos definidos en el citoplasma de los somas de las células de Purkinje y de los cestos y su co-localización en estas áreas con el marcador de Golgi anti- γ -adaptina (Fig. 72A). Aunque el marcaje con anti- γ -adaptina fue más homogéneo, también se restringía sólo a los cuerpos celulares. Este anticuerpo anti- γ -adaptina reconoce una proteína de la red de trans-Golgi, presente en vesículas generadas en el aparato de Golgi y que está probablemente distribuída por todo el citoplasma del soma de estas neuronas. Además, la doble incubación de secciones similares con el anticuerpo anti-SPCA1 y DAPI para la tinción de núcleos (Fig. 72B) muestra que la SPCA1 se expresa solamente en las células de Purkinje y las interneuronas, pero no en otras células como la glía.

Un aspecto interesante a considerar es la distribución de SPCA1 en relación con las otras bombas de Ca^{2+} SERCA y PMCA que, como se ha mostrado en el capítulo 1, están presentes en altas cantidades y con una distribución específica en cerebelo de cerdo. Así, la proteína SERCA2, que inmunorreacciona con el anticuerpo IID8 (Fig. 72C), presentó co-localización con SPCA1 sólo en el cuerpo celular, de forma similar a la γ -adaptina. La proteína PMCA, marcada con el anticuerpo 5F10 (Fig. 72D), no mostró una clara co-localización con SPCA1 en ningún lugar de las células de Purkinje. El marcador de sinapsis anti-sinaptofisina, presente en las tres capas de la corteza cerebelosa, no co-localizó con SPCA1 ni en las células de Purkinje ni en las de los cestos (Fig. 72E).

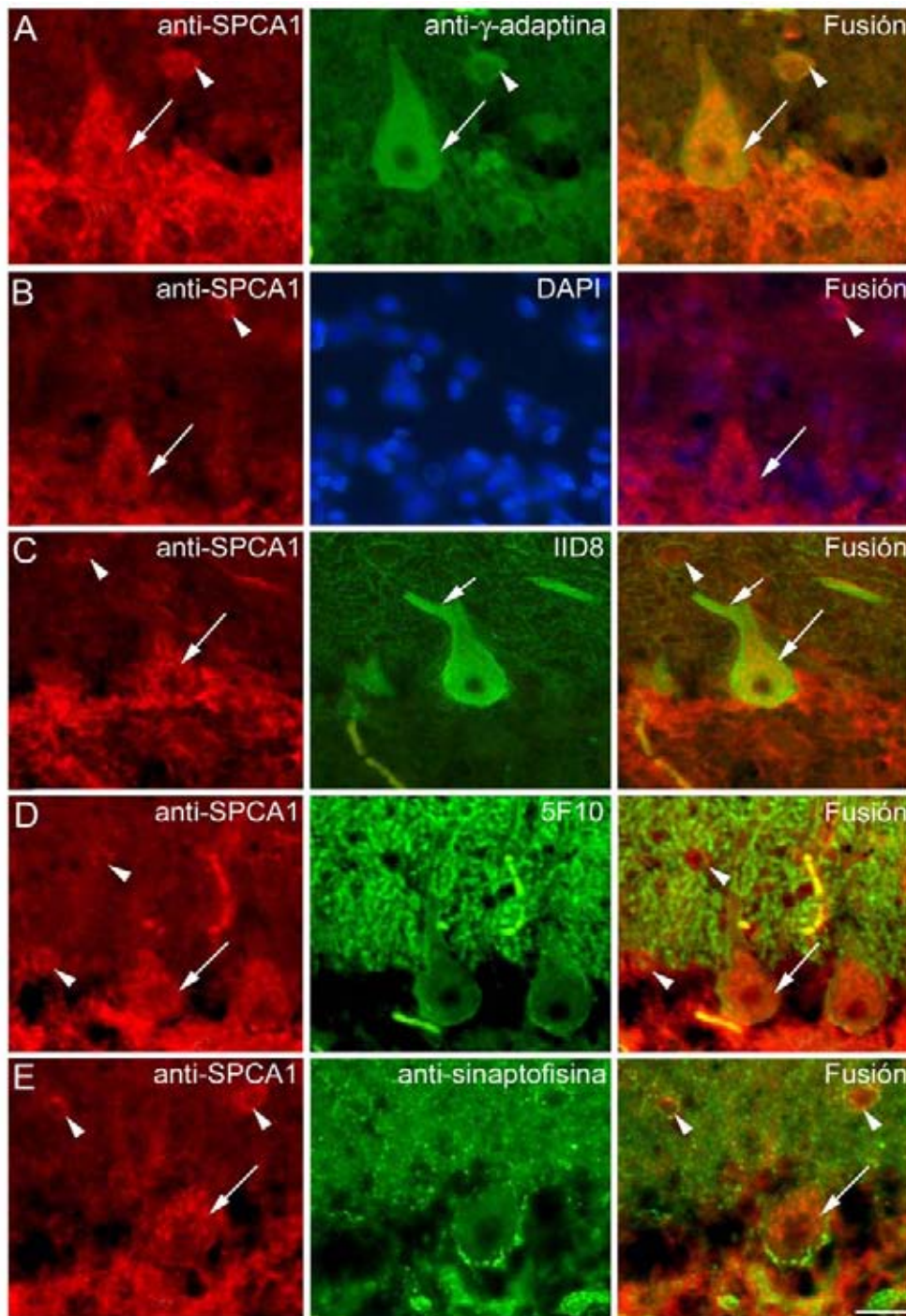


Fig. 72 Doble inmunolocalización de SPCA1 con γ -adaptina, otras bombas de Ca^{2+} y sinaptofisina, en las capas de Purkinje y molecular. El anticuerpo anti-SPCA1 (rojo en A-E, dilución 1/250) reacciona en acúmulos del citoplasma de los somas de las células de Purkinje (flechas largas) y de los cestos (cabezas de flecha). La doble inmunorreacción con anti-SPCA1 (rojo en A) y anti- γ -adaptina (verde en A, dil. 1/200) muestra co-localización de ambas proteínas (Fusión). La tinción de núcleos con DAPI 10 μM (azul en B) permite observar que sólo las células de Purkinje y las interneuronas eran SPCA1 positivas. El anticuerpo anti-SERCA2 IID8 (verde en C, dil. 1/500) marca homogéneamente el citoplasma del soma y la arborización dendrítica (flecha corta) de las células de Purkinje, mostrando co-localización con SPCA1 sólo en el soma (Fusión). El anticuerpo anti-PMCA 5F10 (verde en D, dil. 1/500) reacciona en la periferia del soma y en espinas dendríticas de la arborización de Purkinje, sin co-localizar con SPCA1. El anticuerpo anti-sinaptofisina (verde en E, dil. 1/250) no co-localiza con SPCA1, ni en las células de Purkinje ni de los cestos. Barra de escala: 27 μm .

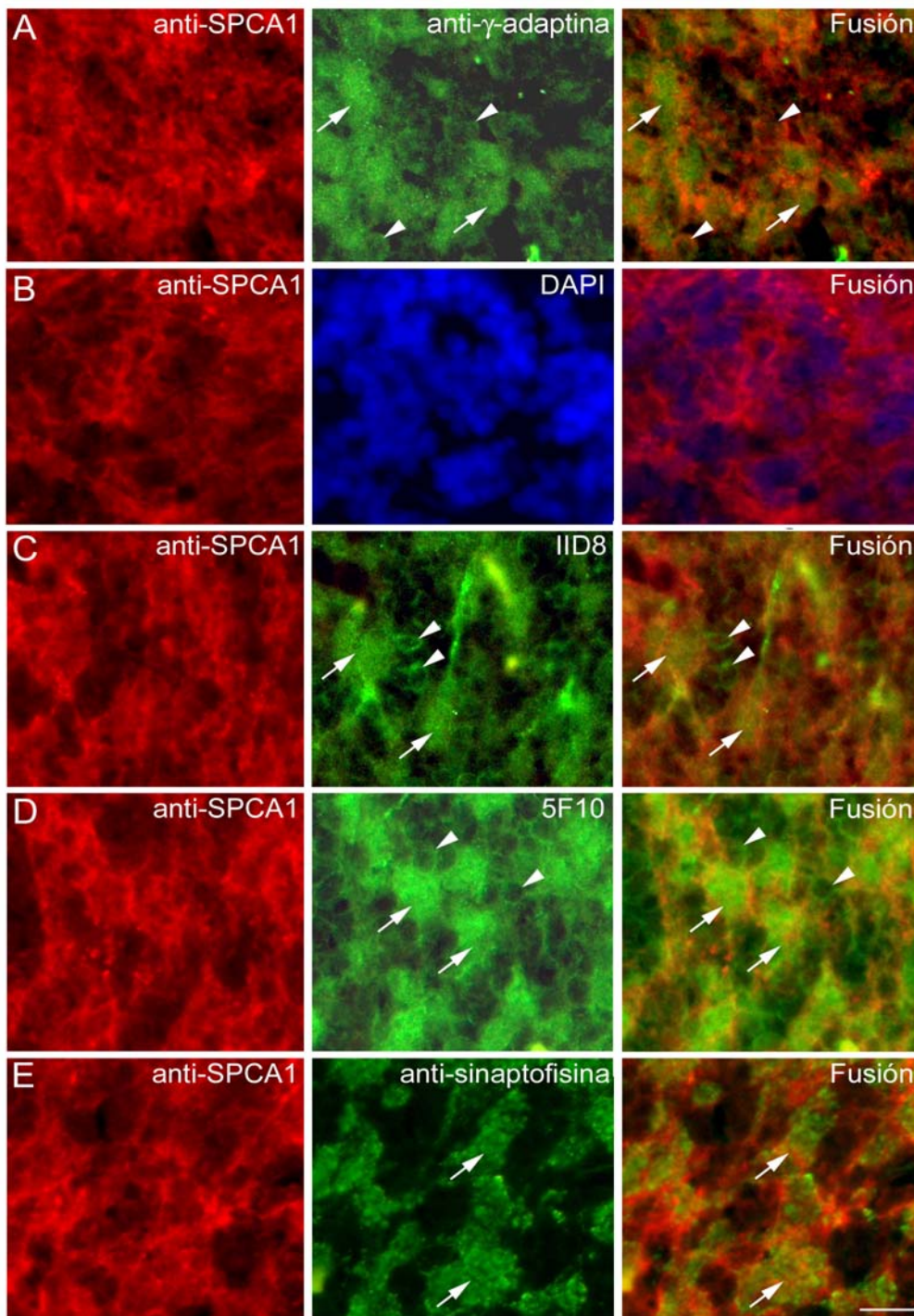


Fig. 73 Doble inmunolocalización de SPCA1 con γ -adaptina, otras bombas de calcio y sinaptofisina en la capa granular. La inmunorreacción de anti-SPCA1 (rojo en A-D, dilución 1/250) se localiza por toda la capa granular. El soma de las células de los granos (cabezas de flecha en A-C) es positivo para anti- γ -adaptina (verde en A, dil. 1/200), IID8 (verde en C, dil. 1/500) y 5F10 (verde en D, dil. 1/500), pero sólo algunas células de los granos marcadas con el anti- γ -adaptina son SPCA1 positivas (cabezas de flecha en fusión de A). Secciones teñidas con DAPI 10 μ M (azul en B) mostrando que no todas las células de los granos son SPCA1 positivas (Fusión en B). Los glomérulos cerebelosos (flechas en A-E) se marcan con los anticuerpos anti- γ -adaptina (A), IID8 (C), 5F10 (D) y anti-sinaptofisina (E, dil. 1/250), mientras que SPCA1 se localiza en algunas áreas dentro y alrededor de los glomérulos (Fusión en A-E). Barra de escala: 10 μ m.

De forma similar, se realizaron ensayos de doble inmunofluorescencia para analizar con mayor precisión la distribución de SPCA1 por toda la capa granular (Fig. 73). Los anticuerpos anti- γ -adaptina, IID8 y 5F10 (Fig. 73A,C yD) marcaron el soma de las células de los granos, pero sólo algunas células granulares marcadas con el marcador de trans-Golgi anti- γ -adaptina fueron SPCA1 positivas. Además, la tinción con DAPI (Fig. 73B) mostró que no todas las células cuyo núcleo se teñía con DAPI eran SPCA1 positivas. Los glomérulos cerebelosos se marcaron claramente con los anticuerpos anti- γ -adaptina, IID8, 5F10 y anti-sinaptofisina (Fig. 73A,C,D y E, respectivamente), indicando la presencia de Golgi, de las bombas de Ca^{2+} SERCA y PMCA, y de sinapsis en estas estructuras. La SPCA1, en cambio, se localizó sólo en algunas áreas de los glomérulos cerebelosos y alrededor de esta estructura (Fusión en Fig. 73A-E).

La Tabla 9 resume la distribución de la SPCA1 en cerebelo de cerdo, así como la del marcador γ -adaptina y los otros tipos de bombas de Ca^{2+} .

		SPCA1	γ -adaptina	SERCA	PMCA
Células de Purkinje	soma	x	x	x	x
	arborización dendrítica			x	x
Interneuronas de la capa molecular	soma	x	x	x	
	arborización dendrítica				
Células de los granos		x	x	x	x
Glomérulos cerebelosos		x	x	x	x

Tabla 9 Resumen de la distribución de SPCA1, γ -adaptina y otras bombas de calcio en la corteza cerebelosa de cerdo.

DISCUSIÓN

Los ensayos de Western blot y las inmunohistoquímicas presentadas en este capítulo muestran por primera vez la distribución de SPCA1 en el cerebelo de cerdo, asociada a tipos neuronales y estructuras específicos.

La identificación de SPCA1 en todas las fracciones subcelulares analizadas por Western blot, indica una distribución subcelular diferencial de esta bomba en neuronas (Fig. 70). De esta forma, su localización en los microsomas estaría relacionada con la presencia de SPCA1 en las membranas de las cisternas del aparato de Golgi. Estudios de inmunolocalización en células en cultivo de tipo epitelial (Van Baelen *et al.*, 2003), de Sertoli y de músculo liso (Wootton *et al.*, 2004), o de tipo neural como las PC12 (Reinhardt *et al.*, 2004), han mostrado una localización subcelular de SPCA1 alrededor del núcleo, consistente con la disposición del aparato de Golgi en estas células. Sin embargo, esta distribución no coincide con la observada en el cerebelo de cerdo, en forma de acúmulos definidos y dispersos por el citoplasma del soma de las células de Purkinje e interneuronas (Figs. 71 y 72), que concretamente se corresponde con su localización en los compartimentos mayores del aparato de Golgi en estas neuronas del cerebelo (Palay y Chan-Palay, 1974). Esta distribución permitiría a la SPCA transportar Ca^{2+} o Mn^{2+} al interior de estos compartimentos, donde el Ca^{2+} es crítico para la regulación del transporte vesicular entre las diferentes cisternas de Golgi (Porat y Elazar, 2000) y donde además se ha sugerido que la SPCA desempeña un papel importante en el plegamiento y la glicosilación de proteínas de secreción (Durr *et al.*, 1998).

La distribución de SPCA1 en los sinaptosomas y MPS estaría relacionada con su presencia en componentes más distales de las vías de secreción. En líneas derivadas de células β pancreáticas de roedores también se ha mostrado una expresión de SPCA1 más distal en las vías de secreción (Mitchell *et al.*, 2004). La inmunorreacción homogénea de la proteína γ -adaptina observada en los somas neuronales de cerebelo, pone de manifiesto la existencia de una gran cantidad de vesículas procedentes del Golgi por todo el citoplasma. Además, la presencia de SPCA1 en los glomérulos cerebelosos (Fig. 73), donde confluyen terminales sinápticas carentes de complejos de cisternas de Golgi, sugiere que la SPCA1 se encuentra en vesículas procedentes del Golgi. Aunque los resultados de las inmunofluorescencias de la capa granular no han permitido asignar una localización concreta a la SPCA1 dentro de los glomérulos, su presencia junto con las otras bombas de

Ca^{2+} SERCA y PMCA sugiere su contribución en la regulación de Ca^{2+} en estas regiones de alta concentración de sinapsis.

La expresión abundante de SPCA1 en el sistema nervioso, mostrada previamente en rata (Wootton *et al.*, 2004) y ahora en cerebelo de cerdo, y su co-localización con otras bombas de Ca^{2+} dentro de estas células, sugiere que SPCA1 actúa como un mecanismo adicional de regulación de Ca^{2+} asociado a requerimientos elevados del ión en áreas específicas del cerebelo. Por otra parte, su papel en el tejido nervioso podría no limitarse sólo a la regulación de los niveles de Ca^{2+} para la transmisión nerviosa. Así, se ha observado que proteínas como convertasas de pro-proteínas (Steiner, 1998) y secretasas (LaFerla, 2002) encontradas en el Golgi o en vesículas de secreción, y que resultan desencadenantes de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, son dependientes de Ca^{2+} , por lo que alteraciones de la regulación del Ca^{2+} en estos compartimentos podrían contribuir al desarrollo de este tipo de enfermedades.

Por otro lado, la función de la SPCA transportando Mn^{2+} es poco conocida. Diversos estudios muestran que altas concentraciones de Mn^{2+} citosólico interfieren con los sitios de unión de Mg^{2+} de muchas proteínas, influyendo en su actividad. Es el caso de la DNA polimerasa I de *Escherichia coli* (Beckman *et al.*, 1985) y de proteínas que unen las membranas de los orgánulos con el citoesqueleto (Towler *et al.*, 2000), en las que el exceso de Mn^{2+} afecta a su correcta funcionalidad. También se ha relacionado con la apoptosis en células PC12 (Hirata, 2002) e incluso con la enfermedad de Parkinson, pues el exceso de Mn^{2+} inhibe la hidroxilación de tirosina, afectando así a la síntesis de dopamina (Hirata *et al.*, 2001). El hecho de que en levaduras la eliminación del Mn^{2+} tóxico del medio se produzca por acción de la Pmr1 (la proteína homóloga de la SPCA), acumulándose el Mn^{2+} en compartimentos de Golgi para después eliminarse por exocitosis de la célula, nos sugiere un importante papel de la SPCA transportando Mn^{2+} en distintos tejidos, incluido el neural, que todavía no ha sido dilucidado.

CONCLUSIONES

Los resultados de esta Tesis Doctoral permiten obtener las siguientes conclusiones:

1. Las Ca^{2+} -ATPasas de retículo sarco(endo)plásmico (SERCA) y de membrana plasmática (PMCA) presentan una diferente distribución subcelular en el cerebelo de cerdo. Su localización conjunta o independiente según el tipo neuronal y área sináptica, podría relacionarlas con requerimientos de Ca^{2+} concretos en específicas regiones celulares.
2. Las proteínas SERCA y PMCA tienen una expresión específica durante el desarrollo del cerebelo de pollo. La SERCA va aumentando su actividad funcional hasta el nacimiento según se incrementa su contenido en proteína. La actividad de la PMCA también aumenta con el desarrollo debido probablemente a la co-expresión con distintos moduladores de esta bomba durante el desarrollo del cerebelo. En cambio, el contenido en proteína PMCA permanece constante durante el desarrollo, debido a cambios en la expresión de sus distintas isoformas.
3. Las bombas de Ca^{2+} SERCA y PMCA presentan diferentes patrones de localización que van ligados a la maduración de neuronas y al establecimiento de conexiones sinápticas en el desarrollo del cerebelo de pollo. Además, la expresión de ambas proteínas en los plexos coroideos sugiere su implicación en los mecanismos de producción y secreción del líquido cefalorraquídeo, con una especial relevancia en estadios tempranos del desarrollo.

4. Las isoformas 1, 2 y 3 de PMCA están presentes en las células de Purkinje en desarrollo de pollo, aunque muestran una diferente distribución regional en la membrana plasmática. Sin embargo, otros tipos neuronales sólo expresan alguna(s) de las isoformas cuando han terminado su maduración. La distinta combinación de isoformas presentes en neuronas inhibitorias y excitatorias, con una específica compartimentación celular, parece sugerir una diferencia funcional en la regulación de Ca^{2+} que repercute en la integración final de la información que sale del cerebelo.
5. Durante el desarrollo postnatal del cerebelo de ratón, se producen cambios importantes para la bomba PMCA en el estadio P12, tanto a nivel funcional como en la expresión de isoformas, que podrían vincularse a la maduración neuronal final del cerebelo.
6. La PMCA4 es la única isoforma de la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática sinaptosomal que se localiza en microdominios lipídicos “*rafts*” en cerebelo de cerdo. Su asociación específica a *rafts* podría estar relacionada con diferencias en su secuencia de aminoácidos respecto a las otras isoformas, a su interacción con proteínas MAGUK a través de dominios PDZ y/o la palmitoilación de residuos de cisteína. La diferente distribución de isoformas en dominios de membrana permite relacionar a la isoforma PMCA4 con una función más específica en la señalización celular u otros procesos moleculares.
7. Hemos identificado un tercer tipo de bomba de calcio, la Ca^{2+} -ATPasa de vías secretoras, y concretamente, la isoforma 1 (SPCA1) en cerebelo de cerdo, mostrando una amplia distribución subcelular asociada al complejo de Golgi. Su localización en el soma y áreas sinápticas de ciertos tipos neuronales implica un mecanismo adicional en la homeostasis de Ca^{2+} al de las otras bombas de Ca^{2+} presentes en el cerebelo.

BIBLIOGRAFÍA

Alvarado-Mallart, R.M. (2000) The chick/quail transplantation model to study central nervous system development. *Prog Brain Res*, **127**, 67-98.

Anderson, J.M. (1996) Cell signalling: MAGUK magic. *Curr Biol*, **6**, 382-384.

Anderson, R.G. (1998) The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem*, **67**, 199-225.

Arni, S., Keilbaugh, S.A., Ostermeyer, A.G. y Brown, D.A. (1998) Association of GAP-43 with detergent-resistant membranes requires two palmitoylated cysteine residues. *J Biol Chem*, **273**, 28478-28485.

Baba-Aissa, F., Raeymaekers, L., Wuytack, F., Callewaert, G., Dode, L., Missiaen, L. y Casteels, R. (1996a) Purkinje neurons express the SERCA3 isoform of the organellar type Ca²⁺-transport ATPase. *Brain Res Mol Brain Res*, **41**, 169-174.

Baba-Aissa, F., Raeymaekers, L., Wuytack, F., De Greef, C., Missiaen, L. y Casteels, R. (1996b) Distribution of the organellar Ca²⁺ transport ATPase SERCA2 isoforms in the cat brain. *Brain Res*, **743**, 141-153.

Baba-Aissa, F., Raeymaekers, L., Wuytack, F., Dode, L. y Casteels, R. (1998) Distribution and isoform diversity of the organellar Ca²⁺ pumps in the brain. *Mol Chem Neuropathol*, **33**, 199-208.

Balbis, A., Baquiran, G., Mounier, C. y Posner, B.I. (2004) Effect of insulin on caveolin-enriched membrane domains in rat liver. *J Biol Chem*, **279**, 39348-39357.

Bavari, S., Bosio, C.M., Wiegand, E., Ruthel, G., Will, A.B., Geisbert, T.W., Hevey, M., Schmaljohn, C., Schmaljohn, A. y Aman, M.J. (2002) Lipid raft microdomains: a gateway for compartmentalized trafficking of Ebola and Marburg viruses. *J Exp Med*, **195**, 593-602.

Beckman, R.A., Mildvan, A.S. y Loeb, L.A. (1985) On the fidelity of DNA replication: manganese mutagenesis in vitro. *Biochemistry*, **24**, 5810-5817.

Berridge, M.J. (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*, **361**, 315-325.

Bertossi, M., Roncali, L., Mancini, L., Ribatti, D. y Nico, B. (1986) Process of differentiation of cerebellar Purkinje neurons in the chick embryo. *Anat Embryol (Berl)*, **175**, 25-34.

Black, B.L., McDonald, J.M. y Jarett, L. (1980) Characterization of Mg²⁺- and (Ca²⁺ + Mg²⁺)-ATPase activity in adipocyte endoplasmic reticulum. *Arch Biochem Biophys*, **199**, 92-102.

Borke, J.L., Caride, A., Verma, A.K., Penniston, J.T. y Kumar, R. (1989) Plasma membrane calcium pump and 28-kDa calcium binding protein in cells of rat kidney distal tubules. *Am J Physiol*, **257**, F842-849.

Borke, J.L., Caride, A., Verma, A.K., Penniston, J.T. & Kumar, R. (1990) Cellular and segmental distribution of Ca²⁺(+)-pump epitopes in rat intestine. *Pflugers Arch*, **417**, 120-122.

Borke, J.L., Caride, A.J., Yaksh, T.L., Penniston, J.T. y Kumar, R. (1989) Cerebrospinal fluid calcium homeostasis: evidence for a plasma membrane Ca²⁺-pump in mammalian choroid plexus. *Brain Res*, **489**, 355-360.

Borke, J.L., Minami, J., Verma, A., Penniston, J.T. y Kumar, R. (1987) Monoclonal antibodies to human erythrocyte membrane Ca⁺⁺-Mg⁺⁺ adenosine triphosphatase pump recognize an epitope in the basolateral membrane of human kidney distal tubule cells. *J Clin Invest*, **80**, 1225-1231.

Borke, J.L., Minami, J., Verma, A.K., Penniston, J.T. y Kumar, R. (1988) Co-localization of erythrocyte Ca⁺⁺-Mg⁺⁺ ATPase and vitamin D-dependent 28-kDa-calcium binding protein. *Kidney Int*, **34**, 262-267.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.

Brandl, C.J., deLeon, S., Martin, D.R. y MacLennan, D.H. (1987) Adult forms of the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum. Expression in developing skeletal muscle. *J Biol Chem*, **262**, 3768-3774.

Brandt, P. y Neve, R.L. (1992) Expression of plasma membrane calcium-pumping ATPase mRNAs in developing rat brain and adult brain subregions: evidence for stage-specific expression. *J Neurochem*, **59**, 1566-1569.

Brandt, P., Neve, R.L., Kammesheidt, A., Rhoads, R.E. y Vanaman, T.C. (1992) Analysis of the tissue-specific distribution of mRNAs encoding the plasma membrane calcium-pumping ATPases and characterization of an alternately spliced form of PMCA4 at the cDNA and genomic levels. *J Biol Chem*, **267**, 4376-4385.

Brouland, J.P., Gelebart, P., Kovacs, T., Enouf, J., Grossmann, J. y Papp, B. (2005) The loss of sarco/endoplasmic reticulum calcium transport ATPase 3 expression is an early event during the multistep process of colon carcinogenesis. *Am J Pathol*, **167**, 233-242.

Brown, D.A. y London, E. (2000) Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem*, **275**, 17221-17224.

Bruckner, K., Pablo Labrador, J., Scheiffle, P., Herb, A., Seeburg, P.H. y Klein, R. (1999) EphrinB ligands recruit GRIP family PDZ adaptor proteins into raft membrane microdomains. *Neuron*, **22**, 511-524.

Burette, A., Rockwood, J.M., Strehler, E.E. y Weinberg, R.J. (2003) Isoform-specific distribution of the plasma membrane Ca²⁺ ATPase in the rat brain. *J Comp Neurol*, **467**, 464-476.

Burk, S.E., Lytton, J., MacLennan, D.H. y Shull, G.E. (1989) cDNA cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of a third organellar Ca²⁺ pump. *J Biol Chem*, **264**, 18561-18568.

Campbell, A.M., Wuytack, F. y Fambrough, D.M. (1993) Differential distribution of the alternative forms of the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase, SERCA2b and SERCA2a, in the avian brain. *Brain Res*, **605**, 67-76.

Carafoli, E. (1994) Biogenesis: plasma membrane calcium ATPase: 15 years of work on the purified enzyme. *Faseb J*, **8**, 993-1002.

Caride, A.J., Filoteo, A.G., Enyedi, A., Verma, A.K. y Penniston, J.T. (1996) Detection of isoform 4 of the plasma membrane calcium pump in human tissues by using isoform-specific monoclonal antibodies. *Biochem J*, **316 (Pt 1)**, 353-359.

Caride, A.J., Penheiter, A.R., Filoteo, A.G., Bajzer, Z., Enyedi, A. y Penniston, J.T. (2001) The plasma membrane calcium pump displays memory of past calcium spikes. Differences between isoforms 2b and 4b. *J Biol Chem*, **276**, 39797-39804.

Caroni, P. y Carafoli, E. (1981) The Ca²⁺-pumping ATPase of heart sarcolemma. Characterization, calmodulin dependence, and partial purification. *J Biol Chem*, **256**, 3263-3270.

Chiesi, M. y Inesi, G. (1979) The use of quench reagents for resolution of single transport cycles in sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, **254**, 10370-10377.

Colyer, J., Mata, A.M., Lee, A.G. y East, J.M. (1989) Effects on ATPase activity of monoclonal antibodies raised against (Ca²⁺ + Mg²⁺)-ATPase from rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum and their correlation with epitope location. *Biochem J*, **262**, 439-447.

de Bilbao, F., Guarin, E., Nef, P., Vallet, P., Giannakopoulos, P. y Dubois-Dauphin, M. (1999) Postnatal distribution of cyp32/caspase 3 mRNA in the mouse central nervous system: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol*, **409**, 339-357.

de Meis, L. (2003) Brown adipose tissue Ca²⁺-ATPase: uncoupled ATP hydrolysis and thermogenic activity. *J Biol Chem*, **278**, 41856-41861.

de Talamoni, N., Smith, C.A., Wasserman, R.H., Beltramino, C., Fullmer, C.S. y Penniston, J.T. (1993) Immunocytochemical localization of the plasma membrane calcium pump, calbindin-D28k, and parvalbumin in Purkinje cells of avian and mammalian cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 11949-11953.

del Monte, F. y Hajjar, R.J. (2003) Targeting calcium cycling proteins in heart failure through gene transfer. *J Physiol*, **546**, 49-61.

DeMarco, S.J. y Strehler, E.E. (2001) Plasma membrane Ca²⁺-atpase isoforms 2b and 4b interact promiscuously and selectively with members of the membrane-associated guanylate kinase family of PDZ (PSD95/Dlg/ZO-1) domain-containing proteins. *J Biol Chem*, **276**, 21594-21600.

Durr, G., Strayle, J., Plemper, R., Elbs, S., Klee, S.K., Catty, P., Wolf, D.H. y Rudolph, H.K. (1998) The medial-Golgi ion pump Pmr1 supplies the yeast secretory pathway with Ca²⁺ and

Mn²⁺ required for glycosylation, sorting, and endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Mol Biol Cell*, **9**, 1149-1162.

Eakin, T.J., Antonelli, M.C., Malchiodi, E.L., Baskin, D.G. y Stahl, W.L. (1995) Localization of the plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoform PMCA3 in rat cerebellum, choroid plexus and hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res*, **29**, 71-80.

East, J.M. y Lee, A.G. (1982) Lipid selectivity of the calcium and magnesium ion dependent adenosinetriphosphatase, studied with fluorescence quenching by a brominated phospholipid. *Biochemistry*, **21**, 4144-4151.

Eggermont, J.A., Wuytack, F., De Jaegere, S., Nelles, L. y Casteels, R. (1989) Evidence for two isoforms of the endoplasmic-reticulum Ca²⁺ pump in pig smooth muscle. *Biochem J*, **260**, 757-761.

el-Husseini Ael, D. y Bredt, D.S. (2002) Protein palmitoylation: a regulator of neuronal development and function. *Nat Rev Neurosci*, **3**, 791-802.

Elwess, N.L., Filoteo, A.G., Enyedi, A. y Penniston, J.T. (1997) Plasma membrane Ca²⁺ pump isoforms 2a and 2b are unusually responsive to calmodulin and Ca²⁺. *J Biol Chem*, **272**, 17981-17986.

Enyedi, A., Verma, A.K., Heim, R., Adamo, H.P., Filoteo, A.G., Strehler, E.E. y Penniston, J.T. (1994) The Ca²⁺ affinity of the plasma membrane Ca²⁺ pump is controlled by alternative splicing. *J Biol Chem*, **269**, 41-43.

Fallon, L., Moreau, F., Croft, B.G., Labib, N., Gu, W.J. y Fon, E.A. (2002) Parkin and CASK/LIN-2 associate via a PDZ-mediated interaction and are co-localized in lipid rafts and postsynaptic densities in brain. *J Biol Chem*, **277**, 486-491.

Feirabend, H.K. (1990) Development of longitudinal patterns in the cerebellum of the chicken (*Gallus domesticus*): a cytoarchitectural study on the genesis of cerebellar modules. *Eur J Morphol*, **28**, 169-223.

Filoteo, A.G., Elwess, N.L., Enyedi, A., Caride, A., Aung, H.H. y Penniston, J.T. (1997) Plasma membrane Ca²⁺ pump in rat brain. Patterns of alternative splices seen by isoform-specific antibodies. *J Biol Chem*, **272**, 23741-23747.

Foggia, L. y Hovnanian, A. (2004) Calcium pump disorders of the skin. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, **131C**, 20-31.

Foster, L.J., De Hoog, C.L. y Mann, M. (2003) Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 5813-5818.

Fragoso, R., Ren, D., Zhang, X., Su, M.W., Burakoff, S.J. y Jin, Y.J. (2003) Lipid raft distribution of CD4 depends on its palmitoylation and association with Lck, and evidence for CD4-induced lipid raft aggregation as an additional mechanism to enhance CD3 signaling. *J Immunol*, **170**, 913-921.

Fresu, L., Dehpour, A., Genazzani, A.A., Carafoli, E. y Guerini, D. (1999) Plasma membrane calcium ATPase isoforms in astrocytes. *Glia*, **28**, 150-155.

Fujimoto, T. (1993) Calcium pump of the plasma membrane is localized in caveolae. *J Cell Biol*, **120**, 1147-1157.

- Gaide, O., Favier, B., Legler, D.F., Bonnet, D., Brissoni, B., Valitutti, S., Bron, C., Tschopp, J. y Thome, M. (2002) CARMA1 is a critical lipid raft-associated regulator of TCR-induced NF-kappa B activation. *Nat Immunol*, **3**, 836-843.
- Garcia, M.L., Murray, K.D., Garcia, V.B., Strehler, E.E. y Isackson, P.J. (1997) Seizure-induced alterations of plasma membrane calcium ATPase isoforms 1, 2 and 3 mRNA and protein in rat hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res*, **45**, 230-238.
- Garrahan, P.J. y Rega, A.F. (1990) Plasma membrana calcium pump. En *Intracellular Calcium Regulation* (Broker, F. ed.) Alan, R. Liss. Nueva York. pp: 271-303.
- Ghosh, A. y Greenberg, M.E. (1995) Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science*, **268**, 239-247.
- Goldberg, M. y Steinberg, S.F. (1996) Tissue-specific developmental regulation of protein kinase C isoforms. *Biochem Pharmacol*, **51**, 1089-1093.
- Goldowitz, D. y Hamre, K. (1998) The cells and molecules that make a cerebellum. *Trends Neurosci*, **21**, 375-382.
- Greeb, J. y Shull, G.E. (1989) Molecular cloning of a third isoform of the calmodulin-sensitive plasma membrane Ca²⁺-transporting ATPase that is expressed predominantly in brain and skeletal muscle. *J Biol Chem*, **264**, 18569-18576.
- Gubitski-Klug, R.A., Mancuso, D.J. y Gross, R.W. (2005) The human Kv1.1 channel is palmitoylated, modulating voltage sensing: Identification of a palmitoylation consensus sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 5964-5968.
- Gunteski-Hamblin, A.M., Clarke, D.M. y Shull, G.E. (1992) Molecular cloning and tissue distribution of alternatively spliced mRNAs encoding possible mammalian homologues of the yeast secretory pathway calcium pump. *Biochemistry*, **31**, 7600-7608.
- Gunteski-Hamblin, A.M., Greeb, J. y Shull, G.E. (1988) A novel Ca²⁺ pump expressed in brain, kidney, and stomach is encoded by an alternative transcript of the slow-twitch muscle sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase gene. Identification of cDNAs encoding Ca²⁺ and other cation-transporting ATPases using an oligonucleotide probe derived from the ATP-binding site. *J Biol Chem*, **263**, 15032-15040.
- Hakim, G., Itano, T., Verma, A.K. y Penniston, J.T. (1982) Purification of the Ca²⁺-and Mg²⁺-requiring ATPase from rat brain synaptic plasma membrane. *Biochem J*, **207**, 225-231.
- Hamburger, V. y Hamilton, H.L. (1951) A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Dev Dyn*, **195**, 231-272.
- Hao, L., Rigaud, J.L. y Inesi, G. (1994) Ca²⁺/H⁺ countertransport and electrogenicity in proteoliposomes containing erythrocyte plasma membrane Ca-ATPase and exogenous lipids. *J Biol Chem*, **269**, 14268-14275.
- Hasselbach, W. (1964) Relaxation and the Sarcotubular Calcium Pump. *Fed Proc*, **23**, 909-912.
- Hering, H., Lin, C.C. y Sheng, M. (2003) Lipid rafts in the maintenance of synapses, dendritic spines, and surface AMPA receptor stability. *J Neurosci*, **23**, 3262-3271.

Hidalgo-Sanchez, M., Millet, S., Bloch-Gallego, E. y Alvarado-Mallart, R.M. (2005) Specification of the meso-isthmo-cerebellar region: the Otx2/Gbx2 boundary. *Brain Res Brain Res Rev*, **49**, 134-149.

Hidalgo-Sanchez, M., Simeone, A. y Alvarado-Mallart, R.M. (1999) Fgf8 and Gbx2 induction concomitant with Otx2 repression is correlated with midbrain-hindbrain fate of caudal prosencephalon. *Development*, **126**, 3191-3203.

Hillman, D.E., Chen, S., Bing, R., Penniston, J.T. y Llinas, R. (1996) Ultrastructural localization of the plasmalemmal calcium pump in cerebellar neurons. *Neuroscience*, **72**, 315-324.

Hirata, Y. (2002) Manganese-induced apoptosis in PC12 cells. *Neurotoxicol Teratol*, **24**, 639-653.

Hu, Z., Bonifas, J.M., Beech, J., Bench, G., Shigihara, T., Ogawa, H., Ikeda, S., Mauro, T. y Epstein, E.H., Jr. (2000) Mutations in ATP2C1, encoding a calcium pump, cause Hailey-Hailey disease. *Nat Genet*, **24**, 61-65.

Hung, A.Y. y Sheng, M. (2002) PDZ domains: structural modules for protein complex assembly. *J Biol Chem*, **277**, 5699-5702.

Inesi, G. (1972) Active transport of calcium ion in sarcoplasmic membranes. *Annu Rev Biophys Bioeng*, **1**, 191-210.

Inesi, G. (1987) Sequential mechanism of calcium binding and translocation in sarcoplasmic reticulum adenosine triphosphatase. *J Biol Chem*, **262**, 16338-16342.

Inesi, G. y de Meis, L. (1989) Regulation of steady state filling in sarcoplasmic reticulum. Roles of back-inhibition, leakage, and slippage of the calcium pump. *J Biol Chem*, **264**, 5929-5936.

Inesi, G. y Sagara, Y. (1994) Specific inhibitors of intracellular Ca²⁺ transport ATPases. *J Membr Biol*, **141**, 1-6.

James, P., Inui, M., Tada, M., Chiesi, M. y Carafoli, E. (1989a) Nature and site of phospholamban regulation of the Ca²⁺ pump of sarcoplasmic reticulum. *Nature*, **342**, 90-92.

James, P.H., Pruschy, M., Vorherr, T.E., Penniston, J.T. y Carafoli, E. (1989b) Primary structure of the cAMP-dependent phosphorylation site of the plasma membrane calcium pump. *Biochemistry*, **28**, 4253-4258.

John, L.M., Lechleiter, J.D. & Camacho, P. (1998) Differential modulation of SERCA2 isoforms by calreticulin. *J Cell Biol*, **142**, 963-973.

Johnson, R.J., Pyun, H.Y., Lytton, J. y Fine, R.E. (1993) Differences in the subcellular localization of calreticulin and organellar Ca(2+)-ATPase in neurons. *Brain Res Mol Brain Res*, **17**, 9-16.

Jones, I., Jacobsen, N., Green, E.K., Elvidge, G.P., Owen, M.J. y Craddock, N. (2002) Evidence for familial cosegregation of major affective disorder and genetic markers flanking the gene for Darier's disease. *Mol Psychiatry*, **7**, 424-427.

Jones, L.R. y Cala, S.E. (1981) Biochemical evidence for functional heterogeneity of cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles. *J Biol Chem*, **256**, 11809-11818.

- Jorgensen, A.O., Arnold, W., Pepper, D.R., Kahl, S.D., Mandel, F. y Campbell, K.P. (1988) A monoclonal antibody to the Ca²⁺-ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum cross-reacts with slow type I but not with fast type II canine skeletal muscle fibers: an immunocytochemical and immunochemical study. *Cell Motil Cytoskeleton*, **9**, 164-174.
- Juhaszova, M., Church, P., Blaustein, M.P. y Stanley, E.F. (2000) Location of calcium transporters at presynaptic terminals. *Eur J Neurosci*, **12**, 839-846.
- Kaprielian, Z., Campbell, A.M. y Fambrough, D.M. (1989) Identification of a Ca²⁺-ATPase in cerebellar Purkinje cells. *Brain Res Mol Brain Res*, **6**, 55-60.
- Kim, E., DeMarco, S.J., Marfatia, S.M., Chishti, A.H., Sheng, M. y Strehler, E.E. (1998) Plasma membrane Ca²⁺ ATPase isoform 4b binds to membrane-associated guanylate kinase (MAGUK) proteins via their PDZ (PSD-95/Dlg/ZO-1) domains. *J Biol Chem*, **273**, 1591-1595.
- Kim, S.K. (1995) Tight junctions, membrane-associated guanylate kinases and cell signaling. *Current Opinion in Cell Biology*, **7**, 641-649.
- Kondoh, G., Tojo, H., Nakatani, Y., Komazawa, N., Murata, C., Yamagata, K., Maeda, Y., Kinoshita, T., Okabe, M., Taguchi, R. y Takeda, J. (2005) Angiotensin-converting enzyme is a GPI-anchored protein releasing factor crucial for fertilization. *Nat Med*, **11**, 160-166.
- Kosk-Kosicka, D. y Bzdega, T. (1988) Activation of the erythrocyte Ca²⁺-ATPase by either self-association or interaction with calmodulin. *J Biol Chem*, **263**, 18184-18189.
- Kozel, P.J., Friedman, R.A., Erway, L.C., Yamoah, E.N., Liu, L.H., Riddle, T., Duffy, J.J., Doetschman, T., Miller, M.L., Cardell, E.L. y Shull, G.E. (1998) Balance and hearing deficits in mice with a null mutation in the gene encoding plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoform 2. *J Biol Chem*, **273**, 18693-18696.
- Kuhar, S.G., Feng, L., Vidan, S., Ross, M.E., Hatten, M.E. y Heintz, N. (1993) Changing patterns of gene expression define four stages of cerebellar granule neuron differentiation. *Development*, **117**, 97-104.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- LaFerla, F.M. (2002) Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*, **3**, 862-872.
- Ledesma, M.D., Simons, K. y Dotti, C.G. (1998) Neuronal polarity: essential role of protein-lipid complexes in axonal sorting. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 3966-3971.
- Lee, A.G. (2002) Ca²⁺ -ATPase structure in the E1 and E2 conformations: mechanism, helix-helix and helix-lipid interactions. *Biochim Biophys Acta*, **1565**, 246-266.
- Lee, A.G. y East, J.M. (2001) What the structure of a calcium pump tells us about its mechanism. *Biochem J*, **356**, 665-683.
- Lee, S.J., Liyanage, U., Bickel, P.E., Xia, W., Lansbury, P.T., Jr. y Kosik, K.S. (1998) A detergent-insoluble membrane compartment contains A beta in vivo. *Nat Med*, **4**, 730-734.

Legname, G., Nelken, P., Guan, Z., Kanyo, Z.F., DeArmond, S.J. y Prusiner, S.B. (2002) Prion and doppel proteins bind to granule cells of the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 16285-16290.

Lehotsky, J. (1995) Plasma membrane Ca(2+)-pump functional specialization in the brain. Complex of isoform expression and regulation by effectors. *Mol Chem Neuropathol*, **25**, 175-187.

Lehotsky, J., Kaplan, P., Murin, R. y Raeymaekers, L. (2002) The role of plasma membrane Ca2+ pumps (PMCA) in pathologies of mammalian cells. *Front Biosci*, **7**, d53-84.

Lin, J.C. y Cepko, C.L. (1998) Granule cell raphes and parasagittal domains of Purkinje cells: complementary patterns in the developing chick cerebellum. *J Neurosci*, **18**, 9342-9353.

Logan-Smith, M.J., Lockyer, P.J., East, J.M. y Lee, A.G. (2001) Curcumin, a molecule that inhibits the Ca2+-ATPase of sarcoplasmic reticulum but increases the rate of accumulation of Ca2+. *J Biol Chem*, **276**, 46905-46911.

Lytton, J. y MacLennan, D.H. (1988) Molecular cloning of cDNAs from human kidney coding for two alternatively spliced products of the cardiac Ca2+-ATPase gene. *J Biol Chem*, **263**, 15024-15031.

Lytton, J., Westlin, M., Burk, S.E., Shull, G.E. y MacLennan, D.H. (1992) Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps. *J Biol Chem*, **267**, 14483-14489.

Ma, L., Huang, Y.Z., Pitcher, G.M., Valtschanoff, J.G., Ma, Y.H., Feng, L.Y., Lu, B., Xiong, W.C., Salter, M.W., Weinberg, R.J. y Mei, L. (2003) Ligand-dependent recruitment of the ErbB4 signaling complex into neuronal lipid rafts. *J Neurosci*, **23**, 3164-3175.

MacLennan, D.H. (1970) Purification and properties of an adenosine triphosphatase from sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, **245**, 4508-4518.

MacLennan, D.H. (1990) Molecular tools to elucidate problems in excitation-contraction coupling. *Biophys J*, **58**, 1355-1365.

MacLennan, D.H., Brandl, C.J., Korczak, B. y Green, N.M. (1985) Amino-acid sequence of a Ca2+ + Mg2+-dependent ATPase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its complementary DNA sequence. *Nature*, **316**, 696-700.

Madore, N., Smith, K.L., Graham, C.H., Jen, A., Brady, K., Hall, S. y Morris, R. (1999) Functionally different GPI proteins are organized in different domains on the neuronal surface. *Embo J*, **18**, 6917-6926.

Mahfoud, R., Garmy, N., Maresca, M., Yahi, N., Puigserver, A. y Fantini, J. (2002) Identification of a common sphingolipid-binding domain in Alzheimer, prion, and HIV-1 proteins. *J Biol Chem*, **277**, 11292-11296.

Manukian, K.H. y Kirakosian, L.G. (1985) Proteolipids in developing rat brain. *Neurochem Res*, **10**, 1533-1545.

Martinez, S. y Alvarado-Mallart, R.M. (1989) Rostral Cerebellum Originates from the Caudal Portion of the So-Called 'Mesencephalic' Vesicle: A Study Using Chick/Quail Chimeras. *Eur J Neurosci*, **1**, 549-560.

Martone, M.E., Zhang, Y., Simpliciano, V.M., Carragher, B.O. y Ellisman, M.H. (1993) Three-dimensional visualization of the smooth endoplasmic reticulum in Purkinje cell dendrites. *J Neurosci*, **13**, 4636-4646.

Mata, A.M., Lee, A.G. y East, J.M. (1989) Probing the nucleotide-binding site of sarcoplasmic reticulum (Ca²⁺-Mg²⁺)-ATPase with anti-fluorescein antibodies. *FEBS Lett*, **253**, 273-275.

Mata, A.M., Matthews, I., Tunwell, R.E., Sharma, R.P., Lee, A.G. y East, J.M. (1992) Definition of surface-exposed and trans-membranous regions of the (Ca²⁺)-Mg²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum using anti-peptide antibodies. *Biochem J*, **286 (Pt 2)**, 567-580.

Mata, A.M., Stefanova, H.I., Gore, M.G., Khan, Y.M., East, J.M. y Lee, A.G. (1993) Localization of Cys-344 on the (Ca²⁺)-Mg²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum using resonance energy transfer. *Biochim Biophys Acta*, **1147**, 6-12.

Mattson, M.P., LaFerla, F.M., Chan, S.L., Leissring, M.A., Shepel, P.N. y Geiger, J.D. (2000) Calcium signaling in the ER: its role in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci*, **23**, 222-229.

Michaelis, M.L. (1994) Ion transport systems and Ca²⁺ regulation in aging neurons. *Ann N Y Acad Sci*, **747**, 407-418.

Michelangeli, F., Di Virgilio, F., Villa, A., Podini, P., Meldolesi, J. y Pozzan, T. (1991) Identification, kinetic properties and intracellular localization of the (Ca²⁺)-Mg²⁺-ATPase from the intracellular stores of chicken cerebellum. *Biochem J*, **275 (Pt 3)**, 555-561.

Migala, A., Agostini, B. y Hasselbach, W. (1973) Tryptic fragmentation of the calcium transport system in the sarcoplasmic reticulum. *Z Naturforsch [C]*, **28**, 178-182.

Millen, K.J., Hui, C.C. y Joyner, A.L. (1995) A role for En-2 and other murine homologues of Drosophila segment polarity genes in regulating positional information in the developing cerebellum. *Development*, **121**, 3935-3945.

Miller, K.K., Verma, A., Snyder, S.H. y Ross, C.A. (1991) Localization of an endoplasmic reticulum calcium ATPase mRNA in rat brain by in situ hybridization. *Neuroscience*, **43**, 1-9.

Missiaen, L., Raeymaekers, L., Wuytack, F., Vrolix, M., de Smedt, H. y Casteels, R. (1989) Phospholipid-protein interactions of the plasma-membrane Ca²⁺-transporting ATPase. Evidence for a tissue-dependent functional difference. *Biochem J*, **263**, 687-694.

Missiaen, L., Van Acker, K., Parys, J.B., De Smedt, H., Van Baelen, K., Weidema, A.F., Vanoevelen, J., Raeymaekers, L., Renders, J., Callewaert, G., Rizzuto, R. y Wuytack, F. (2001) Baseline cytosolic Ca²⁺ oscillations derived from a non-endoplasmic reticulum Ca²⁺ store. *J Biol Chem*, **276**, 39161-39170.

Missiaen, L., Vanoevelen, J., Parys, J.B., Raeymaekers, L., De Smedt, H., Callewaert, G., Erneux, C. y Wuytack, F. (2002a) Ca²⁺ uptake and release properties of a thapsigargin-insensitive nonmitochondrial Ca²⁺ store in A7r5 and 16HBE14o- cells. *J Biol Chem*, **277**, 6898-6902.

Missiaen, L., Vanoevelen, J., Van Acker, K., Raeymaekers, L., Parys, J.B., Callewaert, G., Wuytack, F. y De Smedt, H. (2002b) Ca²⁺ signals in Pmr1-GFP-expressing COS-1 cells with functional endoplasmic reticulum. *Biochem Biophys Res Commun*, **294**, 249-253.

Mitchell, K.J., Tsuboi, T. y Rutter, G.A. (2004) Role for plasma membrane-related Ca²⁺-ATPase-1 (ATP2C1) in pancreatic beta-cell Ca²⁺ homeostasis revealed by RNA silencing. *Diabetes*, **53**, 393-400.

Miura, Y., Hanada, K. y Jones, T.L. (2001) G(s) signaling is intact after disruption of lipid rafts. *Biochemistry*, **40**, 15418-15423.

Molander-Melin, M., Blennow, K., Bogdanovic, N., Dellheden, B., Mansson, J.E. y Fredman, P. (2005) Structural membrane alterations in Alzheimer brains found to be associated with regional disease development; increased density of gangliosides GM1 and GM2 and loss of cholesterol in detergent-resistant membrane domains. *J Neurochem*, **92**, 171-182.

Murphy, V.A., Smith, Q.R. y Rapoport, S.I. (1989) Uptake and concentrations of calcium in rat choroid plexus during chronic hypo- and hypercalcemia. *Brain Res*, **484**, 65-70.

Naslavsky, N., Stein, R., Yanai, A., Friedlander, G. y Taraboulos, A. (1997) Characterization of detergent-insoluble complexes containing the cellular prion protein and its scrapie isoform. *J Biol Chem*, **272**, 6324-6331.

Nicholls, J.G., Martin, A.R. y Wallace, B.G. (1992). Neuronal development and the formation of synaptic connections. In: From neuron to brain: a cellular and molecular approach to the function of the nervous system. Sunderland: Sinauer Associates, Inc. pp. 339-387.

Niggli, V., Penniston, J.T. & Carafoli, E. (1979) Purification of the (Ca²⁺-Mg²⁺)-ATPase from human erythrocyte membranes using a calmodulin affinity column. *J Biol Chem*, **254**, 9955-9958.

Niggli, V., Sigel, E. y Carafoli, E. (1982) The purified Ca²⁺ pump of human erythrocyte membranes catalyzes an electroneutral Ca²⁺-H⁺ exchange in reconstituted liposomal systems. *J Biol Chem*, **257**, 2350-2356.

Oda, K. (1992) Calcium depletion blocks proteolytic cleavages of plasma protein precursors which occur at the Golgi and/or trans-Golgi network. Possible involvement of Ca(2+)-dependent Golgi endoproteases. *J Biol Chem*, **267**, 17465-17471.

Odermatt, A., Becker, S., Khanna, V.K., Kurzydowski, K., Leisner, E., Pette, D. y MacLennan, D.H. (1998) Sarcoplipin regulates the activity of SERCA1, the fast-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *J Biol Chem*, **273**, 12360-12369.

Odermatt, A., Taschner, P.E., Khanna, V.K., Busch, H.F., Karpati, G., Jablecki, C.K., Breuning, M.H. y MacLennan, D.H. (1996) Mutations in the gene-encoding SERCA1, the fast-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase, are associated with Brody disease. *Nat Genet*, **14**, 191-194.

Okunade, G.W., Miller, M.L., Pyne, G.J., Sutliff, R.L., O'Connor, K.T., Neumann, J.C., Andringa, A., Miller, D.A., Prasad, V., Doetschman, T., Paul, R.J. y Shull, G.E. (2004) Targeted ablation of plasma membrane Ca²⁺-ATPase (PMCA) 1 and 4 indicates a major housekeeping function for PMCA1 and a critical role in hyperactivated sperm motility and male fertility for PMCA4. *J Biol Chem*, **279**, 33742-33750.

Ono, A. y Freed, E.O. (2001) Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 13925-13930.

Ozog, A., Pouzet, B., Bobe, R. y Lompre, A.M. (1998) Characterization of the 3' end of the mouse SERCA 3 gene and tissue distribution of mRNA spliced variants. *FEBS Lett*, **427**, 349-352.

Padanyi, R., Paszty, K., Penheiter, A.R., Filoteo, A.G., Penniston, J.T. y Enyedi, A. (2003) Intramolecular interactions of the regulatory region with the catalytic core in the plasma membrane calcium pump. *J Biol Chem*, **278**, 35798-35804.

Palacios, J., Sepúlveda, M.R., Lee, A.G. y Mata, A.M. (2004) Ca²⁺ transport by the synaptosomal plasma membrane Ca²⁺-ATPase and the effect of thioridazine. *Biochemistry*, **43**, 2353-2358.

Palacios, J., Sepúlveda, M.R., Salvador, J.M. y Mata, A.M. (2003) Effect of spermine on the activity of synaptosomal plasma membrane Ca(2+)-ATPase reconstituted in neutral or acidic phospholipids. *Biochim Biophys Acta*, 1611, 197-203.

Palay, S.L. y Chan-Palay, V. (1974) Cerebellar cortex. Cytology and organization. Springer-Verlag. Berlín.

Pang, Y., Zhu, H., Wu, P. y Chen, J. (2005) The characterization of plasma membrane Ca²⁺-ATPase in rich sphingomyelin-cholesterol domains. *FEBS Lett*, **579**, 2397-2403.

Papp, B., Brouland, J.P., Gelebart, P., Kovacs, T. y Chomienne, C. (2004) Endoplasmic reticulum calcium transport ATPase expression during differentiation of colon cancer and leukaemia cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **322**, 1223-1236.

Papanikolaou, A., Papafotika, A., Murphy, C., Papamarcaki, T., Tsolas, O., Drab, M., Kurzchalia, T.V., Kasper, M. y Christoforidis, S. (2005) Cholesterol-dependent lipid assemblies regulate the activity of the ecto-nucleotidase CD39. *J Biol Chem*, **280**, 26406-26414.

Papp, B., Enyedi, A., Paszty, K., Kovacs, T., Sarkadi, B., Gardos, G., Magnier, C., Wuytack, F. y Enouf, J. (1992) Simultaneous presence of two distinct endoplasmic-reticulum-type calcium-pump isoforms in human cells. Characterization by radio-immunoblotting and inhibition by 2,5-di-(t-butyl)-1,4-benzohydroquinone. *Biochem J*, **288 (Pt 1)**, 297-302.

Parkin, E.T., Hussain, I., Karran, E.H., Turner, A.J. y Hooper, N.M. (1999) Characterization of detergent-insoluble complexes containing the familial Alzheimer's disease-associated presenilins. *J Neurochem*, **72**, 1534-1543.

Perez, A.S. y Bredt, D.S. (1998) The N-terminal PDZ-containing region of postsynaptic density-95 mediates association with caveolar-like lipid domains. *Neurosci Lett*, **258**, 121-123.

Petrie, R.J., Schnetkamp, P.P., Patel, K.D., Awasthi-Kalia, M. y Deans, J.P. (2000) Transient translocation of the B cell receptor and Src homology 2 domain-containing inositol phosphatase to lipid rafts: evidence toward a role in calcium regulation. *J Immunol*, **165**, 1220-1227.

Pike, L.J. (2003) Lipid rafts: bringing order to chaos. *J Lipid Res*, **44**, 655-667.

Plessers, L., Eggermont, J.A., Wuytack, F. y Casteels, R. (1991) A study of the organellar Ca²⁺-transport ATPase isozymes in pig cerebellar Purkinje neurons. *J Neurosci*, **11**, 650-656.

Poch, E., Leach, S., Snape, S., Cacic, T., MacLennan, D.H. y Lytton, J. (1998) Functional characterization of alternatively spliced human SERCA3 transcripts. *Am J Physiol*, **275**, C1449-1458.

Porat, A. y Elazar, Z. (2000) Regulation of intra-Golgi membrane transport by calcium. *J Biol Chem*, **275**, 29233-29237.

Pourquie, O., Hallonet, M.E. y Le Douarin, N.M. (1992) Association of BEN glycoprotein expression with climbing fiber axonogenesis in the avian cerebellum. *J Neurosci*, **12**, 1548-1557.

Radeva, G. y Sharom, F.J. (2004) Isolation and characterization of lipid rafts with different properties from RBL-2H3 (rat basophilic leukaemia) cells. *Biochem J*, **380**, 219-230.

Rainteau, D.P., Weinman, S.J., Kabaktchis, C.A., Smith, V.L., Kaetzel, M.A., Dedman, J.R. y Weinman, J.S. (1988) The expression of the 35- and 67-kDa calcimedins is dependent on thyroid hormone. *J Biol Chem*, **263**, 12844-12848.

Ramón y Cajal, S. (1904) Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados. Tomo II. Capítulos XVI y XVII, pp: 307-372.

Reinhardt, T.A., Horst, R.L. y Waters, W.R. (2004) Characterization of Cos-7 cells overexpressing the rat secretory pathway Ca²⁺-ATPase. *Am J Physiol Cell Physiol*, **286**, C164-169.

Rintoul, D.A., Creed, R.D. y Conrad, G.W. (1984) Changes in chick corneal lipids during development. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **25**, 1151-1155.

Roderick, H.L., Lechleiter, J.D. y Camacho, P. (2000) Cytosolic phosphorylation of calnexin controls intracellular Ca²⁺ oscillations via an interaction with SERCA2b. *J Cell Biol*, **149**, 1235-1248.

Rudolph, H.K., Antebi, A., Fink, G.R., Buckley, C.M., Dorman, T.E., LeVitre, J., Davidow, L.S., Mao, J.I. y Moir, D.T. (1989) The yeast secretory pathway is perturbed by mutations in PMR1, a member of a Ca²⁺ ATPase family. *Cell*, **58**, 133-145.

Sabatini, B.L., Maravall, M. y Svoboda, K. (2001) Ca²⁺ signaling in dendritic spines. *Curr Opin Neurobiol*, **11**, 349-356.

Sagara, Y., Fernandez-Belda, F., de Meis, L. y Inesi, G. (1992) Characterization of the inhibition of intracellular Ca²⁺ transport ATPases by thapsigargin. *J Biol Chem*, **267**, 12606-12613.

Sagara, Y. y Inesi, G. (1991) Inhibition of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ transport ATPase by thapsigargin at subnanomolar concentrations. *J Biol Chem*, **266**, 13503-13506.

Sakuntabhai, A., Ruiz-Perez, V., Carter, S., Jacobsen, N., Burge, S., Monk, S., Smith, M., Munro, C.S., O'Donovan, M., Craddock, N., Kucherlapati, R., Rees, J.L., Owen, M., Lathrop, G.M., Monaco, A.P., Strachan, T. y Hovnanian, A. (1999) Mutations in ATP2A2, encoding a Ca²⁺ pump, cause Darier disease. *Nat Genet*, **21**, 271-277.

Salvador, J.M., Berengena, M., Sepúlveda, M.R. y Mata, A.M. (2001) Distribution of the intracellular Ca²⁺-ATPase isoform 2b in pig brain subcellular fractions and cross-reaction with a monoclonal antibody raised against the enzyme isoform. *J Biochem (Tokyo)*, **129**, 621-626.

Salvador, J.M., Inesi, G., Rigaud, J.L. y Mata, A.M. (1998) Ca²⁺ transport by reconstituted synaptosomal ATPase is associated with H⁺ countertransport and net charge displacement. *J Biol Chem*, **273**, 18230-18234.

Salvador, J.M. y Mata, A.M. (1996) Purification of the synaptosomal plasma membrane (Ca²⁺ + Mg²⁺)-ATPase from pig brain. *Biochem J*, **315 (Pt 1)**, 183-187.

Salvador, J.M. y Mata, A.M. (1998) Characterization of the intracellular and the plasma membrane Ca²⁺-ATPases in fractionated pig brain membranes using calcium pump inhibitors. *Arch Biochem Biophys*, **351**, 272-278.

Schatzmann, H.J. (1966) ATP-dependent Ca⁺⁺-extrusion from human red cells. *Experientia*, **22**, 364-365.

Scheiffele, P., Roth, M.G. y Simons, K. (1997) Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid-cholesterol membrane domains via its transmembrane domain. *Embo J*, **16**, 5501-5508.

Schmidt, M., Enthoven, L., van der Mark, M., Levine, S., de Kloet, E.R. y Oitzl, M.S. (2003) The postnatal development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the mouse. *Int J Dev Neurosci*, **21**, 125-132.

Schnitzer, J.E., Oh, P., Jacobson, B.S. y Dvorak, A.M. (1995) Caveolae from luminal plasmalemma of rat lung endothelium: microdomains enriched in caveolin, Ca(2+)-ATPase, and inositol trisphosphate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 1759-1763.

Schuh, K., Cartwright, E.J., Jankevics, E., Bundschu, K., Liebermann, J., Williams, J.C., Armesilla, A.L., Emerson, M., Oceandy, D., Knobloch, K.P. y Neyses, L. (2004) Plasma membrane Ca²⁺ ATPase 4 is required for sperm motility and male fertility. *J Biol Chem*, **279**, 28220-28226.

Seifert, G., Zhou, M. y Steinhauser, C. (1997) Analysis of AMPA receptor properties during postnatal development of mouse hippocampal astrocytes. *J Neurophysiol*, **78**, 2916-2923.

Sepúlveda, M.R. y Mata, A.M. (2004) The interaction of ethanol with reconstituted synaptosomal plasma membrane Ca²⁺ -ATPase. *Biochim Biophys Acta*, **1665**, 75-80.

Sharp, A.H., McPherson, P.S., Dawson, T.M., Aoki, C., Campbell, K.P. y Snyder, S.H. (1993) Differential immunohistochemical localization of inositol 1,4,5-trisphosphate- and ryanodine-sensitive Ca²⁺ release channels in rat brain. *J Neurosci*, **13**, 3051-3063.

Shull, G.E. (2000) Gene knockout studies of Ca²⁺-transporting ATPases. *Eur J Biochem*, **267**, 5284-5290.

Shull, G.E. y Greeb, J. (1988) Molecular cloning of two isoforms of the plasma membrane Ca²⁺-transporting ATPase from rat brain. Structural and functional domains exhibit similarity to Na⁺,K⁺- and other cation transport ATPases. *J Biol Chem*, **263**, 8646-8657.

Simons, K. y Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature*, **387**, 569-572.

Simons, K. y Toomre, D. (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **1**, 31-39.

Simpson, P.B., Challiss, R.A. y Nahorski, S.R. (1995) Neuronal Ca²⁺ stores: activation and function. *Trends Neurosci*, **18**, 299-306.

Singer, S.J. y Nicolson, G.L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, **175**, 720-731.

Sorin, A., Rosas, G. y Rao, R. (1997) PMR1, a Ca²⁺-ATPase in yeast Golgi, has properties distinct from sarco/endoplasmic reticulum and plasma membrane calcium pumps. *J Biol Chem*, **272**, 9895-9901.

Sotelo, C. (2004) Cellular and genetic regulation of the development of the cerebellar system. *Prog Neurobiol*, **72**, 295-339.

Sowa, G., Pypaert, M. y Sessa, W.C. (2001) Distinction between signaling mechanisms in lipid rafts vs. caveolae. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 14072-14077.

Squier, T.C. y Bigelow, D.J. (2000) Protein oxidation and age-dependent alterations in calcium homeostasis. *Front Biosci*, **5**, D504-526.

Stahl, W.L., Eakin, T.J., Owens, J.W., Jr., Breining, J.F., Filuk, P.E. y Anderson, W.R. (1992) Plasma membrane Ca(2+)-ATPase isoforms: distribution of mRNAs in rat brain by in situ hybridization. *Brain Res Mol Brain Res*, **16**, 223-231.

Stauffer, T.P., Guerini, D., Celio, M.R. y Carafoli, E. (1997) Immunolocalization of the plasma membrane Ca²⁺ pump isoforms in the rat brain. *Brain Res*, **748**, 21-29.

Stauffer, T.P., Hilfiker, H., Carafoli, E. y Strehler, E.E. (1993) Quantitative analysis of alternative splicing options of human plasma membrane calcium pump genes. *J Biol Chem*, **268**, 25993-26003.

Stefanova, H.I., Mata, A.M., East, J.M., Gore, M.G. y Lee, A.G. (1993) Reactivity of lysyl residues on the (Ca(2+)-Mg(2+)-ATPase to 7-amino-4-methylcoumarin-3-acetic acid succinimidyl ester. *Biochemistry*, **32**, 356-362.

Stefanova, H.I., Mata, A.M., Gore, M.G., East, J.M. y Lee, A.G. (1993) Labeling the (Ca(2+)-Mg(2+)-ATPase of sarcoplasmic reticulum at Glu-439 with 5-(bromomethyl)fluorescein. *Biochemistry*, **32**, 6095-6103.

Steiner, D.F. (1998) The proprotein convertases. *Curr Opin Chem Biol*, **2**, 31-39.

Strehler, E.E., James, P., Fischer, R., Heim, R., Vorherr, T., Filoteo, A.G., Penniston, J.T. y Carafoli, E. (1990) Peptide sequence analysis and molecular cloning reveal two calcium pump isoforms in the human erythrocyte membrane. *J Biol Chem*, **265**, 2835-2842.

Strehler, E.E. y Treiman, M. (2004) Calcium pumps of plasma membrane and cell interior. *Curr Mol Med*, **4**, 323-335.

Strehler, E.E. y Zacharias, D.A. (2001) Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps. *Physiol Rev*, **81**, 21-50.

Strid, H. y Powell, T.L. (2000) ATP-dependent Ca²⁺ transport is up-regulated during third trimester in human syncytiotrophoblast basal membranes. *Pediatr Res*, **48**, 58-63.

Szasz, I., Sarkadi, B., Schubert, A. y Gardos, G. (1978) Effects of lanthanum on calcium-dependent phenomena in human red cells. *Biochim Biophys Acta*, **512**, 331-340.

Takahashi, K. y Kitamura, K. (1999) A point mutation in a plasma membrane Ca(2+)-ATPase gene causes deafness in Wriggle Mouse Sagami. *Biochem Biophys Res Commun*, **261**, 773-778.

Taraboulos, A., Scott, M., Semenov, A., Avrahami, D., Laszlo, L. y Prusiner, S.B. (1995) Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform. *J Cell Biol*, **129**, 121-132.

Towler, M.C., Prescott, A.R., James, J., Lucocq, J.M. y Ponnambalam, S. (2000) The manganese cation disrupts membrane dynamics along the secretory pathway. *Exp Cell Res*, **259**, 167-179.

Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H. y Ogawa, H. (2000) Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature*, **405**, 647-655.

Toyoshima, C., Nomura, H. y Sugita, Y. (2003) Crystal structures of Ca²⁺-ATPase in various physiological states. *Ann N Y Acad Sci*, **986**, 1-8.

Ueno, T., Kameyama, K., Hirata, M., Ogawa, M., Hatsuse, H., Takagaki, Y., Ohmura, M., Osawa, N. y Kudo, Y. (2002) A mouse with a point mutation in plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoform 2 gene showed the reduced Ca²⁺ influx in cerebellar neurons. *Neurosci Res*, **42**, 287-297.

Vaage, S. (1969) The segmentation of the primitive neural tube in chick embryos (*Gallus domesticus*). A morphological, histochemical and autoradiographical investigation. *Ergeb Anat Entwicklungsgesch*, **41**, 3-87.

Van Baelen, K., Dode, L., Vanoevelen, J., Callewaert, G., De Smedt, H., Missiaen, L., Parys, J.B., Raeymaekers, L. y Wuytack, F. (2004) The Ca²⁺/Mn²⁺ pumps in the Golgi apparatus. *Biochim Biophys Acta*, **1742**, 103-112.

Van Baelen, K., Vanoevelen, J., Callewaert, G., Parys, J.B., De Smedt, H., Raeymaekers, L., Rizzuto, R., Missiaen, L. y Wuytack, F. (2003) The contribution of the SPCA1 Ca²⁺ pump to the Ca²⁺ accumulation in the Golgi apparatus of HeLa cells assessed via RNA-mediated interference. *Biochem Biophys Res Commun*, **306**, 430-436.

Van Baelen, K., Vanoevelen, J., Missiaen, L., Raeymaekers, L. y Wuytack, F. (2001) The Golgi PMR1 P-type ATPase of *Caenorhabditis elegans*. Identification of the gene and demonstration of calcium and manganese transport. *J Biol Chem*, **276**, 10683-10691.

Vanoevelen, J., Dode, L., Van Baelen, K., Fairclough, R.J., Missiaen, L., Raeymaekers, L. y Wuytack, F. (2005) The secretory pathway Ca²⁺/Mn²⁺-ATPase 2 is a Golgi-localized pump with high affinity for Ca²⁺ ions. *J Biol Chem*, **280**, 22800-22808.

Varadi, A., Lebel, L., Hashim, Y., Mehta, Z., Ashcroft, S.J. y Turner, R. (1999) Sequence variants of the sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-transport ATPase 3 gene (SERCA3) in Caucasian type II diabetic patients (UK Prospective Diabetes Study 48). *Diabetologia*, **42**, 1240-1243.

Verboomen, H., Wuytack, F., Van den Bosch, L., Mertens, L. y Casteels, R. (1994) The functional importance of the extreme C-terminal tail in the gene 2 organellar Ca²⁺-transport ATPase (SERCA2a/b). *Biochem J*, **303 (Pt 3)**, 979-984.

Verma, A.K., Filoteo, A.G., Stanford, D.R., Wieben, E.D., Penniston, J.T., Strehler, E.E., Fischer, R., Heim, R., Vogel, G., Mathews, S. y et al. (1988) Complete primary structure of a human plasma membrane Ca²⁺ pump. *J Biol Chem*, **263**, 14152-14159.

Vey, M., Pilkuhn, S., Wille, H., Nixon, R., DeArmond, S.J., Smart, E.J., Anderson, R.G., Taraboulos, A. y Prusiner, S.B. (1996) Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 14945-14949.

Wei, Y., Chen, J., Rosas, G., Tompkins, D.A., Holt, P.A. y Rao, R. (2000) Phenotypic screening of mutations in Pmr1, the yeast secretory pathway $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -ATPase, reveals residues critical for ion selectivity and transport. *J Biol Chem*, **275**, 23927-23932.

Weinman, J., Della Gaspera, B., Dautigny, A., Pham Dinh, D., Wang, J., Nojima, H. y Weinman, S. (1991) Developmental regulation of calmodulin gene expression in rat brain and skeletal muscle. *Cell Regul*, **2**, 819-826.

Wolf-Heidegger, G. (1984) Atlas de Anatomía Humana. 1ª ed. Reimpr. Vol. 3. Salvat Editores, S.A. Barcelona.

Wong, R.O. & Ghosh, A. (2002) Activity-dependent regulation of dendritic growth and patterning. *Nat Rev Neurosci*, **3**, 803-812.

Wootton, L.L., Argent, C.C., Wheatley, M. y Michelangeli, F. (2004) The expression, activity and localisation of the secretory pathway Ca^{2+} -ATPase (SPCA1) in different mammalian tissues. *Biochim Biophys Acta*, **1664**, 189-197.

Wu, K.D., Lee, W.S., Wey, J., Bungard, D. y Lytton, J. (1995) Localization and quantification of endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase isoform transcripts. *Am J Physiol*, **269**, C775-784.

Wuytack, F. y Raeymaekers, L. (1992) The Ca^{2+} -transport ATPases from the plasma membrane. *J Bioenerg Biomembr*, **24**, 285-300.

Wuytack, F., Raeymaekers, L. y Missiaen, L. (2002) Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps. *Cell Calcium*, **32**, 279-305.

Yu, X., Carroll, S., Rigaud, J.L. y Inesi, G. (1993) H^{+} countertransport and electrogenicity of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} pump in reconstituted proteoliposomes. *Biophys J*, **64**, 1232-1242.

Zacharias, D.A., Dalrymple, S.J. y Strehler, E.E. (1995) Transcript distribution of plasma membrane Ca^{2+} pump isoforms and splice variants in the human brain. *Brain Res Mol Brain Res*, **28**, 263-272.

Zacharias, D.A., DeMarco, S.J. y Strehler, E.E. (1997) mRNA expression of the four isoforms of the human plasma membrane Ca^{2+} -ATPase in the human hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res*, **45**, 173-176.

Zacharias, D.A. y Kappen, C. (1999) Developmental expression of the four plasma membrane calcium ATPase (Pmca) genes in the mouse. *Biochim Biophys Acta*, **1428**, 397-405.

Zacharias, D.A. y Strehler, E.E. (1996) Change in plasma membrane Ca^{2+} -ATPase splice-variant expression in response to a rise in intracellular Ca^{2+} . *Curr Biol*, **6**, 1642-1652.

Zajchowski, L.D. y Robbins, S.M. (2002) Lipid rafts and little caves. Compartmentalized signalling in membrane microdomains. *Eur J Biochem*, **269**, 737-752.

Zhang, W., Tribble, R.P. y Samelson, L.E. (1998) LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation. *Immunity*, **9**, 239-246.

Zhao, Y., Fan, X., Yang, F. y Zhang, X. (2004) Gangliosides modulate the activity of the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase from porcine brain synaptosomes. *Arch Biochem Biophys*, **427**, 204-212.

Zlatkis, A., Zak, B. y Boyle, A.J. (1953) A new method for the direct determination of serum cholesterol. *J Lab Clin Med*, **41**, 486-492.

Zurini, M., Krebs, J., Penniston, J.T. y Carafoli, E. (1984) Controlled proteolysis of the purified Ca²⁺-ATPase of the erythrocyte membrane. A correlation between the structure and the function of the enzyme. *J Biol Chem*, **259**, 618-627.

Zylinska, L., Guerini, D., Gromadzinska, E. y Lachowicz, L. (1998) Protein kinases A and C phosphorylate purified Ca²⁺-ATPase from rat cortex, cerebellum and hippocampus. *Biochim Biophys Acta*, **1448**, 99-108.

