



TESIS DOCTORAL

*Expresión y actividad de Ca^{2+} -ATPasas en el
encéfalo adulto y en desarrollo de distintas
especies y en cultivos neuronales*

DANIEL MARCOS CORCHADO

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética

Conformidad del Director:

Fdo: Ana María Mata Durán

2013



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, Catedrática de Universidad, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Extremadura,

CERTIFICA:

Que la presente Tesis Doctoral titulada “*Expresión y actividad de Ca²⁺-ATPasas en el encéfalo adulto y en desarrollo de distintas especies y en cultivos neuronales*”, de la que es autor **Daniel Marcos Corchado**, se ha realizado bajo mi dirección en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética de la Universidad de Extremadura.

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

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, expido el presente certificado en Badajoz, a 19 de marzo de 2013.

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

Agradecimientos

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a las ayudas otorgadas por los siguientes organismos públicos o privados:

- Proyectos de investigación del Plan Nacional I+D+I: BFU2005-00663, BFU2008-00182, BFU2011-23313, Ministerio de Ciencia e Innovación.

Investigador Principal: Ana María Mata Durán



- Fundación Marcelino Botín.

Investigador Principal: Ana María Mata Durán



Durante el periodo de realización de esta Tesis Doctoral he disfrutado de las siguientes becas y ayudas:

- Beca de Investigación, Desarrollo Tecnológico e Innovación para no Doctores. Vicerrectorado de Investigación, Desarrollo e Innovación. Universidad de Extremadura.
- Beca y contraro en prácticas para la formación Predoctoral del Personal Investigador. Junta de Extremadura, asociada al proyecto del Plan Nacional de I+D+I BFU2005-00663
- Ayudas al grupo de investigación “Bioquímica y Biofísica de Sistemas de Transporte de Membranas” (BIOTRAM), financiada por la Consejería de Infraestructura y Desarrollo Tecnológico de la Junta de Extremadura.



GOBIERNO DE EXTREMADURA

Consejería de Empleo, Empresa e Innovación

Cuando un largo camino desemboca en el esperado destino, uno mira hacia atrás y observa todo el sendero recorrido. A la memoria vienen tramos en los que el caminar se hacía liviano y placentero, se caminaba disfrutando de la belleza del paisaje, del frescor de la ribera y la sombra de la arboleda. Recuerda también etapas duras, en las que aumentaba la pendiente y el sendero se hacía sinuoso, estrecho y pedregoso, donde la marcha resultaba lenta y se avanzaba poco a pesar del esfuerzo. Otras etapas en las que todo alrededor era vasto y árido, donde uno se sentía pequeño y parecía estar en medio de ninguna parte, momentos de encontrarse perdido... Pero en este camino, a lo largo de todos estos años, siempre han existido espacios para descansar, en los que retomar fuerzas, fuentes para saciar la sed, curar heridas... A estos "lugares", representados en multitud de personas, quiero dedicarles unas palabras para mostrarles mi más sincero agradecimiento. Quisiera, por tanto, dedicar algunas líneas a reconocer el trabajo, el esfuerzo y la aportación que muchas personas han realizado para llevar a buen término este proyecto.

Esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la participación, de uno u otro modo, de las siguientes personas, a las cuales quiero expresar mi más sincera gratitud:

En primer lugar a la Dra. Ana M^a. Mata Durán, Directora de esta Tesis Doctoral y la persona que me ha enseñado todo lo que sé sobre ciencia. Gracias por tu dedicación, constancia, rigurosidad y paciencia a la hora de enseñarme a "hacer ciencia". Gracias, a pesar de todo, por seguir apostando y creyendo en mí.

Gracias a mis compañeras de laboratorio, mis "hermanas científicas", ellas han sido apoyo constante a lo largo de todos estos años. Gracias Chary por todo lo que me has enseñado, por tu dedicación, por tener siempre esa palabra justa en el momento preciso, eres modelo a seguir. Gracias también a María B y María V, habéis sido un apoyo incondicional a lo largo de todo este tiempo. No podría olvidar a Antonio, miembro del grupo vecino, con el que he compartido también parte del trayecto.

También quiero expresar mi agradecimiento a todo el equipo humano que trabaja y ha trabajado durante estos años en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética (Áreas de Bioquímica y de Genética, Facultad de Ciencias) donde he llevado a cabo esta Tesis, por todas las veces que, de una forma u otra, me han prestado desinteresadamente su ayuda. Este agradecimiento quiero hacerlo extensivo también a los miembros de los Departamentos de Ciencias Morfológicas y Biología Celular y Animal así como a los miembros del Departamento de Fisiología animal.

Al Dr. Jesús Ávila de Grado y a la Dra. Mar Pérez Martínez (Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" CBM-SO), donde realicé una de mis estancias predoctorales y aprendí el manejo de los cultivos neuronales. Gracias por poner vuestro tiempo y persona a mi disposición y permitirme abrir fronteras en mi carrera. Quisiera hacer extensivo este agradecimiento a las personas que componen este grupo de investigación (Alberto, Alicia, Elena, Raquel, y tantos más...), grandes profesionales y mejores personas. Gracias por vuestra disponibilidad y por todo el tiempo que me dedicasteis durante mis días en Madrid.

Agradezco también al Dr. Frank Wuytack (Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Khatolieke Universiteit Leuven, Bélgica) y a todo el grupo de investigación, el permitirme realizar una estancia predoctoral en su laboratorio, donde aprendí el manejo de líneas celulares y la sobreexpresión de

proteínas en sistemas eucariotas. Gracias por vuestra hospitalidad, disposición y por demostrarme que no existen fronteras cuando de “hacer ciencia” se trata.

Gracias al Dr. Gervasio Martín Partido (Departamento de Ciencias Morfológicas y Biología Celular y Animal) por permitirme utilizar todo el equipamiento necesario para la preparación de cortes histológicos. Al Dr. Manuel Ramírez Fernández (Departamento de Microbiología) y a la Dra. Elena Guzmán Cabañas (Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética) por la generosa cesión de los microscopios de fluorescencia para la adquisición de imágenes.

Una parte de este trabajo ha sido posible gracias a la generosa donación de cerebros de cerdo por parte de FRICOSI (Matadero municipal de Olivenza S. L., Badajoz). Gracias a Pablo y Julio, veterinarios del matadero, y a todo el equipo humano que allí trabaja (Chola, Juanjo, ... entre otros), que con sus expertas manos han suministrado ejemplares de excelente calidad. De igual modo, una gran parte de la Tesis no hubiese sido posible sin la dedicación del personal del Servicio de Animalario de la UEx, ellos suministraron especímenes de ratón siempre puntuales. Gracias a Maribel, Placi, Juan y Vicente por vuestra disponibilidad y servicio.

Gracias también a mis compañeros de promoción que continuaron la labor investigadora en la Facultad. A Pedro, Fran, Sara, Iñaki, Rico, Ana, Paco con los que, a pesar de no haber podido compartir muchas “paradas” a lo largo del camino siempre han estado en los momentos áridos, gracias. Espero que la vida nos vuelva a juntar.

Gracias a la “buena-gente” de las comunidades de San Juan de Ribera y de San Fernando y Santa Isabel, a todos los miembros de las Delegaciones Episcopales de Pastoral de Juventud y Vocacional así como a las hermanas de la comunidad de Esclavas de Cristo Rey (Ana Mari, Fany, Juanita, Lillian, Magdalena y Susana), junto a ellos he caminado estos años de Tesis. Gracias por mostrarme la “otra VIDA” más allá de los laboratorios. Gracias también a todas las personas de las comunidades Perpetuo Socorro y Guadalupe con los que también he compartido camino algunos de estos años. Este agradecimiento se hace extensivo al equipo docente del colegio Marista Nuestra Sra. del Carmen (Badajoz), con ellos he tenido la oportunidad de compartir algún tiempo durante estos últimos años, gracias por vuestro apoyo y mostrarme la “otra cara” de la biología.

No podía olvidar a un grupo muy especial de personas, entre los que abundan los biólogos y otros “profesionales la vida”, personas con las que he compartido buenos momentos a lo largo de mi vida y durante este tiempo. Gracias a Samuel, Pilar, David, Inés, Alberto, Anselmo, M^a José, Borja, por tener siempre un rato para escuchar y, sobre todo, ser referentes de vida.

A mis “niños grandes”, os habéis convertido en hombres y mujeres. Gracias Alex, Claudia, Cristina, Fran, Javi, Jorge, Juan, Lucía, María F, María G, Penélope, Saray, Sergio y el pequeño Sergio Jr., a vosotros también os pertenece un trocito de este trabajo. Gracias por vuestra propia vida y persona, por ser como sois y hacerme, cada día, ver “más allá”. Recordad volar siempre con “alas blancas”.

Gracias a mis amigos de toda la vida, aquellos con los que comencé la andadura desde los días de instituto. ¡Cuánto ha llovido! Como ya sabéis no digo amigo a cualquiera, vosotros os lo habéis ganado. A Jaime y Jose Vera, gracias por los “cafés filosóficos” y las “charletas transcendentales”, cuánto bien han hecho todos estos años. A Cristina, ahora en ultramar, gracias por confiar siempre en mí. Como no, gracias Ángela, Jorge, Jose G., M^a Carmen, Manoli, M^a José, Oscar, Tony, todos vosotros me habéis mostrado que existe vida fuera de la “cueva”. Una mención especial a Rodrigo y Marta, gracias no sólo por abrirme las puertas de vuestra casa en mis idas y venidas a Madrid, sino por ofrecerme algo más, un hogar. También quisiera dedicar unas breves palabras a Manolo R., gracias por sacar siempre un hueco para escuchar. A todos vosotros, gracias.

Por último me gustaría dar las gracias, desde lo más profundo de mí, a los grandes artífices de este proyecto, mi familia. Gracias a mis abuelos, primos y tíos, los cuales siempre confiaron en mí. A ti Fermín, que ya sabes que te consideramos de la familia, una gran parte de este trabajo te pertenece.

Gracias a mi padre Juanjo, la persona más inteligente que conozco. Gracias por enseñarme a que no son necesarios los títulos cuando de hacer bien las cosas se trata. A mi madre Pilar, porque tus silencios han sido más importante que tus palabras, gracias por tu insistencia, por enseñarme a no tirar la toalla jamás. A mi hermano Javier, por aguantarme todo este tiempo. A pesar de la “caña” que te doy, sabes que te quiero.

Gracias papá, gracias mamá, gracias Javier.

“Duc in altum”
(Lc. 5, 4b)

Abreviaturas

- **A β** : péptido β amiloide.
- **APP**: amyloid precursor protein (proteína precursora del amiloide).
- **Ara-C**: β -D-arabinofuranósido.
- **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.
- **BSS**: buffered salt solution.
- **CA**: *Cornu Ammonis*.
- **CaM** : calmodulina.
- **ccP** : capa de células de Purkinje.
- **ccp**: capa de las células piramidales.
- **CE**: corteza entorrinal.
- **cg**: capa granular.
- **cig**: capa infragranular.
- **cm**: capa molecular.
- **D.E.**: desviación estándar.
- **DAB**: 3,3'-diaminobencidina tetrahidroclorada.
- **DAPI**: 4'-6-diamidino-2-fenilindol.
- **DIV**: días *in-vitro*.
- **DMSO**: dimetil sulfóxido.
- **EA**: Enfermedad de Alzheimer.
- **EDTA**: ácido etilendiaminotetraacético.
- **EGTA**: ácido etilenglicol bis (2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraacético.
- **ELISA**: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay.
- **fh**: fisura hipocampal.
- **g**: Aceleración de la gravedad.
- **GD**: giro dentado.
- **h**: hora(s).
- **HBSS**: Hank's buffered salt solution.
- **Hepes**: ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-etanosulfónico).
- **hl**: hilus.
- **HS**: horse serum (suero de caballo).
- **kDa**: kilodalton.
- **LDH**: lactato deshidrogenasa.
- **MB**: membranas.
- **min**: minuto(s).
- **MPS**: vesículas de membrana plasmática sinaptosomal.
- **MTT**: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio.
- **NADH**: nicotinamida adenín dinucleótido (forma reducida).
- **NB**: medio neurobasal.
- **°C**: grados centígrados.
- **OPD**: orto-fenil-dietnolamina.
- **p/p**: relación peso/peso.
- **p/v**: relación peso/volumen.
- **P0-P30**: estadio de desarrollo postnatal desde 0 a 30 días.
- **PBS**: tampón fosfato salino.
- **PC**: fosfatidilcolina.
- **PEP**: fosfoenolpiruvato.
- **PK**: piruvato quinasa.
- **PMCA**: Ca²⁺-ATPasa de membrana plasmática.

- **PMSF**: fluoruro de fenilmetilsulfonilo.
- **PrP^C**: proteína del prión celular.
- **PS**: fosfatidilserina.
- **PVDF**: difluoruro de polivinilideno.
- **s**: segundos.
- **SB**: subículo.
- **SDS**: dodecilsulfato sódico.
- **SERCA**: Ca²⁺-ATPasa de retículo sarco(endo)plásmico.
- **slm**: *stratum lacunosum-moleculare*.
- **so**: *stratum oriens*.
- **SPCA**: Ca²⁺-ATPasa de vías secretoras.
- **sr**: *stratum radiates*.
- **TBS**: tampón Tris salino.
- **Tris**: Tris-(hidroximetil)-aminometano.
- **Tw**: tween.
- **TX**: tritón X-100.
- **v/v** : relación volumen/volumen.
- **VM**: vesículas de membrana.
- **V_{máx}**: velocidad máxima.
- **WB**: Western blot

Índice general

ÍNDICE:

INTRODUCCIÓN

1

1. El ión Ca^{2+} en las células y en el sistema nervioso central.....	3
1.1 Papel del Ca^{2+} en el sistema nervioso.....	3
1.2 El Ca^{2+} y el desarrollo neural.....	6
1.3 El Ca^{2+} y la neurodegeneración.....	6
2. Descripción general de las Ca^{2+} ATPasas.....	9
3. La Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarcoplásmico (SERCA).....	10
3.1 Estructura de la SERCA.....	11
3.2 Isoformas de la SERCA.....	12
3.3 Regulación de la SERCA.....	14
4. La bomba de Ca^{2+} de las vías secretoras (SPCA).....	15
4.1 Estructura de la SPCA.....	15
4.2 Isoformas de la SPCA.....	16
4.3 Regulación de la SPCA.....	17
5. La bomba de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA).....	18
5.1 Estructura de la PMCA.....	18
5.2 Isoformas de la PMCA.....	21
5.3 Regulación de la PMCA.....	23
6. Microdominios lipídicos “ <i>rafts</i> ” de la membrana plasmática.....	26
7. El hipocampo como modelo de estudio.....	28
7.1 Organización histológica del hipocampo.....	29
7.2 Conexiones del hipocampo.....	32
8. La corteza cerebral y el cerebelo.....	34
8.1 La corteza cerebral.....	34
8.2 El Cerebelo.....	36

OBJETIVOS

39

MATERIALES Y MÉTODOS

43

1. Materiales y animales empleados.....	45
1.1 Reactivos.....	45
1.2 Animales de experimentación.....	47
2. Preparaciones de membranas.....	48
2.1 Preparación de extractos de membranas.....	48
2.2 Preparación de vesículas de membrana plasmática sinaptosomal de hipocampo de cerdo (MPS).....	48
3. Purificación de la PMCA de hipocampo de cerdo.....	50
3.1 Solubilización de las MPS.....	50
3.2 Cromatografía de afinidad en columna de calmodulina-agarosa.....	50
4. Determinación de la concentración de proteína.....	51

5. Electroforesis y Western blot.....	51
6. Ensayos funcionales.....	52
6.1 Medida de la actividad Ca^{2+} -ATPasa.....	52
6.2 Medida del transporte de Ca^{2+}	55
7. Ensayos histoquímicos.....	56
7.1 Preparación y fijación de tejidos.....	56
7.2 Congelación y microtomía en criostato.....	56
7.3 Tinción de tejidos con azul de toluidina.....	57
7.4 Ensayos inmunohistoquímicos.....	57
7.5 Ensayos de inmunofluorescencia.....	58
7.6 Montaje de las muestras para microscopía.....	58
8. Aislamiento de microdominios lipídicos “rafts”.....	59
9. Determinación de colesterol.....	59
10. Cultivos primarios de hipocampo de ratón.....	60
10.1 Preparación de cultivos primarios de hipocampo de ratón.....	60
10.2 Ensayos de viabilidad.....	61
10.3 Preparación de extractos de membranas de células en cultivo.....	62
10.4 Ensayos inmunocitoquímicos	63
11. Técnicas de interacción proteína-proteína.....	64
11.1 Experimentos de “over-lay” en placas ELISA.....	64
11.2 Experimentos de “over-lay” sobre membranas de PVDF.....	65
11.3 Ensayos de inmunoprecipitación.....	66
12. Producción y caracterización de un anticuerpo policlonal anti-péptido A β 1-42.....	67
13. Soportes informáticos.....	68
13.1 Bad-4.....	68
13.2 Adobe Photoshop CS2.....	68
13.3 Image J.....	68
13.4 Sigma Plot 10.0.....	68
13.5 EndNote X1.....	68

RESULTADOS

69

Capítulo I “Caracterización funcional e inmunológica de las Ca^{2+} -ATPasas en el hipocampo de cerdo adulto”.....70

Inmunodetección de las tres familias de Ca^{2+} -ATPasas en extractos de membrana del hipocampo de cerdo.....	73
Caracterización funcional de bombas de calcio en hipocampo de cerdo.....	75
Distribución de SERCA2, SPCA1 y la PMCA total en secciones parasagitales de hipocampo de cerdo.....	77
Localización de isoformas de la PMCA en secciones de hipocampo de cerdo.....	82
Distribución de las isoformas PMCA en microdominios lipídicos rafts.....	88

Capítulo II “Expresión funcional y localización de las Ca^{2+} -ATPasas en el encéfalo de ratón durante el desarrollo postnatal”.....91

Expresión de SERCA2b, SPCA1 y PMCA total en diferentes regiones del encéfalo de ratón.....93

Niveles de expresión de las isoformas PMCA en el hipocampo, la corteza y el cerebelo durante el desarrollo.....94

Expresión funcional de SERCA, SPCA y PMCA en diferentes áreas del cerebro de ratón en desarrollo.....96

Inmunolocalización de bombas de Ca^{2+} en secciones parasagitales de encéfalo de ratón durante el desarrollo.....98

Localización y distribución de las PMCAs en secciones sagitales del cerebro del ratón durante el desarrollo.....102

Capítulo III “Caracterización de las Ca^{2+} -ATPasas en cultivos primarios de neuronas del hipocampo de ratón y su modulación por el péptido β -amiloide”.....109

Morfología y regulación de las neuronas del hipocampo de ratón en cultivos primarios. Análisis funcional de Ca^{2+} -ATPasas.....111

Expresión y actividad de las tres familias de Ca^{2+} -ATPasas en neuronas de hipocampo de ratón en cultivos primarios a los 7 DIV.....112

Inmunolocalización neuronal de SERCA2b, SPCA1, PMCA total e isoformas PMCA en los cultivos primarios de ratón.....114

Efecto del péptido A β 1-42 en la viabilidad de las neuronas del hipocampo.....117

Efecto del péptido A β 1-42 sobre la actividad Ca^{2+} -ATPasa y papel protector de la calmodulina.....118

Expresión y localización de la PMCA en células tratadas con A β 1-42 y calmodulina.....122

Interacción del péptido β -amiloide con la PMCA y con la calmodulina.....125

DISCUSIÓN 129

Expresión de las tres familias de Ca^{2+} -ATPasas en el encéfalo de diferentes sistemas modelo.....131

Distribución de la isoforma 4 de la PMCA en microdominios lipídicos (*rafts*) de membranas de hipocampo de cerdo.....135

Análisis funcional de las Ca^{2+} -ATPasas en los distintos sistemas modelo.....136

Localización celular de las tres familias de Ca^{2+} -ATPasas neuronales.....139

Ca^{2+} -ATPasas en cultivos primarios de hipocampo de ratón.....143

Efecto del péptido β -amiloide en los cultivos primarios y las Ca^{2+} -ATPasas.....146

CONCLUSIONES 151

BIBLIOGRAFÍA 155

Índice de figuras y tablas

FIGURAS

Fig. 1 Representación esquemática de una sinapsis.....	5
Fig. 2 Procesamiento de la proteína precursora del β -amiloide (APP).....	8
Fig. 3 Esquema general simplificado del ciclo de reacción de las Ca^{2+} -ATPasas	10
Fig. 4 Estructura de la bomba de Ca^{2+} del retículo sarco(endo)plásmico SERCA	11
Fig. 5 Variantes de las diferentes isoformas SERCA.....	12
Fig. 6 La bomba de Ca^{2+} de las vías secretoras SPCA.....	16
Fig. 7 Estructura de la bomba de Ca^{2+} de la membrana plasmática PMCA.....	20
Fig. 8 Variantes de las diferentes isoformas de la PMCA.....	23
Fig. 9 Representación esquemática de un dominio lipídico en la membrana plasmática.....	27
Fig. 10 Sistema nervioso central del cerdo y del ratón.....	28
Fig. 11 División del hipocampo por áreas.....	29
Fig. 12 Estructura del hipocampo de cerdo adulto.....	29
Fig. 13 División en capas del asta de Amón del hipocampo.....	31
Fig. 14 Circuito de conexiones en el hipocampo.....	33
Fig. 15 Corte parasagital del encéfalo de ratón adulto.....	34
Fig. 16 División de la corteza cerebral en capas.....	35
Fig. 17 Anatomía del encéfalo de ratón adulto.....	36
Fig. 18 División en capas de la corteza cerebelosa.....	37
Fig. 19 Procedimiento de aislamiento de extractos de membrana a partir de tejidos.....	48
Fig. 20 Esquema de preparación de vesículas de membrana sinaptosomal.....	49
Fig. 21 Reacciones enzimáticas que se producen en el sistema acoplado de enzimas piruvato quinasa y lactato deshidrogenasa.....	53
Fig. 22 Evolución de la actividad Ca^{2+} -ATPasa en el transcurso de una cinética enzimática en presencia de los diferentes inhibidores.....	53
Fig. 23 Aislamiento de extractos de membrana a partir de células en cultivo.....	63
Fig. 24 Detección de la interacción $\text{A}\beta$ -proteína por “ <i>over-lay</i> ” en placa ELISA.....	65
Fig. 25 Esquema del “ <i>over-lay</i> ” por Western blot para analizar la interacción $\text{A}\beta$ -PMCA.....	66
Fig. 26 Inmunodetección de $\text{A}\beta$ 1-42 empleando el anticuerpo policlonal anti- $\text{A}\beta$ 1-42.....	68
Fig. 27 Inmunodetección de las tres familias de bombas de Ca^{2+} en extractos de membrana de hipocampo de cerdo.....	73
Fig. 28 Western blot de isoformas PMCA en extractos de membranas de hipocampo de cerdo.....	74
Fig. 29 Caracterización cinética de las Ca^{2+} -ATPasas en extractos de membrana de hipocampo.....	75
Fig. 30 Efecto de diferentes fosfolípidos en la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA purificada de hipocampo de cerdo.....	76
Fig. 31 Localización de la SERCA2 en secciones para-sagitales del hipocampo de cerdo.....	79
Fig. 32 Distribución de la SPCA1 en secciones para-sagitales del hipocampo de cerdo.....	80
Fig. 33 Inmunodetección de la PMCA total en secciones para-sagitales del hipocampo de cerdo.....	81
Fig. 34 Inmunohistoquímica de PMCA1 en secciones para-sagitales de hipocampo de cerdo.....	84
Fig. 35 Localización de PMCA2 en hipocampo de cerdo.....	85
Fig. 36 Inmunohistoquímica de PMCA3 en hipocampo de cerdo.....	86
Fig. 37 Localización de PMCA4 en hipocampo de cerdo.....	87
Fig. 38 Distribución de PrP y colesterol las fracciones del gradiente de Nicodenz.....	89
Fig. 39 Distribución de las cuatro isoformas PMCA en el gradiente de densidad de Nicodenz.....	90
Fig. 40: Distribución de las tres familias de bombas de calcio en extractos de membrana de hipocampo, corteza y cerebelo de ratón en desarrollo.....	93
Fig. 41 Inmunodetección de las isoformas PMCA en las diferentes áreas del encéfalo de ratón.....	95
Fig. 42 Actividad SERCA, SPCA y PMCA en vesículas de membrana de diferentes áreas del encéfalo de ratón en desarrollo.....	97
Fig. 43 Localización de SERCA2b, SPCA1 y PMCA total en la región CA de hipocampo de ratón durante el desarrollo.....	99
Fig. 44 Distribución de las bombas de Ca^{2+} en la capa V de la corteza de ratón en desarrollo.....	100

Fig. 45 Inmunolocalización de bombas de Ca ²⁺ en secciones parasagittales de cerebelo de ratón durante el desarrollo postnatal.....	101
Fig. 46 Distribución de las isoformas PMCA en el área CA1 del cuerno de Amón del hipocampo en desarrollo.....	104
Fig. 47 Localización de las isoformas PMCA en secciones parasagittales de corteza durante el desarrollo.....	105
Fig. 48 Localización de isoformas PMCA en la corteza cerebelosa en desarrollo.....	106
Fig. 49 Doble inmunofluorescencia de PMCA2 o PMCA3 y sinaptofisina en diferentes áreas del cerebro en el estadio P30.....	107
Fig. 50 Caracterización morfológica y actividad Ca ²⁺ -ATPasa total de neuronas de hipocampo en cultivo.....	112
Fig. 51 Inmunodetección y actividad de SERCA, SPCA y PMCA en extractos de membrana de neuronas de hipocampo a los 7 DIV.....	113
Fig. 52 Inmunodetección de isoformas PMCA en extractos de membrana de células a los 7 DIV.....	114
Fig. 53 Localización de SERCA, SPCA y PMCA en neuronas de hipocampo a los 7 DIV.....	115
Fig. 54 Inmunolocalización de PMCA1, 2, 3 y 4 en células de hipocampo a los 7DIV.....	116
Fig. 55 Efecto de la concentración y del tiempo de incubación con A β 1-42 en la supervivencia de cultivos primarios de hipocampo de ratón.....	118
Fig. 56 Actividades SERCA, SPCA y PMCA de cultivos primarios en presencia de A β 1-42.....	119
Fig. 57 Morfología de células de hipocampo crecidas en presencia de A β 1-42.....	120
Fig. 58 Efecto del A β 1-42 y calmodulina en la viabilidad neuronal.....	121
Fig. 59 Morfología de células de hipocampo crecidas en presencia de A β 1-42 y calmodulina.....	121
Fig. 60 Actividades SERCA, SPCA y PMCA de cultivos primarios en presencia de A β 1-42 y calmodulina.....	122
Fig. 61 Localización de la PMCA y morfología de neuronas de hipocampo en cultivos tratados con A β 1-42 y calmodulina.....	124
Fig. 62 Ensayo de "overlay" para analizar la interacción de la PMCA con el péptido A β 1-42.....	126
Fig. 63 Co-inmunoprecipitación (co-IP) de la PMCA y A β	127
Fig. 64 Interacción de calmodulina con el péptido A β 1-42.....	128

TABLAS:

Tabla I Relación de anticuerpos primarios empleados en este trabajo.....	46
Tabla II Relación de anticuerpos secundarios empleados en este trabajo.....	46
Tabla III: Resumen de la expresión y abundancia relativa de las isoformas PMCA1-4 en las principales neuronas del hipocampo, la corteza y el cerebelo en desarrollo.....	108

Resumen

El ión Ca^{2+} desempeña un papel fundamental en el sistema nervioso regulando procesos como la transmisión sináptica, el crecimiento y el desarrollo de neuritas o la apoptosis. El mantenimiento de la concentración intracelular óptima del Ca^{2+} es crítico para el correcto desarrollo de estos procesos, siendo para ello crucial la intervención de las bombas de Ca^{2+} intracelulares (SERCA y SPCA) y de membrana plasmática (PMCA).

Un proceso neurodegenerativo como la enfermedad de Alzheimer (EA) se caracteriza, entre otros aspectos, por una desregulación de los niveles intracelulares del Ca^{2+} , siendo el hipocampo una de las primeras áreas que degeneran en esta enfermedad.

En esta Tesis se ha realizado la caracterización funcional e inmunológica de las bombas de Ca^{2+} en el hipocampo del cerdo adulto, así como en el hipocampo, la corteza y el cerebelo del ratón durante el desarrollo. Todas las bombas están presentes y son funcionales en todas las áreas estudiadas, siendo la PMCA la que presenta mayor actividad. Las Ca^{2+} -ATPasas muestran una localización específica y restringida según el área y estadio de desarrollo, localizándose la PMCA en regiones ricas en sinapsis. Además la PMCA4 se distribuye en microdominios lipídicos *rafts*. También se han caracterizado los cultivos primarios del hipocampo de ratón en ausencia y presencia del péptido β -amiloide ($\text{A}\beta$), uno de los marcadores moleculares de la EA y de la calmodulina, una proteína de unión a Ca^{2+} que activa a la PMCA y se han analizado sus efectos sobre las Ca^{2+} -ATPasas en membranas procedentes de estos cultivos. El $\text{A}\beta$ produce cambios en la supervivencia, la morfología celular y la elongación de las neuritas, además de la inhibición específica de la actividad PMCA. Estos efectos son bloqueados por la calmodulina.

Los resultados de este trabajo sugieren un posible papel específico de las bombas de Ca^{2+} en la regulación de este ión en funciones concretas en el sistema nervioso durante procesos celulares y en el desarrollo.

Summary

Calcium ions play a key role in the activation and regulation of several mechanisms in the nervous system, such as synaptic transmission, neurite development or apoptosis. The fine tuning of intracellular Ca^{2+} levels is essential for the functioning of these processes and is mainly carried out by intracellular Ca^{2+} pumps (SERCA and SPCA) and the plasma membrane Ca^{2+} pump (PMCA). Besides, a neurodegenerative disorder such as Alzheimer disease (AD) is characterized by the dysregulation of Ca^{2+} levels, being the hippocampus one of the first region affected by the disease.

The goal of this Thesis has been the immunological and functional characterization of Ca^{2+} pumps in adult pig hippocampus, as well as in developing mouse hippocampus, cortex and cerebellum. The results show the expression and activities of the pumps in all the analyzed areas, being the PMCA the ATPase with the highest activity. The Ca^{2+} -ATPases are localized according to the area and developing stage, being the PMCA specifically expressed in rich synapse regions. Furthermore the PMCA4 is the only isoform that also is distributed in lipid rafts microdomains. The study has been extended to hippocampal primary neuronal cultures in the absence and presence of the AD molecular marker $\text{A}\beta$, and the Ca^{2+} binding protein calmodulin, which is the main PMCA activator and its effects in Ca^{2+} -ATPases. The $\text{A}\beta$ peptide affects neuronal survival, cellular morphology and neurite elongation. It has been analyzed their effects on Ca^{2+} -ATPases activity from these cultures. It also inhibits specifically the PMCA activity. These effects are prevented by calmodulin.

Overall, the results of this work strongly suggest a specific role of Ca^{2+} pumps in the regulation of this ion in precise functions in brain areas during cellular processes and development.

Introducción

1. EL IÓN Ca^{2+} EN LAS CÉLULAS Y EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

1.1 Papel del Ca^{2+} en el sistema nervioso

El Ca^{2+} juega un papel fundamental en la fisiología de las células nerviosas, interviniendo en funciones tan importantes como la plasticidad neuronal, la expresión génica, la transmisión del impulso nervioso, el envejecimiento neuronal o la apoptosis (Wuytack *et al.* 2002, Ginty 1997, Malenka *et al.* 1989, Berridge 1995, Ghosh y Greenberg 1995, Clapham 1995, Squier y Bigelow 2000). Estos procesos dependen de la amplitud, frecuencia y localización subcelular de las señales de Ca^{2+} citosólico (Berridge 1993, Berridge *et al.* 2003). La regulación de la concentración de este ión en estos procesos es crítica, por lo tanto es muy importante conocer en profundidad los sistemas implicados en mantener los niveles adecuados del Ca^{2+} intracelular. Las neuronas contienen muchas proteínas de unión a Ca^{2+} y sistemas de transporte que mantienen las concentraciones de este ión en el intervalo de 50 a 300 nM en el citoplasma respecto a niveles milimolares en el medio extracelular (Miller 1991). Este hecho permite a las células mantener un gradiente entre ambos compartimentos y emplear el Ca^{2+} como mensajero secundario para la integración de las numerosas funciones en las que interviene. Cuando el Ca^{2+} penetra en la célula, se une a proteínas enlazadoras de Ca^{2+} , entre ellas la calmodulina que activa a su vez a otras proteínas como a la quinasa dependiente de Ca^{2+} -calmodulina o a la adenilato ciclasa dependiente de Ca^{2+} , que se encargan de transducir la información hacia el interior celular. Esta señal desembocaría en la ejecución de respuestas como la modificación de proteínas sinápticas o bien otro tipo de procesos que requieren cambios en la expresión génica (Ghosh y Greenberg 1995). Sin embargo, cuando las células excitables son incapaces de mantener los niveles óptimos de Ca^{2+} citosólico llevan en una gran número de casos a la neurodegeneración celular (Mattson *et al.* 2000, Mattson 2007).

En el sistema nervioso, uno de los procesos más importante en los que el Ca^{2+} juega un papel crucial es en la transmisión del impulso nervioso, tiene lugar de la siguiente forma: tras la llegada de un potencial de acción al terminal presináptico, se produce la entrada de Ca^{2+} al interior de la célula a través de canales específicos que existen en la membrana plasmática, como son los canales sensibles a voltaje (VOCs, *voltage-operated calcium channels*), que se activan por la despolarización de la membrana (Antkiewicz-Michaluk 1995, Cens *et al.* 2006). Otros sistemas implicados en la entrada de Ca^{2+} al interior celular son los canales activados por la unión de un ligando (ROCs, *receptor-operated calcium channels*) (Antkiewicz-Michaluk 1995). También se ha descrito la presencia de unos canales de Ca^{2+} activados por el vaciado de depósitos intracelulares, denominados canales sensibles al vaciado de depósitos (SOCs, *store-operated calcium channels*). Estos canales constituyen una importante vía de entrada de Ca^{2+} al citoplasma en células no excitables, que se denomina “entrada capacitiva de Ca^{2+} ” (Parekh y Putney 2005, Putney 2005, Putney 2007). Este primer influjo provoca una nueva liberación de Ca^{2+} hacia el citoplasma desde las cisternas intracelulares a través de los canales de Ca^{2+} que se abren por la acción del IP_3 (receptor del IP_3 , InsP_3R) y de la rianodina (receptor de rianodina, RyR). Este mecanismo se conoce como “liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} ” (Belan *et al.* 1993, Verkhratsky y Shmigol 1996, Usachev y Thayer 1997, Verkhratsky y Petersen 1998, Akita y Kuba 2000). Esta entrada de Ca^{2+} al citoplasma promueve el desplazamiento de las vesículas cargadas de neurotransmisores hacia la membrana del terminal presináptico y la liberación de los mismos al espacio sináptico, donde se unirán a sus receptores en el terminal postsináptico de otra neurona. Tras este proceso los niveles de Ca^{2+} han de volver a su estado basal, para iniciar una nueva señal, pues de lo contrario, resultarían muy tóxicos para la célula.

La recuperación de los niveles basales de Ca^{2+} en el citoplasma se produce, principalmente, por diferentes transportadores localizados en las membranas biológicas (Fig. 1):

- ✓ El intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$: es un cotransportador situado en la membrana plasmática y que tiene gran capacidad de transporte de Ca^{2+} desde el citosol al exterior celular, pero con baja afinidad por este ión. Su estequiometría es de $3\text{Na}^+:1\text{Ca}^{2+}$ (Eisner y Lederer 1985).
- ✓ El uniportador de Ca^{2+} : está localizado en la membrana mitocondrial, utiliza un gradiente electroquímico de protones, producido por la cadena respiratoria mitocondrial, para la entrada de Ca^{2+} dentro de la matriz (Raffaello *et al.* 2012).
- ✓ Las ATPasas transportadoras de Ca^{2+} : también llamadas Ca^{2+} -ATPasas o bombas de Ca^{2+} . Transportan Ca^{2+} en contra del gradiente de concentración a expensas de la hidrólisis de ATP. Tienen alta afinidad por Ca^{2+} y están altamente expresadas en el sistema nervioso. Se conocen tres familias con distinta localización subcelular: la Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarco(endo)plásmico (SERCA), la Ca^{2+} -ATPasa de las vías secretoras (SPCA) y la Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática (PMCA).

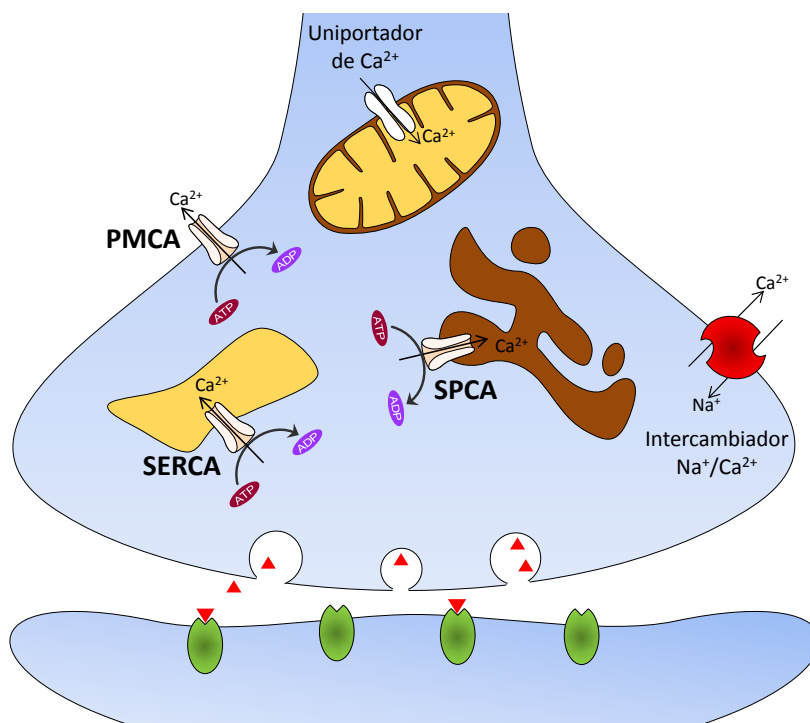


Figura 1 Representación esquemática de una sinapsis. Se muestran los diferentes sistemas implicados en la eliminación del Ca^{2+} citosólico. Adaptado de Mata y Sepúlveda 2005.

1.2 El Ca^{2+} y el desarrollo neural

Durante el desarrollo neuronal el mantenimiento de los niveles intracelulares de Ca^{2+} , a concentraciones del orden de nM, es crítico para la correcta diferenciación, el crecimiento de las dendritas y la maduración celular (Ghosh y Greenberg 1995, Wong y Ghosh 2002) así como para el funcionamiento óptimo de los mecanismos implicados en la plasticidad sináptica (Zacharias y Strehler 1996). De hecho la disrupción de la homeostasis del Ca^{2+} durante el desarrollo de las neuronas de la corteza de rata, produce un déficit en la elongación de las neuritas (Ringler *et al.* 2008), que desemboca en un fallo en la función de las sinapsis y por consiguiente en los procesos cognitivos (Chakroborty y Stutzmann 2011). Numerosas evidencias han demostrado que las bombas de Ca^{2+} son esenciales en la regulación del ión Ca^{2+} durante el desarrollo neuronal (Sepúlveda *et al.* 2005, Kip *et al.* 2006, Sepúlveda *et al.* 2007b, Sepúlveda *et al.* 2008). Trabajos realizados en el cerebelo de pollo, que tiene un desarrollo prenatal, y el del ratón, que tiene un desarrollo postnatal, han mostrado un patrón de expresión y de localización de las Ca^{2+} -ATPasas diferente dependiendo del estadio analizado, lo que pone de manifiesto una posible implicación diferencial de cada una de las bombas en momentos concretos del desarrollo (Sepúlveda *et al.* 2007b, Sepúlveda *et al.* 2005, Sepúlveda *et al.* 2008). Sin embargo, no existen estudios detallados sobre el papel de las bombas de Ca^{2+} en la función y el desarrollo del hipocampo.

1.3 El Ca^{2+} y la neurodegeneración

Durante el envejecimiento normal y en estados patológicos, la capacidad de las células para regular los niveles de Ca^{2+} se ven comprometidos, contribuyendo al inicio o a la progresión de enfermedades neurodegenerativas (Mattson 2007, Berridge 2010). Esta alteración en los niveles del Ca^{2+} afecta a un amplio espectro de respuestas celulares, tales como la activación de proteasas (Chan y Mattson 1999, Nixon 2003), el estrés oxidativo

(Mattson 2003) o el inicio de las vías apoptóticas (Mattson y Chan 2003, Mattson 2007), que desembocarían en procesos de muerte celular.

Uno de los estados patológicos en los cuales el Ca^{2+} juega un papel relevante es la enfermedad de Alzheimer (EA) (Bezprozvanny y Mattson 2008). La EA es una demencia senil que se manifiesta, en sus primeros estadios, en el giro dentado del hipocampo y en el lóbulo temporal del cerebro, produciendo alteraciones en la memoria a corto plazo (Wilhelmsen 1999). Esta enfermedad se caracteriza, entre otros factores, por la presencia de ovillos neurofibrilares, compuesto principalmente por la proteína Tau y de placas seniles cuyo componente fundamental es el péptido β -amiloide ($\text{A}\beta$) (Glennner y Wong 1984, Glennner *et al.* 1984, Selkoe 1989, Selkoe 1998, Castellani *et al.* 2010). Este péptido, de unos 40 a 43 aminoácidos y 4 KDa, procede del metabolismo de una proteína anclada a la membrana plasmática llamada proteína precursora del amiloide (APP) (Masters *et al.* 1985). La APP se puede metabolizar por dos vías diferentes (Fig. 2); una no amiloidogénica, en la que intervienen secuencialmente las α y γ -secretasas que producen fragmentos no tóxicos, y otra amiloidogénica, en situaciones patológicas, en la que participan las β y γ -secretasas, que dan lugar al fragmento tóxico $\text{A}\beta$ de 40 y 42 aminoácidos (Selkoe *et al.* 1996). La agregación de $\text{A}\beta$ en forma de oligómeros y fibrillas resulta tóxica para la célula (Yankner 1996, Giovannelli *et al.* 1998, Stephan *et al.* 2001).

Se ha comprobado que en los cerebros de pacientes afectados por la EA, la presencia de $\text{A}\beta$ en forma de oligómeros y fibras está implicada en la desregulación de los niveles de Ca^{2+} (Demuro *et al.* 2005, Bezprozvanny y Mattson 2008, Mattson *et al.* 1992). Este fenómeno da lugar a lo que se conoce como “hipótesis del Ca^{2+} ” (revisado en Berridge 2010). Esta hipótesis propone que la activación de la vía amiloidogénica y la consiguiente acumulación del péptido $\text{A}\beta$, provocaría una remodelación y alteración en las rutas de señalización del Ca^{2+} , afectando este hecho de forma adversa a la fisiología celular y provocando, en última instancia, la muerte neuronal (Khachaturian 1994, LaFerla 2002,

Berridge 2010). Estudios realizados *in vivo* con modelos animales apoyan esta teoría (Kirischuk y Verkhratsky 1996, Murchison y Griffith 2007, Thibault *et al.* 2007, Toescu y Verkhratsky 2007).

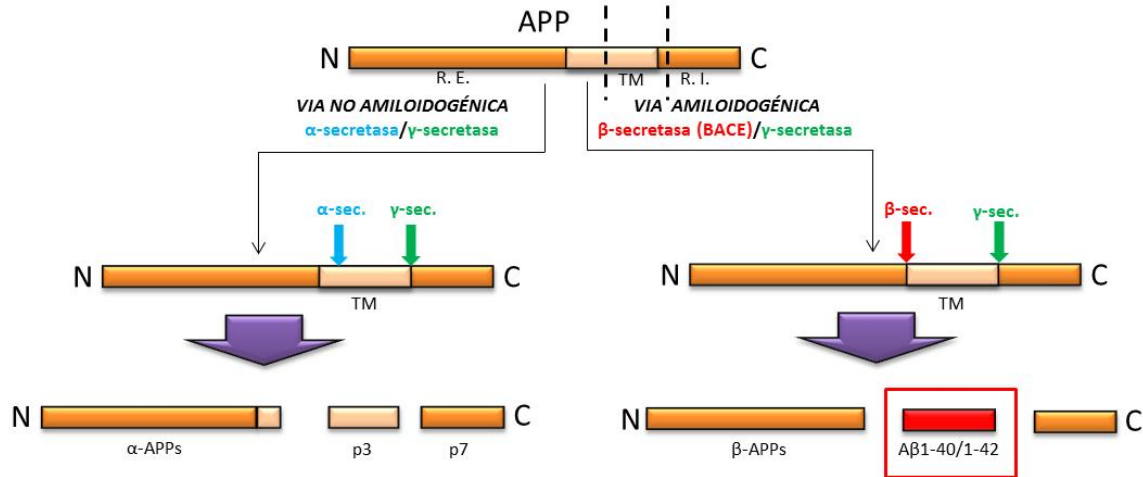


Figura 2 Procesamiento de la proteína precursora del β-amiloide (APP). En la vía no amiloidogénica los cortes sucesivos de APP por la α-secretasa (azul) y la γ-secretasa (verde) dan lugar a los fragmentos α-APP soluble, p3 y p7 no tóxicos. En la vía amiloidogénica, los cortes de APP por la β-secretasa (rojo) y la γ-secretasa (verde) producen los fragmentos α-APP soluble y el Aβ1-40/1-42 tóxico. R.E.: región extracelular; TM.: región transmembrana; R.I.: región intracelular. Adaptado de Verdile *et al.* 2004.

Los mecanismos por los cuales el Aβ produce la alteración de los niveles de Ca²⁺ son variados y se han propuesto diferentes teorías al respecto. Así, se ha descrito la formación de canales permeables al Ca²⁺ en la membrana plasmática por parte de oligómeros de Aβ (Arispe *et al.* 1993, Kawahara y Kuroda 2000), o la inducción de estrés oxidativo que causaría la disrupción de la homeostasis de Ca²⁺ (Duchen 2000). Por otra parte el Aβ es susceptible de interactuar con las proteínas implicadas en la homeostasis del Ca²⁺, como las Ca²⁺-ATPasas, dando lugar a la desregulación en los niveles de este ión (Mark *et al.* 1995, Berrocal *et al.* 2009, Mata *et al.* 2011, Berrocal *et al.* 2012). Este hecho pone de manifiesto la relación existente entre el ión Ca²⁺, el péptido Aβ, sus proteínas reguladoras y la neurodegeneración. Por tanto un conocimiento profundo de los sistemas implicados en la regulación del Ca²⁺ intracelular resulta de vital importancia.

2. DESCRIPCIÓN GENERAL DE LAS Ca^{2+} ATPasas

Las Ca^{2+} -ATPasas son proteínas de membrana que transportan Ca^{2+} en contra del gradiente de concentración mediante la hidrólisis de ATP y resultan esenciales en la regulación de los niveles del Ca^{2+} intracelular. Pertenecen a la familia de ATPasas de tipo P, porque durante su ciclo catalítico se fosforilan en un residuo de aspartato (Carafoli 1987, Carafoli y Brini 2000, Pedersen 2007).

Durante el ciclo (Fig. 3), el Ca^{2+} se une al dominio citosólico de la enzima en su conformación de alta afinidad (E1) y también se une el ATP, fosforilando un residuo de aspartato y provocando un cambio conformacional al estado E2, en el cual el Ca^{2+} queda expuesto al interior del lumen del retículo endoplásmico (la SERCA) o del complejo de Golgi (la SPCA) o al exterior celular (la PMCA). La enzima en este estado tiene baja afinidad por Ca^{2+} y por tanto libera el ión y posteriormente se desfosforila. Esto provoca un cambio conformacional a su estado inicial E1 (Carafoli y Brini 2000, Lee 2002).

Además de estas etapas se ha descrito una etapa alternativa durante el ciclo de reacción denominada “*slippage*” o deslizamiento tanto para la SERCA de músculo esquelético (Inesi y de Meis 1989, Logan-Smith *et al.* 2001) como para la PMCA de cerebro de cerdo (Palacios *et al.* 2004). Durante este proceso el Ca^{2+} unido al intermedio fosforilado se libera hacia el sitio citoplasmático de la membrana en lugar de ser transportado al lumen o al espacio extracelular. La consecuencia de este fenómeno es que la hidrólisis de ATP no se acopla al transporte de Ca^{2+} y por tanto la mayor parte de la energía que se deriva de esa hidrólisis la utiliza la célula para producir calor, contribuyendo al control térmico en mecanismos de hibernación y anoxia (de Meis 2003).

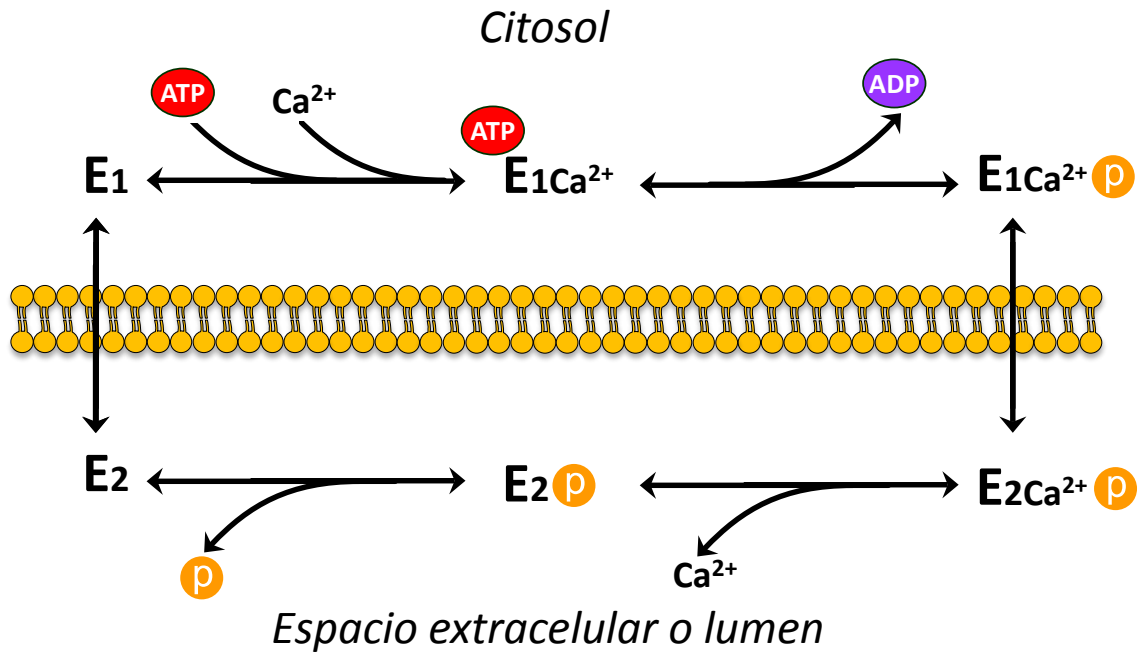


Figura 3 Esquema general simplificado del ciclo de reacción de las Ca^{2+} -ATPasas. La enzima (E) existe en dos estados conformacionales: el estado E1, con alta afinidad por Ca^{2+} y el E2 con baja afinidad. El ATP fosforila un residuo de ácido aspártico antes de la translocación del Ca^{2+} , produciendo un cambio conformacional al estado E2 y la liberación del Ca^{2+} al espacio extracelular o al lumen. (Adaptado de Carafoli y Brini 2000).

3. LA Ca^{2+} -ATPasa DEL RETÍCULO SARCOPLÁSMICO (SERCA)

La SERCA se descubrió en 1961 en fracciones del retículo sarcoplásmico (Hasselbach y Makinose 1961), en el que representa el 80-90% de la proteína total (Inesi 1972). Transporta 2 moles de Ca^{2+} desde el citoplasma al lumen de estos compartimentos, usando la energía de hidrólisis de 1 mol ATP en presencia de Mg^{2+} (Inesi 1987, Hao *et al.* 1994). El transporte de Ca^{2+} está acoplado a un cotransporte de H^+ , funcionando como una bomba electrogénica ($1\text{H}^+ : 1\text{Ca}^{2+}$) (Yu *et al.* 1993).

3.1 Estructura de la SERCA

Es una proteína transmembrana localizada en el retículo sarco(endo)plásmico, formada por 1001 aminoácidos y con una masa molecular de 110 kDa. La obtención de cristales de esta proteína (Toyoshima *et al.* 2000) ha permitido obtener una información más amplia sobre su estructura. Está compuesta por un dominio transmembranal (M) y tres dominios citosólicos (N, P y A) (Fig. 4) (Toyoshima *et al.* 2000, Inesi *et al.* 2008, Toyoshima 2008, Vangheluwe *et al.* 2009).

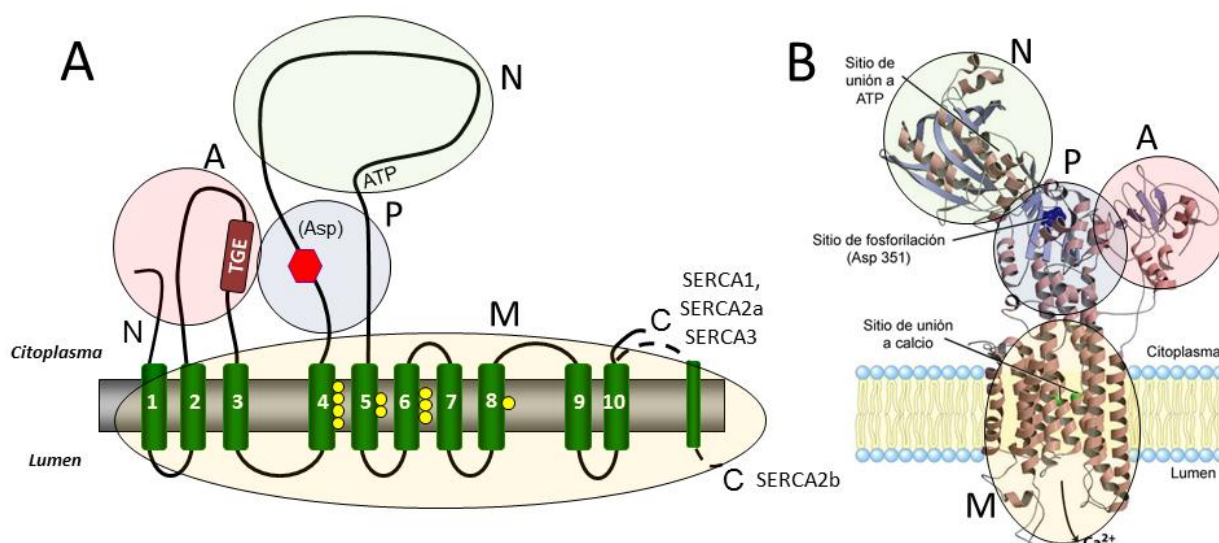


Figura 4 Estructura de la bomba de Ca²⁺ del retículo sarco(endo)plásmico SERCA. A: modelo de la SERCA en el que se muestran los dominios transmembrana (M), de fosforilación (P), de unión a nucleótidos (N) y accionador (A), así como los residuos implicados en la unión de iones Ca²⁺ (círculos amarillos). B: Representación tridimensional de la SERCA1 en la que se muestran los sitios de unión al ATP y al Ca²⁺ y el sitio de fosforilación (Adaptado de Sweadner y Donnet 2001, Vangheluwe *et al.* 2009).

El dominio M está formado por diez hélices transmembranales, que contienen los sitios de unión a iones Ca²⁺. El primer sitio de unión a Ca²⁺ está rodeado por las hélices M5, M6 y M8, mientras que el segundo sitio de unión está cercano a la hélice M4 (Toyoshima 2008). De los dominios citosólicos, el más grande es el dominio de unión a nucleótidos (N), que es el encargado de captar el ATP para la fosforilación de la enzima (Toyoshima *et al.* 2000). El segundo es el denominado dominio P, en el que aparece la secuencia ⁽³⁵¹⁾DKTGTLT⁽³⁵⁷⁾, muy conservada en todas las bombas de tipo P, y que cataliza la autofosforilación de la bomba en el residuo de aspártico durante el ciclo de reacción

(Jorgensen *et al.* 2001). Existe un tercer dominio citosólico, denominado accionador (A), cuya función es la de controlar el movimiento de la enzima durante los cambios conformacionales que se producen durante el ciclo catalítico. En este dominio está presente el motivo $^{(180)}TGE^{(182)}$ que participa en la desfosforilación de la proteína (Olesen *et al.* 2004).

3.2 Isoformas de la SERCA

La SERCA es el producto de una familia multigénica codificada por tres genes denominados *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3* en humanos y *atp2A1-3* en ratón. Codifican para las isoformas SERCA1, 2 y 3, y por procesamiento alternativo dan lugar a diferentes subisoformas (Fig. 5).

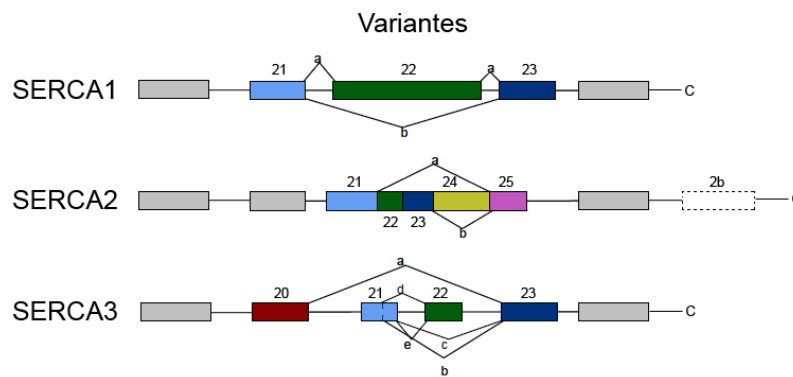


Figura 5 Variantes de las diferentes isoformas SERCA. Esquema en el que se muestra la diversidad de variantes existentes de las diferentes isoformas de la SERCA obtenidas por procesamiento alternativo. Adaptado de Wuytack *et al.* 2002.

- **SERCA1:** codificada por el gen *ATP2A1* da lugar, por procesamiento alternativo del transcrito primario, a las subisoformas SERCA1a y 1b. La SERCA1a es la isoforma predominante en el músculo de contracción rápida adulto, llegando a constituir casi el 90% de la proteína total del retículo sarcoplásmico de músculo esquelético (MacLennan *et al.* 1985). Por el contrario la SERCA1b, que es siete aminoácidos más larga que la 1a, se expresa solamente en el músculo de contracción rápida neonatal. Mutaciones en el gen de la SERCA1 se asocian con la enfermedad de Brody en humanos (Odermatt *et al.*

1996), una miopatía que produce rigidez y calambres en el músculo. La falta de esta isoforma en ratones *knockout* produce una contracción excesiva del diafragma que lleva a la muerte del animal por cianosis debido a una respiración insuficiente (Pan *et al.* 2003).

- **SERCA2:** el gen *ATP2A2* codifica para las variantes SERCA2a y SERCA2b. Ambas se diferencian en el dominio C-terminal (Fig. 5), teniendo la SERCA2b una secuencia extra que da lugar a un dominio transmembranal adicional, responsable de una mayor afinidad por Ca^{2+} (Verboomen *et al.* 1994). La SERCA2a se expresa en músculo esquelético de contracción lenta (MacLennan *et al.* 1985), es abundante en el músculo cardíaco (Lytton y MacLennan 1988) y en el músculo liso (Eggermont *et al.* 1989). Mutaciones de esta isoforma están implicadas en procesos de hipertrofia y fallo cardíaco (del Monte y Hajjar 2003), además la sustitución de esta isoforma por la SERCA2b produce malformaciones cardíacas y un aumento en el 40% en la mortalidad neonatal en ratones transgénicos (Ver Heyen *et al.* 2001). Por el contrario la SERCA2b es una isoforma prácticamente ubicua y la más abundante en el tejido nervioso (Salvador *et al.* 2001, Sepúlveda *et al.* 2004). Mutaciones en esta proteína están relacionadas con la enfermedad de Darier, caracterizada por la pérdida de adhesión entre las células epiteliales y una queratinización anormal de la piel y uñas (Sakuntabhai *et al.* 1999). Además se han descrito casos de desórdenes neuronales ligados a estas mutaciones en familias que padecen esta enfermedad (Jones *et al.* 2002).

- **SERCA3:** está codificada por el gen *ATP2A3* y tiene un alto número de subisoformas, denominadas SERCA3a-3f (Martin *et al.* 2002, Bobe *et al.* 2004). Se expresa a nivel de ARNm o de proteína, en tejido o células no musculares muy concretas, como plaquetas, mastocitos, células PC12, glándulas tiroidea y mamaria, células epiteliales, tráquea, glándulas salivares, placenta, células pancreáticas, células de

Purkinje y corteza cerebral o células de Sertoli (Bobe *et al.* 2005). Posee una inusual baja afinidad por Ca^{2+} (Lytton *et al.* 1992), sugiriendo que sirve para funciones celulares o fisiológicas muy específicas. De hecho se han encontrado diferencias, a nivel del ciclo catalítico, en la actividad enzimática de las SERCA3a, 3b y 3c humanas (Dode *et al.* 2002). Además, estudios recientes muestran la interacción de la SERCA3 con STIM1 (Lopez *et al.* 2008). La carencia de esta isoforma a nivel embrionario no es letal, pero en adultos puede estar relacionada con la pérdida de contracción del músculo liso vascular (Liu *et al.* 1997, Varadi *et al.* 1999) y de algunos tipos de diabetes tipo II (Varadi *et al.* 1999).

3.3 Regulación de la SERCA

La SERCA se regula funcionalmente por interacción con diversas proteínas, como la calreticulina, calnexina o Bcl-2 (Wuytack *et al.* 2002). Algunas isoformas, como las SERCA1 y SERCA2 pueden modularse, de forma reversible, por interacción con proteínas del retículo sarcoplásmico como el fosfolambano (6 kDa) o la sarcolipina (3,7 kDa) (James *et al.* 1989, Odermatt *et al.* 1998).

El inhibidor más específico de la SERCA es la tapsigargina, una lactona sesquiterpénica extraída de las raíces de *Thapsia garganica*. Tiene una afinidad muy alta por la bomba, alcanzando una K_d del orden de concentraciones subnanomolares (Sagara y Inesi 1991). Su mecanismo de acción está bien caracterizado, se une de forma estequiométrica a la fenilalanina 256, bloqueando a la bomba en el estado E2 de forma irreversible (Sagara *et al.* 1992). La SERCA además, como todas las bombas del tipo P, se inhibe por la acción del lantano (Wuytack y Raeymaekers 1992), ya que éste impide la formación del intermediario fosforilado de la proteína, así como por vanadato, a concentraciones superiores de 20 μM (Caroni y Carafoli 1981). Otros inhibidores de la actividad SERCA son el ácido

ciclopiazónico (CPA) (Seidler *et al.* 1989) y la 2,5-di-(tert-butyl)-1,4-benzohidroquinona (BHQ) (Inesi y Sagara 1994) o el tetrabromobisfenol A (TBBPA) (Ogunbayo y Michelangeli 2007) que bloquean a la bomba en el estado E2. También existen compuestos que bloquean a la bomba en el estado E1 como la curcumina, la quercetina, la paxilina o la flufirazina (Michelangeli y East 2011).

4. LA BOMBA DE Ca^{2+} DE LAS VÍAS SECRETORAS (SPCA)

La SPCA es una ATPasa que transporta Ca^{2+} con una estequiometría molar de 1 Ca^{2+} : 1 ATP (Wei *et al.* 2000), pero además puede transportar Mn^{2+} con una afinidad muy alta (Van Baelen *et al.* 2004). Está relacionada estrechamente con la proteína Pmr1 de *Saccharomyces cerevisiae* que no expresa la SERCA (Rudolph *et al.* 1989). Se han identificado homólogos de esta proteína en hongos, gusanos, insectos, mamíferos e incluso bacterias, lo que sugiere que la SPCA podría tratarse de la bomba de Ca^{2+} más antigua de las tres (Sorin *et al.* 1997). Recientemente se ha mostrado su presencia a nivel de expresión y funcional en el cerebelo de cerdo (Sepúlveda *et al.* 2007a). Su función transportando Ca^{2+} y Mn^{2+} parece ser importante en el procesamiento, plegamiento y glicosilación de proteínas (Oda 1992). Además, en levaduras ejerce un papel importante en la detoxificación de Mn^{2+} (Vangheluwe *et al.* 2009).

4.1 Estructura de la SPCA

La SPCA es similar a la SERCA en cuanto a su estructura primaria (Fig. 6). Además conserva residuos críticos para su funcionamiento, como los sitios de fosforilación y de unión al ATP. Su secuencia contiene unos 950 aminoácidos y su peso molecular es de

100 kDa. Por alineamiento de secuencias y construcción de modelos (Wuytack *et al.* 2002) se han podido identificar los 10 segmentos transmembranales y su similitud con la SERCA.

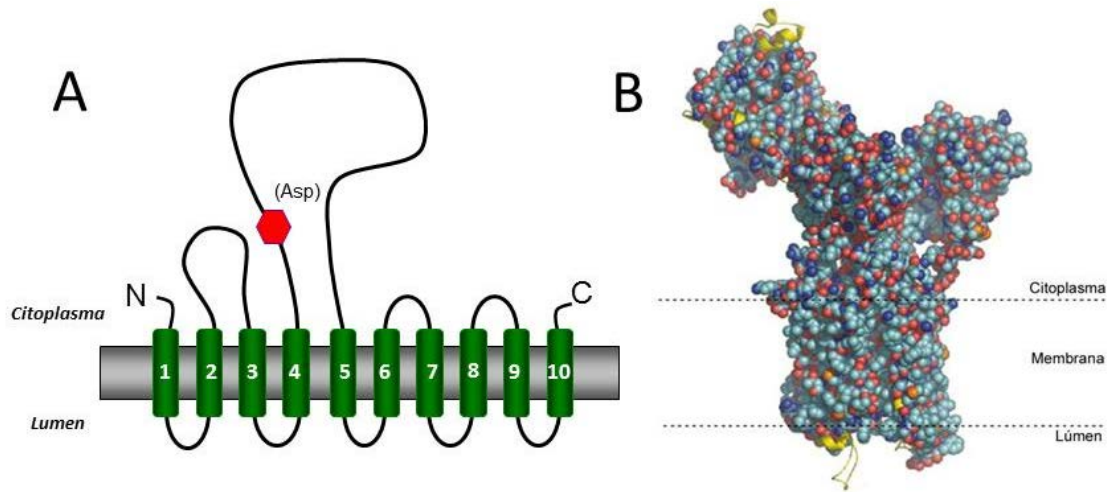


Figura 6 La bomba de Ca^{2+} de las vías secretoras SPCA. A: modelo de la SPCA en el que se muestra el residuo de fosforilación. B: Representación tridimensional de la estructura de la SPCA (bolas) en la que se compara con la SERCA (esqueleto amarillo) (Adaptado de Van Baelen *et al.* 2004).

4.2 Isoformas de la SPCA

Se conocen dos genes (*ATP2C1-2* en ratón) que codifican para las isoformas SPCA1 y 2.

- **SPCA1:** está codificada por el gen *ATP2C1*. Por procesamiento alternativo se han identificado cuatro variantes (SPCA1a-d) en humanos (Fairclough *et al.* 2003), y dos en ratón (SPCA1a-b) (Dode *et al.* 2007). La SPCA1 es la isoforma más abundante expresándose en prácticamente todos los tipos celulares (Vangheluwe *et al.* 2009). Se han descrito altos niveles de expresión de esta proteína en testículos (Wootton *et al.* 2004) y en el sistema nervioso del cerdo y del ratón (Sepúlveda *et al.* 2007a, Sepúlveda *et al.* 2008). Mutaciones de esta isoforma en humanos provocan la enfermedad de Hailey-Hailey, una patología caracterizada por la aparición de ulceraciones en la piel (Fairclough *et al.* 2003). Los ratones *knockout* para esta isoforma presentan letalidad embrionaria, (Okunade *et al.* 2007), que junto a su alta regulación durante el desarrollo del sistema nervioso (Sepúlveda *et al.* 2008), muestran la importancia de esta bomba en los procesos

de maduración celular. Además se ha observado una alteración de la expresión de los niveles de esta proteína en cerebros que han padecido el síndrome de isquemia-reperfusión (Lehotsky *et al.* 2009). Recientes estudios con cultivos de neuronas y glía de ratón procedentes del laboratorio donde se ha realizado esta Tesis, muestran un papel protector de la glía frente a la toxicidad del Mn^{2+} en las neuronas, revelando el posible papel de la SPCA1 en los procesos de detoxificación de Mn^{2+} en el sistema nervioso (Sepúlveda *et al.* 2012).

- **SPCA2:** esta isoforma está codificada por el gen *ATP2C2*. Se asemeja en un 60% a la SPCA1. Su distribución es más restringida que la de SPCA1, expresándose sobre todo en el intestino, la médula ósea, la tráquea y la próstata (Vanoevelen *et al.* 2005). Aunque se ha identificado en cultivos primarios de hipocampo de ratón (Xiang *et al.* 2005), su función fisiológica es aún discutida.

4.3 Regulación de la SPCA

La SPCA también se inhibe por vanadato, a concentraciones superiores a 10 μM (Wootton *et al.* 2004), y no es sensible a tapsigargina a concentraciones menores de 5 μM (Sorin *et al.* 1997). Estas características permiten discriminarla de las actividades enzimáticas de la PMCA y la SERCA y por tanto determinar su contribución a la actividad ATPasa total en extractos crudos de membrana o en extractos celulares (Sepúlveda *et al.* 2007a). Es menos sensible que la SERCA a la inhibición por ácido ciclopiazónico (CPA) o 2,5-di-(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinona (BHQ) (Missiaen *et al.* 2002).

5. LA BOMBA DE Ca^{2+} DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA (PMCA)

La PMCA es una proteína transmembrana de 1200 aminoácidos y unos 140 kDa de peso molecular. Utiliza la energía de hidrólisis de 1 mol de ATP en presencia de Mg^{2+} para transportar 1 mol de Ca^{2+} hacia el exterior de la célula (Carafoli 1994, Salvador y Mata 1998). En el cerebro de cerdo se ha mostrado que también transporta H^+ hacia el citosol. Este transporte electrogénico presenta una estequiometría molar de 0,6 H^+ : 1 Ca^{2+} y un potencial de membrana de 20 mV (Salvador *et al.* 1998). Es el único transportador de Ca^{2+} de alta afinidad de la membrana plasmática, realizando un ajuste fino de la concentración del Ca^{2+} intracelular respecto al exterior. Está presente en la mayoría de las células eucariotas, pero en un porcentaje relativamente bajo, en torno al 0,1% del total de proteínas de la membrana (Garrahan y Rega 1990).

5.1 Estructura de la PMCA

Su topología está organizada en diez dominios transmembranales unidos por cadenas polipeptídicas sencillas y tres dominios citosólicos principales (Fig. 7): un dominio de transducción (A), un dominio catalítico (P) y un dominio regulador (N):

- Dominio de transducción o dominio A: está situado entre los dominios transmembranales 2 y 3, contiene una de las dos regiones de unión a fosfolípidos ácidos, uno de los dos sitios de interacción con el dominio regulador y el sitio A de procesamiento alternativo (Strehler y Zacharias 2001).
- Dominio catalítico o dominio P: se sitúa entre las regiones transmembranales 4 y 5, contiene el sitio de unión de ATP y el sitio de fosforilación, formándose un aspartil fosfato. Se ha descrito una región donde se encuentra el segundo sitio de interacción con el dominio regulador (Strehler y Zacharias 2001, Di Leva *et al.* 2008).

- Dominio regulador o dominio N: también llamado autoinhibidor o dominio de unión de calmodulina. Se encuentra en la secuencia carboxilo terminal que se localiza en el citosol, y contiene distintos sitios de unión a moléculas implicadas en la regulación de la bomba, entre los que destacan los de unión a la calmodulina y a fosfolípidos ácidos (Strehler y Zacharias 2001). La PMCA, a concentraciones basales de Ca^{2+} intracelular, está autoinhibida. En este estado el dominio regulador establece contactos intramoleculares con el receptor del dominio de unión a calmodulina, que se encuentra dividido entre los dominios de transducción y catalítico (Enyedi *et al.* 1987, James *et al.* 1988, Falchetto *et al.* 1991, Falchetto *et al.* 1992, Di Leva *et al.* 2008). Sin embargo, cuando la concentración de Ca^{2+} aumenta, el ión activa a la calmodulina y ésta se une al dominio autoinhibidor de la PMCA desplazándolo del sitio catalítico, con lo cual activa a la ATPasa y permite que el Ca^{2+} entre en su sitio y sea transportado (Di Leva *et al.* 2008). En este mismo dominio se localiza la región de unión a proteínas con dominios PDZ, como las proteínas de la familia de las MAGUK, que participan en el reclutamiento de proteínas implicadas en señalización celular (DeMarco y Strehler 2001). También se encuentra el sitio C de procesamiento alternativo, los sitios de fosforilación de las proteínas quinasas A y C, así como un segundo dominio autoinhibidor que es activado por el etanol (Sepúlveda y Mata 2004).

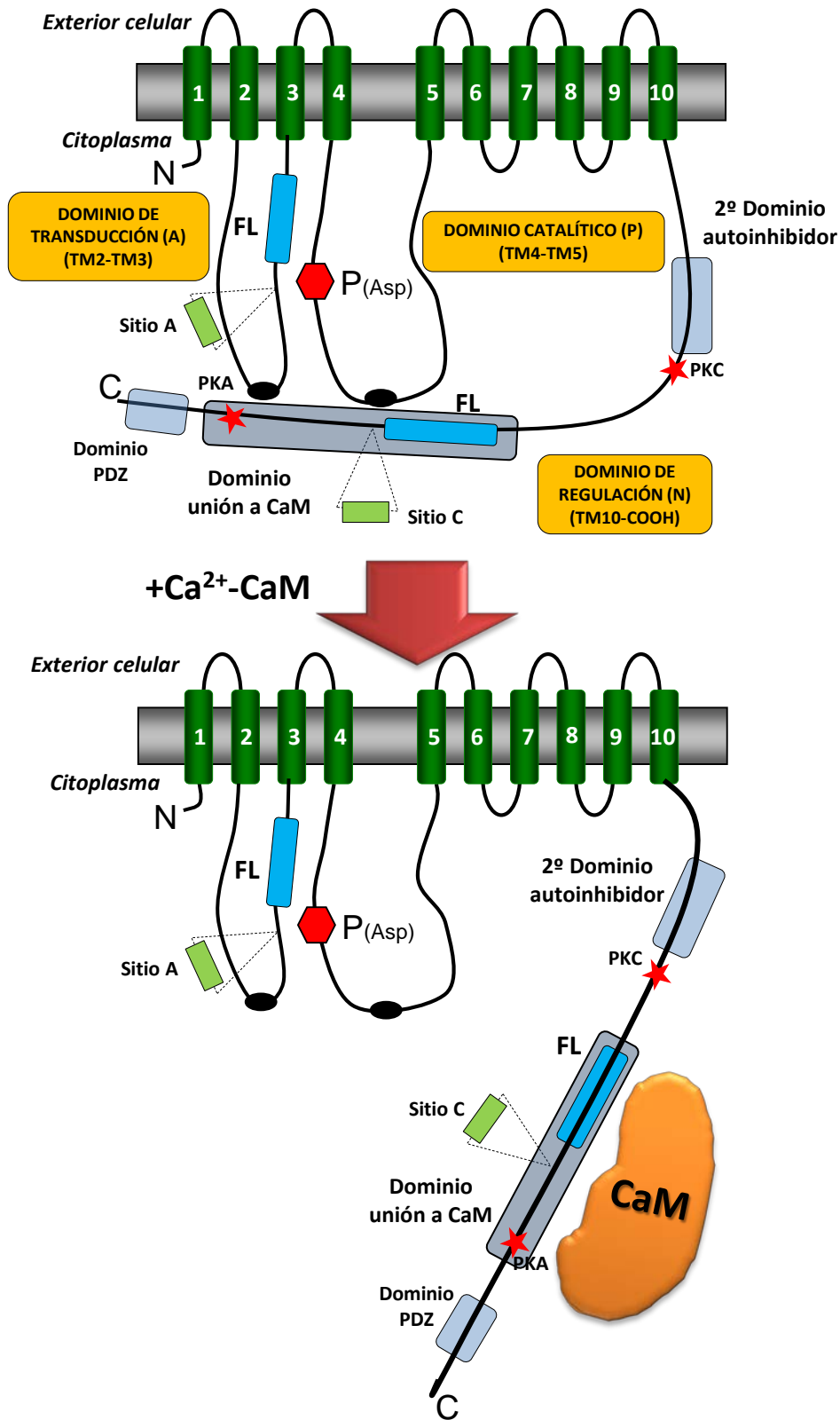


Figura 7 Estructura de la bomba de Ca²⁺ de la membrana plasmática PMCA. Representación esquemática de la PMCA mostrando los dominios de transducción, catalítico y de regulación, así como la interacción con calmodulina y el desplazamiento del dominio autoinhibidor. P: sitio de fosforilación, FL: sitio de unión a fosfolípidos, PKA/C: sitio de fosforilación de las proteínas quinasa A y C (adaptado de Strehler y Zacharias 2001).

5.2 Isoformas de la PMCA

Se han identificado cuatro genes denominados *ATP2B1-4* en humanos y *atp4B1-4* en ratón, que codifican para las isoformas PMCA1, PMCA2, PMCA3 y PMCA4. Por procesamiento alternativo, en los sitios A y C se producen más de veinte variantes (Fig. 8) (Strehler y Zacharias 2001, Strehler *et al.* 2007a, Strehler *et al.* 2007b). La región más variable entre las isoformas se localiza hacia el extremo N-terminal, y comprende unos 80-90 aminoácidos (Di Leva *et al.* 2008). La diversidad en cuanto a la localización, distribución y regulación de estas variantes explica su necesidad para responder a diferentes demandas de Ca^{2+} en tejidos concretos y dominios subcelulares específicos (Domi *et al.* 2007).

- **PMCA1:** está codificada por el gen *ATP2B1* obteniéndose, por procesamiento alternativo, un total de cinco variantes, las PMCA1a-e. Se encuentra ampliamente distribuida en la mayor parte de tejidos, especialmente el cerebro, pulmón y el intestino (Greeb y Shull 1989, De Jaegere *et al.* 1990, Howard *et al.* 1993, Stauffer *et al.* 1995), aunque también depende del desarrollo y tipo celular. Se expresa frecuentemente junto a la PMCA4 y otras isoformas (Prasad *et al.* 2007). Estudios con ratones *knockout* para PMCA1 han mostrado que su falta provoca letalidad embrionaria (Okunade *et al.* 2004).

- **PMCA2:** está codificada por el gen *ATP2B2*, y por procesamiento alternativo en los sitios A y C da lugar a las variantes w, x, z y a, b, c, respectivamente. Tiene una distribución más restringida pero se expresa a altos niveles en las células ciliadas del órgano de Corti (Furuta *et al.* 1998, Dumont *et al.* 2001), en el sistema nervioso (Stauffer *et al.* 1995, Strehler y Zacharias 2001, Sepúlveda *et al.* 2007b) y en la glándula mamaria (Reinhardt *et al.* 2000). Estudios previos han demostrado que ratones *knockout* y ratones con mutaciones específicas presentaban problemas de sordera y equilibrio (Kozel *et al.* 2002, Kozel *et al.* 1998, Bortolozzi *et al.* 2010). La alteración en los niveles de expresión

de esta isoforma en células mamarias epiteliales produce una desestabilización de la proliferación celular conduciendo a la apoptosis o a la progresión del cáncer de mama (VanHouten *et al.* 2010). En humanos, mutaciones de la secuencia de esta proteína se han relacionado con un tipo de sordera hereditaria (Schultz *et al.* 2005, Ficarella *et al.* 2007).

- **PMCA3:** la codifica el gen *ATP2B3* y por procesamiento alternativo da lugar a las subisoformas x, z en el sitio A y a, b, c en el sitio C. Se expresa en el sistema nervioso, el músculo esquelético y el riñón (Di Leva *et al.* 2008). Recientemente se ha identificado en células cancerígenas pancreáticas una mutación sin sentido en el gen de la PMCA3 que causa la sustitución T543M (Jones *et al.* 2008).

- **PMCA4:** está codificada por el gen *ATP2B4*, existiendo variantes en el sitio A (x, z) y en el sitio C (a, b, d). Se expresa en la mayoría de las células y los tejidos, y especialmente en los eritrocitos y en el sistema nervioso (Stauffer *et al.* 1993, Keeton y Shull 1995). Observaciones en ratones con mutaciones para esta proteína (PMCA4^{-/-}) revelaron una falta de contracción de la vena porta (Okunade *et al.* 2004). Además los ratones *knockout* para esta isoforma presentan una viabilidad normal pero una pérdida de fertilidad por una disminución en la movilidad de los espermatozoides (Okunade *et al.* 2004, Schuh *et al.* 2004).

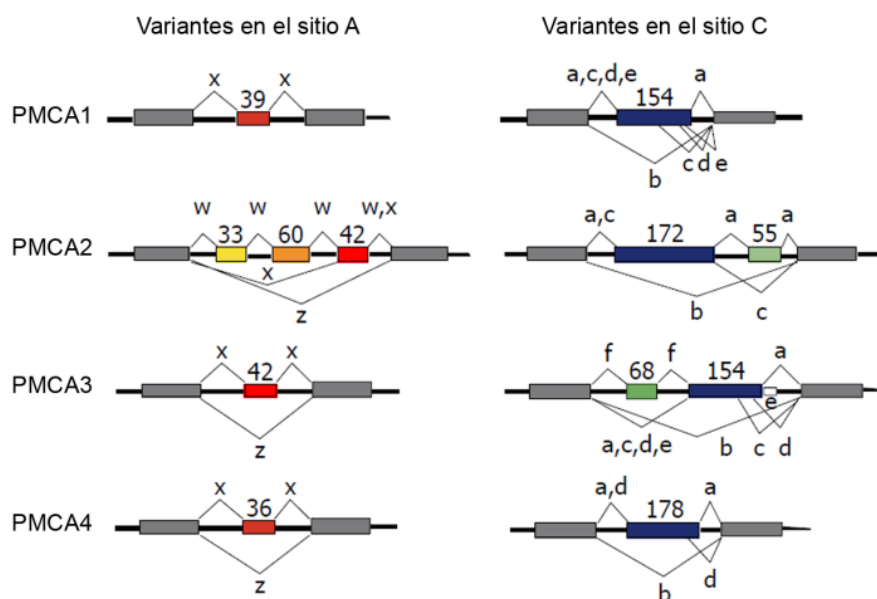


Figura 8 Variantes de las diferentes isoformas de la PMCA. Se muestra la diversidad de variantes de las isoformas de la PMCA obtenidas por modificaciones post-transcripcionales en los sitios A y C. Adaptado de Strehler 2011.

5.3 Regulación de la PMCA

La PMCA es una proteína que se caracteriza por estar altamente regulada.

- **Calmodulina:** es el principal regulador de la actividad de la PMCA (Gopinath y Vincenzi 1977, Jarrett y Penniston 1977, Di Leva *et al.* 2008). Es una proteína de 17 kDa que está presente en todas las células eucariotas y posee cuatro sitios de unión de alta afinidad por Ca^{2+} . Cuando la concentración de Ca^{2+} en la proximidad de la bomba es baja (menor de 50-100 nM), la PMCA se encuentra parcialmente autoinhibida por plegamiento del dominio regulador sobre el sitio catalítico (Di Leva *et al.* 2008). Cuando las concentraciones de Ca^{2+} incrementan y activan a la calmodulina, ésta interacciona con el dominio regulador, desplazándolo y dejando de esta forma libre el sitio activo de la bomba, logrando así incrementar considerablemente la afinidad de la PMCA por Ca^{2+} (disminución de la K_d de 10-20 μM hasta $<1 \mu\text{M}$) y por tanto su actividad enzimática (Carafoli 1994) (Fig. 7). Su alta afinidad por calmodulina se utiliza para

purificar la proteína a partir de preparaciones de membranas solubilizadas (Salvador y Mata 1996).

- **Fosfolípidos:** el entorno lipídico juega un papel muy importante en la función de la PMCA, siendo los reguladores funcionales más importantes junto a la calmodulina (Niggli *et al.* 1981). La PMCA se activa en presencia de fosfolípidos ácidos que se unen a la proteína por dos sitios diferenciados, localizados en los dominios de transducción (Zvaritch *et al.* 1990) y de unión de la calmodulina (Brodin *et al.* 1992) y la activan mediante un cambio conformacional. Cuando la proteína purificada se reconstituye en fosfatidilserina (PS) el dominio de unión a calmodulina se abre completamente, haciendo que su K_d (Ca^{2+}) alcance valores en torno a 100 nM y por tanto la PMCA no se activa posteriormente por unión de la calmodulina. En cambio, en presencia de un fosfolípido neutro como la fosfatidilcolina (PC) la conformación de la proteína cambia. El dominio de unión a calmodulina se encuentra plegado sobre el dominio catalítico y por tanto la actividad de la PMCA es baja. Sin embargo, aumenta en presencia de calmodulina, ya que desplaza su dominio de unión del dominio catalítico. (Enyedi *et al.* 1987, Salvador y Mata 1996, Sepúlveda y Mata 2004).

- **Proteasas:** la PMCA puede activarse por eliminación de su dominio autoinhibidor mediante la acción proteolítica controlada de tripsina, calpaína y quimotripsina (Padanyi *et al.* 2003, Sepúlveda y Mata 2004). La proteólisis controlada justo por encima del dominio de unión a la calmodulina activa a la bomba de forma irreversible haciéndola insensible a la activación por calmodulina. Este mecanismo de activación podría jugar un papel importante en condiciones patológicas en las que se necesitasen altas demandas de exportación de Ca^{2+} (Zurini *et al.* 1984, Salamino *et al.* 1994).

- **Proteínas quinasas A y C:** constituyen otro mecanismo de activación de la PMCA. El dominio de regulación es muy rico en residuos de serina, treonina y tirosina, todos ellos dianas de la fosforilación por proteínas quinasas A y C. Esta fosforilación

incrementa la afinidad de la PMCA por Ca^{2+} y su velocidad máxima (Zylinska *et al.* 1998).

- **Oligomerización:** ensayos *in-vitro* realizados con la enzima purificada mostraron que, a concentraciones superiores a 10-20 μM , ésta se activaba por auto-asociación a través del dominio de unión a calmodulina y del receptor del dominio de calmodulina (Kosk-Kosicka y Bzdega 1988, Levi *et al.* 2000). Estos estudios presentan los dímeros como nivel de agregación y como un mecanismo de protección de la enzima frente a la desnaturalización espontánea (Levi *et al.* 2002), aunque se discute su existencia fisiológica dado el bajo nivel de expresión que tiene esta proteína en la célula (0,1-0,01% de la proteína total).

- **Etanol:** estudios del efecto del etanol sobre la PMCA purificada de cerebro de cerdo han mostrado evidencias de la existencia de un segundo dominio autoinhibidor próximo al dominio de unión de la calmodulina en la secuencia C-terminal (Mata y Sepúlveda 2010, Sepúlveda y Mata 2004). El etanol podría interactuar directamente con este dominio, desplazándolo y estimulando la actividad de la PMCA de forma adicional a la estimulación por calmodulina.

- **Inhibidores:** el inhibidor más específico de la PMCA que se conoce es el vanadato, que la inhibe a concentraciones menores de 10 μM (Caroni y Carafoli 1981). Este compuesto puede inhibir también a la SERCA, pero a concentraciones superiores a 20 μM . Esta característica puede usarse para discriminar selectivamente ambas bombas a nivel funcional. Como todas las bombas de tipo P, también se inhibe por La^{3+} (Di Leva *et al.* 2008, Brini y Carafoli 2009). Otros inhibidores de la actividad PMCA son el ácido ciclopiazónico (CPA), la 2,5-di-(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinona (BHQ) (Salvador y Mata 1998), la espermina (Palacios *et al.* 2003) y la tioridacina, aunque ésta última activa la velocidad de transporte de Ca^{2+} por la PMCA (Palacios *et al.* 2004). Recientemente están apareciendo péptidos sintéticos derivados de la familia de la caloxina que parecen inhibir

específicamente a la PMCA (Szewczyk *et al.* 2008), teniendo un efecto dependiente de isoforma. Así, la caloxina 1C2 tiene alta afinidad por la isoforma 4 ($K_i = 2,35$ mM) en comparación con la K_i para el resto de isoformas que es 10 veces superior (Pande *et al.* 2008). También se ha descrito una inhibición específica de las isoformas 1 y 3 de la PMCA por parte de las proteínas 14-3-3, implicadas en procesos de señalización celular, regulación del ciclo celular, transcripción o apoptosis (Linde *et al.* 2008).

6. MICRODOMINIOS LIPÍDICOS “RAFTS” DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

Las membranas celulares contienen dominios discretos de composición muy específica denominados microdominios lipídicos o “rafts” (Simons y Ikonen 1997) o membranas insolubles en detergentes (*detergent resistant membranes*, DRM). Estos microdominios están enriquecidos en colesterol y esfingolípidos (Fig. 9) y les confiere una estructura de cristal líquido ordenado que los hace resistentes a la extracción con detergentes y permite aislarlos por ultracentrifugación en gradientes de densidad (Arni *et al.* 1998, London y Brown 2000, Sepúlveda *et al.* 2006). Los “rafts” están siendo objeto de investigación reciente debido a su implicación en muchos procesos celulares al actuar como plataforma que agrupan diferentes complejos proteicos implicados en la transducción de señales, incluyendo la señalización por Ca^{2+} (Simons y Ikonen 1997, Brown y London 2000, Simons y Toomre 2000, Pike 2003, Simons y Vaz 2004).

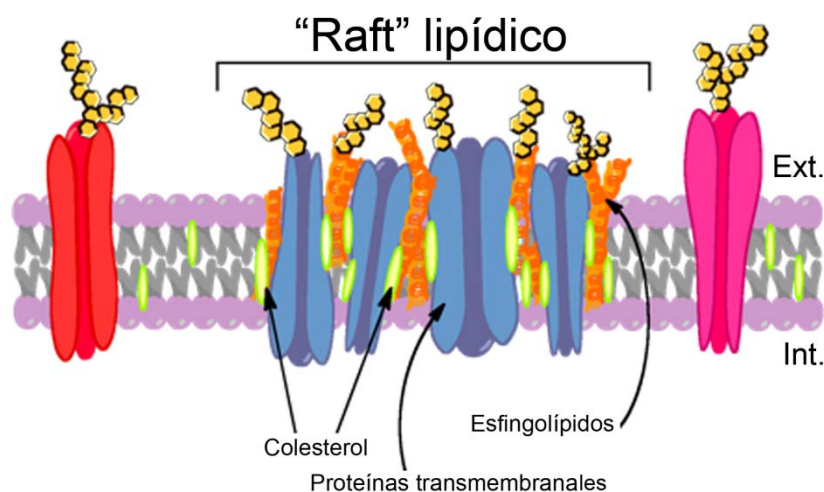


Figura 9 Representación esquemática de un dominio lipídico en la membrana plasmática.

En los últimos años se ha descrito la relevancia de los “rafts” en el sistema nervioso. Así, en las dendritas de las neuronas se han encontrado “rafts” que agrupan una gran variedad de complejos proteicos postsinápticos. De hecho su disrupción se traduce en una reducción de las sinapsis excitatorias e inhibitorias y en una pérdida de las espinas dendríticas, entre otros procesos (Hering *et al.* 2003). En nuestro laboratorio se han realizado estudios en el cerebelo de cerdo que han puesto de manifiesto la localización específica de la isoforma 4 de la PMCA en estos microdominios (Sepúlveda *et al.* 2006). También se ha observado la asociación de la bomba SPCA1 a estas regiones de membrana en células HT29 (adenocarcinoma de colon humano) (Baron *et al.* 2010). Estos resultados sugieren una posible implicación de las bombas de Ca^{2+} en funciones que van más allá del mero transporte de Ca^{2+} . Además existen numerosas evidencias que muestran la implicación de los “rafts” en enfermedades neurodegenerativas como prion-patías (Vey *et al.* 1996, Legname *et al.* 2002), ataxia cerebelosa (Fallon *et al.* 2002, Caputo *et al.* 2009), o la enfermedad de Alzheimer (Lee *et al.* 1998, Parkin *et al.* 1999, Mahfoud *et al.* 2002, Molander-Melin *et al.* 2005).

Estas evidencias ponen de manifiesto la importancia de profundizar en el estudio de los “rafts” y las Ca^{2+} -ATPasas en un área tan importante en los procesos de memoria y por tanto en la enfermedad de Alzheimer, como es el hipocampo.

7. EL HIPOCAMPO COMO MODELO DE ESTUDIO

El sistema nervioso central está formado por el encéfalo y la médula espinal (Fig. 10). Dentro del encéfalo el hipocampo es un área implicada en los procesos de memoria y aprendizaje y se encuentra altamente afectada en los procesos neurodegenerativos, siendo muy interesante como objeto de estudio (Castellani *et al.* 2010).

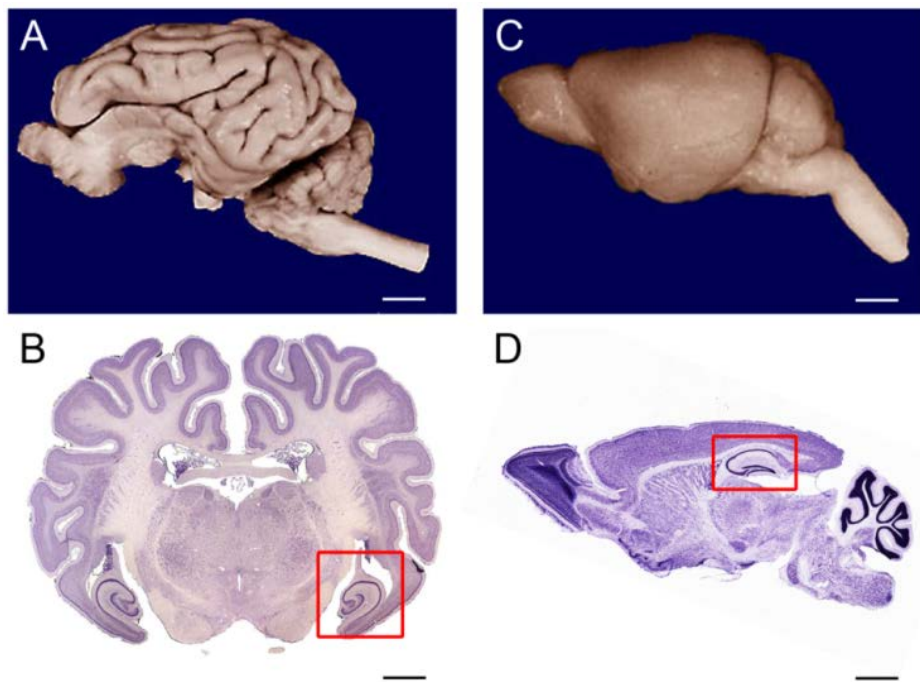


Figura 10 Sistema nervioso central del cerdo y del ratón. A: visión lateral del encéfalo de cerdo adulto *Sus scrofa*. B: sección transversal de un cerebro de cerdo teñido con cresil violeta en la que se resalta la localización del hipocampo. C: visión lateral del encéfalo de ratón adulto *Mus musculus* (P30). D: sección sagital de un cerebro de ratón teñido con cresil violeta en la que se destaca el hipocampo. Barras de escala: A, 1 cm; B, 0,3 cm; C, 0,2 cm; D, 0,15 cm. Fuentes: A, B y C Comparative Mammalian Brain Collection; University of Wisconsin, Michigan State University, National Museum of Health and Medicine y Medicine National Science Foundation. D: <http://www.brainmaps.org>.

7.1 Organización histológica del hipocampo

La formación hipocámpica es una estructura cerebral que está formada por cuatro regiones diferenciadas citoarquitectónicamente y que están conectadas de forma unidireccional: el cuerno de Amón, el giro dentado (separados por la fisura hipocámpal), el subículo o complejo subicular y la corteza entorrinal (Amaral y Witter 1989) (Fig. 11 y 12).

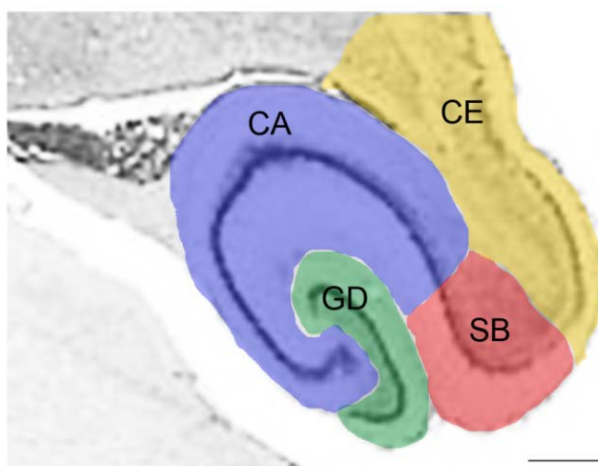


Figura 11 División del hipocampo por áreas. Micrografía del hipocampo de un cerdo adulto teñido con la tinción de Nissl en el que se muestran las diferentes áreas. CE: corteza entorrinal; SB: complejo subicular o subículo; CA: cuerno o asta de Amón; GD: giro dentado. Barra de escala: 2800 μm Adaptado de <http://www.brainmaps.org>.

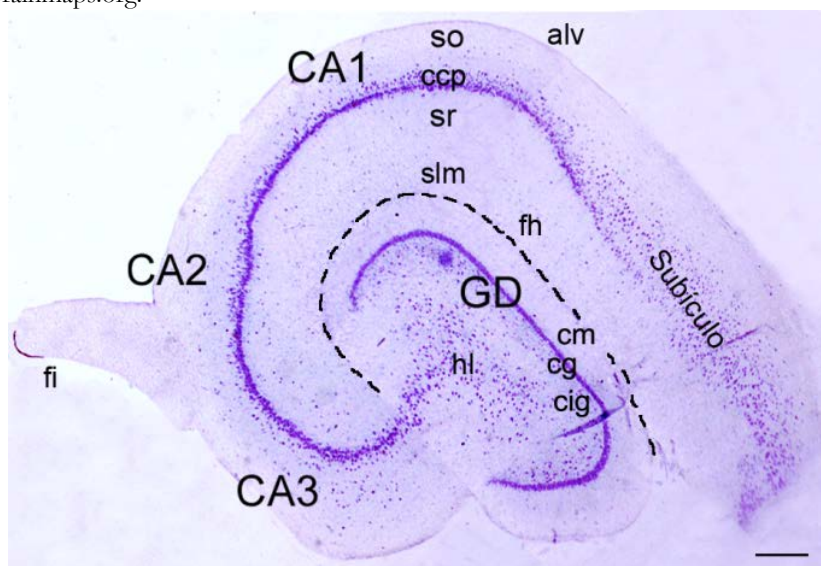


Figura 12 Estructura del hipocampo de cerdo adulto. Micrografía de un hipocampo de cerdo adulto teñido con azul de toluidina en el que se muestran las distintas áreas y capas. Se observa la región final del *subiculum*, las regiones CA1, 2 y 3 del cuerno de Amón y el giro dentado (GD). alv: *alveus*; so: *stratum oriens*; ccp: capa de las células piramidales; sr: *stratum radiatum*; slm: *stratum lacunosum-moleculare*; fh: fisura hipocámpal; cm: capa molecular; cg: capa granular; cig: capa infragranular; hl: *hilus*; fi: fimbria. Barra de escala: 685 μm .

- **El cuerno de Amón (*Cornu Ammonis*; CA):** está dividido en tres áreas, CA1, CA2 y CA3 (Lorente de Nó 1934). La zona más alejada del giro dentado se denomina CA1 y está formada por células piramidales pequeñas altamente empaquetadas. La zona más proximal, formada por las regiones CA2 y CA3, es rica en células piramidales cuyo soma es de mayor tamaño. Las distintas áreas están estratificadas, es decir que en ellas pueden distinguirse diferentes capas (Fig. 13). Así, en la capa más externa encontramos un estrato muy rico en fibras o sustancia blanca llamado *álvelus*, compuesto mayoritariamente por axones eferentes del hipocampo que proceden de las neuronas piramidales y en menor grado de los axones de algunas células aisladas de otras capas y del giro dentado. También pueden encontrarse algunos axones aferentes, pero en una proporción muy baja. A continuación se encuentra una capa estrecha, el *stratum oriens*, formada esencialmente por las dendritas basales de las células piramidales. En este estrato también hay interneuronas aisladas, llamadas células de los cestos, que son de carácter inhibitorio. Éstas realizan sinapsis axo-somáticas con las células piramidales y se excitan por colaterales emitidos por piramidales vecinas. Tras esta capa se puede identificar la **capa de las células piramidales**, una región bien definida con células de tipo piramidal compuesta por somas grandes y pequeños. La cara basal de estas células, junto con sus neuritas basales y el axón se proyecta hacia el *stratum oriens*. Seguidamente, hacia el interior de la estructura, se localiza el *stratum radiatum* que está formado por la región proximal de las neuritas apicales de las neuronas piramidales. Algunos autores describen en la parte más interior (cercana a la fisura hipocampal) otra región denominada *stratum lacunosum-moleculare*, que contiene las ramificaciones más distales y profusas de las dendritas apicales de las neuronas piramidales (Burwell *et al.* 1995).

A todo el conjunto de neuritas, fibras y prolongaciones que conforman los diferentes estratos y que por microscopía óptica se observa como una red homogénea, se le denomina neuropilo.

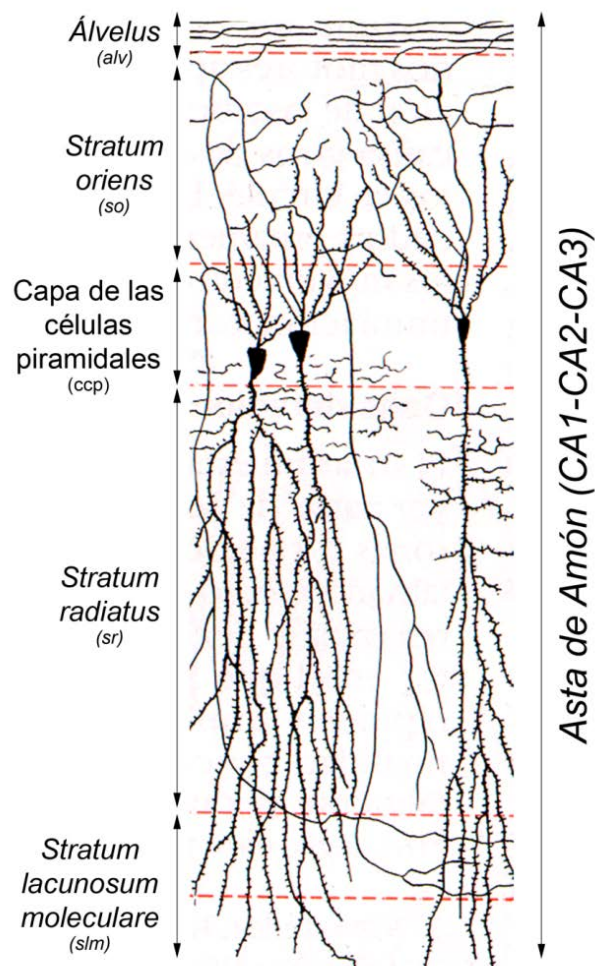


Figura 13 División en capas del asta de Amón del hipocampo. Dibujo elaborado a partir de un corte de hipocampo adulto en el que se muestran las diferentes capas del asta de Amón. Adaptado de Atlas de Anatomía para estudiantes y médicos (Tomo III) Sistema nervioso y órganos de los sentidos. W. Kahle, H. Leonhardt, W. Platzer. (1988). Ed. Omega, Barcelona.

- **El giro dentado (GD):** está formado por una capa de somas pequeños densamente empaquetados en columnas, denominada **capa de las células granulares**. Estas neuronas son de naturaleza glutamatérgica y poseen axones basales denominados fibras musgosas que proyectan hacia la capa CA3 del cuerno de Amón. En la capa más cercana a la **fisura hipocampal**, llamada **capa molecular**, se localizan las prolongaciones dendríticas apicales de las neuronas granulares, algunas interneuronas y

células gliales. La capa más profunda del giro dentado, denominada **capa polimórfica** o **hilus** se caracteriza por su naturaleza polimórfica, compuesta por una gran variedad de tipos celulares, entre las cuáles las células musgosas son mayoritarias (Amaral 1978, Ribak *et al.* 1985, Amaral y Witter 1989). Entre la capa granular y el *hilus* se encuentra una capa de grosor variable, dependiendo de la especie, denominada **capa infragranular**, compuesta por precursores neurales que poseen actividad proliferativa durante la vida adulta (Altman y Das 1965, Kaplan y Bell 1984, Altman y Bayer 1990, Seri *et al.* 2001).

- **El subículo:** es la zona de tránsito entre la corteza entorrinal y el asta de Amón donde el número de capas celulares se van reduciendo progresivamente desde la corteza hasta el asta de Amón.

- **La corteza entorrinal:** es la parte más exterior, continuación de la corteza cerebral, y está dividida en seis capas bien definidas. Las capas II y III están compuestas por los somas de pequeño tamaño de células que envían sus axones para otras áreas hipocámpicas. Las capas I y IV son acelulares. Las capas V y VI están formadas por neuronas grandes que envían sus axones hacia fuera de la formación hipocámpica.

7.2 Conexiones del hipocampo

La formación hipocámpica posee un circuito excitador compuesto por tres sinapsis que comienza en la corteza entorrinal (Burwell *et al.* 1995). Las células de las capas II y III envían sus axones hacia el giro dentado y el hipocampo propio a través de la vía perforante (Fig. 14A) atravesando la capa de células piramidales del *subiculum* (Amaral y Witter 1989, Witter y Amaral 1991). Éstas hacen contacto sináptico con las arborizaciones dendríticas de las neuronas granulares del giro dentado que proyectan sus axones basales, llamados fibras

musgosas, hacia la región proximal de las dendritas de las neuronas piramidales de la CA3, atravesando el *hilus* (Fig 14A/14B) (Blackstad y Kjaerheim 1961, Amaral 1979, Chicurel y Harris 1992).

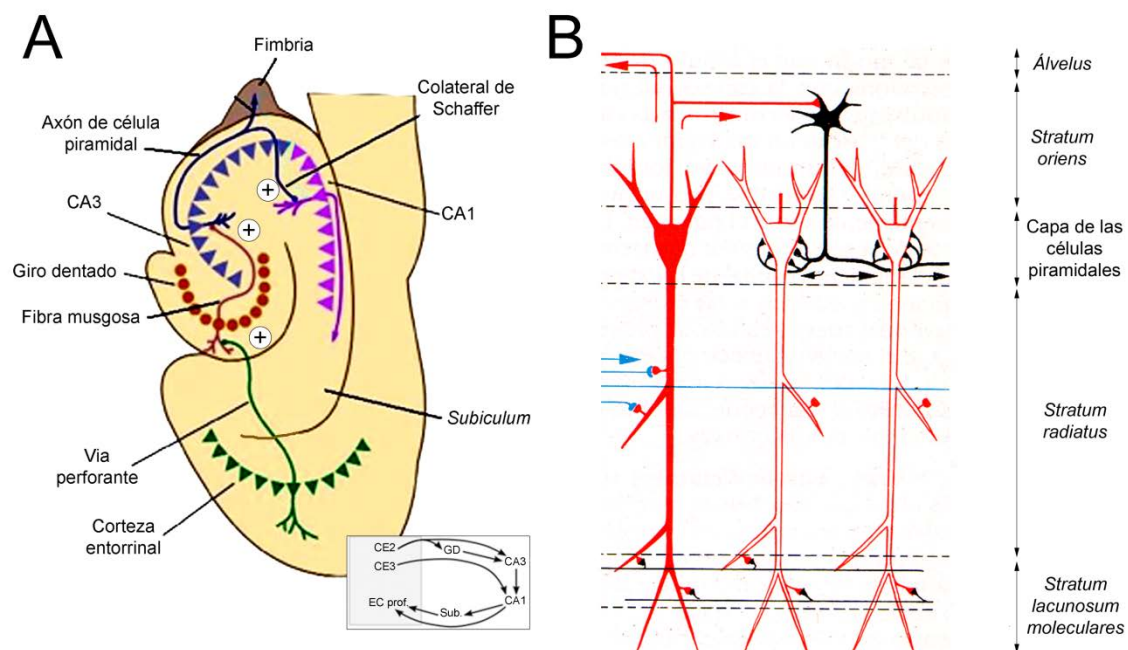


Figura 14 Circuito de conexiones en el hipocampo. A: esquema en el que se muestran las conexiones del circuito hipocámpico desde la vía perforante que procede de la región entorrinal pasando por las fibras musgosas y los colaterales de Schaffer. B: esquema en el que se representan en detalle las conexiones en el asta de Amón. En rojo se representan las vías eferentes procedentes de las células piramidales. Se observa como éstas emiten colaterales que excitan las células de los cestos de carácter inhibitorio. En azul se muestran las conexiones de las fibras musgosas procedentes del giro dentado y en negro los colaterales de Schaffer. Adaptado del Atlas de Anatomía para estudiantes y médicos (Tomo III) Sistema nervioso y órganos de los sentidos. W. Kahle, H. Leonhardt, W. Platzer. (1988). Ed. Omega, Barcelona.

Las neuronas piramidales de la CA3 proyectan sus axones hacia las dendritas de las neuronas piramidales de la CA1 mediante ramificaciones de éstos llamadas colaterales de *Schaffer* (Fig. 14A), donde hacen sinapsis con la región distal de la arborización dendrítica de estas neuronas (Fig 14B). La información integrada en el hipocampo sale de éste hacia otras áreas del cerebro a través de la fimbria, que es la principal conexión externa de la formación hipocámpica y establece conexión con el *septum*. Las células granulares del giro dentado no proyectan hacia fuera de la formación hipocámpica, sin embargo reciben axones procedentes del hipotálamo (Swanson 1977, Vertes 1992). Las neuronas de la CA3 envían sus axones fuera de la formación hipocámpica únicamente a la región septal (Burwell *et al.*

1995). Por el contrario, las neuronas de la CA1 poseen proyecciones mayoritariamente hacia la región septal, pero también hacia otras regiones de la corteza cerebral, así como hacia el bulbo olfatorio, la amígdala y el hipotálamo (Jay *et al.* 1989, van Groen y Wyss 1990).

8. LA CORTEZA CEREBRAL Y EL CEREBELO

8.1 La corteza cerebral

La corteza cerebral se localiza en la parte más externa del cerebro (Fig. 15) y desempeña un papel fundamental en los procesos cognitivos, del lenguaje y la memoria.

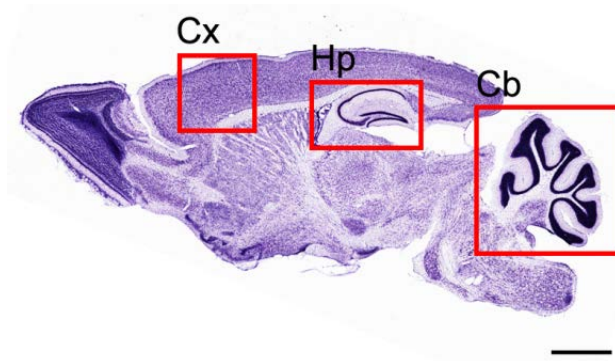


Figura 15 Corte parasagital del encéfalo de ratón adulto. Sección sagital de un cerebro de ratón teñido con cresil violeta en la que se destaca el hipocampo (Hp), la corteza (Cx) y el cerebelo (Cb). Barra de escala 0,15 cm. Fuente: <http://www.brainmaps.org>.

En los mamíferos superiores, como el cerdo o el humano, la corteza se repliega dando lugar a circunvoluciones, pero en otras especies como el ratón, estos pliegues son inexistentes. Está subdividida en seis capas citoarquitectónicamente diferenciables por su densidad celular, espesor y por las conexiones que establecen (Fig. 16) y que se nombran desde la parte más externa:

- **Capa I o capa molecular o plexiforme:** formada por las prolongaciones dendríticas apicales de las neuronas de capas más profundas y algunas neuronas dispersas.

- **Capa II o capa granular externa:** compuesta por neuronas piramidales pequeñas y células estrelladas. Sus prolongaciones dendríticas acaban en la capa I y los axones en capas más profundas.

- **Capa III o capa piramidal externa:** contiene células piramidales y células estrelladas.

- **Capa IV o capa granular interna:** contiene distintos tipos de células estrelladas.

- **Capa V o capa piramidal interna:** en ella abundan las células piramidales muy grandes y es la principal fuente de eferencias.

- **Capa VI o capa multiforme:** se caracteriza por la presencia de abundantes células fusiformes y piramidales modificadas.

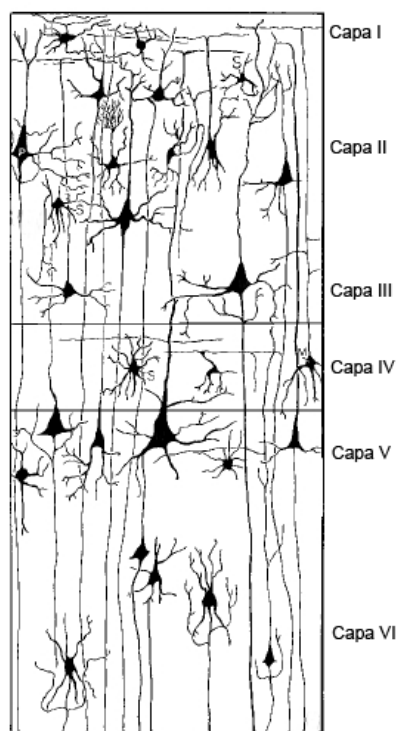


Figura 16 División de la corteza cerebral en capas. Dibujo elaborado a partir de un corte de corteza teñido por el método de Golgi. Adaptado del Atlas de Anatomía para estudiantes y médicos (Tomo III) Sistema nervioso y órganos de los sentidos. W. Kahle, H. Leonhardt, W. Platzer. (1988). Ed. Omega, Barcelona.

8.2 El Cerebelo

Es la región del sistema nervioso central encargada de la coordinación y sincronización fina de los movimientos corporales y de la regulación del tono muscular. Regula los movimientos estereotipados, el mantenimiento de la postura y el equilibrio y en él reside el aprendizaje de las habilidades motoras. En los mamíferos está formado por dos hemisferios unidos por el vermis y presenta numerosas circunvoluciones (Fig. 17).

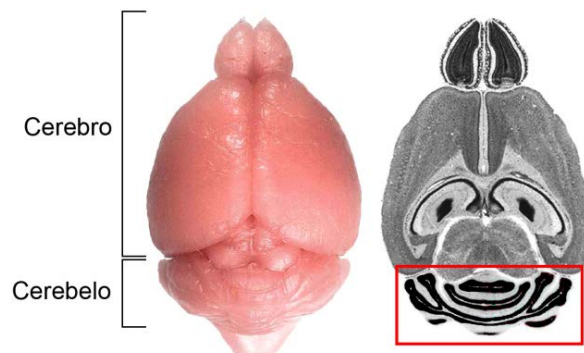


Figura 17 Anatomía del encéfalo de ratón adulto. Se muestra la morfología de un encéfalo adulto y el detalle de las circunvoluciones cerebrales.

Éstas se organizan en una región más interna formada por fibras nerviosas (sustancia blanca) y otra más externa rica en cuerpos celulares (sustancia gris) llamada corteza cerebelosa. A su vez, ésta última, se encuentra subdividida en diferentes capas (Fig. 18).

La corteza cerebelosa se organiza en tres capas (desde la superficie al interior):

- **Capa molecular:** posee bajo número de células, principalmente células estrelladas y células de los cestos, pero gran cantidad de sinapsis. Éstas provienen de la arborización de las células de la capa adyacente, denominada capa de las células de Purkinje.
- **Capa de las células de Purkinje:** formada principalmente por los somas de estas células que forman una monocapa.
- **Capa granular:** presenta gran densidad celular predominando las células de los granos.

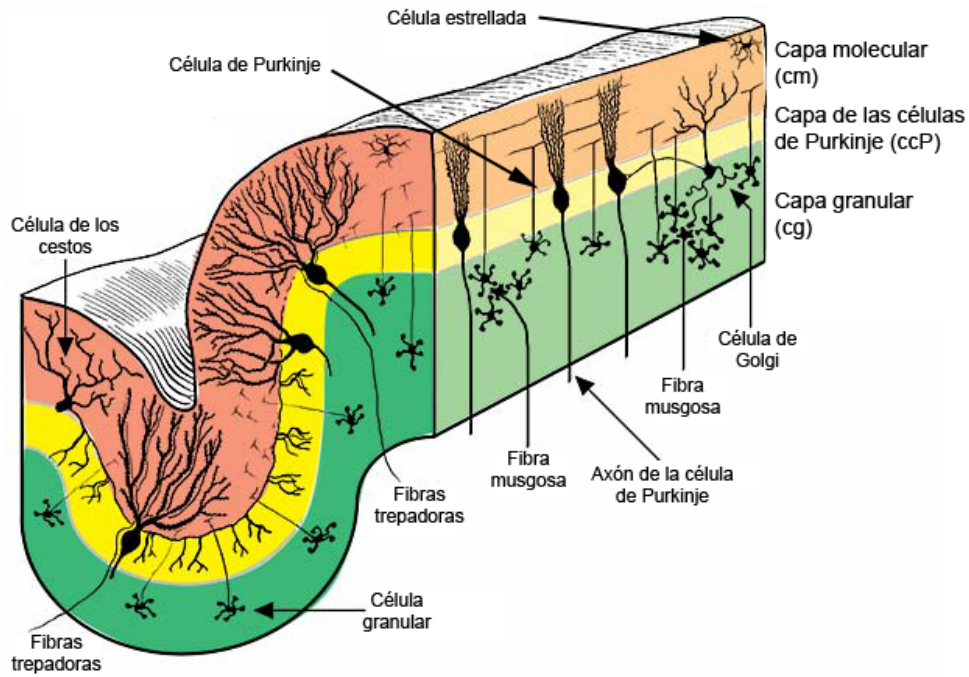


Figura 18 División en capas de la corteza cerebelosa. Dibujo en el que se representa la corteza cerebelosa y su división en capas, así como los principales tipos celulares. Fuente: Atlas Veterinary Neurohistology (2000) <http://vanat.cvm.umn.edu/>

Objetivos

Las Ca^{2+} -ATPasas son importantes sistemas implicados en el mantenimiento de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en el sistema nervioso. Por ello, es importante profundizar en el conocimiento de estas proteínas reguladoras tanto en organismos adultos como durante el desarrollo, así como en regiones altamente afectadas en procesos neurodegenerativos como es el hipocampo, para identificar las posibles implicaciones de estos sistemas en procesos patológicos dependientes de Ca^{2+} .

De esta forma, se ha planteado como *objetivo general* de este trabajo **estudiar de la expresión, localización y función de las distintas familias de bombas de Ca^{2+} en el encéfalo adulto y durante el desarrollo de distintas especies animales y en cultivos neuronales.**

Para ello se plantean los siguientes *objetivos específicos*:

- 1- Caracterizar la distribución y función de las tres familias de Ca^{2+} -ATPasas en el hipocampo de cerdo. Se realizarán estudios funcionales y de localización, tanto a nivel celular en secciones de tejido como su distribución en microdominios “*rafts*” de membrana.
- 2- Analizar la expresión, actividad y localización de las tres familias de Ca^{2+} -ATPasas en el hipocampo en desarrollo. Para ello se utilizará como modelo de estudio el ratón, con un desarrollo neural postnatal, y se comparará con otras regiones como la corteza cerebral y el cerebelo.
- 3- Caracterizar los cultivos neuronales primarios de hipocampo de ratón en ausencia y presencia del péptido neurotóxico β -amiloide, que se acumula en cerebros afectados por la EA, y de calmodulina, una proteína que une Ca^{2+} y activa a la PMCA, y analizar su efecto sobre las Ca^{2+} -ATPasas.

Materiales y Métodos

1. MATERIALES Y ANIMALES EMPLEADOS

1.1 Reactivos

La tapsigargina se obtuvo en Sigma-Aldrich y el monovanadato amónico en Merk. Las enzimas piruvato-quinasa (PK) y lactato deshidrogenasa (LDH) se adquirieron en Roche. El $^{45}\text{Ca}^{2+}$ de American Radiolabeled Chemical Co. y el líquido de centelleo Filtron X, de National Diagnostics. Los lípidos fosfatidilcolina (PC) tipo XI-E de yema de huevo y fosfatidilserina (PS), la calmodulina-agarosa y la calmodulina de cerebro bovino se compraron en Sigma-Aldrich. El Brij 96V, en FLUKA y el NicodenzTM en Sigma-Aldrich. Los medios de cultivo NeurobasalTM, HBSS (-Ca²⁺, -Mg²⁺), los suplementos N2, B27 y el suero de caballo procedían de GIBCO[®] (InvitrogenTM). La DNAasa I se obtuvo de Roche. La penicilina, estreptomycin y el MTT fueron de Sigma-Aldrich. La proteína-A/G PLUS agarosa, de Santa Cruz Biotechnology. El péptido β -amiloide se obtuvo de Stab Vida y se prepararon a 4 mg/ml (886 μM) siguiendo las instrucciones del fabricante. La cantidad de 1 mg de péptido liofilizado se diluyó en 60 μl de NH_4OH 1% y se llevó hasta 250 μl con Hepes/KOH 200 mM. Se hicieron alícuotas y se congelaron inmediatamente a -20°C para evitar su agregación.

Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados para la realización de los experimentos de esta Tesis se resumen en las Tablas I y II.

El resto de los reactivos empleados fueron de la mejor calidad y la mayor pureza disponible en el mercado.

Anticuerpo	Clase	Procedencia	Especificidad
IID8	Monoclonal	Affinity Bioreagents	SERCA2
anti-SERCA2b	Policlonal	Lab. Dr. F. Wuytack. KUL (Bélgica) (Wuytack <i>et al.</i> 1989)	SERCA2b
anti-SPCA1	Policlonal	Lab. Dr. F. Wuytack. KUL (Bélgica)(Van Baelen <i>et al.</i> 2001)	SPCA1
5F10	Monoclonal	Affinity Bioreagents	Todas las isoformas PMCA
pbPMCA	Policlona	Lab. Dra. A.M. Mata UEx (Badajoz) (Sepúlveda <i>et al.</i> 2004)	Varias isoformas PMCA
anti-PMCA1	Policlonal	Affinity Bioreagents	PMCA1
anti-PMCA2	Policlonal	Affinity Bioreagents	PMCA2
anti-PMCA3	Policlonal	Affinity Bioreagents	PMCA3
anti-PMCA4	Monoclonal	Affinity Bioreagents	PMCA4
anti-Aβ1-42	Policlonal	Lab. Dra. A.M. Mata UEx (Badajoz)	Péptido β -amiloide1-42
anti-β-tubulina	Monoclonal	Sigma-Aldrich	β -Tubulina
334	Policlonal	Lab. Dr. Jesús Ávila CBMSO (Madrid)	β -Tubulina
6H4	Monoclonal	Prionics	Proteína del Prión ^c
anti-sinaptofisina	Monoclonal	CRP Inc.	Sinaptofisina

Tabla I: Anticuerpos primarios utilizados en este trabajo.

Anticuerpo	Origen	Procedencia	Aplicación
anti-ratón conjugado a peroxidasa	Conejo	Sigma-Aldrich	Western blot
anti-conejo conjugado a peroxidasa	Cabra	Sigma-Aldrich	Western blot
anti-ratón conjugado a biotina	Conejo	Sigma-Aldrich	Inmunohistoquímica
anti-conejo conjugado a biotina	Cabra	Sigma-Aldrich	Inmunohistoquímica
anti-ratón Alexa488	Cabra	Molecular Probes	Inmunofluorescencia (515-535nm, verde)
anti-conejo Alexa594	Cabra	Molecular Probes	Inmunofluorescencia (600-620nm, rojo)

Tabla II: Anticuerpos secundarios utilizados en este trabajo.

1.1 Animales de experimentación

Se han utilizado dos especies animales, el cerdo (*Sus scrofa*, variedad *Large White*) y ratón (*Mus musculus*).

Para caracterizar inmunológica y funcionalmente las Ca^{2+} -ATPasas en el hipocampo, se han utilizado cerebros de cerdo obtenidos del Matadero de Olivenza (FRICOSI; Carretera EX-107, Km 25,6 Olivenza, Badajoz). Tras la muerte de los animales por shock eléctrico se cogieron los encéfalos y se conservaron en un tampón que contenía Hepes/KOH 10 mM (pH 7,4), sacarosa 0,32 M, MgSO_4 0,5 mM, PMSF 0,1 mM y β -mercaptoetanol 2 mM (Tampón I) a 4°C hasta el momento de su utilización, bien para la realización de preparaciones de membranas o para la fijación de tejidos para el análisis inmunohistoquímico.

Para los estudios de desarrollo y en cultivos primarios se han utilizado ratones consanguíneos ICR, proporcionados por el servicio del animalario de la Universidad de Extremadura, en los estadios de desarrollo siguientes: en el día de nacimiento (P0) y a los 8 (P8), 15 (P15) y 30 (P30) días tras el nacimiento, así como hembras preñadas en el estadio de gestación E18 (18 días tras la fecundación). Los animales se anestesiaron con CO_2 y se sacrificaron por dislocación cervical. Se extrajeron los encéfalos y se diseccionaron la corteza, el hipocampo y el cerebelo.

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.

2. PREPARACIONES DE MEMBRANAS

2.1 Preparación de extractos de membranas

Se realizaron siguiendo el protocolo de (Sepúlveda *et al.* 2005). Para ello un hipocampo de cerdo, o la corteza, el hipocampo y el cerebelo de un ratón en los diferentes estadios se homogeneizaron en 5 ml (2 ml para ratón) de Tampón I suplementado con un cóctel inhibidor de proteasas (Tampón de homogenización) a 4°C en un homogeneizador Potter-Elvehjem. El homogeneizado se llevó a 10 ml con Tampón I y se centrifugó a 1.500xg durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se centrifugó a 100.000xg durante 45 min a 4°C obteniéndose en el precipitado los extractos de membrana, que se resuspendieron en Hepes/KOH 10 mM (pH 7,4), 0,32 M sacarosa (solución A) y se realizaron alícuotas que se conservaron a -80°C hasta su uso.

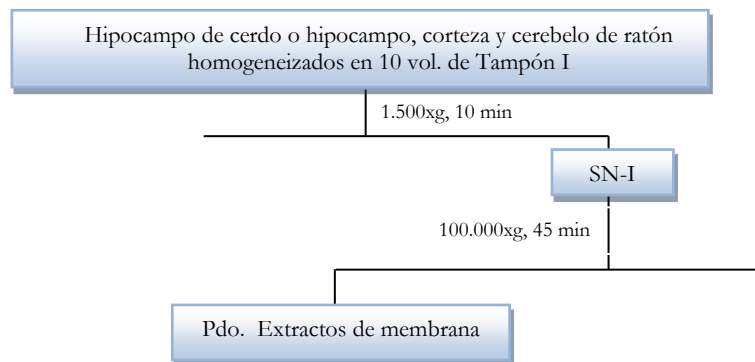


Figura 19 Procedimiento de aislamiento de extractos de membrana a partir de tejidos.

2.2 Preparación de vesículas de membrana plasmática sinaptosomal de hipocampo de cerdo (MPS)

Se realizó siguiendo el método de (Salvador y Mata 1996) para cerebro de cerdo. Se extrajeron los hipocampos de seis cerebros y se homogeneizaron en diez volúmenes de Tampón I a 4°C en un homogeneizador Potter-Elvehjem. El homogeneizado se centrifugó a 1.500xg durante 10 min a 4°C y el sobrenadante obtenido (SN-I) se volvió a centrifugar a 20.000xg durante 20 min a 4°C. El precipitado (P-II) de esta segunda centrifugación se

resuspendió en 1 ml de Tampón I y se sometió a un gradiente discontinuo que contenía 19 ml de sacarosa al 40% (p/v) y 15 ml de sacarosa al 20% (p/v), en Hepes/KOH 10 mM (pH 7,4) y se centrifugó a 55.000xg durante 2 h a 4°C. Los sinaptosomas se obtuvieron en la interfase del gradiente y se lavaron con 16 volúmenes de Hepes/KOH 10 mM (pH 7,4). El precipitado (P-III) se resuspendió en 100 volúmenes de Hepes/KOH 10 mM (pH 7,4), EDTA 1 mM y 2 mM de β -mercaptoetanol (Tampón de Lisis) y se incubó durante 40 min a 4°C con agitación suave. Tras la incubación todo el volumen se centrifugó a 20.000xg durante 30 min a 4°C. El precipitado final (P-IV) que constituía las MPS se resuspendió en Solución A y se realizaron alícuotas que se conservaron a -80°C hasta su uso para la posterior purificación de la PMCA o la preparación de “rafts” lipídicos.

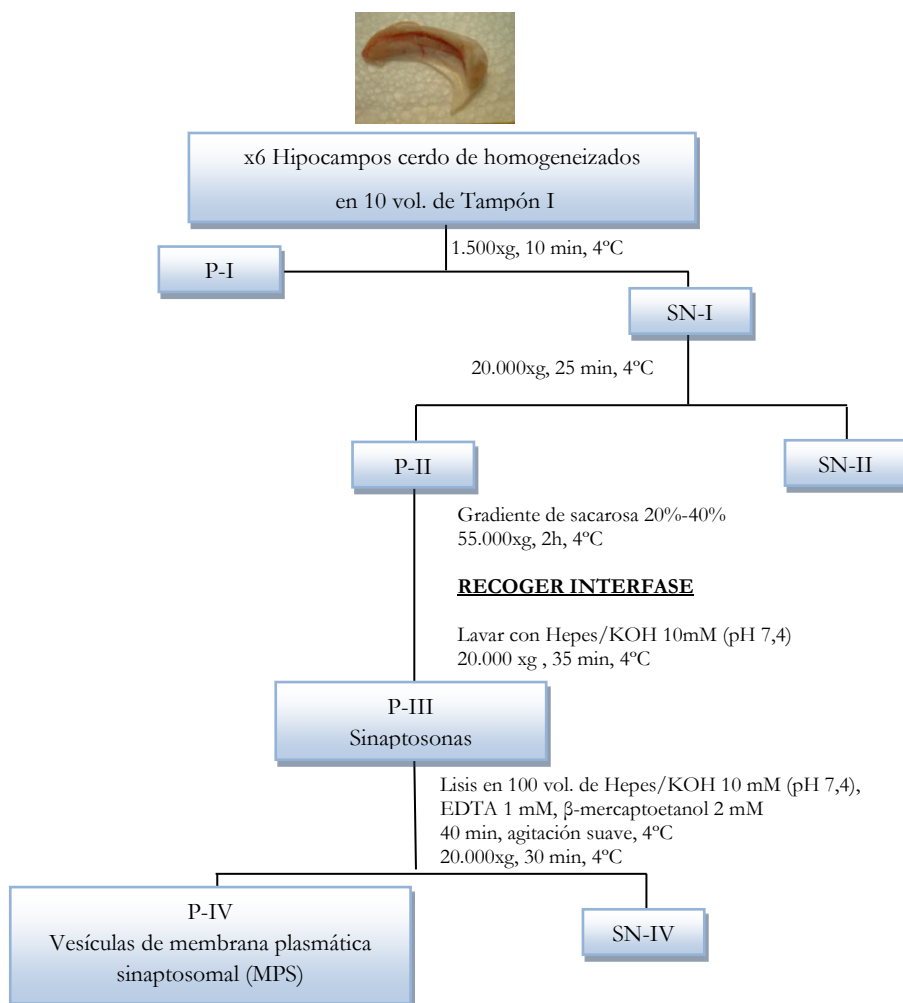


Figura 20 Esquema de preparación de vesículas de membrana plasmática sinaptosomal.

3. PURIFICACIÓN DE LA PMCA DEL HIPOCAMPO DE CERDO

La purificación de la PMCA se realizó siguiendo el protocolo de (Salvador y Mata 1996) a partir de MPS de hipocampo de cerdo mediante su solubilización y posterior separación por cromatografía de afinidad en calmodulina-agarosa.

3.1 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. A continuación se solubilizaron por tratamiento con Tritón X-100 al 0,6% (p/v) durante 15 min a 4°C en agitación suave. Después se centrifugaron durante 30 min a 100.000xg a 4°C, obteniendo en el sobrenadante las MPS solubilizadas.

3.2 Cromatografía de afinidad en calmodulina-agarosa

Todo el proceso se realizó en una columna de calmodulina-agarosa de 6 ml (1.2 cm de diámetro y 6 cm de alto) conectada a un equipo de cromatografía ÄKTAprime (Amersham Pharmacia Biotech), ubicado en una cámara fría a 4°C y con un flujo de 1 ml/min. La columna de calmodulina-agarosa se activó previamente con calcio mediante el pase de 40 ml de Hepes/KOH 20 mM (pH 7,4), KCl 130 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 100 μM, glicerol al 15%, β-mercaptoetanol 2 mM, y Tritón X-100 al 0,6% (p/v) (Tampón de equilibrado). Posteriormente se inyectó la muestra de las MPS solubilizadas con ayuda de un *super-loop* y las proteínas no retenidas se eliminaron mediante lavado con 40 ml de un tampón igual al anterior pero que contenía Tritón X-100 0,06% (p/v) (Tampón de lavado). La PMCA, al tener alta afinidad por Ca²⁺-calmodulina, se retuvo en la columna y su elución se realizó mediante un tampón similar al de lavado pero que contenía EDTA 2 mM en lugar de CaCl₂ 100 μM (Tampón de elución). El seguimiento de la elución se hizo por

espectrofotometría a 280nm y se recogieron las fracciones de 1ml que conformaban el pico de elución. Se alícuotearon y se guardaron a -80°C hasta su uso.

4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA

La concentración de proteína se determinó utilizando el método de (Bradford 1976). Éste emplea el colorante hidrofóbico Azul Coomasie G-250 que se une con gran afinidad a los residuos de arginina, triptófano y tirosina. La disolución de Azul Coomasie en presencia de ácido fosfórico posee un color pardo, con un máximo de absorbancia de 465 nm. Cuando el colorante se une a los residuos de aminoácidos de la proteína anteriormente citados, origina un color azul intenso que absorbe a 595 nm. La intensidad del color es proporcional a la concentración de proteínas. Se preparó una recta patrón con 0, 2, 4, 6 y 8 µg de albúmina de suero bovino (BSA) en SDS 0,1% en un volumen final de 10 µl. Las muestras también se prepararon en SDS 0.1% y se les añadió 1ml de una solución que contenía Azul Coomasie G250 0,01%, etanol 4,7% y H₃PO₄ 8,5% (Solución de Bradford). La aparición de color azul debida a al complejo colorante-proteína se midió por absorbancia a 595nm.

5. ELECTROFORESIS Y WESTERN BLOT

Se llevó a cabo en el sistema MiniProtean II (BioRad) según el método de (Laemmli 1970) en geles de poliacrilamida en SDS a diferentes porcentajes, dependiendo del tamaño de la proteína que se quería separar, a 200 V fijos durante 45 min, en un tampón que contenía Tris 25 mM, glicina 0,2 M y SDS 0,1% (Tampón de electroforesis). Las muestras se prepararon en un tampón compuesto por Tris/HCl 62,5mM (pH 6.8), azul de bromofenol 0,004% (p/v), SDS 2%, β-mercaptoetanol 5% y glicerol 10% (p/v) (Tampón Laemmli) y se calentaron a 100°C durante 2 min antes de cargarlas en el gel. Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno

(PVDF), utilizando un sistema Trans-Blot SD (Bio-Rad) a 15 V fijos durante 30 min a temperatura ambiente, en un tampón que contenía Tris 48 mM, glicina 39 mM, SDS 0,0375% y metanol al 20% (Tampón de transferencia). A continuación la membrana se bloqueó durante 30 min en un tampón formado por leche desnatada en polvo al 2% (p/v), Tris/HCl 50 mM (pH 7.4) y NaCl 150 mM (TBS-leche). Tras el bloqueo, la membrana se lavó tres veces durante cinco min en TBS-Tween 20 al 0,05% (v/v) (TBS-Tw) y se incubó con los anticuerpos primarios cuya especificidad se detalla en la Tabla I a las siguientes diluciones: IID8 (1:3000), anti-SERCA2b (1:200), anti-SPCA1 (1:1000), 5F10 (1:3000), anti-PMCA_s1, 2, 3 y 4 (1:1000), 6H4 (1:3000) y anti-A β 1-42 (1:15000) en TBS-Tw durante toda la noche a 4°C. En todos los casos que fue necesario se empleó la inmunorreacción con el anticuerpo monoclonal anti- β -tubulina (1:1000) como control de carga. Tras la incubación, las membranas se lavaron tres veces durante 5 min en TBS-leche al 2% (p/v) y se incubaron una hora con el anticuerpo secundario anti-ratón o anti-conejo conjugado a peroxidasa (1:3000) diluido en TBS-leche 2% (p/v). La unión antígeno-anticuerpo se reveló de dos formas diferentes: a) por color, incubando las membranas con los sustratos 4-cloro-2-metoxi-1-naphtol al 0.05% (p/v) o 3,3'-diamionobencidina tetrahidroclorada (DAB) a 0,25 mg/ml y con H₂O₂ al 0,07% y b) por quimioluminiscencia, empleando el sustrato SuperSignal West Pico (Pierce) y películas Kodak X-OMAT LS.

6. ENSAYOS FUNCIONALES

6.1 Medida de la actividad Ca²⁺-ATPasa

Se midió usando un sistema enzimático que acopla la actividad Ca²⁺-ATPasa con las actividades de las enzimas piruvato-quinasa y lactato-deshidrogenasa de forma que la hidrólisis de 1 mol de ATP produce la oxidación de 1 mol de NADH (Fig. 21) (East y Lee 1982).

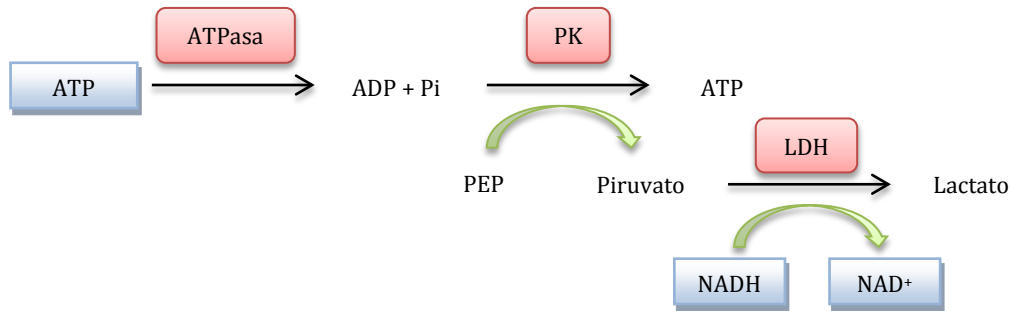


Figura 21 Reacciones enzimáticas que se producen en el sistema acoplado de las enzimas piruvato quinasa y lactato deshidrogenasa. PK: piruvato quinasa; LDH: lactato deshidrogenasa; PEP: fosfoenolpiruvato.

Para medir la contribución de cada una de las bombas de Ca^{2+} (SERCA, SPCA y PMCA) a la actividad Ca^{2+} -ATPasa total se usaron inhibidores de cada una de ellas (Fig. 22) (Sepúlveda *et al.* 2007a).

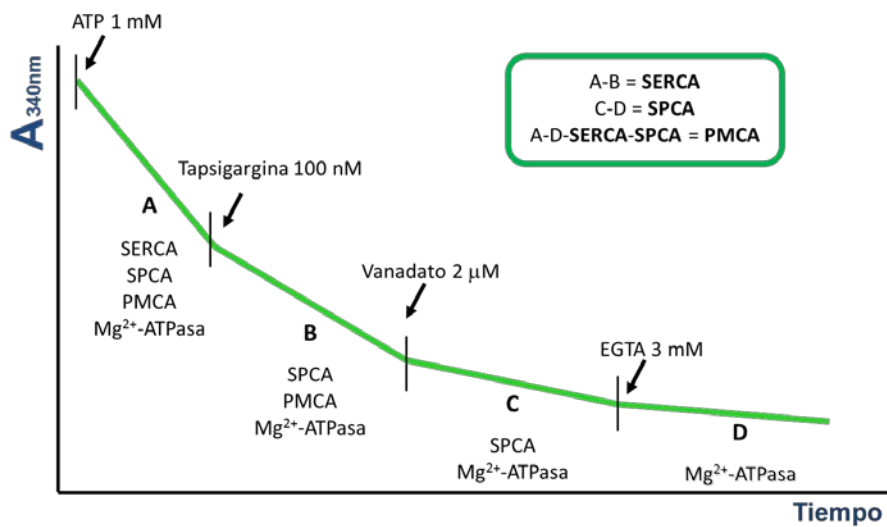


Figura 22 Evolución de la actividad Ca^{2+} -ATPasa en transcurso de una cinética enzimática en presencia de los diferentes inhibidores.

Cuarenta microgramos de extractos de membrana de hipocampo de cerdo o 20 μg de membranas del hipocampo, la corteza o el cerebelo de ratón obtenidos en los estadios postnatales P0, P8, P15 y P30, se añadieron a una mezcla de reacción 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 (para obtener una concentración de Ca^{2+} libre 3,16 μM), NADH 0,22 mM, fosfoeneol piruvato 0,42 mM, 10 U de piruvato quinasa, 28 U de lactato deshidrogenasa y saponina 0,01% (p/v), en un volumen de 1 ml. La mezcla se incubó 4 min a 37°C y la reacción se inició con 1 mM de ATP. Después se añadieron tapsigargina 100 nM (para inhibir la actividad SERCA), vanadato 2 μM (concentración que inhibe selectivamente a la PMCA) (Sepúlveda *et al.* 2007a) y EGTA 3 mM (que inhibe la actividad de todas las Ca^{2+} -ATPasas) para evaluar la contribución de cada bomba a la actividad (Ca^{2+} - Mg^{2+})-ATPasa total. La actividad debida a las tres ATPasas juntas se obtuvo después de restar la actividad Mg^{2+} -ATPasa de la actividad ($\text{Ca}^{2+}+\text{Mg}^{2+}$)-ATPasa total medida justamente después de añadir ATP. La actividad SERCA se calculó restando la actividad en presencia de tapsigargina a la actividad ATPasa total, mientras que la actividad correspondiente a la SPCA se obtuvo restando a la actividad en presencia de tapsigargina y vanadato la actividad Mg^{2+} -ATPasa. Finalmente, la actividad de la PMCA se calculó restando a la actividad en presencia de tapsigargina la actividad Mg^{2+} -ATPasa y la actividad correspondiente a la SPCA.

La PMCA purificada se eluye de la columna con glicerol. Por tanto está delipidada y no posee actividad enzimática. Para medir su actividad es preciso reconstituirla previamente con fosfolípidos neutros como PC o ácidos como PS (Salvador y Mata 1996). Para ello 2,5 μg de proteína se incubaron con 13,33 μg de PC o PS durante 4 min a 37°C. A continuación se añadió la mezcla de reacción del ensayo anterior y la reacción se disparó con ATP 1 mM. En presencia de PC la proteína no muestra su actividad máxima y por ello es preciso añadir, tras el ATP, 0,32 μg de calmodulina. Todas las medidas de actividad específica se realizaron en un espectrofotómetro UV-visible (UNICAM V2) con sistema de termostatación de cubetas y se expresaron en $\mu\text{moles de ATP}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$.

6.2 Medida del transporte de Ca^{2+}

Los ensayos de transporte de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ se llevaron a cabo en extractos de membrana de hipocampo de cerdo a 37°C mediante la técnica de filtración (Chiesi y Inesi 1979) optimizada por (Palacios *et al.* 2004). Brevemente, $40\ \mu\text{g}$ de extractos de membranas se incubaron en el tampón de transporte que contenía Hepes/KOH $50\ \text{mM}$ (pH 7,4), KCl $100\ \text{mM}$, CaCl_2 $100\ \mu\text{M}$, MgCl_2 $2\ \text{mM}$, NaN_3 $5\ \text{mM}$, BAPTA $100\ \mu\text{M}$ (para obtener Ca^{2+} libre $3,16\ \mu\text{M}$), KH_2PO_4 $20\ \text{mM}$ y $0,3\ \mu\text{Ci}$ de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (aproximadamente $20.000\ \text{cpm/nmol}$) en un volumen final de $1\ \text{ml}$. El fosfato es necesario para la precipitación del Ca^{2+} , quedando de este modo retenido por las vesículas, permitiendo así su medición por filtración. Tras $4\ \text{min}$ de incubación la reacción se inició por adición de ATP $1\ \text{mM}$ y se paró a los $30\ \text{min}$ por filtración en un sistema Millipore empleando filtros de celulosa HAWP-045. Los filtros se lavaron con $3\ \text{ml}$ de un tampón que contenía Hepes/KOH $20\ \text{mM}$, pH 7,4 y LaCl_3 $1\ \text{mM}$, repitiendo este lavado tres veces. A continuación se disolvieron con líquido de centelleo Filtron-X y el $^{45}\text{Ca}^{2+}$ se midió en un contador β (Beckman LS3801). Se realizó un blanco omitiendo la proteína para determinar la unión inespecífica del calcio a los filtros.

Para poder determinar la contribución de cada bomba al transporte de calcio se realizaron medidas en diferentes condiciones. El transporte de Ca^{2+} realizado por la SPCA se midió añadiendo al medio tapsigargina $100\ \text{nM}$ (para inhibir selectivamente a la SERCA) y saponina $0,002\%$ que solubiliza selectivamente la membrana plasmática y elimina el transporte correspondiente a la PMCA (Missiaen *et al.* 1994, Van Baelen *et al.* 2001). El transporte de Ca^{2+} realizado por la SERCA se calculó por sustracción de los valores obtenidos en presencia de tapsigargina al valor total obtenido sin tapsigargina ni saponina. El Ca^{2+} transportado por acción de la PMCA se calculó restando el valor de transporte debido a la SPCA al obtenido en presencia de tapsigargina.

7. ENSAYOS HISTOQUÍMICOS

7.1 Preparación y fijación de tejidos

Los cerebros de cerdo se guardaron en frío y en Tampón I inmediatamente después de sacrificar al animal. A continuación se procedió su disección y a la extracción de los hipocampos. Posteriormente se cortaron en piezas de aproximadamente 1cm³ y se fijaron por inmersión en paraformaldehído al 4% (p/v) en un tampón que contenía NaCl 0,14 M, KCl 2,7 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM y NaHPO₄ 8,1 mM (pH 7,4) (tampón fosfato salino, PBS) durante 24 h a 4°C.

Los encéfalos de ratón, de cada estadio de desarrollo, se fijaron por perfusión transcardiaca con el mismo fijador. Tras anestesiar a los animales con cloroformo, se abrió la caja torácica y con ayuda de un sistema de gotero y una vía con aguja tipo G-25, se introdujo el fijador a través del ventrículo izquierdo del corazón hasta vaciar completamente de sangre el sistema circulatorio. Después los encéfalos se extrajeron del cráneo y se mantuvieron en la misma solución de fijación durante 24 h a 4°C.

Las piezas, tanto de cerdo como de ratón, una vez fijadas se pasaron a PBS y se lavaron durante 1-2 días con cambios sucesivos cada 6-8 h y después se introdujeron en una solución de sacarosa 10%, Na₃N 0,1% (p/v) en PBS durante 2 días.

7.2 Congelación y microtomía en criostato

Las piezas de tejido incubadas en la solución anterior se sumergieron en otra solución de gelatina 10%-sacarosa 10% (p/v) en PBS durante 30 min a 37°C para embeber los tejidos. A continuación se utilizaron bloques en los que se había depositado una capa de la solución de gelatina y se habían dejado enfriar, para orientar la pieza. Después se cubrieron completamente con la misma solución y se dejaron solidificar a 4°C durante 15 min. Los bloques de gelatina con la pieza se fijaron a una lámina de corcho con ayuda de

Tissue-Tek[®] (SAKURA) y se congelaron durante 2 min en isopropanol, enfriado a -70°C con hielo seco. Los cortes, de 20 µm de grosor, se realizaron en un criostato (Leica CM19000), se dejaron secar a temperatura ambiente durante 30 min y se almacenaron a -20°C.

7.3 Tinción de tejidos con azul de toluidina

Para la visualización de la citoarquitectura del tejido los cortes se tiñeron con colorantes. Así, una vez rehidratados los tejidos durante 30 min en PBS, se sumergieron en una solución de azul de toluidina 1% (p/v) y tetraborato sódico 2% (p/v) durante 1 min. Tras lavar el exceso del colorante con agua los cortes se montaron con Eukitt[®].

7.4 Ensayos inmunohistoquímicos

Se llevó a cabo siguiendo el método de (Sternberger *et al.* 1970), usando los anticuerpos primarios a las siguientes diluciones: IID8 (1:500), anti-SERCA2b (1:50), anti-SPCA1 (1:250), 5F10 (1:500), anti-sinaptofisina (1:500) y los anti-PMCA1, anti-PMCA2, anti-PMCA3 y anti-PMCA4 a una dilución 1:50. Todos ellos diluidos en PBS-gelatina (2g/L)-Tritón X-100 0,25% (p/v) (PBS-G-TX). Los cortes de tejido se hidrataron en PBS y se permeabilizaron con PBS-Tritón X-100 al 0,05% (p/v) (PBS-TX) durante 15 min. Después se inactivó la peroxidasa endógena sumergiendo los cortes en una solución que contenía H₂O₂ al 0,2% (v/v) en PBS-TX durante 45 min. Tras dos lavados en PBS-G-TX, se bloquearon los sitios inespecíficos incubando los cortes con lisina 0,1 M en PBS-G-TX durante 1 h en cámara húmeda a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron las secciones con los anticuerpos anteriormente citados a sus respectivas diluciones durante toda la noche en cámara húmeda y a temperatura ambiente. Tras 3 lavados de 10 min con PBS-TX y uno con PBS-G-TX las secciones se incubaron con anticuerpos secundarios biotinilados anti-ratón (1:300) o anti-conejo (1:600) en PBS-G-TX durante 2 h en cámara

húmeda y a temperatura ambiente. Después, los cortes se lavaron 3 veces durante 10 min en PBS-TX y uno en PBS-G-TX y se incubaron con ExtrAvidin-peroxidasa (1:200) en PBS-G-TX. Se hicieron tres lavados en PBS-TX durante 10 min y la inmunodetección se realizó usando 3,3'-diaminobenzidina-tetrahidroclorido (DAB) al 0,03% (p/v). La reacción se paró mediante varios lavados en PBS-TX. Las secciones se observaron en un microscopio Nikon ECLIPSE E600. Se realizaron controles negativos omitiendo los anticuerpos primarios.

7.5 Ensayos de inmunofluorescencia

El protocolo seguido fue similar al del punto 7.4 pero se omitió el paso de bloqueo de la peroxidasa endógena con H_2O_2 . Una vez incubados los cortes con los respectivos anticuerpos primarios, y lavados 3 veces durante 10 min en PBS-TX y una en PBS-G-TX, se incubaron con los anticuerpos secundarios fluorescentes anti-ratón Alexa488 (verde) y anti-conejo Alexa594 (rojo) 1:2000 en PBS-G-TX durante 1 h a temperatura ambiente. Tras realizar los mismos lavados, los cortes se incubaron durante 5 min con 4', 6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI) 10 μ M para teñir los núcleos.

7.6 Montaje de las muestras para microscopía

Para la observación de las secciones a microscopía óptica, se deshidrataron pasándolas sucesivamente, durante 3 min, por etanol al 70%, 80% y 90%, dos veces por etanol 100% y dos veces por xilol y tras ello se aplicó una pequeña cantidad de Eukitt[®] en el cubreobjetos y se colocó sobre los cortes.

Para los cortes en los que se realizaron las inmunofluorescencias, se empleó el medio de montaje FluorSave[®] que conservaba durante más tiempo la fluorescencia de las muestras. Tras la aplicación del DAPI los cortes se lavaron 2 veces durante 5 min con PBS y 1 vez con agua. A continuación se aplicó una pequeña cantidad de FluorSave[®] sobre los

cubreobjetos y se colocó sobre las muestras. Se dejó secar en oscuridad a temperatura ambiente y las muestras se conservaron a 4°C para conservar la fluorescencia.

8. AISLAMIENTO DE MICRODOMINIOS LIPÍDICOS “RAFTS”

La preparación de “rafts” se realizó siguiendo el procedimiento descrito en (Sepúlveda *et al.* 2006). Un volumen de 0,75 ml de MPS de hipocampo de cerdo (10 mg de proteína total), preparadas como se describe en el apartado 2.2, se solubilizó con Brij-96 al 0,5% (p/v) en Tris/HCl 25 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM durante 1 h a 4°C en un agitador horizontal. A continuación se ajustó el solubilizado a una concentración de Nicodenz 35% añadiendo 0,75 ml de Nicodenz 70% (p/v) en Tris/HCl 25 mM, (pH 7,4), NaCl 150 mM, Brij 96V 1% (v/v). El volumen de 1,5 ml se depositó en el fondo de un tubo de ultracentrífuga de 4 ml y sobre éste se depositó sucesivamente 214 µl de soluciones de Nicodenz al 25%, 22,5%, 20%, 18%, 15%, 12% y 8% preparadas en Tris/HCl 25 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, Brij 96V 0,5%. Tras 4 h de centrifugación a 260.000xg a 4°C en la ultracentrífuga Beckman Optima L-90K, utilizando el rotor basculante SW 60 Ti se recogieron, con extremo cuidado, 13 fracciones de 230 µl desde la parte superior hasta el fondo. Éstas se conservaron a -80°C hasta su uso.

9. DETERMINACIÓN DE COLESTEROL

Se determinó por colorimetría empleando cloruro férrico en una solución de ácido sulfúrico y ácido acético siguiendo el procedimiento de Zlatkis *et al.* 1953, modificado por Sepúlveda *et al.* 2006. Diez µl de cada una de las fracciones recogidas tras el gradiente de Nicodenz se mezclaron con 80 µl de cloroformo/metanol (2/1, v/v), y las fases obtenidas se separaron por centrifugación mediante un pulso a 10000 rpm. La fase que contenía los lípidos (inferior) se transfirió a un tubo de vidrio y se secó con nitrógeno. El colesterol se extrajo añadiendo a cada tubo 0,75 ml de ácido acético glacial y 0,5 ml del reactivo de

cloruro de hierro (preparado mezclando 1 ml de FeCl_3 2,5% (p/v) en H_3PO_4 al 85% con 11,5 ml de H_2SO_4 concentrado). Las muestras se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente y se midió la aparición de color por absorbancia a 550 nm. Se emplearon soluciones estándar de colesterol para realizar una recta de calibrado.

10. CULTIVOS PRIMARIOS DE HIPOCAMPO DE RATÓN

10.1 Preparación de cultivos primarios de hipocampo de ratón

Los cultivos celulares se realizaron en placas y cristales, dependiendo del uso posterior de las células, para preparar membranas y ensayos de viabilidad (placas p60 y p24) y ensayos inmunocitoquímicos (cristales). El día previo a la realización del cultivo se cubrieron con poli-L-lisina a 0,1 mg/ml durante 3 h a 37°C, se lavaron profusamente con agua estéril y se conservaron a 4°C hasta su uso.

Los cultivos primarios se realizaron de acuerdo al método de (Hernandez *et al.* 2004) con pequeñas modificaciones. Las hembras ICR, en el estadio E18 de gestación, se sacrificaron por inhalación de CO_2 y se colocaron en posición dorso-ventral. Tras rociar la zona abdominal con etanol al 70% se realizó un corte y se extrajo el saco vitelino. Los embriones se depositaron, en condiciones de esterilidad, en una placa con PBS estéril. Los cerebros se diseccionaron bajo la lupa y los hipocampos se extrajeron y depositaron en HBSS sin Ca^{2+} y sin Mg^{2+} . Tras esto, el tejido segmentado en porciones más pequeñas se digirió en 10 ml de HBSS sin Ca^{2+} y sin Mg^{2+} que contenía tripsina al 0,25% (p/v) y DNAasa I a 0,1 mg/ml durante 15 min a 37°C. El tubo se agitó cada cierto tiempo para mejorar el proceso de digestión. Tras 3 lavados con HBSS sin Ca^{2+} y sin Mg^{2+} el tejido se disgregó pasándolo por dos pipetas pasteur siliconizadas, una con una apertura normal y la segunda con una apertura más estrecha. De este modo se conseguía una mejor disociación de las células.

Las células viables se contaron en una cámara de Neubauer, utilizando el colorante azul tripán y se sembraron a diferentes densidades según su posterior uso. Así, para ensayos de viabilidad e inmunocitoquímicos se sembraron en placas de 24 pocillos (p24) o cristales, respectivamente, a una densidad de 74000 células por pocillo. Para los ensayos cuyo objetivo era la preparación de membranas para posteriores experimentos cinéticos, las células se sembraron en placas de 60 mm de diámetro (p60) a una densidad de 10^6 células por placa. Las células se mantuvieron durante 3 h a 37°C y 5% de CO₂ en medio Neurobasal suplementado con suero de caballo al 10%, glutamina 0,5 mM, piruvato 1 mM y penicilina/estreptomicina al 1% (p/v) para favorecer su fijación a la polilisina. Tras este tiempo todo el medio se retiró y se reemplazó por el medio de mantenimiento que estaba compuesto por medio Neurobasal suplementado con B27 al 2%, N2 al 1% (v/v), glutamina 0,5 mM, piruvato 1 mM y penicilina/estreptomicina al 1%. Un tercio del medio se cambió cada tres días sustituyéndolo por medio fresco. A partir del primer cambio de medio se añadió al cultivo citosina β-D-arabinofuranósido (Ara-C) para evitar el crecimiento de la glía y obtener de este modo un cultivo más puro en neuronas. Las células se mantuvieron durante 5 DIV en un incubador a 37°C, 5% de CO₂/95% de aire y humedad a saturación (condiciones estándar) hasta su posterior utilización en los diferentes ensayos.

Cuando el experimento lo requirió las células se trataron con el péptido Aβ1-42 y/o con calmodulina a distintas concentraciones durante 48 h a en condiciones estándar. La solución *stock* de calmodulina se preparó en Hepes/KOH 20 mM (pH 7,4) y se diluyó en medio de cultivo antes de la aplicación.

10.2 Ensayos de viabilidad.

La supervivencia neuronal se midió analizando la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) a formazán por acción de las enzimas

deshidrogenasas mitocondriales (Mosmann 1983, Denizot y Lang 1986). Éste forma un precipitado azul oscuro que una vez disuelto en DMSO es cuantificable por colorimetría.

Para medir la viabilidad de las células antes y después de los tratamientos, se reemplazó el medio de cultivo por otro buffer que contenía Hepes/NaOH 10 mM (pH 7.4), NaCl 128 mM, KCl 2,4 mM, MgCl₂ 1,2 mM, KH₂PO₄ 1,2mM, D-glucosa 10 mM (Tampón BSS) y MTT 150 µg/ml y se incubó durante 1 h a 37°C, 5% CO₂. Tras ese tiempo se retiró todo el medio y los cristales precipitados de formazán se resuspendieron en 1 ml de DMSO. A continuación se midió la absorbancia a 495 y 650 nm. La viabilidad se calcula por la diferencia de absorbancias $A_{495}-A_{650}$ y se relativiza al 100% con el valor del respectivo control.

10.3 Preparación de extractos de membranas de cultivos celulares

Se emplearon de dos a tres placas p60 con aproximadamente 10⁶ células por placa. El medio en el que crecían las células se eliminó por completo y se lavaron dos veces con 3 ml de PBS. Las células se levantaron con 1 ml de PBS con ayuda de un rascador y se recolectaron en un tubo de 15 ml en hielo. A continuación se lavaron por centrifugación durante 3 min a 1700xg a 4°C y se resuspendieron en 2 ml de tampón de homogenización. La suspensión celular se pasó a un Potter-Elvehjem donde se realizó la lisis celular con 20 pasos a 4°C. El homogeneizado resultante se llevó a 10 ml con Tampón I y se centrifugó a 1500xg durante 10 min a 4°C. El sobrenadante obtenido se centrifugó de nuevo a 100.000xg durante 45 min a 4°C y el precipitado se resuspendió en solución A y se almacenó en alícuotas a -80°C hasta su uso.

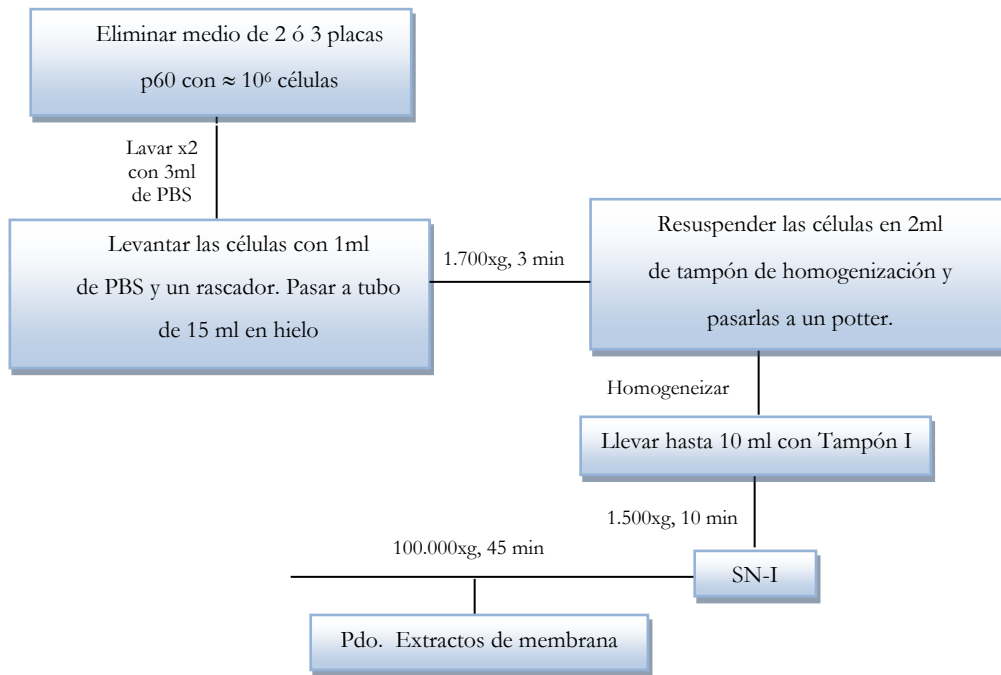


Figura 23 Aislamiento de extractos de membranas a partir de cultivos celulares.

10.4 Ensayos inmunocitoquímicos

Las células crecidas en cristales cubreobjetos se lavaron con 1 ml de PBS, se fijaron durante 20 min en una solución que contenía paraformaldehído al 4% (p/v) y sacarosa al 4% (p/v) en PBS y se lavaron dos veces con 1 ml de PBS. Si la inmunocitoquímica no se realizaba inmediatamente después, las células se conservaron en PBS con azida 0,025% a 4°C. El ensayo se continuó permeabilizando las células con Tritón X-100 al 0,2% (p/v) en PBS durante 4 min y bloqueando posteriormente los sitios de unión inespecíficos con BSA 3% en PBS durante 1 h a temperatura ambiente. Después se incubaron 1 h a temperatura ambiente con los siguientes anticuerpos primarios: los monoclonales anti- β -tubulina (1:1000), 5F10 (1:1000), anti-PMCA4 (1:1000) y los policlonales pbPMCA (1:400), 334 (1:500), anti-PMCA1, 2, 3 (1:1000), anti-SERCA2b (1:50) y anti-SPCA1 (1:1000), todos ellos diluidos en PBS-BSA 1% (p/v). A continuación las células se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con los anticuerpos secundarios anti mouse Alexa-488 (verde) y anti conejo Alexa-594 (rojo) a una dilución de 1:2000 en PBS-BSA 1% (p/v) durante 1 h a temperatura

ambiente y en oscuridad. Los núcleos se tiñeron con 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) 10 μ M durante 5 min. El exceso de DAPI se eliminó mediante lavado con PBS y los cubreobjetos se montaron con FluorSave. Las células se visualizaron con un microscopio de fluorescencia Nikon ECLIPSE E600. La cuantificación de la longitud de las prolongaciones se realizó empleando el software Image-J (Maryland, USA).

11. TÉCNICAS DE INTERACCIÓN PROTEÍNA-PROTEÍNA

11.1 Experimentos de “*over-lay*” en placas ELISA

Las placas ELISA se cubrieron con 0,5 μ g de A β 1-42, 1 μ g de PMCA purificada de hipocampo de cerdo, 5 μ g de membranas de hipocampo de cerdo, 1 μ g de SERCA2b sobreexpresada en células COS, 1 μ g de membranas de retículo sarcoplásmico de conejo (ricas en SERCA1 y cedidas por el Dr. Fernando Henao, UEx) y 1, 2,5 o 5 μ g de calmodulina, en tampón carbonato 0,05 M (pH 9,6) hasta un volumen final de 200 μ l/pocillo. Las placas se mantuvieron durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Tras dos lavados con PBS-Tween 0,05% (p/v) (PBS-Tw) y uno con PBS se incubaron con diferentes concentraciones de A β 1-42 en PBS durante 30 min a 37°C. El péptido A β 1-42 no unido a sus proteínas diana se eliminó mediante dos lavados con PBS-Tw y uno con PBS y las placas se incubaron con el anticuerpo anti-A β 1-42, producido en el laboratorio (según el procedimiento descrito en el apartado 12) (1:15000) en PBS-Tw durante 1 h a 37°C en cámara húmeda. Tras eliminar el anticuerpo no unido mediante tres lavados con PBS-Tw las placas se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo unido a peroxidasa (1:10000) en PBS-Tw durante 1 h a 37°C también en cámara húmeda y la unión antígeno-anticuerpo se detectó mediante los sustratos orto-fenilendiamina (OPD) 0,04% (p/v) en tampón citrato-fosfato 0,15 M (pH 5,5) y H₂O₂ 0,05% (v/v). La reacción se paró

añadiendo 25 μl de H_2SO_4 12,5% a cada pocillo. Las placas se leyeron en un lector de placas ELISA (Titertek Multiskan[®] PLUS, ICN Flow) a 492 nm.

En la figura 24 se resume el proceso experimental seguido para detectar la interacción $\text{A}\beta$ -proteína mediante “*over-lay*” en placas ELISA.

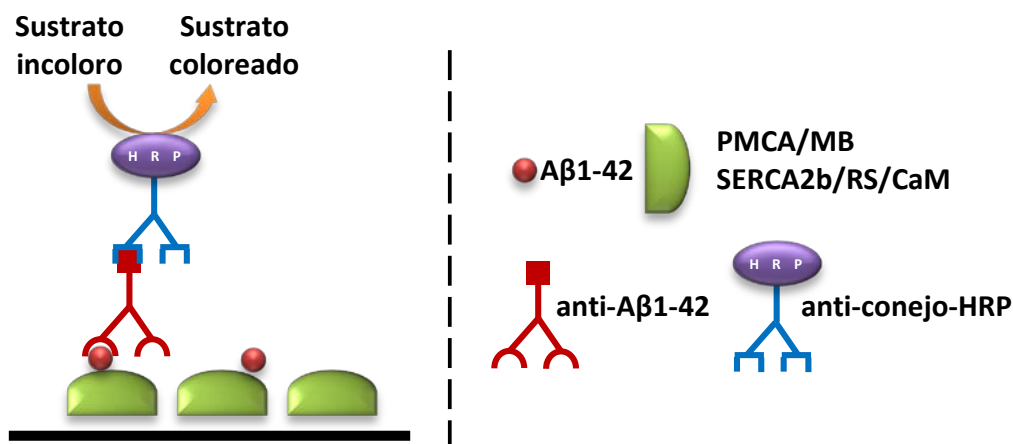


Figura 24 Detección de la interacción $\text{A}\beta$ -proteína por “*over-lay*” en placa ELISA. MB: membranas; RS: retículo sarcoplásmico de conejo (rico en SERCA1); CaM: calmodulina.

11.2 Experimentos de “*over-lay*” sobre membranas de PVDF

La PMCA purificada (1,5 μg), se sometió a electroforesis en un gel Laemmli 7,5% (Laemmli 1970) y se transfirió a una membrana de PVDF en el sistema Trans-Blot SD (Bio-Rad). La membrana de PVDF se bloqueó durante 30 min en TBS-leche, se lavó tres veces durante cinco min en TBS-Tw y se cortó en tiras. Una de ellas se incubó con $\text{A}\beta$ 1-42 2,5 μM en PBS durante 1 h a 37°C, y se lavó tres veces con TBS-Tw para eliminar la proteína no unida. A continuación se incubó con el anticuerpo anti- $\text{A}\beta$ 1-42 (1:15000) en TBS-Tw. Otras tiras se incubaron con calmodulina biotinilada (1:1000) en PBS más 0,5mM de CaCl_2 o bien con 5F10 (1:3000) en TBS-Tw, durante 2 h a temperatura ambiente. La unión del anticuerpo a su antígeno se reveló empleando anticuerpos secundarios anti-ratón o anti-conejo unidos a peroxidasa (1:3000) o extravidin peroxidasa (1:1000) y como sustratos DAB 0,25 mg/ml y H_2O_2 0,07%.

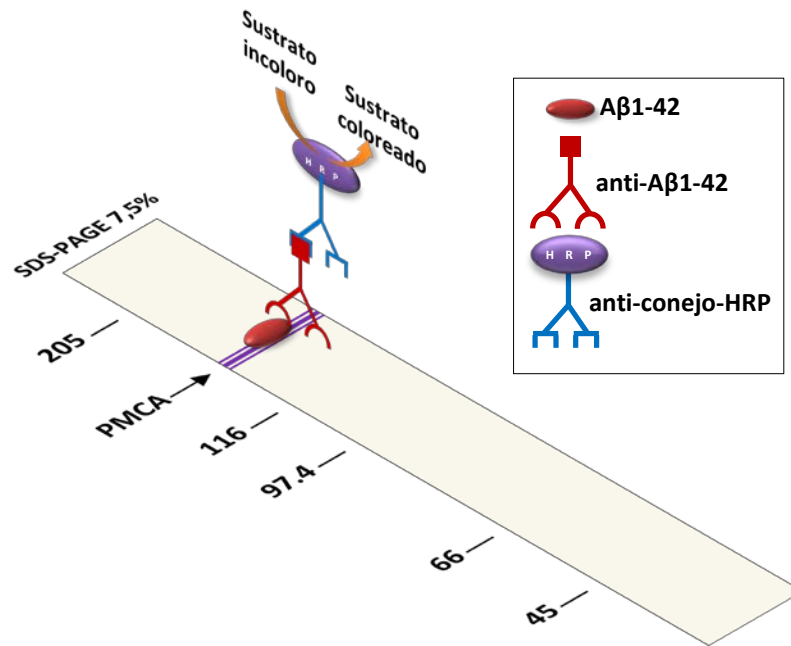


Figura 25 Esquema del “*over-lay*” por Western blot para analizar la interacción A β -PMCA. Se muestra una membrana de PVDF en la que se ha transferido la PMCA y ha sido incubada con el péptido A β 1-42 y posteriormente con un anticuerpo anti-A β 1-42.

11.3 Ensayos de inmunoprecipitación

Se realizaron según el protocolo de (DeMarco y Strehler 2001), incubando los extractos de membranas de hipocampo de cerdo (200 μ g) con el péptido A β 100 μ M durante 2 min a 37°C en un volumen final de 50 μ l. Después se llevó a un volumen final de 140 μ l con un tampón que contenía HEPES/KOH 50mM (pH 7,4), NaCl 150mM, NP-40 1%, DOC 0,5%, PMSF 1mM y un cóctel inhibidor de proteasas (Tampón IP) y 1 μ l del anticuerpo monoclonal 5F10, que reconoce todas las isoformas PMCA, y se incubó durante 2 h a 4°C en agitación suave. Tras ello se añadieron 30 μ l de proteína A/G-PLUS Agarosa (Santa Cruz), con alta afinidad por los anticuerpos, y se incubó 2 h a 4°C en agitación suave. Las proteínas unidas al complejo anticuerpo-proteína A/G-agarosa se obtuvieron en el precipitado tras centrifugar a 1500xg 30 s. Este precipitado se lavó mediante incubación durante 5 min con 200 μ l de Tampón IP y posterior centrifugación. Se realizaron un total de cuatro lavados.

Las proteínas unidas a la proteína A/G se eluyeron resuspendiendo el precipitado resultante del cuarto lavado en Tampón Laemmli y calentándolas a 100°C durante 2 min. Cada fracción (precipitados y sobrenadantes) de la inmunoprecipitación se cargó en un gel SDS-PAGE al 10% para su posterior análisis. Se realizaron controles en las mismas condiciones pero omitiendo el anticuerpo.

12. PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN ANTICUERPO POLICLONAL ANTI-PÉPTIDO A β 1-42

El anticuerpo anti-A β 1-42 se obtuvo por inmunización de un conejo (*Oryctolagus cuniculus*) de la variedad New Zealand de aproximadamente 3 kg de peso. Se realizó una inmunización con una solución que contenía 500 μ g de A β 1-42 envejecido 2 h a 37°C, en 0,5 ml de PBS y 0,5 ml de adyuvante completo de Freud (ACF). Se inyectaron por vía intramuscular 0,5 ml de la emulsión en cada una de las patas traseras del animal. Posteriormente se realizaron dos inmunizaciones con un intervalo de dos semanas inyectando 200 μ g de A β 1-42 envejecido, preparado en 0,5 ml de PBS y 0,5 ml adyuvante incompleto de Freud (AIF). Fue necesario inmunizar cuatro veces más en intervalos de dos semanas empleando 25 μ g de A β 1-42 envejecido, en 0,5 ml de PBS y 0,5 ml de AIF. A los siete días de cada inmunización se cuantificaron los niveles de anticuerpos producidos contra el péptido A β 1-42 mediante ensayos ELISA. El proceso se repitió hasta obtener los niveles mayores de anticuerpos. Tras la última inmunización se desangró al animal y la sangre se dejó coagular durante 4 h a temperatura ambiente. Después se centrifugó a 2500xg durante 15 min a 4°C obteniendo el suero policlonal en el sobrenadante. Todo el material se dividió en alícuotas y se conservaron a -80°C hasta su uso. La figura 26 muestra la especificidad del anticuerpo anti-A β 1-42, revelando que es capaz de reconocer tanto al péptido fresco como a agregados del mismo.

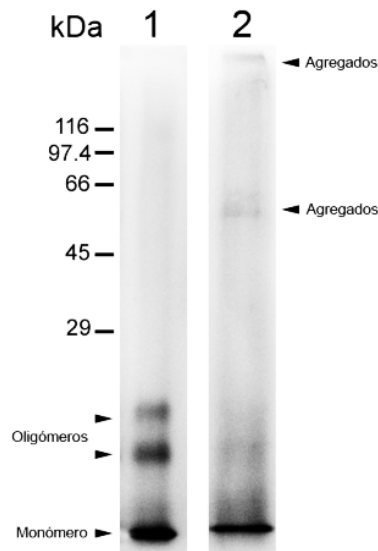


Figura 26 Inmunodetección de A β 1-42 empleando el anticuerpo policlonal anti-A β 1-42. Se cargaron en un gel Laemmli al 12% 0,1 μ g de A β 1-42 fresco (calle 1) y 0,25 μ g de A β 1-42 previamente incubado 2 h a 37°C (calle 2). Tras la electroforesis y la transferencia, la membrana de PVDF se incubó con el anticuerpo (suero final) anti-A β 1-42 1:15000 preparado en nuestro laboratorio durante 2 h a temperatura ambiente. La inmunorreacción se reveló por quimioluminiscencia.

13. SOPORTES INFORMÁTICOS

13.1 Bad-4

Se empleó para calcular la cantidad de BAPTA para tener una cantidad de Ca²⁺ libre de 3,16 μ M para los ensayos funcionales.

13.2 Adobe Photoshop CS2

Se empleó para el montaje de las figuras así como para la cuantificación de las intensidades de banda.

13.3 Image J

Programa de software libre utilizado para la medir la longitud de las prolongaciones dendríticas de las células cultivadas *in-vitro*.

13.4 Sigma Plot 10.0

Este programa se utilizó para la elaboración de gráficas.

13.5 EndNote X1

Con este programa se ha elaborado y ordenado la bibliografía.

Resultados

Capítulo I

“Caracterización funcional e inmunológica de las Ca^{2+} -ATPasas en el hipocampo de cerdo adulto.”

Resumen

El Ca^{2+} desempeña un papel fundamental en diversos procesos en el sistema nervioso. El mantenimiento de unos niveles apropiados de este ión es crucial para la supervivencia celular y el correcto funcionamiento de las neuronas y para ello es precisa la intervención de las bombas de Ca^{2+} . En este capítulo se ha estudiado la actividad de las tres familias de Ca^{2+} -ATPasas en extractos de membrana, así como la expresión y la localización de isoformas específicas como la SERCA2, la SPCA1 y las PMCA4 en el hipocampo de cerdo adulto, una región implicada en los procesos de memoria y aprendizaje y especialmente afectada en enfermedades neurodegenerativas en las que se produce una alteración de los niveles de Ca^{2+} . Los resultados han mostrado la funcionalidad de estas bombas así como su distribución específica en esta área. Además, la PMCA4 es la única isoforma PMCA que se localiza en microdominios lipídicos de membrana (“rafts”). Estos resultados contribuyen a un mejor entendimiento del papel que juegan las bombas de Ca^{2+} en la regulación de este ión en funciones específicas de esta área cerebral.

Inmunodetección de las tres familias de Ca^{2+} -ATPasas en extractos de membranas del hipocampo de cerdo.

Se ha determinado la expresión de las isoformas SERCA2, SPCA1, PMCA1, 2, 3 y 4 en extractos de membranas de hipocampo de cerdo. Para ello las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida al 6,5% y se detectaron por Western blot usando los siguientes anticuerpos: IID8, específico de SERCA2; anti-SPCA1, que reconoce de forma específica la isoforma SPCA1 (Van Baelen *et al.* 2003) y 5F10, que reconoce todas las isoformas PMCA (Fig. 27). Se observó que las tres familias de Ca^{2+} -ATPasas están presentes en los extractos de membranas del hipocampo, apareciendo todas ellas a las alturas correspondientes a sus respectivos pesos moleculares: ≈ 110 kDa para la SERCA, ≈ 100 kDa la SPCA y ≈ 140 kDa la PMCA.

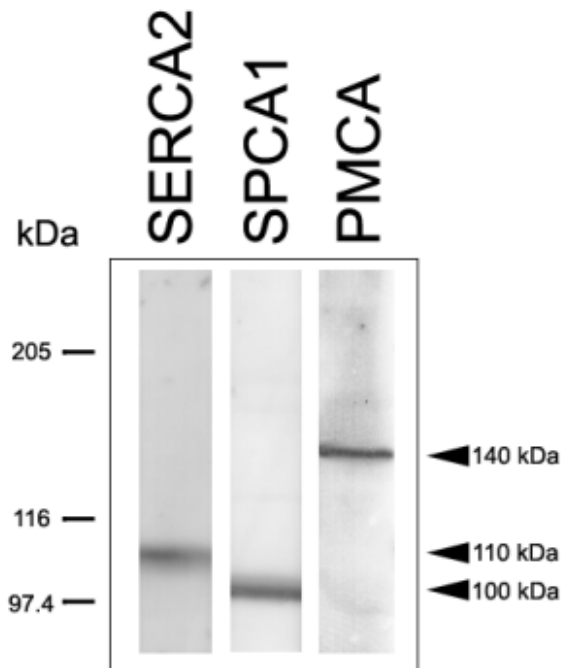


Figura 27 Inmunodetección de las tres familias de bombas de Ca^{2+} en extractos de membranas del hipocampo de cerdo. Se cargaron en un solo pocillo 440 μg de extractos de membranas del hipocampo de cerdo. Tras la electroforesis y la transferencia, la membrana de PVDF se dividió en calles de 0,5 cm (aproximadamente 30 μg de proteína) y se incubaron cada una de ellas con los anticuerpos primarios: 5F10, IID8 y anti-SPCA1 a las diluciones indicadas en la sección de Materiales y Métodos.

Los anticuerpos específicos de cada una de las isoformas de la PMCA detectaron una única banda para cada isoforma (Fig. 28A), correspondiente a un tamaño comprendido entre 127 y 138 kDa. La cuantificación de estas bandas (Fig. 28B), determinó que la isoforma más abundante es la PMCA4 mientras que la isoforma PMCA3 es la que se encuentra en menor proporción en las membranas del hipocampo de cerdo.

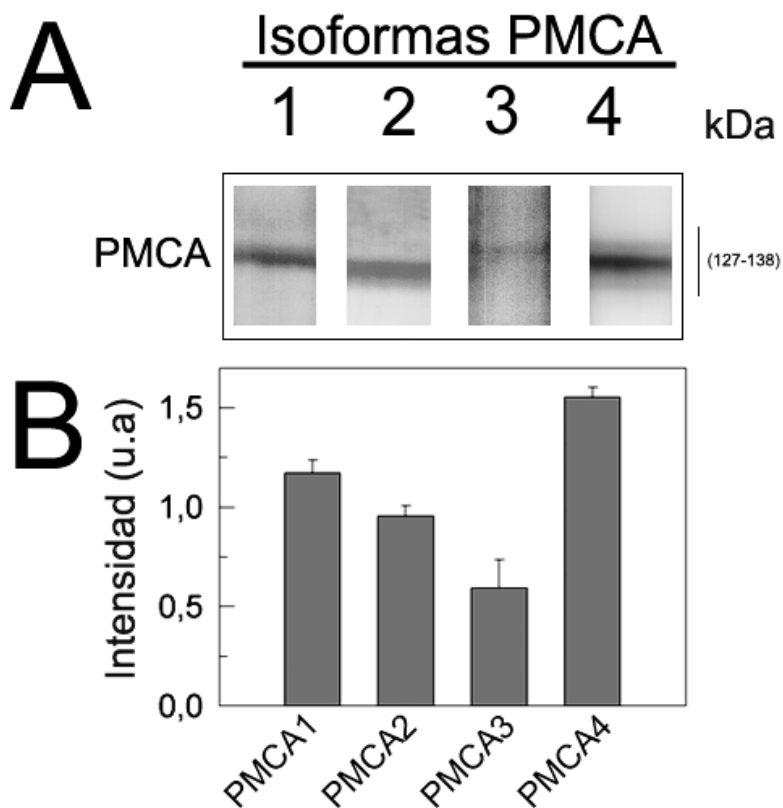


Figura 28 Western blot de isoformas PMCA en extractos de membranas de hipocampo de cerdo. A) Cuatrocientos cuarenta μ g de extractos de membranas del hipocampo de cerdo cargadas en un solo pocillo. Tras la separación en geles de poliacrilamida y la electrotransferencia, el PVDF se dividió en calles de 0,5 cm (aproximadamente 30 μ g de proteína) y se incubaron cada una de ellas con los anticuerpos primarios a las diluciones indicadas en los Materiales y Métodos. Calle 1: anti-PMCA1; calle 2: anti-PMCA2; calle 3: anti-PMCA3; calle 4: anti-PMCA4. B) Cuantificación de las bandas correspondientes a las distintas PMCA mostradas en A.

Caracterización funcional de bombas de calcio en el hipocampo de cerdo.

La contribución funcional de SERCA, SPCA y PMCA se determinó en cuanto a su actividad de hidrólisis de ATP y al transporte de Ca^{2+} . La actividad Ca^{2+} -ATPasa total se midió en extractos de membrana de hipocampo de cerdo mediante la adición de inhibidores de estas bombas, según se describe en los Materiales y Métodos. Así, se usó 100 nM de tapsigargina, para inhibir selectivamente a la SERCA (Sagara *et al.* 1992), el vanadato a 2 μM para inhibir la PMCA, pues a concentraciones menores de 10 μM inhibe a la PMCA pero no inhibe a la SERCA ni a la SPCA (Caroni y Carafoli 1981). Los resultados obtenidos (Fig. 29A) revelaron la funcionalidad de las bombas representando la PMCA el 53,4% de la actividad debida a las tres Ca^{2+} -ATPasas.

El transporte de Ca^{2+} se determinó empleando la tapsigargina 100 nM y saponina 0,002%, tal como se describe en los Materiales y Métodos, lo que permitió discriminar el transporte correspondiente a SERCA, SPCA y PMCA. El transporte debido a la PMCA, de forma similar a lo obtenido en actividad, fue superior al de las otras dos bombas, contribuyendo un 52,3% al transporte de Ca^{2+} debido a todas las Ca^{2+} -ATPasas (Fig 29B).

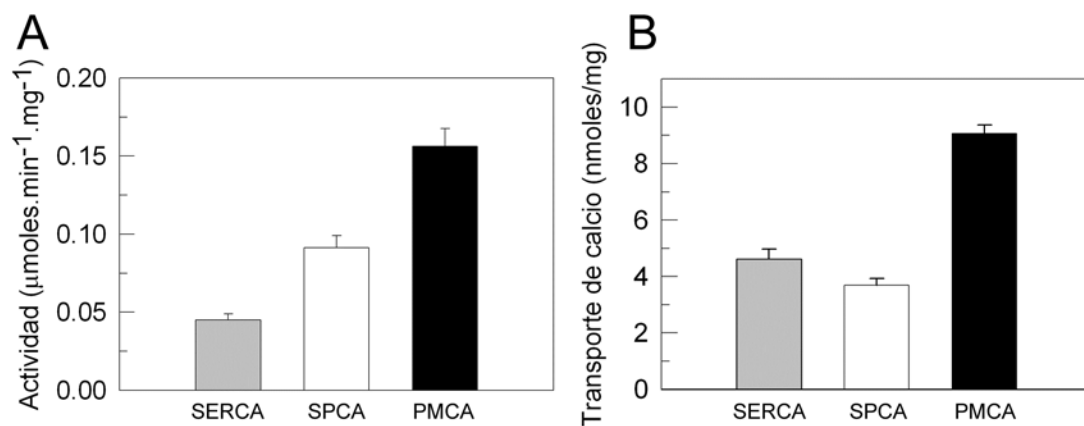


Figura 29 Caracterización cinética de las Ca^{2+} -ATPasas en extractos de membranas de hipocampo. A) Las actividades SERCA, SPCA y PMCA se analizaron en 40 μg de extractos de membrana de hipocampo de cerdo como se describe en Materiales y Métodos. Los datos se representan como la media \pm D.E. de tres experimentos realizados por triplicado y en tres preparaciones diferentes. B) Transporte de Ca^{2+} correspondiente a cada bomba utilizando 40 μg extractos de membranas de hipocampo, como se describe en Materiales y Métodos. Los datos son la media \pm D.E de dos experimentos realizados por cuadruplicado y en dos preparaciones diferentes.

Teniendo en cuenta la mayor contribución de la PMCA a la actividad y al transporte de Ca^{2+} , se purificó esta proteína del hipocampo de cerdo mediante cromatografía de afinidad en una columna de calmodulina-agarosa siguiendo el protocolo de (Salvador y Mata 1996) descrito para el cerebro total de cerdo. La proteína purificada se obtenía delipidada y sin actividad pero se activaba al reconstituirla con fosfolípidos (Fig 30). Así, en presencia de PS la proteína se activa totalmente alcanzando una velocidad máxima de $0,290 \pm 0,02 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. Sin embargo, cuando se reconstituye con PC se activó parcialmente, aunque la posterior adición de calmodulina la activó 1,9 veces, alcanzando la velocidad máxima.

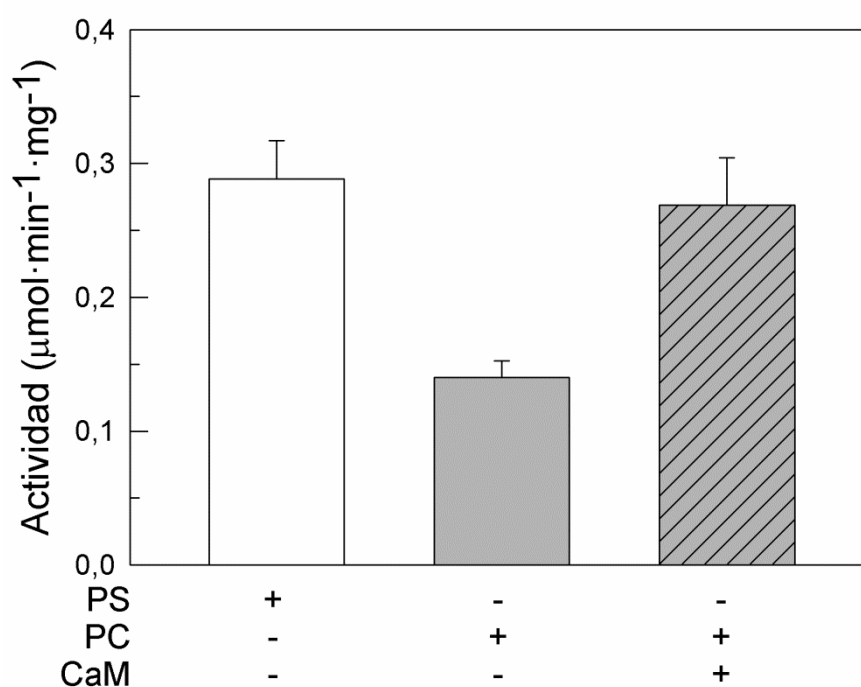


Figura 30 Efecto de diferentes fosfolípidos en la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA purificada de hipocampo de cerdo. La actividad ATPasa se midió tras reconstituir 2,5 μg de PMCA con 13,3 μg de PC o PS (relación proteína:lípido 1:5,33) e iniciar la reacción con ATP 1mM como se describe en Materiales y Métodos. Además se midió la actividad de la proteína reconstituída en PC tras añadir 14 nM de calmodulina. Los datos se muestran como la media \pm S.D. de dos experimentos realizados por triplicado de dos preparaciones diferentes.

Distribución de SERCA2, SPCA1 y la PMCA total en secciones parasagitales de hipocampo de cerdo

La localización tisular de las tres familias de Ca^{2+} -ATPasas, SERCA, SPCA y PMCA en el hipocampo de cerdo se analizó mediante ensayos inmunohistoquímicos.

En la figura 31A se muestra la distribución de la SERCA2 en el hipocampo, con el anticuerpo IID8 (que reconoce específicamente a esta isoforma). Se observó marcaje en el subículo, en las regiones CA1, CA2 y CA3 del cuerno de Amón y en el giro dentado. Detalles a grandes aumentos de estas regiones se muestran en la figura 31B. El anticuerpo IID8 marcó de forma homogénea el citoplasma de los somas y troncos dendríticos principales de diferentes tipos celulares. Este marcaje se corresponde con regiones enriquecidas en el retículo endoplásmico, donde se localiza la SERCA. Así, se observó inmunorreacción en las células piramidales del subículo (a y a'), en las células piramidales de CA (b, b'), obteniéndose mayor intensidad en la región CA1, en las neuronas de la región polimórfica (c, c'), y en las células de la capa granular del giro dentado (d y d'). En todos los casos, los núcleos de las células marcadas fueron inmunonegativos.

La distribución de SPCA1 se determinó empleando el anticuerpo anti-SPCA1 (Fig. 32A/B). Éste marcó una serie de acúmulos discretos en el citoplasma de las neuronas del subículo (a y a'), en las células piramidales del cuerno de Amón (b y b'), así como en las neuronas polimórficas (c y c') y las células granulares (d y d') del giro dentado. Este tipo de marcaje está relacionado con la localización de esta Ca^{2+} -ATPasa en el aparato de Golgi.

El uso del anticuerpo 5F10, que reconoce todas las isoformas de la PMCA, permitió detectar la expresión de esta bomba en el subículo, en las regiones CA1, CA2 y CA3 del cuerno de Amón y en el giro dentado (Fig. 33A). A mayores aumentos (Fig. 33B) la inmunorreacción se localizó en las células piramidales del subículo (a, a'), correspondiendo con la membrana plasmática en el soma y en el neuropilo. El marcaje fue más intenso en el neuropilo de la capa de las células piramidales de CA1 respecto a CA2 y

CA3 (b y b') pero con similar distribución, así como en la región polimórfica (c) y en la granular del giro dentado (d, d'). En todos los casos, los núcleos y citoplasmas de las células marcadas fueron inmunonegativos.

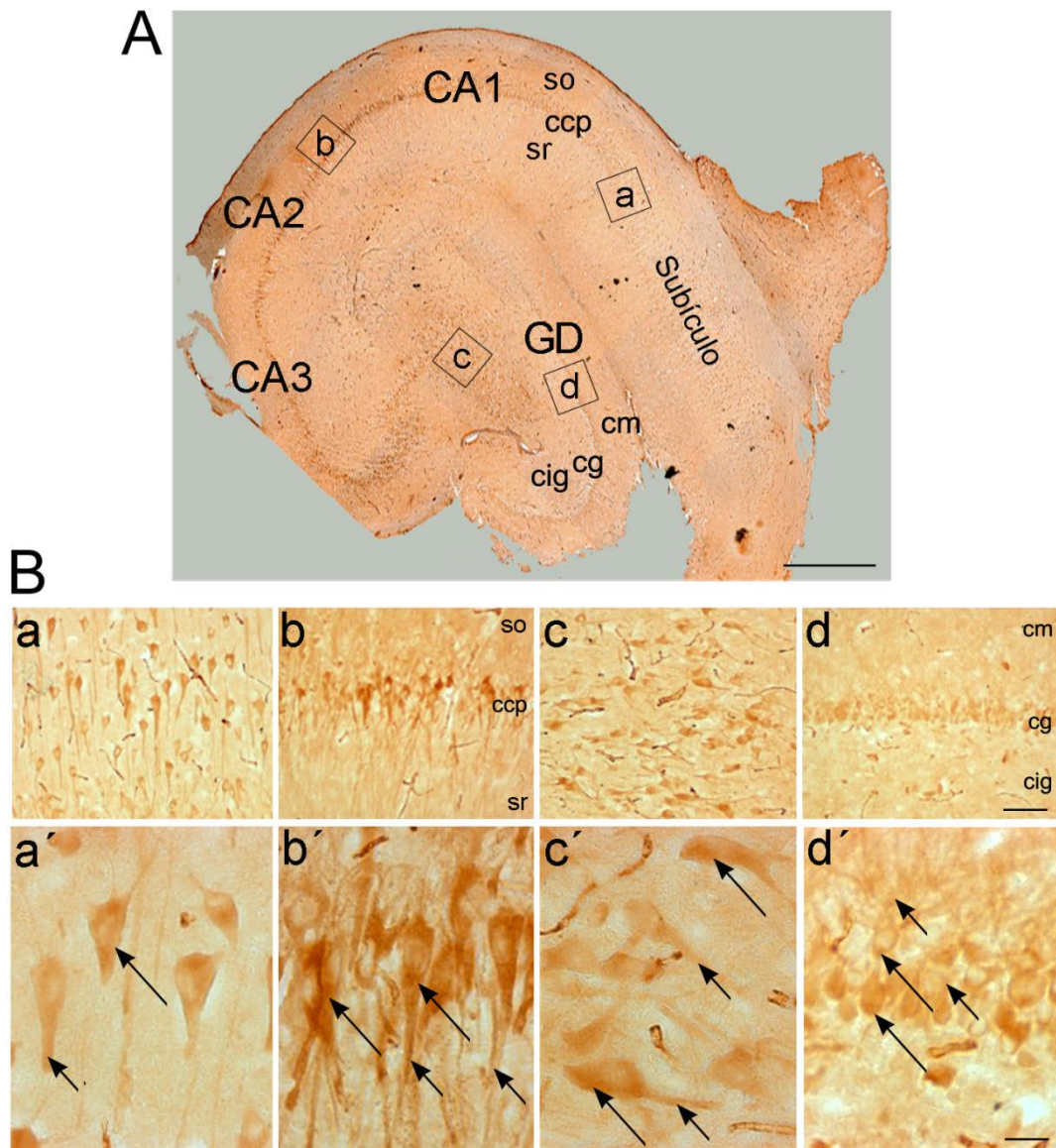


Figura 31 Localización de la SERCA2 en secciones para-sagitales del hipocampo de cerdo. A) Inmunohistoquímica de una sección completa del hipocampo, realizada con el anticuerpo IID8 (1:500) en la que aparece su organización en regiones y capas. B) Análisis de zonas específicas a mayores aumentos. Se observó la presencia de la SERCA en las neuronas del subículo (a), mayoritariamente en el retículo endoplásmico del citoplasma de los somas (flechas largas en a') y en los troncos dendríticos principales (flechas cortas en a') de estas células. En la región CA1, el anticuerpo marcó la capa de células piramidales (b), específicamente el citoplasma del soma (flechas largas en b') y los troncos dendríticos principales (flechas cortas en b') de estas células. La región de las células polimórficas (c) también presentó inmunorreacción en el citoplasma de los cuerpos celulares y troncos dendríticos (flechas largas y cortas en c', respectivamente). En el giro dentado (d), la SERCA se localizó en el interior del soma de las células granulares (d'). En todos los casos, los núcleos de las células marcadas fueron inmunonegativos. CA: *Cornu Ammonis*; GD: giro dentado; so, *stratum oriens*; ccp, capa de las células piramidales; sr, *stratum radiatum*; cm, capa molecular; cg; capa granular; cig, capa infragranular. Barras de escala: A, 685 μ m; d, 94 μ m; d', 23 μ m.

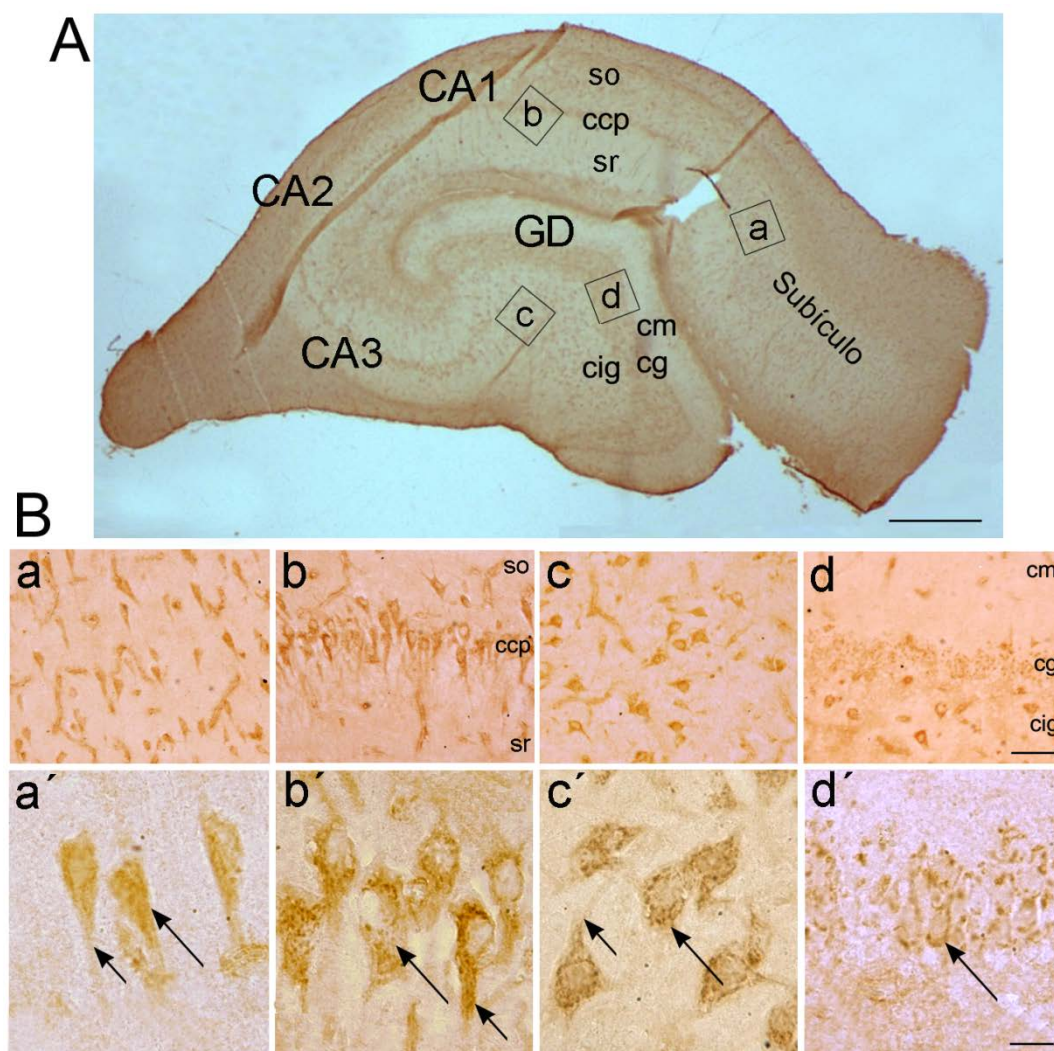


Figura 32 Distribución de la SPCA1 en secciones para-sagitales del hipocampo de cerdo. A) Inmunohistoquímica de una sección completa de hipocampo realizada con el anticuerpo anti-SPCA1 (1:250) donde se indica su estructura en regiones y capas. B) Análisis de zonas específicas: se observó un marcaje a modo de pequeños y discretos acúmulos, correspondientes a la localización de la SPCA1 en los complejos de Golgi, en las neuronas del subículo (a), concretamente en el soma (flechas largas en a') y el comienzo del tronco dendrítico (flechas cortas en a'). La capa de las células piramidales (b) apareció marcada en CA1 en todo el interior del soma y troncos dendríticos (flechas largas y cortas en b', respectivamente). La SPCA1 se localizó también en los troncos dendríticos y el soma de las neuronas polimórficas (flechas cortas y largas en c', respectivamente). En la capa granular del giro dentado (d) también hubo inmunorreacción en el interior de los somas (flechas largas en d'). Al igual que para SERCA el núcleo de las neuronas marcadas con el anticuerpo anti-SPCA1 fue claramente inmunonegativo. CA: *Cornu Ammonis*; GD: giro dentado; so, *stratum oriens*; ccp, capa de las células piramidales; sr, *stratum radiatum*; cm, capa molecular; cg; capa granular; cig, capa infragranular. Barras de escala: A, 685 μ m; d, 94 μ m; d', 23 μ m.

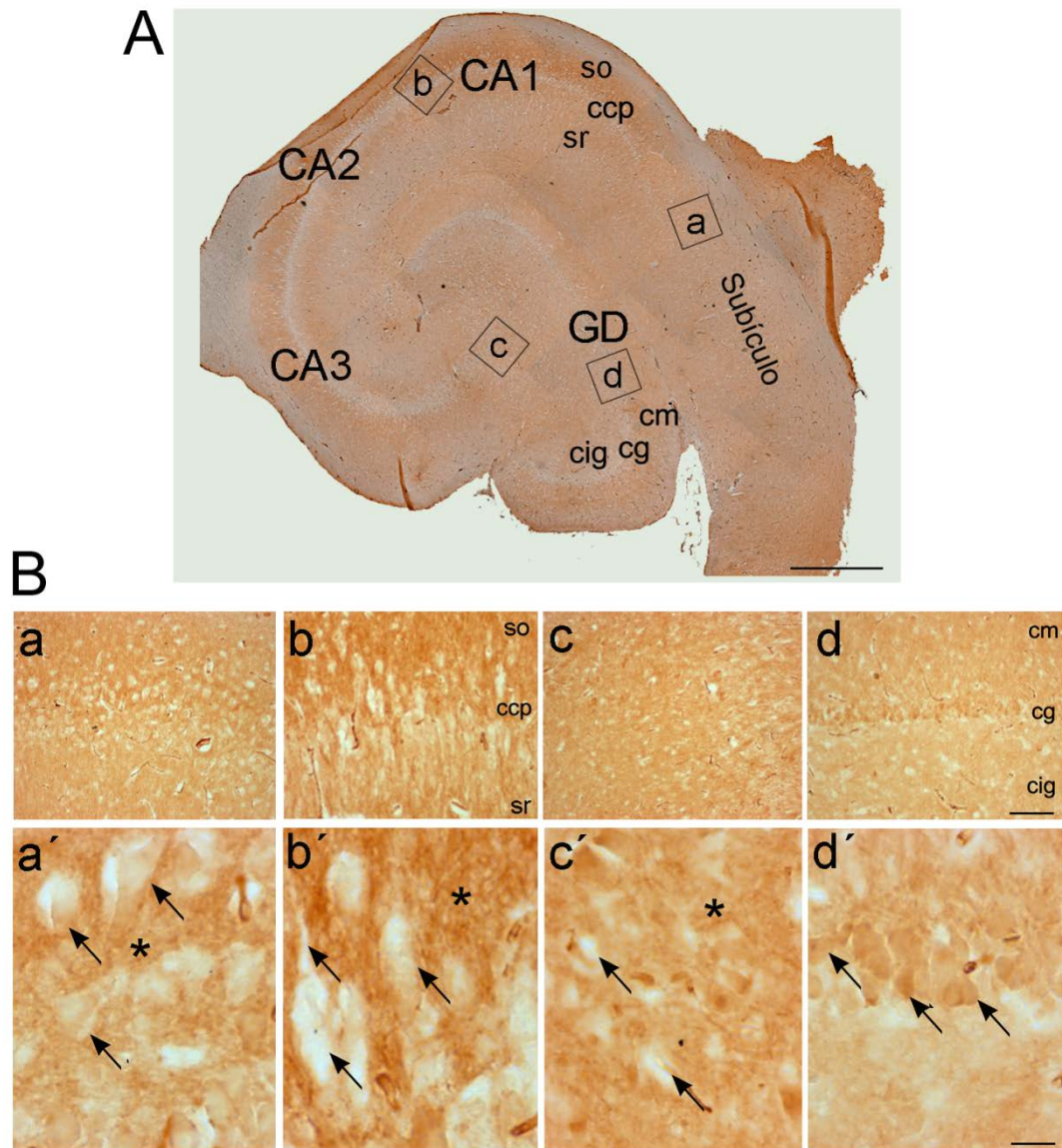


Figura 33 Inmunodetección de la PMCA total en secciones para-sagitales del hipocampo de cerdo.
A) Inmunohistoquímica de una sección completa del hipocampo realizada con 5F10 donde se indica su organización en regiones y capas. B) Análisis de las zonas específicas enmarcadas en A: el marcaje de la PMCA total se observó en el subículo (a), en concreto en la periferia de los cuerpos celulares (flechas en a') y en el neuropilo (asterisco en a'). En la región CA1, el anticuerpo marcó la capa de las células piramidales (b) en toda la periferia del soma y troncos dendríticos (flechas en b') así como el neuropilo (asterisco en b'). Un marcaje similar se observó en la región de las células polimórficas (c, c') y en la capa granular del giro dentado (d, d'). En todos los casos, el interior celular de las neuronas marcadas fue inmunonegativo. CA: *Cornu Ammonis*; GD: giro dentado; so, *stratum oriens*; ccp, capa de las células piramidales; sr, *stratum radiatum*; cm, capa molecular; cg, capa granular; cig, capa infragranular. Barras de escala: A, 685 μ m; d, 94 μ m; d', 23 μ m.

Localización de isoformas de la PMCA en secciones del hipocampo de cerdo

Debido a la abundancia de las isoformas PMCA observadas en los ensayos de Western blot, se analizó su distribución en el hipocampo de cerdo mediante ensayos inmunohistoquímicos utilizando anticuerpos anti-isoformas. Las figuras 34A, 35A, 36A y 37A muestran la distribución general de las PMCA1, PMCA2, PMCA3 y PMCA4, respectivamente, en cortes parasagitales de hipocampo de cerdo. Los paneles B muestran detalles de la localización de cada isoforma, a grandes aumentos.

La expresión de PMCA1 fue débil en todo el hipocampo (Fig. 34A), siendo la inmunorreacción más intensa en el neuropilo de los estratos *oriens* y *radiatum*, desde CA1 a CA3 (Fig. 34Bb). El anticuerpo anti-PMCA1 marcó también los somas y troncos dendríticos de las neuronas del subículo (Fig. 34Ba,a') y de las células piramidales del asta de Amón (Fig. 34Bb,b'). Las células polimórficas y las células granulares del giro dentado presentaron marcaje únicamente en el soma (Fig. 34Bc,c' y d,d', respectivamente).

La presencia de la PMCA2 fue muy intensa en todo el hipocampo (Fig. 35A), localizándose en fibras y puntos definidos distribuidos por las distintas capas. Se encontró inmunorreacción en la región del subículo (Fig. 35Ba,a') y bordeando los somas de las neuronas de las células piramidales del asta de Amón, marcándose también fuertemente los estratos *oriens* y *radiatum*, que contienen las prolongaciones axonales y dendríticas de estas células (Fig. 35Bb,b'). Un marcaje muy similar se observó en torno a los somas de las células polimórficas (Fig. 35Bc,c'). En el giro dentado (Fig. 35Bd,d'), la PMCA2 se localizó en prolongaciones horizontales de la parte inferior de la capa molecular (correspondiente a la vía perforante) y específicamente en la región infragranular, donde se originan las fibras musgosas procedentes de las células granulares.

La expresión de la PMCA3 (Fig. 36A) fue más débil que la de las otras isoformas, distribuyéndose mayoritariamente en el neuropilo de las regiones CA2 y CA3 y de la capa de células polimórficas. También se localizó en los somas y los troncos dendríticos de las

neuronas del subículo (Fig. 36Ba,a'), y de las células piramidales del asta de Amón (Fig. 36Bb,b') y células granulares (Fig. 36Bd,d'). La baja expresión observada coincide con los resultados obtenidos en los ensayos de Western blot en los que también encontramos que la PMCA3 era la isoforma que se encontraba en menor cantidad.

La distribución general de la PMCA4 se muestra en la figura 37A. Esta isoforma se localizó en el interior del soma y del tronco dendrítico principal de algunas de las neuronas del subículo (Fig. 37Ba,a'), de las células piramidales del asta de Amón (Fig. 37Bb,b'), de las neuronas de la región polimórfica (Fig. 37Bc,c') y de las células granulares del giro dentado (Fig. 37Bd,d'). Además, se observó inmunorreacción en el neuropilo de estas regiones de una forma homogénea. Cabe destacar que el anti-PMCA4 no reconocía todas las células de estas regiones, lo que podría indicar que puede tratarse de diferentes poblaciones celulares.

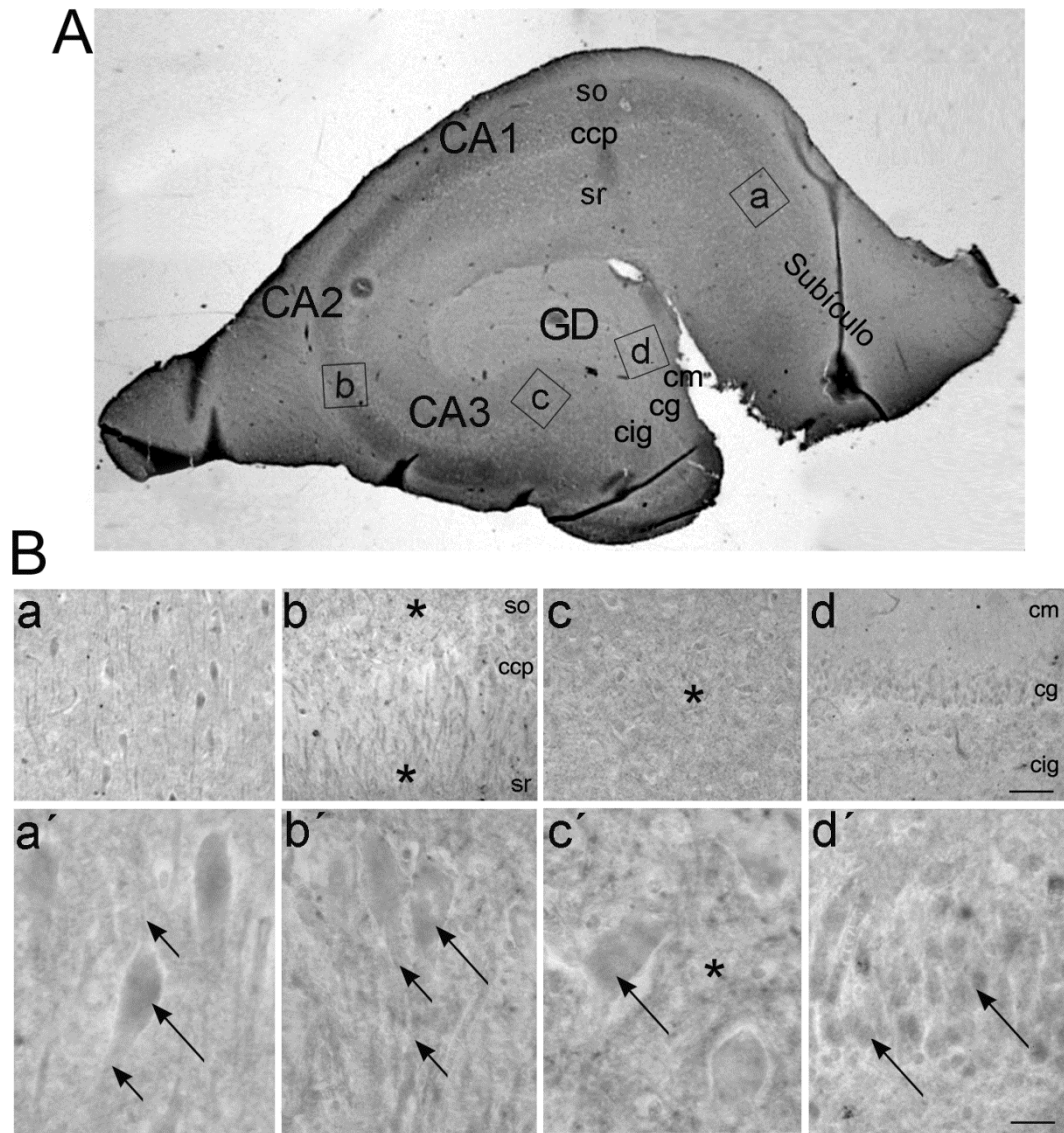


Figura 34 Inmunohistoquímica de PMCA1 en secciones para-sagitales del hipocampo de cerdo. A) Inmunohistoquímica de una sección completa de hipocampo. B) Detalles de las zonas enmarcadas en A: el anticuerpo anti-PMCA1 marcó los somas y troncos dendríticos de las neuronas del subículo (a y flechas largas y cortas en a', respectivamente). En la región de CA2 (b), se marcaron el soma y el tronco dendrítico de las células de la capa piramidal, así como el neuropilo (flechas largas y cortas en b', respectivamente). Además se observó marcaje en el neuropilo de los estratos *oriens* y *radiatum* (asterisco en b). La PMCA1 también se expresó en el soma de las células de la región polimórfica (flechas c y c') y en el neuropilo (asterisco, c y c'). En el giro dentado se localizó en el interior del soma de las células granulares (flechas largas d'). CA: *Cornu Ammonis*; GD: giro dentado; so, *stratum oriens*; ccp, capa de las células piramidales; sr, *stratum radiatum*; cm, capa molecular; cg; capa granular; cig, capa infragranular. Barras de escala: A, 685 μ m; d, 94 μ m; d', 23 μ m.

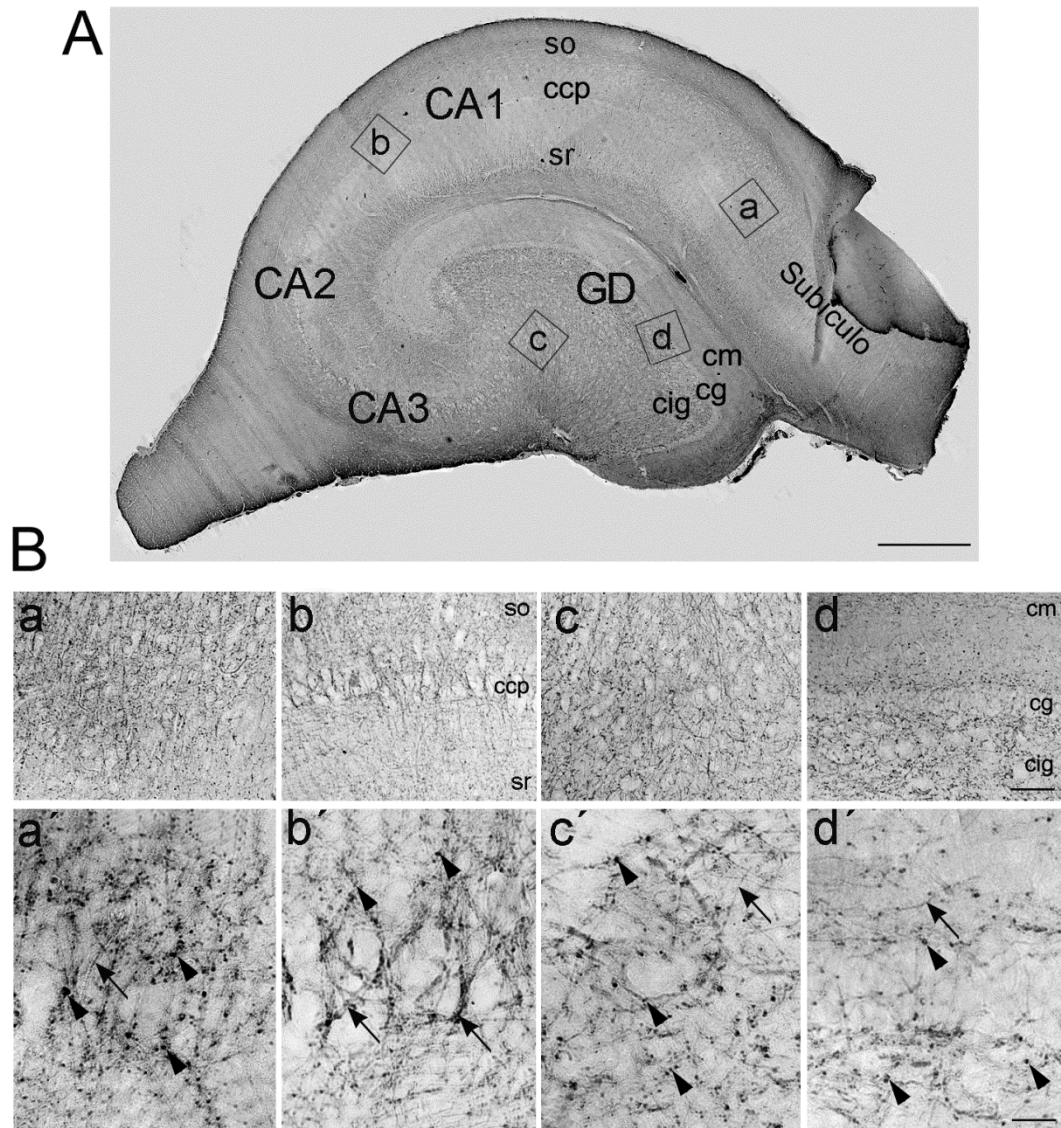


Figura 35 Localización de PMCA2 en el hipocampo de cerdo. A) Sección completa de hipocampo de cerdo marcado con anti-PMCA2. B) Detalles de A. El anticuerpo anti-PMCA2 marcó fibras longitudinales (flechas cortas) y acúmulos definidos, correspondientes a fibras transversales (cabezas de flecha) en las regiones del subículo (a, a'), del asta de Amón (b, b'), de las células polimórficas (c, c') y del giro dentado (d, d'). CA: *Cornu Ammonis*; GD: giro dentado; so, *stratum oriens*; ccp, capa de las células piramidales; sr, *stratum radiatum*; cm, capa molecular; cg, capa granular; cig, capa infragranular. Barras de escala: A, 685 μ m; d, 94 μ m; d', 23 μ m.

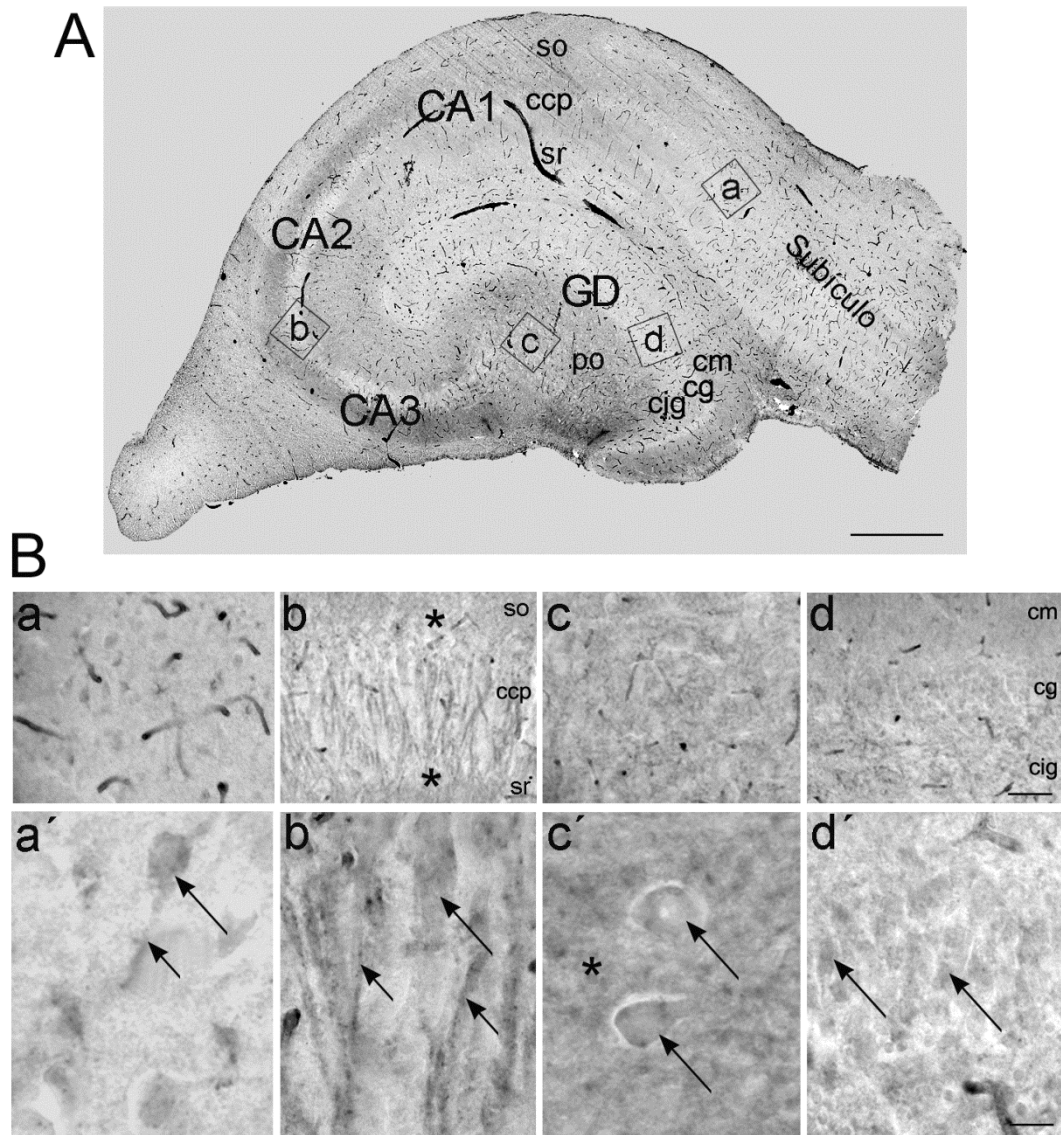


Figura 36 Inmunohistoquímica de PMCA3 en hipocampo de cerdo. A) Sección completa de hipocampo marcada con anti-PMCA3. B) Detalles de A. Se observó inmunorreacción en el neuropilo de CA2 y CA3 y de la región polimórfica (asteriscos en b y c', respectivamente). El anticuerpo marcó débilmente los somas de las neuronas del subículo (flechas en a') y los somas y troncos dendríticos de las neuronas piramidales del asta de Amón (flechas en b). CA: *Cornu Ammonis*; GD: giro dentado; so, *stratum oriens*; ccp, capa de las células piramidales; sr, *stratum radiatum*; cm, capa molecular; cg; capa granular; cig, capa infragranular. Barras de escala: A, 685 μ m; d, 94 μ m; d', 23 μ m.

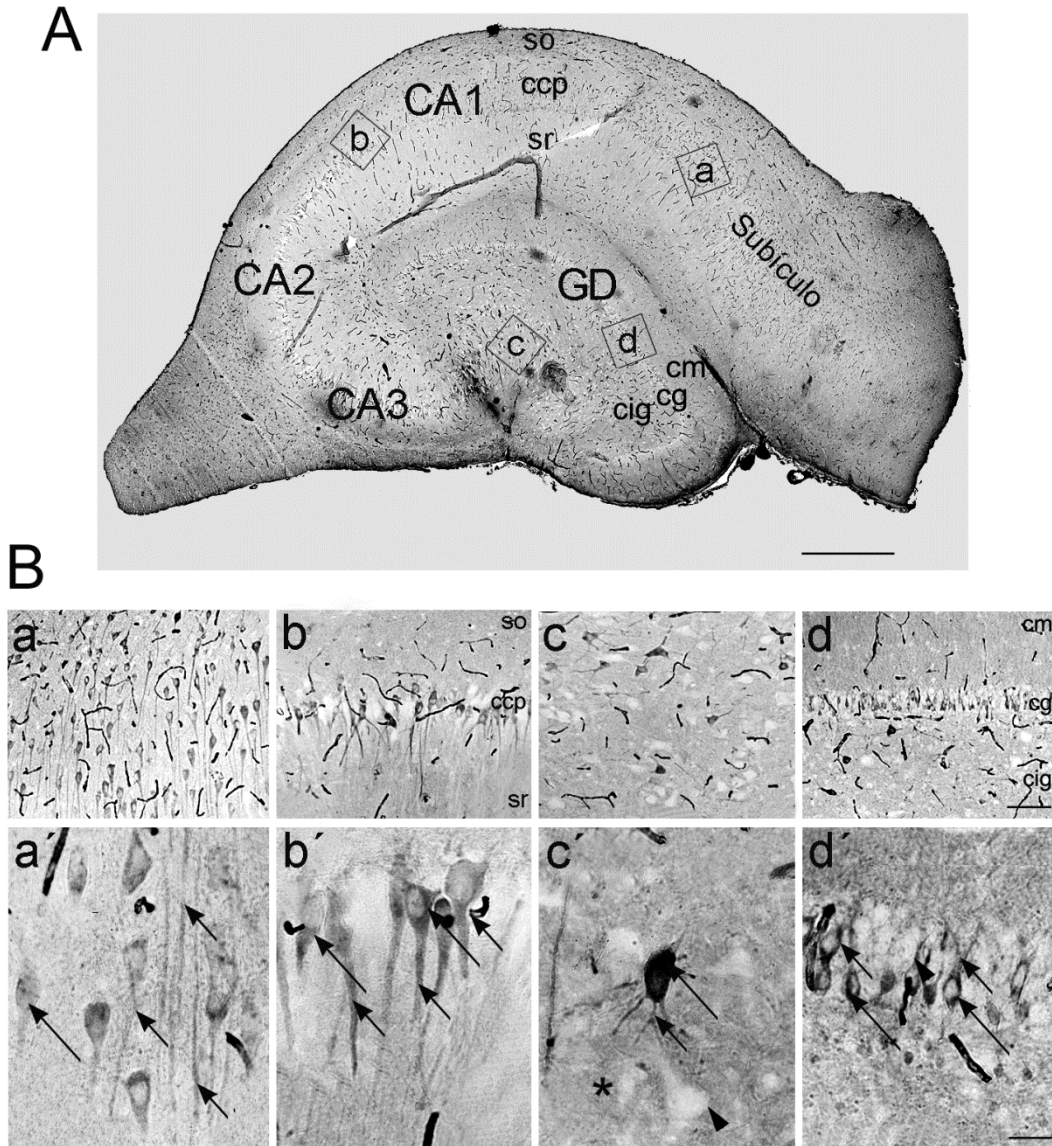


Figura 37 Localización de PMCA4 en hipocampo de cerdo. A) Inmunihistoquímica de hipocampo de cerdo con anti-PMCA4. B) Detalles de A. La inmunorreacción se detectó en el soma (flechas largas) y el tronco dendrítico (flechas cortas) de las neuronas localizadas en el subículo (a, a'), de las células piramidales del asta de Amón (b, b'), de las neuronas de la región polimórfica (c, c') y de las células granulares del giro dentado (cg; d, d'). Nótese como no todas las células de estas regiones presentaban inmunorreacción. Además, el neuropilo de estas regiones presentó un marcaje homogéneo (asterisco). CA: *Cornu Ammonis*; GD: giro dentado; so, *stratum oriens*; ccp, capa de las células piramidales; sr, *stratum radiatum*; cm, capa molecular; cg; capa granular; cig, capa infragranular. Barras de escala: A, 685 μ m; d, 94 μ m; d', 23 μ m.

Distribución de las isoformas PMCA en microdominios lipídicos rafts.

También se analizó la localización de las cuatro isoformas de la PMCA en regiones específicas de la membrana plasmática y concretamente en microdominios *rafts*. Los *rafts* son regiones ricas en colesterol y esfingolípidos que en los últimos años han adquirido especial importancia porque se ha descrito que constituyen plataformas que asocian espacialmente a proteínas implicadas en transducción de señales (Simons y Toomre 2000) y particularmente proteínas que intervienen en enfermedades neurodegenerativas (Scott *et al.* 2000, Mahfoud *et al.* 2002, Molander-Melin *et al.* 2005, Mata *et al.* 2011). Resultados previos de nuestro laboratorio, realizados en el cerebelo de cerdo (Sepúlveda *et al.* 2006), mostraron que sólo la isoforma PMCA4 se asociaba a estos dominios lipídicos. Para analizar si esta distribución ocurría también en el hipocampo, se aislaron microdominios *rafts* mediante tratamiento de vesículas de membrana plasmática sinaptosomal (MPS) del hipocampo de cerdo con el detergente no iónico Brij 96V y gradientes de densidad en Nicodenz, siguiendo el protocolo descrito en Sepúlveda *et al.* (2006). Se empleó esta fracción por ser la más rica en membrana plasmática (Sepúlveda *et al.* 2004). Las fracciones del gradiente que contenían *rafts* se determinaron analizando en cada una de ellas la presencia de dos marcadores específicos de estos microdominios, la proteína del prión (PrP^C) mediante Western blot con el anticuerpo 6H4 (Taraboulos *et al.* 1995, Madore *et al.* 1999) y el colesterol por espectrofotometría (Radeva y Sharom 2004, Sepúlveda *et al.* 2006). Las figuras 38A y 38B muestran la presencia de de ambos marcadores en las fracciones de baja densidad del gradiente (superiores) indicando el correcto aislamiento de estas balsas lipídicas. La tinción de la membrana de PVDF con Ponceau (Fig. 38C) indicaba que la mayoría de las proteínas de las MPS no se distribuyen en *rafts*.

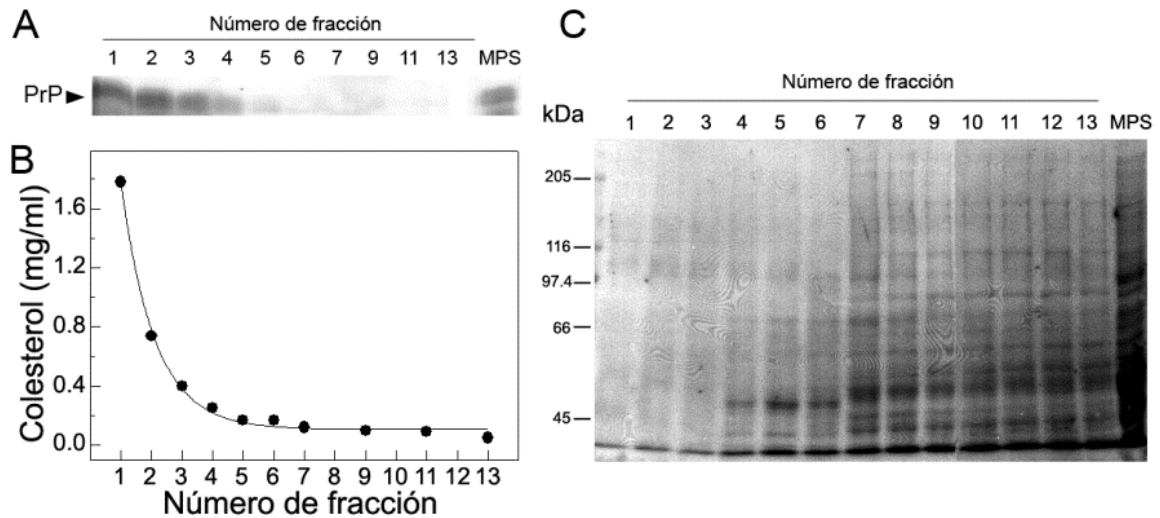


Figura 38 Distribución de PrP y colesterol las fracciones del gradiente de Nicodenz. A) Once μ L de cada fracción obtenida a partir del gradiente y 30 μ g de MPS no sometidas al gradiente (control), se separaron en un gel de poliacrilamida al 10%. Tras la transferencia las membranas se incubaron con el anticuerpo anti-PrP 6H4 (1:3000) toda la noche a 4°C, analizándose su unión mediante un anticuerpo secundario unido a peroxidasa y empleando como sustrato el metoxinaftol. B) Cuantificación del colesterol presente en cada fracción (10 μ l) empleando un método colorimétrico (ver Materiales y Métodos). C) Membrana de PVDF teñida con rojo Ponceau en la que se muestra la distribución en cada fracción de las proteínas de las MPS separadas por electroforesis.

Posteriormente se realizó un Western blot de cada fracción del gradiente con anticuerpos específicos de cada isoforma de PMCA (Fig. 39). Se observó que las PMCA1, 2 y 3 aparecían exclusivamente en las fracciones de alta densidad indicando que no se asociaban a *rafts*. Sin embargo el anticuerpo anti-PMCA4 (Fig. 39A/B) detectó la presencia de esta isoforma en las fracciones de baja densidad, y también en las últimas, indicando la distribución de esta isoforma en microdominios *rafts* y en los dominios no *rafts* de la membrana plasmática.

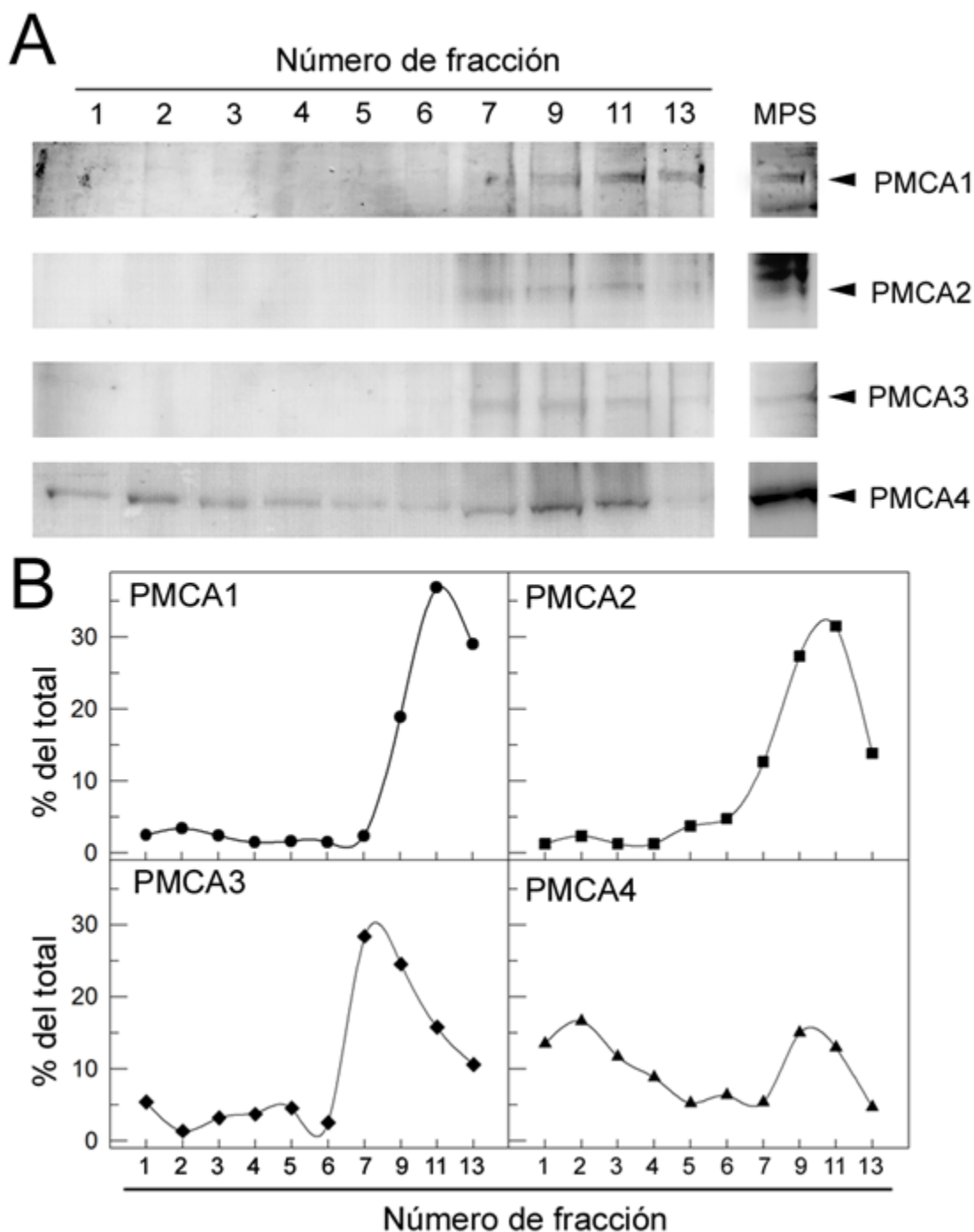


Figura 39 Distribución de las cuatro isoformas PMCA en el gradiente de densidad de Nicodenz. A) En un gel de poliacrilamida al 6,5% se cargaron 11 μ L de cada una de las fracciones y 30 μ g de MPS no tratadas. Tras la transferencia a membranas de PVDF, se incubó con los anticuerpos anti-PMCA1, 2 y 3 (1:500) y anti-PMCA4 (1:1000) toda la noche a 4°C, detectándose la unión mediante anticuerpos secundarios unidos a peroxidasa y como sustrato el metoxinaftol. B) Cuantificación de las bandas de A. Se muestra un blot representativo de tres experimentos independientes.

Capítulo II

“Expresión funcional y localización de las Ca^{2+} -ATPasas en el encéfalo de ratón durante el desarrollo postnatal.”

Resumen

Las bombas de Ca^{2+} son transportadores activos implicados en la homeostasis del ión Ca^{2+} . Considerando el importante papel que este ión desempeña en la señalización durante el desarrollo neuronal y la plasticidad se han analizado la presencia, actividad y localización de la SERCA2b, la SPCA1 y de todas las isoformas PMCA en el hipocampo, la corteza y el cerebelo de ratón en desarrollo. Mediante ensayos de actividad se observó que todas las bombas son funcionales desde los primeros estadios de desarrollo coincidiendo su nivel de expresión con la actividad. La PMCA presenta la mayor actividad de las tres, alcanzando su actividad máxima en la corteza antes que en el hipocampo o el cerebelo. Los ensayos inmunohistoquímicos muestran una localización diferente y restringida según el tipo de bomba, estando la PMCA co-localizada en regiones ricas en sinapsis y membrana plasmática. En conjunto, estos resultados sugieren unos requerimientos específicos de Ca^{2+} durante el desarrollo postnatal de las diferentes áreas estudiadas.

Expresión de *SERCA2b*, *SPCA1* y *PMCA* total en diferentes regiones del encéfalo de ratón

Se determinó la expresión de las tres familias de Ca^{2+} -ATPasas en extractos de membranas obtenidas del hipocampo, la corteza y el cerebelo del ratón durante el desarrollo postnatal, desde el estadio P0 hasta el P30 mediante ensayos de Western blot (Fig. 40). Se observó que las tres bombas estaban presentes en las tres áreas analizadas desde el estadio inicial P0.

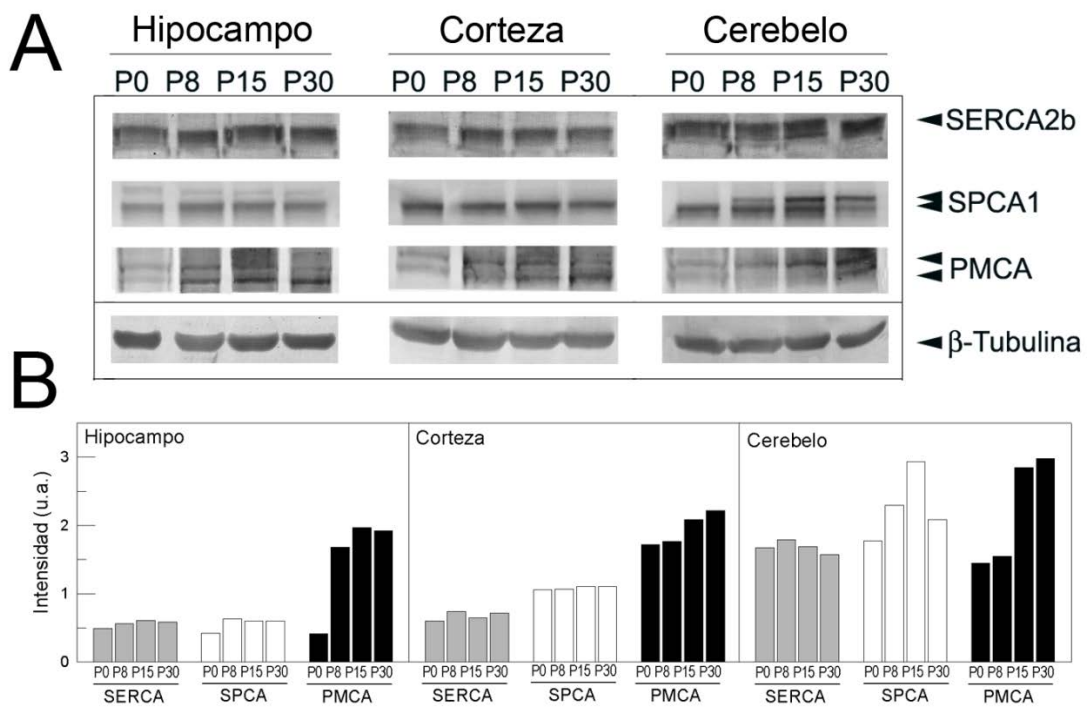


Figura 40 Distribución de las tres familias de bombas de calcio en extractos de membrana de hipocampo, corteza y cerebelo de ratón en desarrollo. A) Se emplearon 20 μ g de extractos de membrana. Las proteínas se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 6,5%. Tras la transferencia el PVDF se incubó con los anticuerpos anti-SERCA2b (1:200), 5F10 (1:3000) y anti-SPCA1 (1:1000). Como control de carga se utilizó la inmunorreacción con anti- β -tubulina. B) Cuantificación de las bandas de las ATPasas respecto a la banda de la β -tubulina.

Los niveles de expresión de la SERCA2b, que es la isoforma mayoritaria en cerebro y cerebelo, se determinaron con el anticuerpo anti-SERCA2b, que reconoce esta isoforma en ratón. Se observó que su expresión permaneció constante durante el desarrollo en todas las regiones estudiadas. El anti-SPCA1 reconoció una o dos bandas de proteína

dependiendo del área analizada. En el hipocampo y la corteza detectó una única banda de aproximadamente 100 kDa cuya expresión permaneció prácticamente constante durante el desarrollo. Por el contrario, en el cerebelo, el anticuerpo detectó dos bandas. La de menor tamaño mostró su máximo de expresión en el estadio P0 mientras que la de mayor tamaño aparece a partir del estadio P8, pudiendo corresponder con algún tipo de subisoforma que se exprese específicamente en el cerebelo.

El anticuerpo 5F10 marcó dos bandas a la altura aproximada de 140 kDa, correspondiente al peso molecular de distintas isoformas de la PMCA. En el hipocampo y la corteza, la intensidad de la banda de menor peso molecular incrementó su expresión con el desarrollo, mientras que en el cerebelo fue la de mayor peso molecular la que aumentó de forma más pronunciada.

Niveles de expresión de las isoformas PMCA en el hipocampo, la corteza y el cerebelo durante el desarrollo.

Debido a la diversidad de isoformas de la bomba de membrana plasmática (PMCA) en el sistema nervioso, el estudio se amplió analizando su expresión y distribución durante el desarrollo postnatal. Mediante Western blot se analizó la expresión de las isoformas PMCA en extractos de membrana de las diferentes áreas del sistema nervioso (Fig. 41A). El anticuerpo anti-PMCA1 detectó dos bandas de proteínas de 130 y 134 kDa cuya expresión aumentó progresivamente con el desarrollo hasta el estadio P15 en las tres áreas analizadas. La intensidad de la banda inferior fue mayor respecto a la de la banda superior en el hipocampo y la corteza, mientras que en el cerebelo ambas bandas se expresaron de forma similar. El anticuerpo anti-PMCA2, detectó un espectro de bandas entre los 126 y los 150 kDa en las tres regiones del encéfalo, incrementado su intensidad progresivamente con el estadio de desarrollo. El anticuerpo anti-PMCA3 reconoció tres bandas principales cuya expresión aumentó también con el desarrollo. La inmunorreacción del anticuerpo anti-

PMCA4 fue muy fuerte en las tres áreas analizadas, apareciendo como un espectro de bandas que incrementó durante el desarrollo. En el hipocampo, la intensidad de éstas incrementó durante todos los estadios, mientras que en la corteza se mantiene constante a partir de de P8 y en el cerebelo, la expresión de la PMCA4 se mantuvo constante prácticamente desde el estadio P0. La inmunorreacción con β -tubulina se empleó como control de carga y referencia para las cuantificaciones (Fig. 41B). Cabe destacar que el mayor incremento de la expresión de la PMCA total apareció a partir del estadio P15 en el hipocampo y cerebelo y de P8 en la corteza.

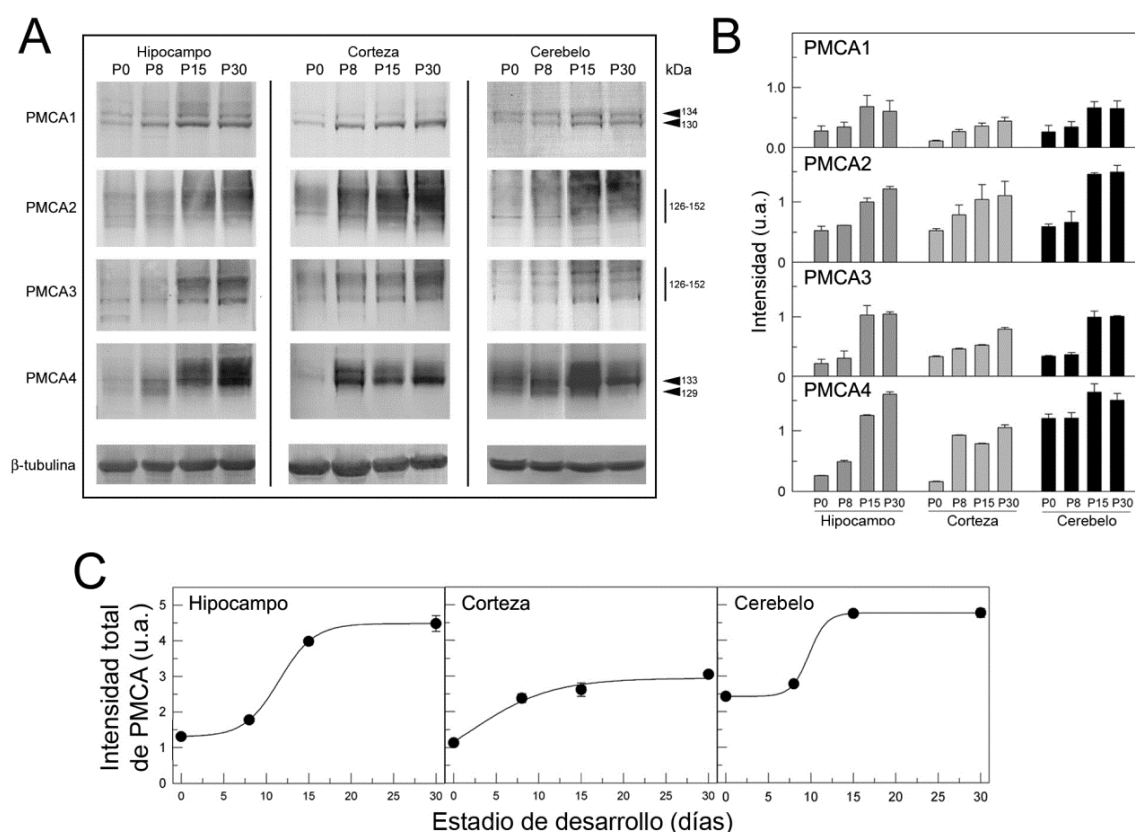


Figura 41 Inmunodetección de las isoformas PMCA en las diferentes áreas del encéfalo de ratón. A) Extractos de membranas (20 μ g) de la corteza, el hipocampo y el cerebelo de los estadios indicados se separaron por electroforesis, se transfirieron a membranas de PVDF y se incubaron con los anticuerpos específicos de cada isoforma (1:1000). La inmunorreacción con β -tubulina se empleó como control de carga. B) Cuantificación de las isoformas PMCA (combinando las variantes de cada isoforma) respecto a la β -tubulina. C) Intensidad total de PMCA teniendo en cuenta las intensidades de todas las isoformas en todos los estadios del desarrollo.

Expresión funcional de SERCA, SPCA y PMCA en diferentes áreas del cerebro de ratón en desarrollo.

Las actividades Ca^{2+} -ATPasas de las tres familias de las bombas de Ca^{2+} se midieron en extractos de membranas del hipocampo, la corteza y el cerebelo en los diferentes estadios de desarrollo (Fig. 42). Los resultados obtenidos a partir de estos ensayos enzimáticos mostraron que las tres bombas son funcionales desde los estadios más prematuros del desarrollo cerebral. En el hipocampo la actividad SERCA aumenta progresivamente con el desarrollo alcanzando un incremento final del 211% respecto a la actividad inicial. En la corteza, la SERCA mostró un brusco aumento de actividad, del 512% hasta P8 para después estabilizarse. En el cerebelo la SERCA presentó valores más bajos de actividad que en las otras áreas. La actividad de la SPCA incrementó de forma lineal en el hipocampo y la corteza, mientras que en el cerebelo prácticamente no varió durante los primeros ocho días del desarrollo y después aumentó de forma lineal hasta el P30. La PMCA contribuyó en mayor medida a la actividad Ca^{2+} -ATPasa total que las otras ATPasas en todas las áreas y todos los estadios analizados. Además la actividad de la PMCA siguió dos patrones diferenciados durante el desarrollo postnatal, alcanzando la V_{max} en el hipocampo y el cerebelo en el estadio P15 mientras que en la corteza la obtuvo en el P8. Los valores de V_{max} fueron similares en todas las regiones ($0.237 \pm 0.017 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) y el incremento de actividad fue más marcado (en torno a 4 veces) en el hipocampo y la corteza que en el cerebelo (de 2-3 veces). Esta diferencia en el patrón de actividades podría sugerir unas necesidades de la regulación del Ca^{2+} diferentes según las áreas y el estadio de desarrollo.

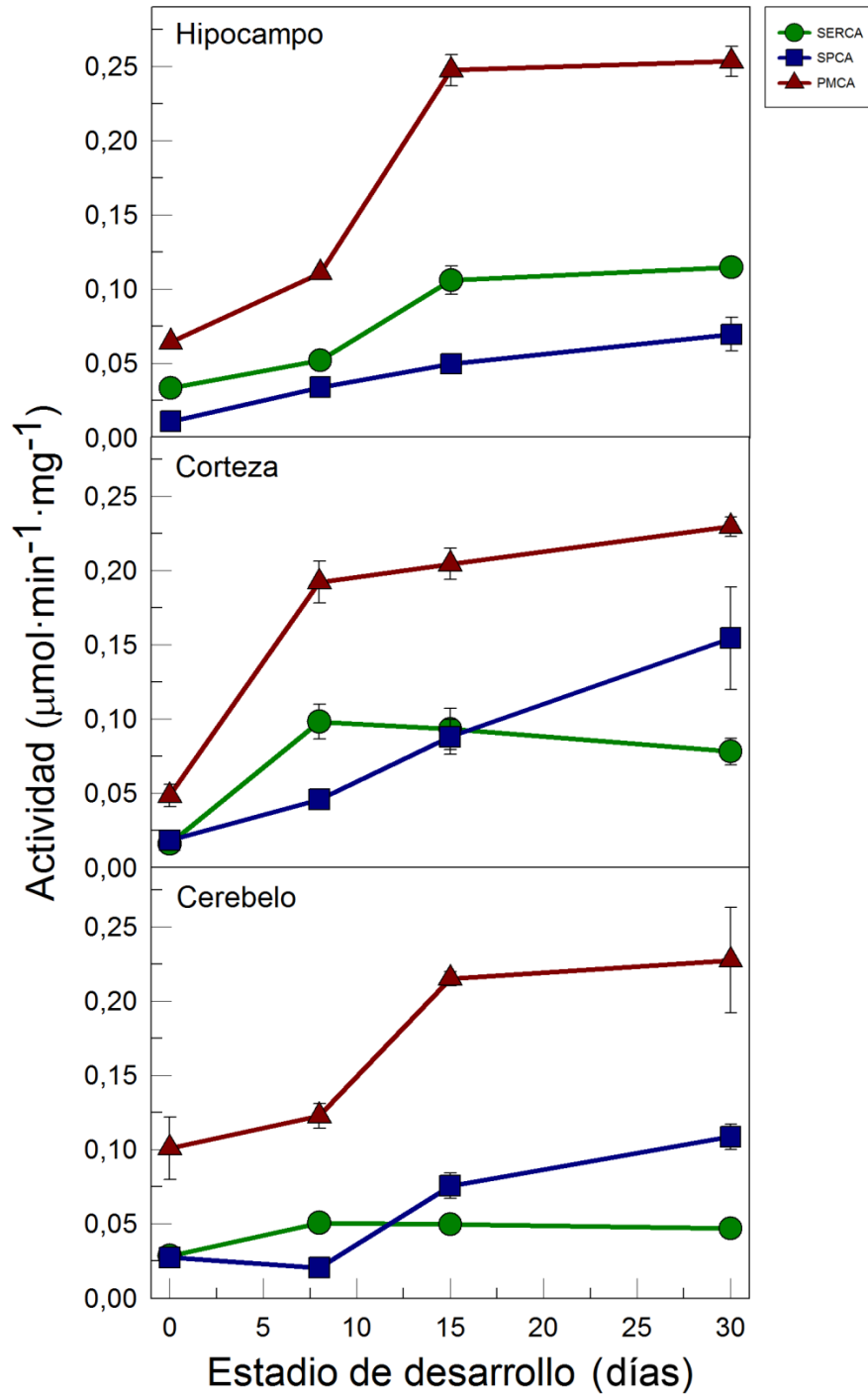


Figura 42 Actividad SERCA, SPCA y PMCA en vesículas de membranas de diferentes áreas del encéfalo de ratón en desarrollo. La actividad enzimática de cada una de las Ca^{2+} -ATPasas se midió en $20 \mu\text{g}$ de proteína usando el sistema enzimático acoplado e inhibidores como se describe en los Materiales y Métodos. Los datos representan la media \pm DE de tres experimentos realizados con tres preparaciones diferentes.

Inmunolocalización de bombas de Ca^{2+} en secciones parasagitales del encéfalo de ratón durante el desarrollo.

Se realizaron inmunohistoquímicas en cortes parasagitales del encéfalo y se emplearon anticuerpos específicos de cada una de las ATPasas, para analizar la distribución de las isoformas SERCA2b, SPCA1 y PMCA en el hipocampo, la corteza y el cerebelo del ratón durante el desarrollo postnatal.

En la figura 43 se muestra la distribución de las tres familias de Ca^{2+} -ATPasas en la región CA del hipocampo de ratón en los distintos estadios. La SERCA2b se localizó uniformemente en el citoplasma de los somas de las células piramidales del asta de Amón desde P0 hasta P30, mientras que la SPCA1 se distribuyó a modo de acúmulos discretos en el interior de los somas de estas mismas células. La PMCA se expresó fuertemente en la periferia de los somas de las células piramidales así como en el neuropilo del *stratum oriens* y *radiatum* del asta de Amón.

En la corteza (Fig. 44) la SERCA2b se localizó de forma homogénea en el interior de los somas de las células piramidales desde el día del nacimiento (P0), mientras que la SPCA1 marcó los somas en P0, y con el desarrollo se distribuyó a modo de acúmulos en el interior del soma de las neuronas piramidales. Por el contrario la PMCA se localizó en la periferia del soma de las neuronas desde P0. Esta localización progresó hacia el neuropilo de las células según avanzaba el desarrollo postnatal.

En el cerebelo (Fig. 45) el anti-SERCA2b marcó el interior de las células precursoras de Purkinje y las células maduras, así como el principio de la arborización. En los estadios tempranos del desarrollo la SPCA1 se localizó de forma homogénea en los precursores de las células de Purkinje, pero a partir del estadio P8 el marcaje se localizó a modo de acúmulos en el soma de estas células, el comienzo del tronco dendrítico y las interneuronas. La PMCA se expresó, desde P0, en la periferia de los precursores de las

células de Purkinje y a partir de P8 se localizó fuertemente en la periferia de estas células así como en el neuropilo y en las capas molecular y granular.

El marcaje de los anticuerpos en las tres áreas analizadas se corresponde con la localización de la SERCA en el retículo endoplásmico, de la SPCA en el aparato de Golgi y de la PMCA en la membrana plasmática.

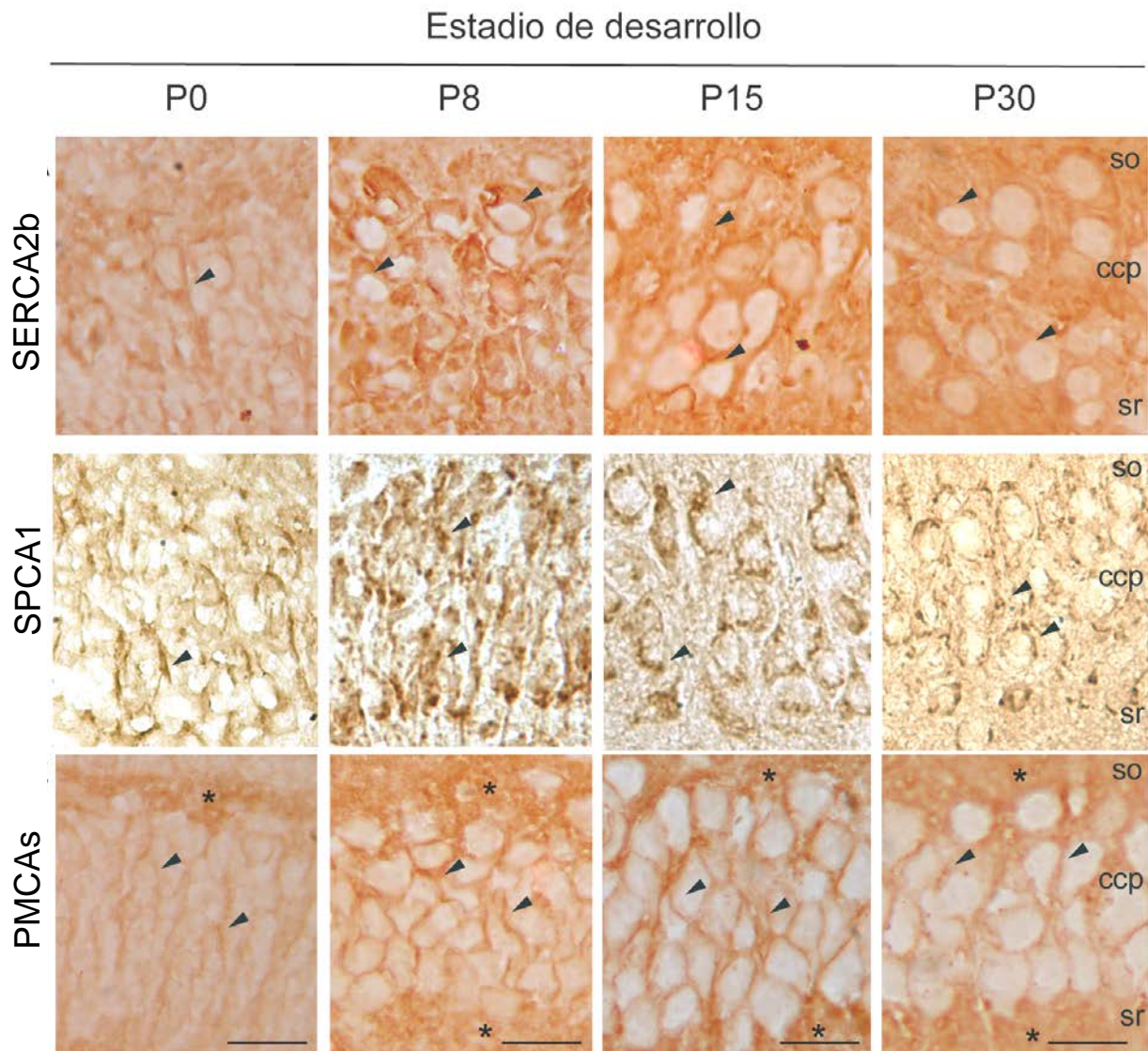


Figura 43 Localización de SERCA2b, SPCA1 y PMCA total en la región CA del hipocampo de ratón durante el desarrollo. El anti-SERCA2b marcó el interior de los somas de las células piramidales del asta de Amón (puntas de flechas). El anti-SPCA1 marcó gránulos en el interior de los somas de estas mismas células (cabezas de flechas). El anticuerpo 5F10 marcó a la PMCA en el contorno celular de las células de piramidales (puntas de flecha) y en el neuropilo de los estratos *oriens* y *radiatum* del asta de Amón (asteriscos). so: *stratum oriens*; ccp: capa de las células piramidales; sr: *stratum radiatum*. Barras de escala: 95 μ m en P0, 55 μ m en P8, 60 μ m en P15 y 65 μ m en P30.

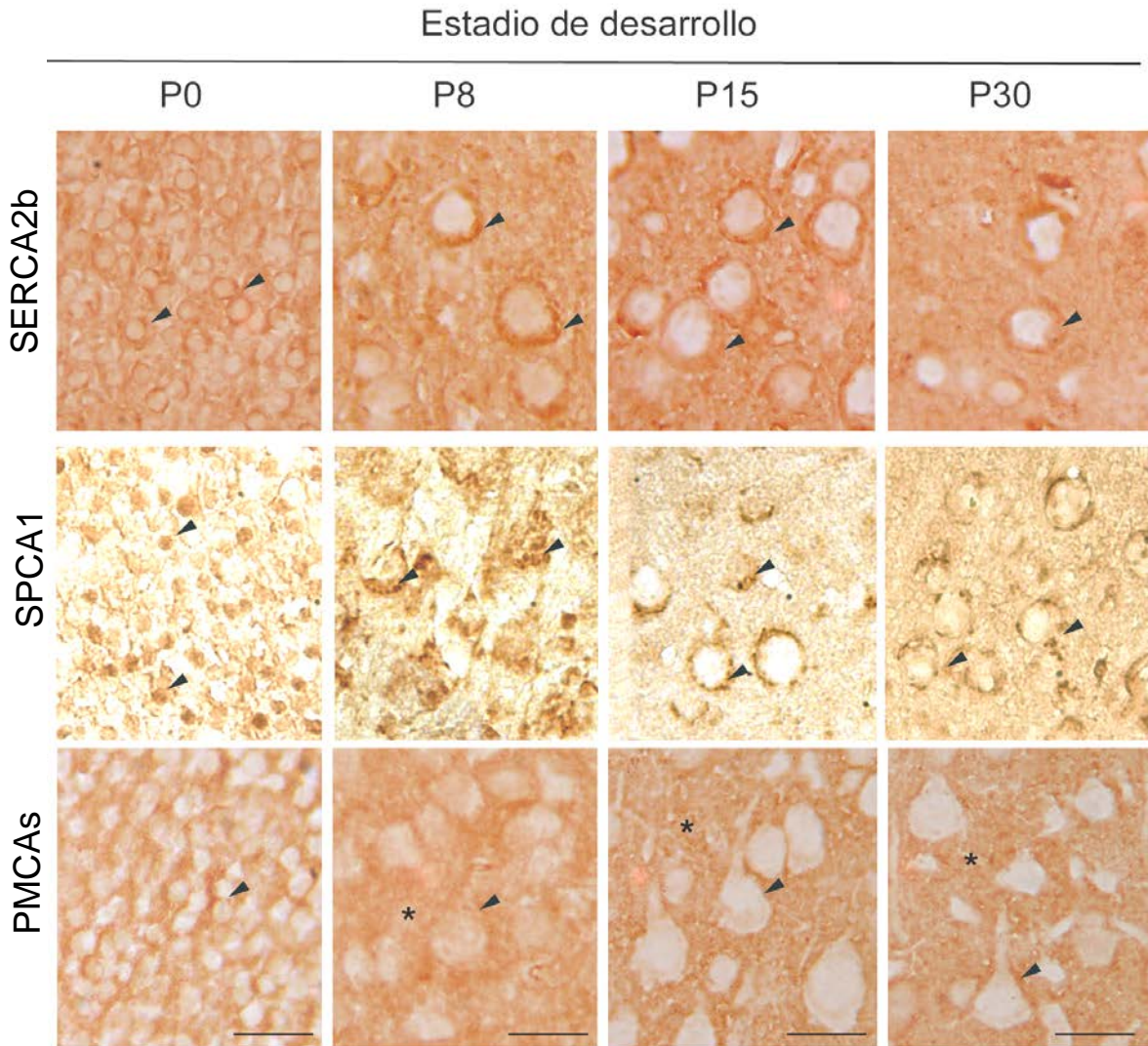


Figura 44 Distribución de las bombas de Ca^{2+} en la capa V de la corteza de ratón en desarrollo. La SERCA2b se distribuyó en el interior de los somas de las células piramidales de la corteza (puntas de flecha). La SPCA1 se localizó homogéneamente en el interior de los somas en P0 (puntas de flecha) y a partir de P8 se localizó a modo de acúmulos definidos en el interior de los somas de las mismas células (puntas de flecha). El anticuerpo 5F10 marcó a la PMCA en la membrana plasmática de las células piramidales (puntas de flecha) y en el neuropilo de esta área (asteriscos). Barras de escala: 95 μm en P0, 55 μm en P8, 60 μm en P15 y 65 μm en P30.

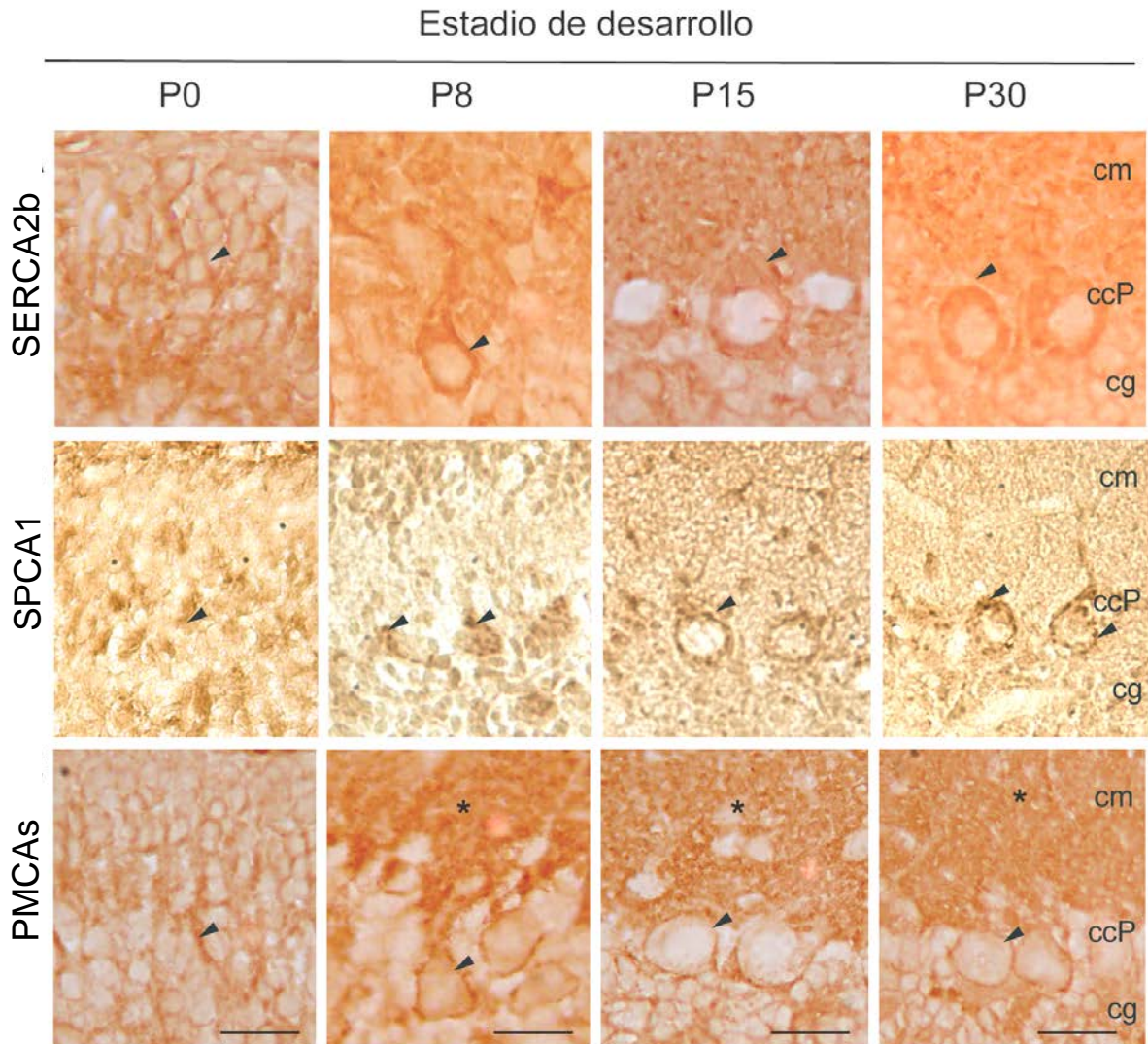


Figura 45 Inmunolocalización de bombas de Ca^{2+} en secciones parasagitales del cerebelo de ratón durante el desarrollo postnatal. La SERCA2b se localizó intensamente en el interior de los somas de las células de Purkinje (puntas de flecha). La SPCA se localizó en acúmulos en el interior de los somas de estas mismas células y el interior de los troncos dendríticos (puntas de flecha). La PMCA se localizó en el contorno de los precursores de las células de Purkinje en P0 (puntas de flecha) y a partir de P8 la proteína se distribuyó en el contorno celular (puntas de flecha) y en la capa molecular (asteriscos). cm: capa molecular; ccP: capa de las células de Purkinje; cg: capa granular. Barras de escala: 95 μ m en P0, 55 μ m en P8, 60 μ m en P15 y 65 μ m en P30

Localización y distribución de las PMCAs en secciones sagitales del cerebro de ratón durante el desarrollo.

Con el objetivo de analizar si la variación de la actividad PMCA y los cambios expresión de las isoformas PMCA durante el desarrollo iban asociados a la maduración de tipos celulares concretos, se analizó su localización mediante ensayos inmunohistoquímicos en secciones parasagitales del encéfalo a los 0, 8, 15 y 30 días de desarrollo postnatal (Fig. 46, 47, 48). En general, la distribución de cada isoforma fue consecuente con el patrón temporal de expresión observado por Western blot.

En el cuerno de Amón del hipocampo (Fig. 46) las cuatro isoformas PMCA se expresaron débilmente en los primeros estadios del desarrollo. En el P8, estadio en el que ya están establecidas las diferentes capas celulares, las isoformas PMCA1 y PMCA2 mostraron los mayores niveles de expresión. Éstas se localizaron en la membrana plasmática de los somas de las neuronas piramidales y mostraron un marcaje intenso, a modo de puntos, en el neuropilo de los estratos *oriens* y *radiatum*. En P30 todas las isoformas presentaron un nivel de expresión y distribución similares.

En la corteza cerebral (Fig. 47), todas las isoformas PMCA se expresaron en los precursores neuronales en P0, pero su distribución se fue definiendo conforme avanzaba el desarrollo neuronal, pasando a localizarse en el neuropilo y la periferia celular. La expresión de la PMCA3 fue comparativamente débil en todos los estadios. En el P30 las cuatro isoformas se expresaron más intensamente en el neuropilo y en el contorno de las células piramidales de la corteza. En todos los casos no se encontró inmunorreacción de PMCA en los citoplasmas y los troncos dendríticos.

En el cerebelo (Fig. 48) las isoformas 1 y 3 mostraron en P0 una expresión menor en los precursores neuronales que las PMCA2 y la 4. Desde el estadio P8 en adelante las PMCAs 1 y 3 se distribuyeron a modo de puntos en el neuropilo de la capa molecular. La PMCA2 se localizó en regiones similares a las PMCAs 1 y 3 pero se expresó con mayor

intensidad en la membrana plasmática del soma y los troncos dendríticos de las células de Purkinje. Por el contrario, en el estadio P30 la PMCA4 aparecía mayormente localizada en el soma y los troncos dendríticos de estas células. En la capa granular, las células granulares maduras expresaron PMCA1 y PMCA3, mientras que en los glomérulos cerebelosos parecían expresarse todas las isoformas.

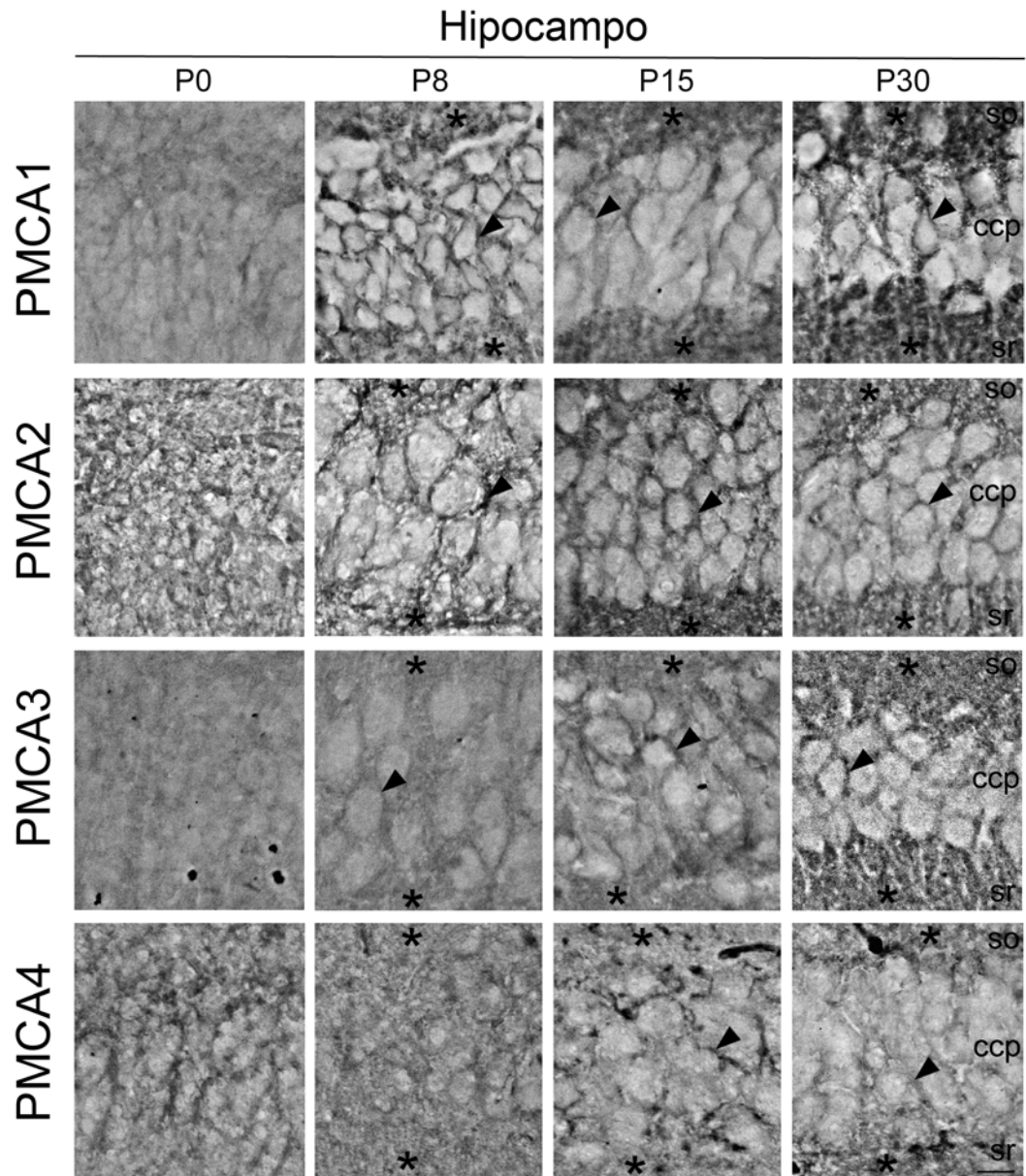


Figura 46 Distribución de las isoformas PMCA en el área CA1 del cuerno de Amón del hipocampo en desarrollo. En el estadio P0 todas las isoformas se expresaron débilmente en esta área. Los niveles de expresión incrementaron en P8 para las PMCA1 y PMCA2 y en P15 para las PMCA3 y PMCA4. En el estadio P30 todas las isoformas presentaron una distribución similar, localizándose en la membrana plasmática del soma de las neuronas piramidales (cabezas de flecha) y en el neuropilo (*) de los estratos *oriens* (so) y *radiatum* (sr). El citoplasma de los cuerpos celulares no presentó inmunorreacción. ccp: capa de las células piramidales. Barras de escala: 50 μ m.

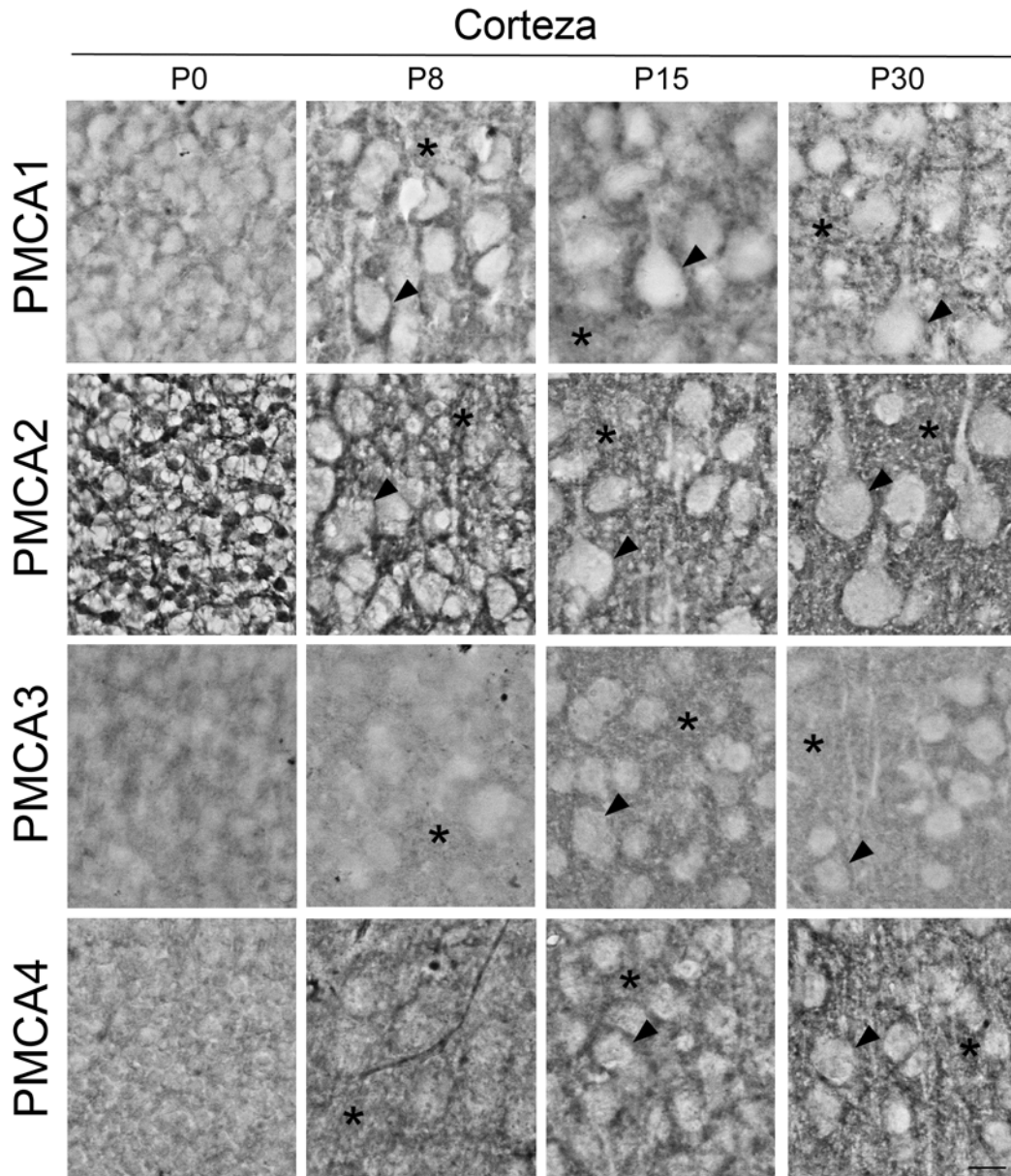


Figura 47 Localización de las isoformas PMCA en secciones parasagitales de la corteza durante el desarrollo. Las imágenes muestran la capa V de la corteza. Las isoformas PMCA1 y 4 estaban presentes en las neuronas piramidales en desarrollo (cabezas de flecha) desde los primeros estadios hasta las células ya maduras. La PMCA2 fue la isoforma que más se expresó, al contrario que la PMCA3, en todos los estadios analizados. Desde P8 las cuatro isoformas se localizaron en el neuropilo (*) y la membrana plasmática de los cuerpos celulares de las neuronas corticales (cabezas de flecha). El citoplasma del soma y los troncos dendríticos fueron inmunonegativos. Barras de escala: 50 μ m.

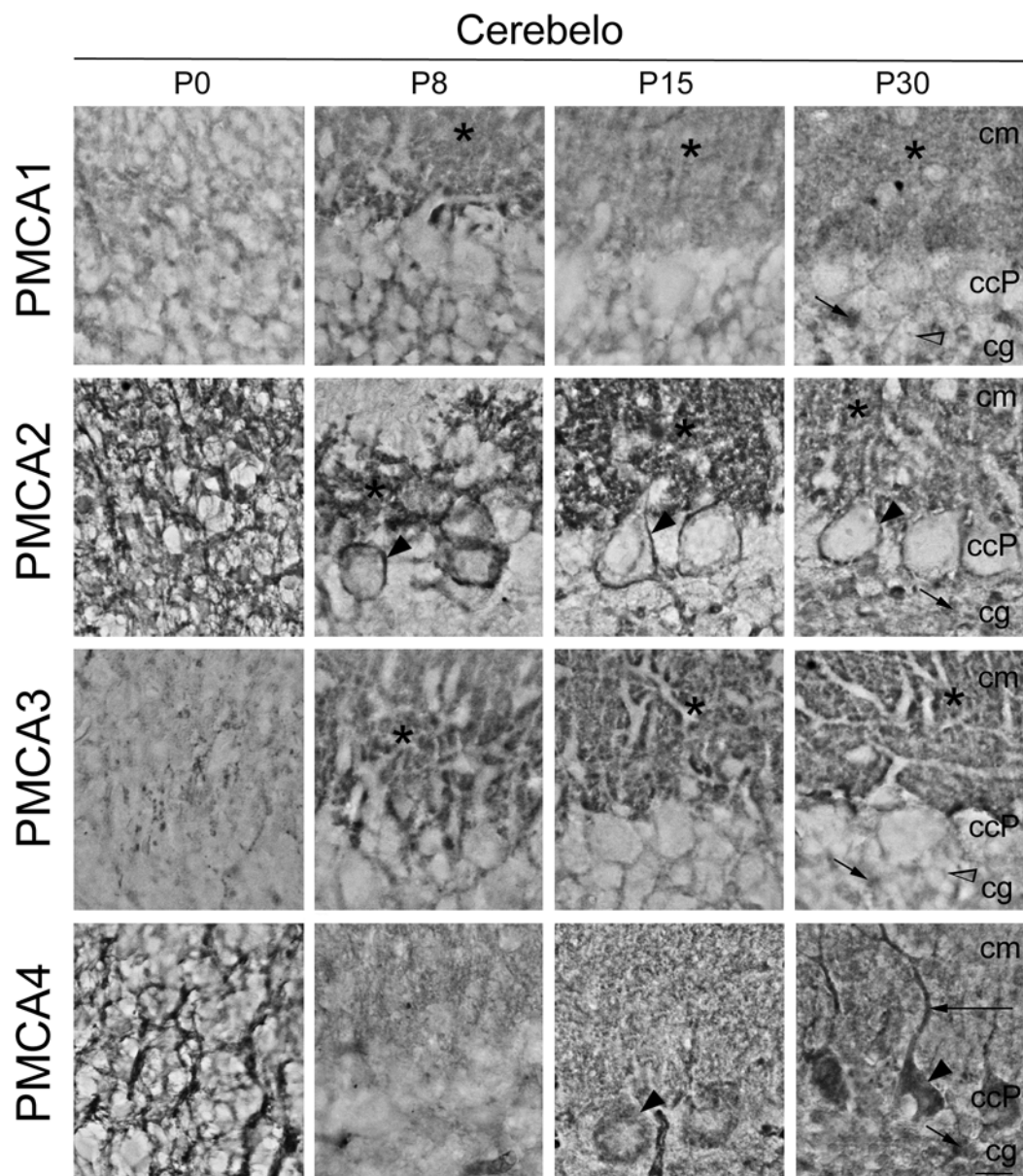


Figura 48 Localización de isoformas PMCA en la corteza cerebelosa en desarrollo. En el estadio P0 la PMCA1 se expresó débilmente en los precursores neuronales y a partir de P8 se localizó principalmente en el neuropilo de la capa molecular (cm, *). La PMCA2 mostró altos niveles de expresión desde P0, esta expresión estaba asociada a las células de Purkinje con una clara localización en las membranas del soma (cabezas de flecha) y el árbol dendrítico (*). La PMCA3 mostró un patrón de distribución similar a la PMCA1 pero con una mayor inmunorreacción. Por el contrario la PMCA4 se expresó en el soma de las células de Purkinje (cabezas de flecha) desde P15, y también en las principales dendritas en P30 (flecha larga). En el estadio P30 sólo se expresaban las PMCA1 y 3 (cabeza de flecha abierta) en las células maduras de la capa granular (cg), sin embargo todas las isoformas se expresaron en los glomérulos cerebelosos (flecha corta). ccP: capa de las células de Purkinje. Barras de escala: 50 μ m.

Para analizar en detalle y corroborar si la distribución de la PMCA en el neuropilo y en los glomérulos cerebelosos correspondía con una localización en sinapsis, se realizaron dobles inmunofluorescencias en las tres regiones en el estadio P30, empleando los anticuerpos anti-PMCA2 o PMCA3 (que diferían en su patrón de marcaje) y el marcador de sinapsis anti-sinaptofisina (Fig. 49). Los resultados mostraron una clara co-localización de estas PMCAs con sinaptofisina, lo que corroboraba la presencia de estas proteínas en áreas sinápticas.

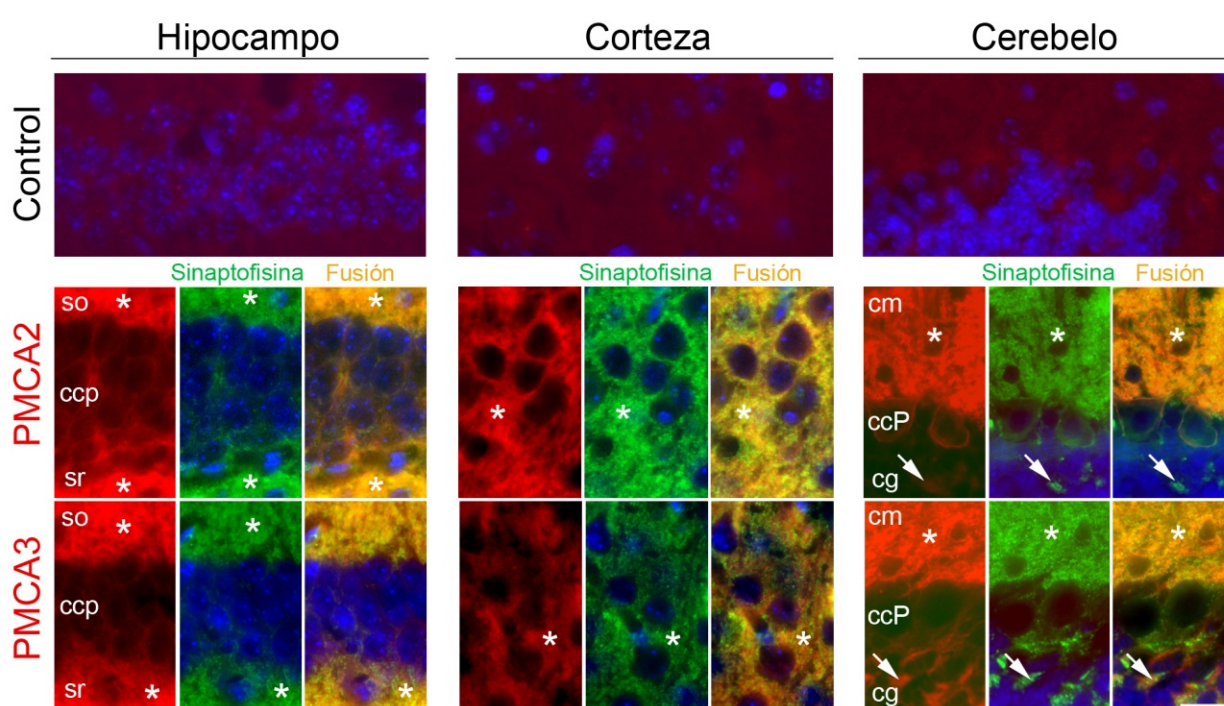


Figura 49 Doble inmunofluorescencia de PMCA2 o PMCA3 y sinaptofisina en diferentes áreas del cerebro en el estadio P30. Se muestran cortes control en los que se omitió el anticuerpo primario para verificar la especificidad de la señal. Las PMCA2 y PMCA3 (rojo) colocalizan con sinaptofisina (verde) en el neuropilo (*) y en los glomérulos cerebelosos (flechas cortas), confirmando de esta forma la presencia de estas bombas en áreas sinápticas (mezcla). Los núcleos se visualizaron mediante tinción con DAPI (azul). so: *stratum oriens*, sr: *stratum radiatum*, cm: capa molecular, ccP: capa de las células de Purkinje, cg: capa granular. Barras de escala: 25 μ m.

En la Tabla III se resume la expresión de las cuatro isoformas PMCA en las tres áreas estudiadas durante el desarrollo. Las isoformas con mayor representación en las tres áreas en el estadio P30, fueron la PMCA1 y PMCA3, junto con la PMCA2 en el cerebelo.

		Hipocampo				Corteza				Cerebelo			
		P0	P8	P15	P30	P0	P8	P15	P30	P0	P8	P15	P30
PMCA1	Cuerpo	(+)	+	++	++	(+)	+	+	+	(+)	(+)	+	+
	Neuropilo	(+)	+	++	+++	(+)	++	++	++	(+)	+	++	++
PMCA2	Cuerpo	(+)	+	++	++	(+)	+	++	++	+	++	+++	+++
	Neuropilo	(+)	+	++	++	(+)	++	++	+++	+	++	+++	+++
PMCA3	Cuerpo	(+)	(+)	+	++	(+)	(+)	+	+	(+)	(+)	+	+
	Neuropilo	(+)	+	++	+++	(+)	+	+	++	(+)	++	++	++
PMCA4	Cuerpo	(+)	(+)	+	+	(+)	(+)	+	+	(+)	(+)	+	++
	Neuropilo	(+)	+	+	+	+	+	++	++	+	+	+	+

(+), débil; +, presente; ++, fuerte; +++, muy fuerte.

Tabla III Resumen de la expresión y abundancia relativa de las isoformas PMCA1-4 en las principales neuronas del hipocampo, la corteza y el cerebelo del ratón en desarrollo.

Capítulo III

“Caracterización de las Ca^{2+} -ATPasas en cultivos primarios de neuronas del hipocampo de ratón y su modulación por el péptido β -amiloide”

Resumen

El péptido β -amiloide (A β 1-42) es el principal componente de las placas seniles en los cerebros afectados por la enfermedad de Alzheimer. Su efecto incluye la alteración de diversos mecanismos moleculares, entre ellos la homeostasis del Ca^{2+} intracelular. Debido a la importancia que las Ca^{2+} -ATPasas tienen en el mantenimiento de los niveles intracelulares de este ión, en este trabajo se ha investigado su expresión, función y localización en un sistema aislado como son los cultivos primarios en presencia de A β 1-42. Los resultados obtenidos muestran que las células crecidas en presencia A β 1-42 presentan menor viabilidad y una alteración en el desarrollo de las prolongaciones dendríticas. Este efecto se revierte cuando las células se incuban además con calmodulina. El efecto protector de la calmodulina puede deberse a una interacción directa entre el péptido y la calmodulina. Por otra parte, las tres familias de Ca^{2+} -ATPasas son activas y la PMCA es la única bomba que se inhibe cuando el péptido amiloide está presente en el medio de cultivo. Además la calmodulina también protege a la actividad ATPasa de la PMCA de su inhibición por A β .

Morfología y regulación de las neuronas del hipocampo de ratón en cultivos primarios. Análisis funcional de Ca^{2+} -ATPasas.

En primer lugar se prepararon y caracterizaron los cultivos primarios del hipocampo de ratón en cuanto a su morfología y se determinó la actividad Ca^{2+} -ATPasa total durante el desarrollo celular *in vitro* del cultivo, con el fin de analizar la evolución de los mismos y de la actividad de las Ca^{2+} -ATPasas, y los efectos de los tratamientos con diferentes agentes tanto en la supervivencia y morfología celular, como en las actividades ATPasas.

Se prepararon cultivos de neuronas a partir de embriones en el estadio E18 de gestación que tras la disociación del tejido y la siembra se mantuvieron a 37°C y en atmósfera del 5% de CO_2 . Las células se recolectaron a diferentes tiempos y posteriormente se prepararon membranas en las que se midió la actividad Ca^{2+} -ATPasa total como se indica en la sección de Materiales y Métodos.

En la figura 50A se muestran las micrografías tomadas durante diferentes días *in vitro* (DIV) del cultivo celular. Se puede observar como a medida que aumenta el tiempo de incubación de las células, evoluciona su morfología y complejidad dendrítica. Tras la siembra aparecen con forma redondeada y comienzan a emitir pequeñas prolongaciones a partir de las primeras 24h. Tras 48h de incubación las células adquieren una forma fusiforme, emitiendo prolongaciones gruesas de las que parten otras de menor grosor. Aproximadamente a los 4-5DIV se aprecian neuronas de morfología fundamentalmente piramidal y una red neurítica compleja que puede visualizarse al microscopio óptico.

La figura 50B muestra la evolución de la actividad Ca^{2+} -ATPasa total medida en los extractos de membranas preparados a partir de las células obtenidas en los diferentes DIV. Se observa como a medida que avanza el desarrollo neuronal incrementaba la actividad Ca^{2+} -ATPasa total debida a las tres bombas, alcanzándose el máximo de actividad a los 7-8 DIV y decayendo posteriormente hacia los 10 DIV. Estos valores de actividad máxima

obtenidos están dentro del intervalo de actividades observado en el hipocampo del ratón en desarrollo, entre los estadios P0 y P8 ($0,109 \pm 0,009$ y $0,21 \pm 0,04 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ respectivamente). Por tanto se fijó el día *in-vitro* 7 como el óptimo para la caracterización de la expresión y de la actividad de las Ca^{2+} -ATPasas.

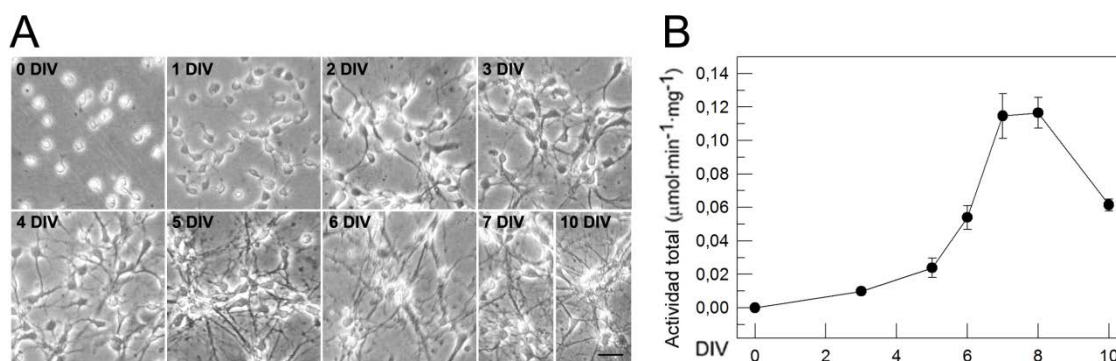


Figura 50 Morfología y actividad Ca^{2+} -ATPasa total en neuronas de hipocampo en cultivo. A) Micrografías de neuronas de hipocampo tomadas desde el día de la siembra hasta los 10 DIV. Puede observarse como la complejidad en el entramado de neuritas incrementa con el desarrollo. Barra de escala: 80 μm . B) Actividad Ca^{2+} -ATPasa total medida en extractos de membrana preparados a los DIV indicados. Los resultados se representan como la media \pm D.E. de tres experimentos de dos preparaciones independientes.

Expresión y actividad de las tres familias de Ca^{2+} -ATPasas en neuronas de hipocampo de ratón en cultivos primarios a los 7 DIV.

Los niveles de expresión de las tres familias de Ca^{2+} -ATPasas se analizaron en extractos de membranas de neuronas de hipocampo a los 7 DIV mediante Western blot y el uso de los anticuerpos específicos anti-SERCA2b, anti-SPCA1 (por ser las isoformas de estas bombas mayoritarias en el sistema nervioso) y 5F10 (que reconoce todas las isoformas de la PMCA). En esos mismos extractos se midió la actividad Ca^{2+} -ATPasa en presencia de diferentes inhibidores que permitían discriminar la actividad correspondiente a cada una de ellas (como se indica en la sección de Materiales y Métodos). Los ensayos de Western blot (Fig. 51A) revelaron la presencia de las tres Ca^{2+} -ATPasas en los extractos a los 7 DIV. Las medidas de actividad (Fig. 51B) mostraron que las tres bombas son funcionales y que la

PMCA tenía el doble actividad que la SERCA y la SPCA. Estos resultados son análogos a los encontrados en el hipocampo de cerdo (Fig. 29A) o del ratón en desarrollo (Fig. 42).

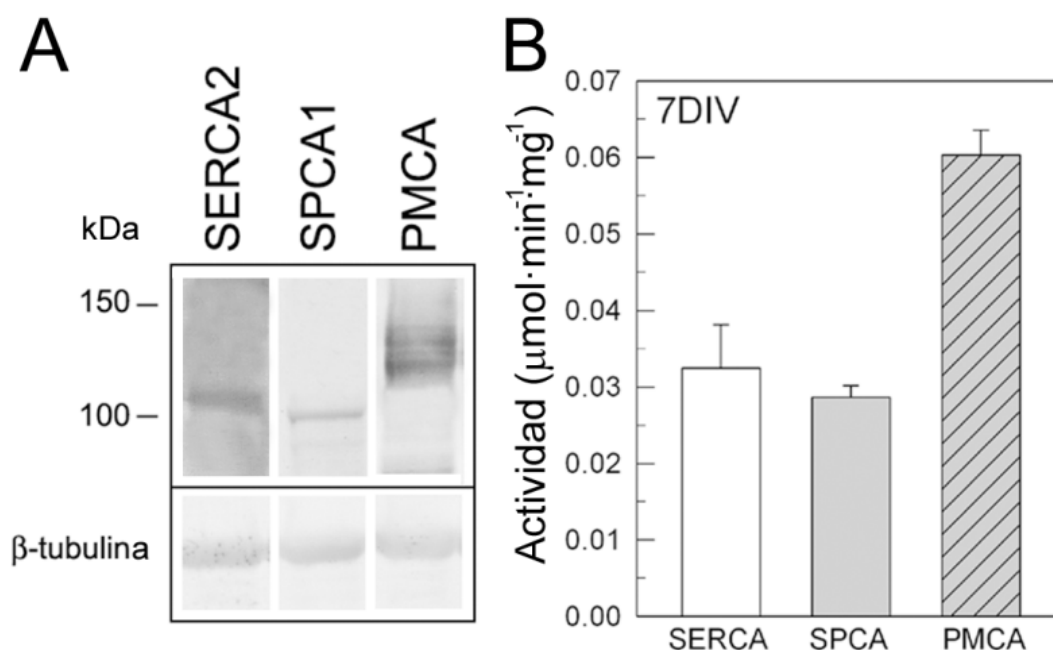


Figura 51 Inmunodetección y actividad de SERCA, SPCA y PMCA en extractos de membranas de neuronas de hipocampo a los 7 DIV. A) Diez μg de extractos de membrana se separaron en gels de poliacrilamida al 6,5%, se transfirieron a membranas de PVDF y se incubaron con los anticuerpos primarios anti-SERCA2b (1:200), anti-SPCA1 (1:1000) y 5F10 (1:3000). Se empleó la inmunodetección con anti- β -tubulina como control de carga. B) Actividades SERCA, SPCA y PMCA medidas en 10 μg de extractos como se indica en la sección de Materiales y Métodos. Los resultados se muestran como la media \pm D.E. de tres experimentos de tres preparaciones independientes.

Debido a la mayor actividad de la PMCA y a la gran variedad de isoformas que posee esta proteína nos planteamos estudiar la presencia y distribución de isoformas PMCA en las neuronas del hipocampo en cultivo a los 7 DIV. Para ello se levantaron las células, se prepararon extractos de membrana y se realizaron Western blots empleando anticuerpos específicos anti-isoformas (Fig. 52). Se observó que las cuatro isoformas se expresaban en los cultivos neuronales a los 7 DIV. La isoforma con mayor representación fue la PMCA1, que suponía el 30,8% del total de expresión de las cuatro isoformas, seguida de las PMCA2, 4 y 3 con un 28,2%, 25,5% y 15,5% de niveles de expresión, respectivamente.

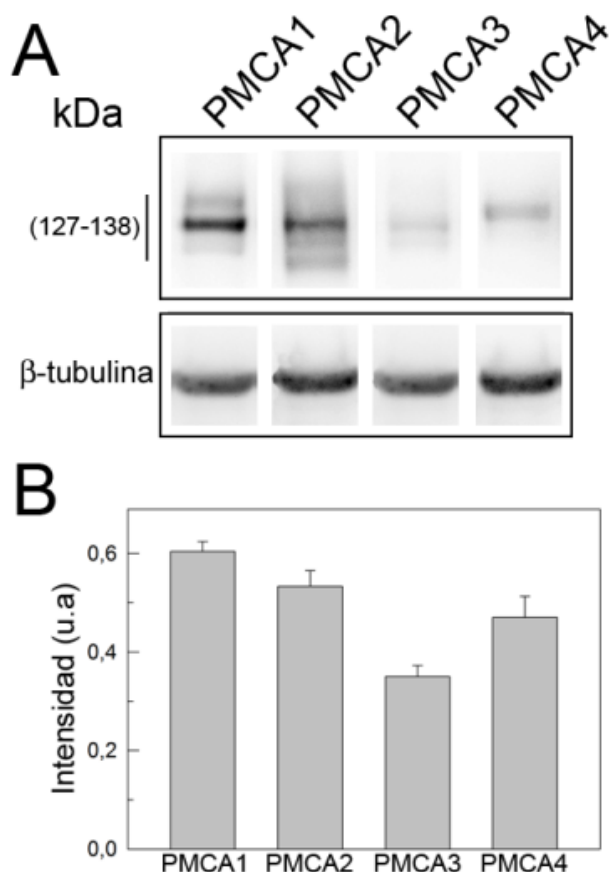


Figura 52 Inmunodetección de isoformas PMCA en extractos de membranas de células a los 7 DIV.

A) Diez μ g de extractos de membranas procedentes de células en cultivo a los 7 DIV se separaron en geles de poliacrilamida al 6,5%, se transfirieron a PVDF y se incubaron con los anticuerpos primarios anti-PMCA1, 2, 3 y 4 (1:1000), durante toda la noche a 4°C. La inmunorreacción con anti- β -tubulina se empleó como control de carga. B) Cuantificación de isoformas PMCA respecto a la β -tubulina.

Inmunolocalización neuronal de SERCA2b, SPCA1, PMCA total e isoformas PMCA en los cultivos primarios de ratón.

Una vez verificada la presencia y funcionalidad de las tres bombas de Ca^{2+} se analizó si su localización en los cultivos primarios era similar a la encontrada en el tejido. Para ello se realizaron ensayos de doble inmunofluorescencia en neuronas del hipocampo a los 7 DIV con los anticuerpos anti-SERCA2b, anti-SPCA1 y 5F10, anti- β -tubulina (monoclonal) y 334 (anticuerpo policlonal frente a β -tubulina), estos dos últimos para delimitar la citoarquitectura neuronal (Fig. 53).

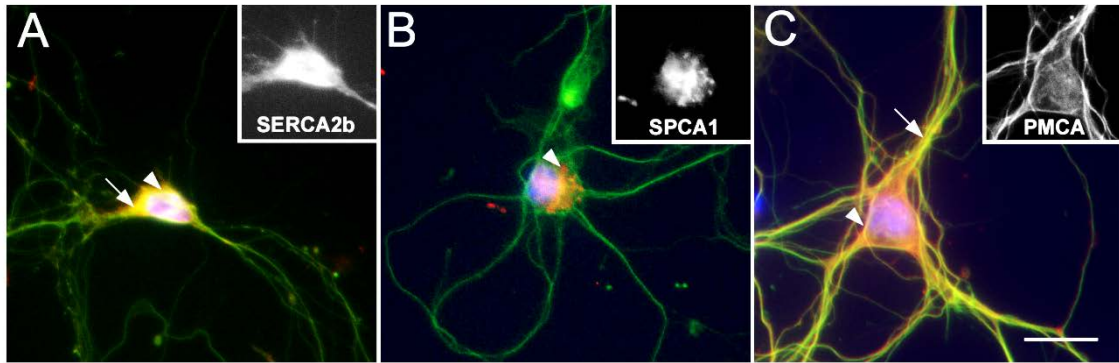


Figura 53 Localización de SERCA, SPCA y PMCA en neuronas de hipocampo a los 7 DIV. Dobles inmunofluorescencias con los anticuerpos anti-SERCA2b (1:50) (A), anti-SPCA1 (1:500) (B), 5F10 (1:500) (C), y los anticuerpos anti- β -tubulina (1:1000) o 334 (1:500) como marcadores del citoesqueleto. Se empleó el colorante DAPI para teñir los núcleos celulares. Las imágenes corresponden a la fusión de los tres canales de color para apreciar la co-localización. En los insertos se muestra, en blanco y negro, la localización correspondiente a cada una de las bombas. Barras de escala: 10,5 μ m.

Se observó que la SERCA2b (Fig. 53A), se localizaba de forma homogénea en el retículo endoplásmico de los somas (cabeza de flecha en A) y en el principio de los troncos dendríticos (flechas cortas en A), pero no en las partes más distales de las prolongaciones neurales. La SPCA1 (Fig. 53B) se localizó mayoritariamente en el soma, en los complejos de Golgi situados cerca del núcleo en estas células (cabeza de flecha en B). Las PMCA, marcadas con el anticuerpo 5F10 (Fig. 53C), se localizaron en el contorno celular (cabeza de flecha en C) y en sus prolongaciones dendríticas (flechas cortas en C) correspondiendo este tipo de marcaje con la localización de esta ATPasa en la membrana plasmática.

También se realizaron ensayos de doble inmunofluorescencia para analizar la distribución de las isoformas PMCA en estas mismas células en cultivo (Fig. 54). Se observó que los anticuerpos anti-PMCA1 y anti-PMCA2 marcaron con intensidad el soma y la región proximal de las neuritas. El anticuerpo anti-PMCA3 marcó con menor intensidad únicamente el soma de estas mismas células. La expresión de la PMCA4 fue muy débil y se localizó en el soma celular y en las prolongaciones dendríticas proximales. Los niveles de expresión de las distintas isoformas observados en las inmunofluorescencias están en concordancia con los obtenidos por Western blot.

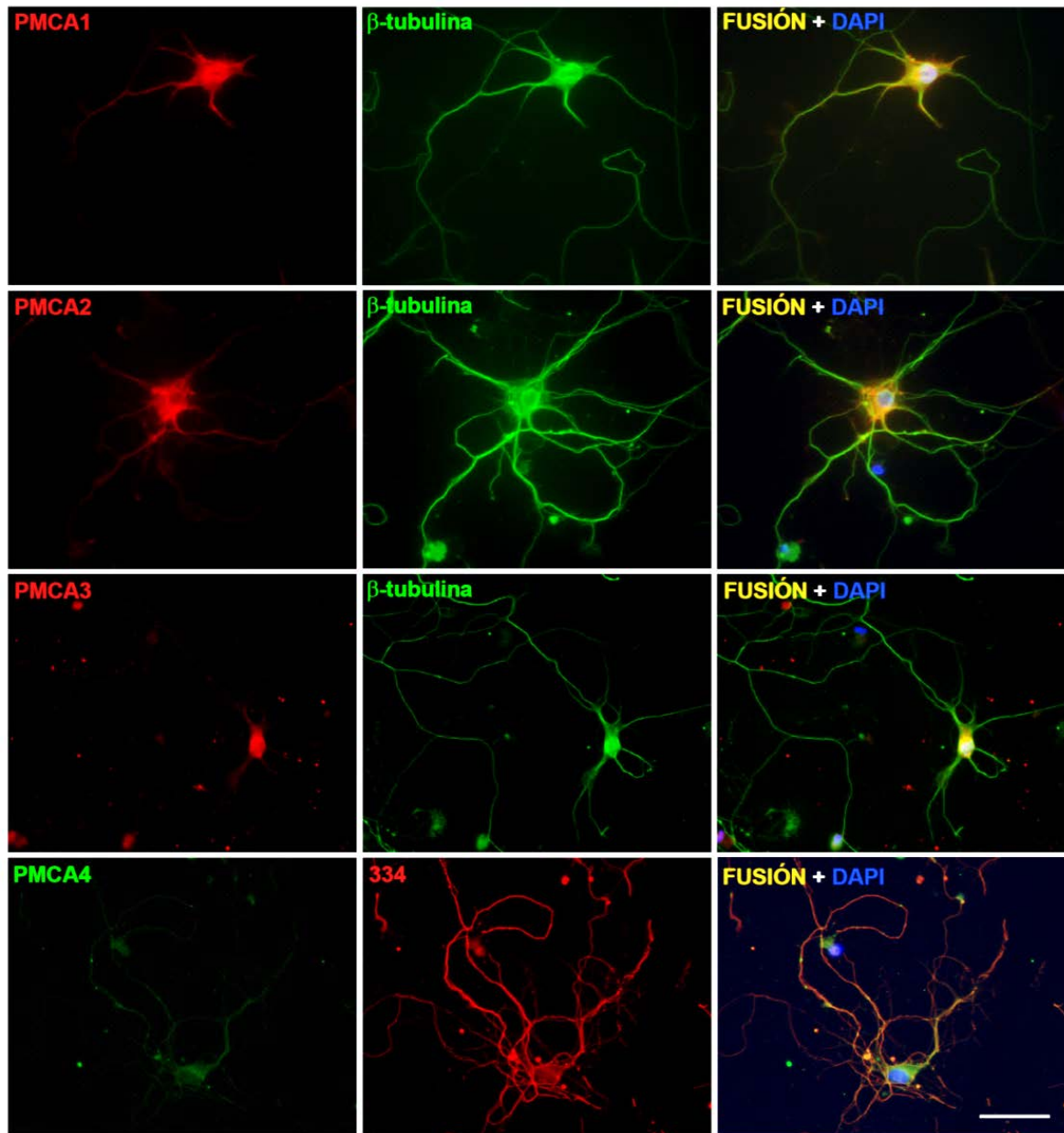


Figura 54 Inmunolocalización de PMCA1, 2, 3 y 4 en células del hipocampo a los 7 DIV. Dobles inmunofluorescencias con los anticuerpos anti-PMCA1, anti-PMCA2, anti-PMCA3 y anti-PMCA4 (1:1000) y los anticuerpos, marcadores del citoesqueleto, anti- β tubulina (1:1000) y 334 (1:500). Se empleó el DAPI como marcador fluorescente de los núcleos. Las figuras de la tercera columna corresponden a la superposición de los tres canales rojo, verde y azul. Barras de escala: 45 μ m.

Efecto del péptido A β 1-42 en la viabilidad de las neuronas del hipocampo

El péptido β -amiloide 1-42 (A β 1-42) es el principal componente de las placas seniles en los cerebros de enfermos afectados por la enfermedad de Alzheimer y se produce por proteólisis de la proteína precursora amiloide (APP) mediante la acción de las enzimas β -secretasa y γ -secretasa (Haass y Selkoe 1993). La alteración de los niveles de Ca^{2+} está implicada en los mecanismos de toxicidad por A β , en la degeneración neuronal en la enfermedad de Alzheimer y en otras enfermedades neurodegenerativas (Mattson *et al.* 1992, Mark *et al.* 1995, Mattson y Chan 2003). Debido a la importancia de las Ca^{2+} -ATPasas en la homeostasis del Ca^{2+} , a su implicación en procesos de maduración celular y siendo el hipocampo una de las primeras áreas que se afectan en la enfermedad de Alzheimer, nos planteamos analizar el efecto del péptido A β 1-42 en cultivos primarios de neuronas de hipocampo de ratón y su relación con las Ca^{2+} -ATPasas.

Los cultivos se prepararon a partir de embriones de ratón extraídos en el estadio E18 de gestación. Tras la siembra en placas de 24 pocillos se dejaron desarrollar hasta los 5 DIV a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente, los cultivos de la mitad de los pocillos se dejaron sin tratar constituyendo de esta forma los controles, y al resto de los pocillos se les añadieron concentraciones variables de A β 1-42 durante diferentes tiempos.

El efecto del A β 1-42 en la viabilidad de las neuronas del hipocampo de ratón se analizó mediante ensayos de reducción del MTT (Fig. 55). Se observó como una concentración de A β 1-42 1,5 μ M comenzaba a afectar la viabilidad celular a partir de las 2h de incubación, disminuyendo la supervivencia con el tiempo de incubación. Los efectos de A β 1-42 en la viabilidad neuronal fueron más marcados para una concentración de péptido de 2,5 μ M, obteniéndose un 50% de supervivencia a partir de las 24h de incubación. Además se observó como el péptido *scramble* (A β 42-1), que contiene la secuencia de aminoácidos invertida, no afectaba la viabilidad neuronal, lo que indica una especificidad de secuencia del péptido amiloide para que ejerza su efecto citotóxico.

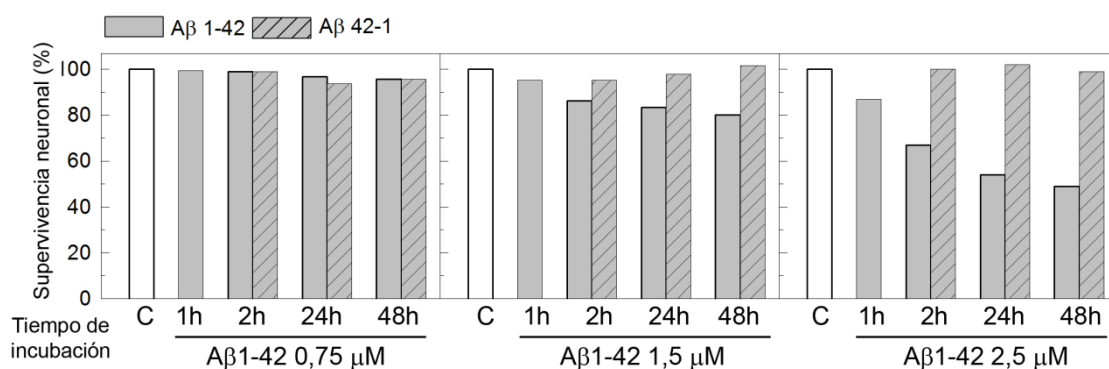


Figura 55 Efecto de la concentración y del tiempo de incubación con Aβ1-42 en la supervivencia de cultivos primarios de hipocampo de ratón. Las células se incubaron durante diferentes tiempos con distintas concentraciones de Aβ1-42 o Aβ42-1. Tras este tiempo se realizó en ellas el ensayo de reducción de MTT para calcular la supervivencia. El 100% corresponde a la viabilidad de las células que no han sido tratadas con péptido amiloide o control (C).

Efecto del péptido Aβ1-42 sobre la actividad Ca^{2+} -ATPasa y papel protector de la calmodulina.

Los cerebros afectados por la enfermedad de Alzheimer se caracterizan por la presencia de depósitos de Aβ, que parecen estar implicados en la alteración de los niveles de Ca^{2+} que ocurren durante la neurodegeneración (Mattson 2007, Bezprozvanny y Mattson 2008). Debido a la importancia que las bombas de Ca^{2+} tienen en la regulación en los niveles de este ión, nos planteamos analizar el efecto del Aβ1-42 en la actividad de las Ca^{2+} -ATPasas en un sistema más próximo a las condiciones fisiológicas como son los cultivos primarios de neuronas de ratón.

Las células del hipocampo se sembraron en placas de 60 mm y se dejaron desarrollar hasta los 5DIV. Tras este tiempo las diferentes placas se trataron con Aβ1-42 durante 48h, después las células se recolectaron y se utilizaron para preparar extractos de membrana en los que se midió la contribución de cada una de las tres familias de Ca^{2+} -ATPasas a la actividad total (Fig. 56) según se describe en la sección de los Materiales y Métodos.

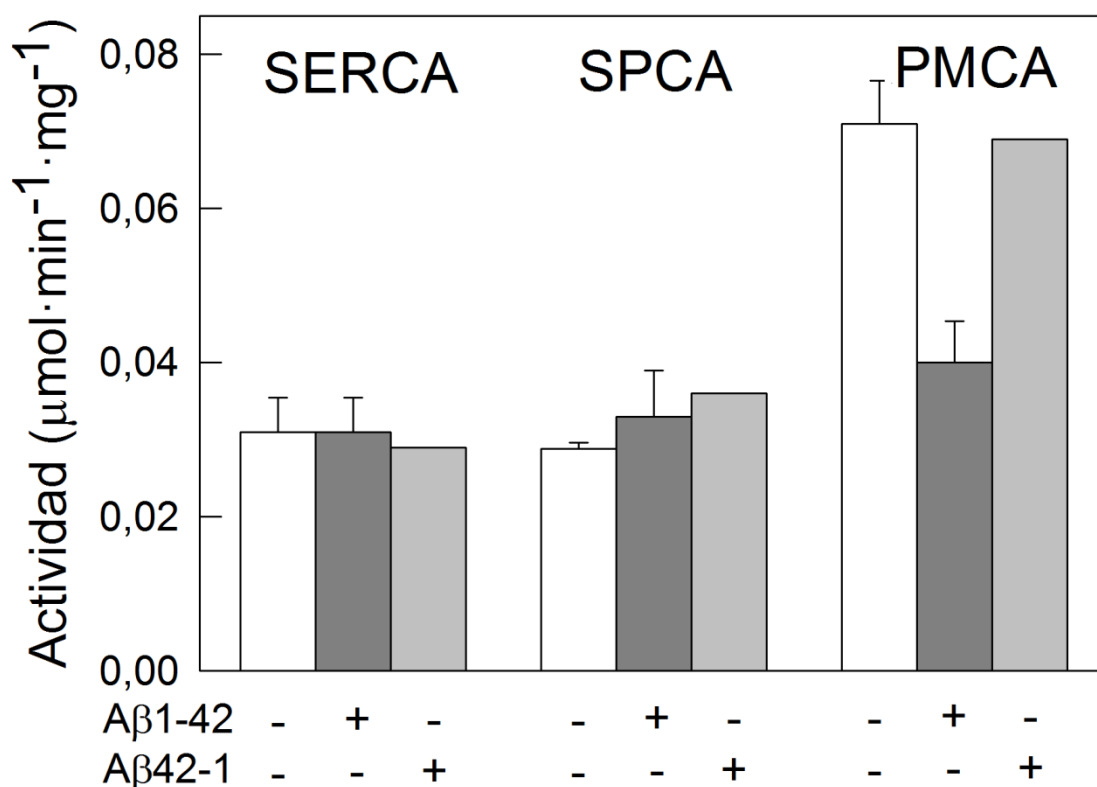


Figura 56 Actividades SERCA, SPCA y PMCA de cultivos primarios en presencia de Aβ1-42. Diez μg de extractos de membrana preparados a partir de células en cultivo sin tratar o tratadas con péptido se emplearon para medir las actividades SERCA, SPCA y PMCA en diferentes condiciones de cultivo: Aβ1-42 y Aβ42-1 a la concentración de 2,5 μM, durante 48h. Los datos se representan como media ± D.E. de tres experimentos diferentes de tres preparaciones diferentes.

Se observó que las actividades de las ATPasas SERCA y SPCA no se afectaban por la presencia del péptido, mientras que la actividad de la PMCA de las células crecidas en presencia de Aβ1-42 2,5 μM disminuía aproximadamente un 50% respecto a la de las células control. Por otra parte la actividad PMCA de las células tratadas con el péptido Aβ42-1 (*scramble*) 2,5 μM, fue similar a la de los controles, con lo que se concluye que la secuencia específica de aminoácidos de Aβ1-42 es la que inhibe a la PMCA en ensayos sobre células vivas. El análisis de los cultivos por microscopía óptica (Fig. 57) mostró que la disminución de actividad PMCA va asociada además a una retracción neurítica o pérdida de la capacidad de elongación de las prolongaciones dendríticas y pérdida en la morfología celular en los cultivos tratados con Aβ1-42.

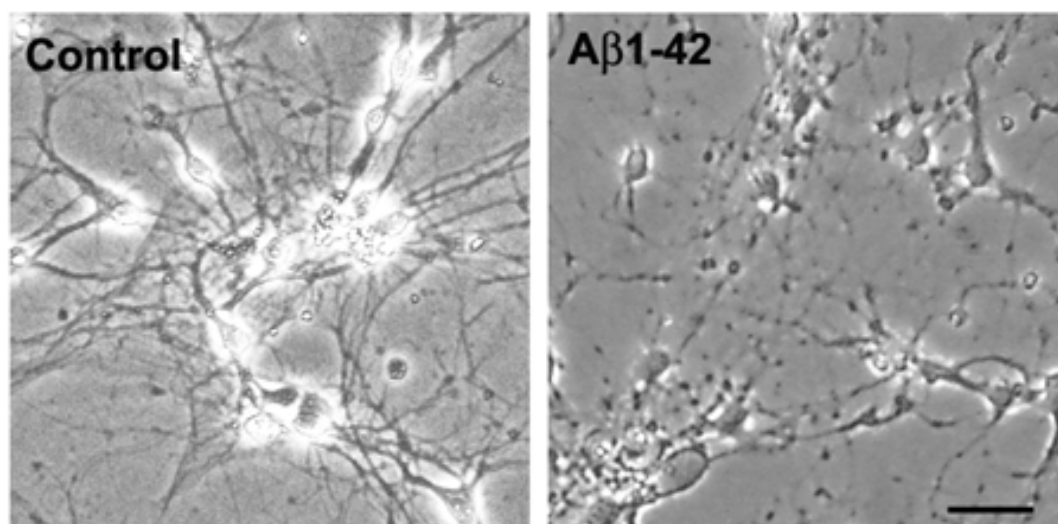


Figura 57 Morfología de células de hipocampo crecidas durante 48h en presencia de $A\beta$ 1-42 μ M. Barras de escala: 90 μ m.

Estos resultados concuerdan con estudios previos de nuestro laboratorio con la PMCA purificada del cerebro de cerdo, que han puesto en evidencia que esta bomba de Ca^{2+} se inhibe específicamente por el péptido $A\beta$ (Berrocal *et al.* 2009).

Por otra parte, en el laboratorio, se ha mostrado que la calmodulina, principal modulador de la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA (Gopinath y Vincenzi 1977, Jarrett y Penniston 1977, Di Leva *et al.* 2008), ejerce un papel protector sobre la inhibición de la actividad PMCA por $A\beta$ (Berrocal *et al.* 2012). Por ello nos planteamos analizar los efectos conjuntos de la calmodulina y del péptido $A\beta$ en los cultivos primarios de neuronas de ratón. Los ensayos de viabilidad (Fig. 58A) mostraron que las células crecidas durante 48h en ausencia o presencia de calmodulina 14 nM tenían una supervivencia similar, mientras que la presencia de $A\beta$ disminuía su supervivencia aproximadamente un 50% como se muestra en la figura 58A. En cambio, aquellas células que se trataron conjuntamente con $A\beta$ 1-42 y calmodulina eran viables prácticamente al 100%. Estos resultados se ven reflejados también en la figura 58B en la que se observan por microscopía óptica la proporcionalidad entre las células y los precipitados de formazán.

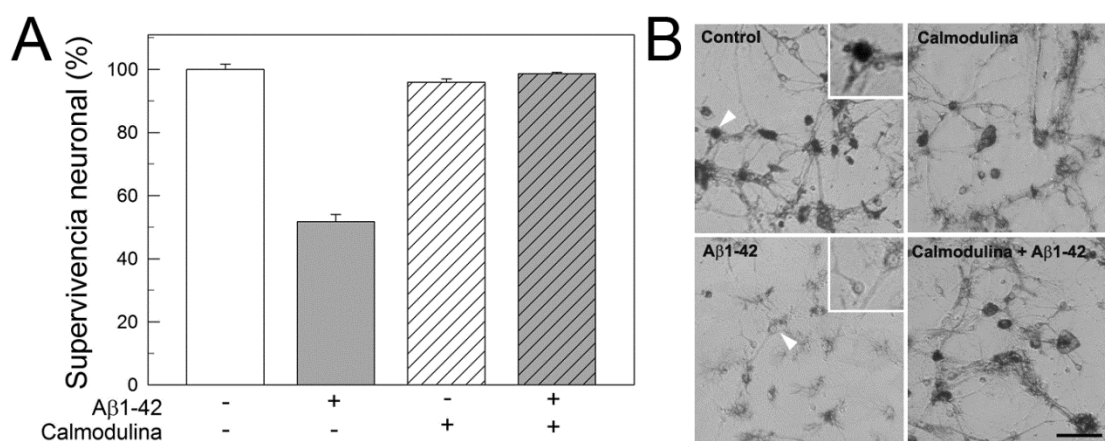


Figura 58 Efecto del péptido Aβ1-42 y calmodulina en la viabilidad neuronal. A) Supervivencia neuronal tras someter los cultivos primarios a los diferentes tratamientos con péptido amiloide. Las células se incubaron durante 48h con Aβ1-42 a 2,5 μM en ausencia o presencia de calmodulina 14 nM. Tras este tiempo se realizó en ellas el ensayo de reducción de MTT para estimar la supervivencia. B) Precipitados de formazán obtenidos mediante el entrayo MTT tras cada uno de los tratamientos de A. Barras de escala: 90 μm.

Además, las neuronas tratadas con Aβ1-42 y calmodulina no presentaban disrupción de la red dendrítica ni pérdida de la morfología celular (Fig. 59).

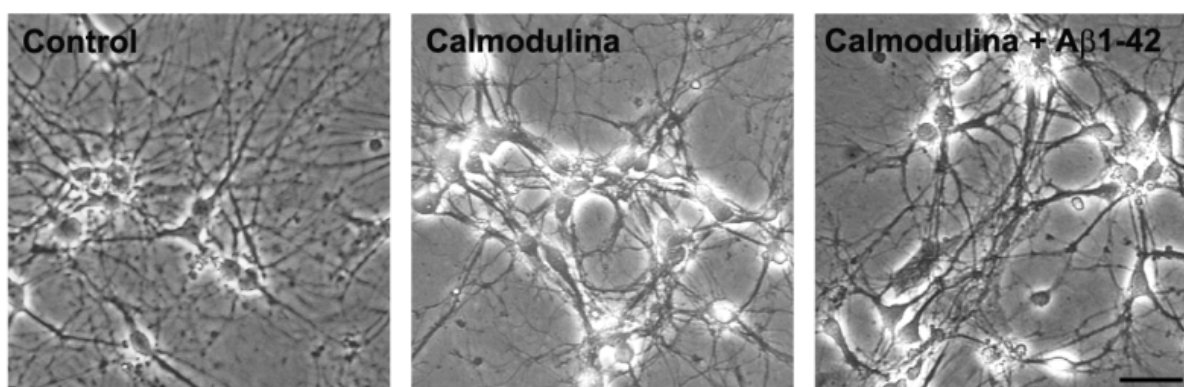


Figura 59 Morfología de células de hipocampo crecidas en presencia de Aβ1-42 y calmodulina. Aspecto morfológico de las células del hipocampo crecidas durante 48h en presencia de Aβ1-42 2,5 μM y calmodulina 14 nM. Barras de escala: 90 μm.

Se realizaron ensayos de actividad Ca^{2+} -ATPasa en los extractos de membrana preparados a partir de cultivos paralelos (Fig. 60), observándose que sólo la actividad de la PMCA se inhibía un 50% por efecto del péptido. Además la presencia de calmodulina 14 nM protegía totalmente a la PMCA de su inhibición por Aβ.

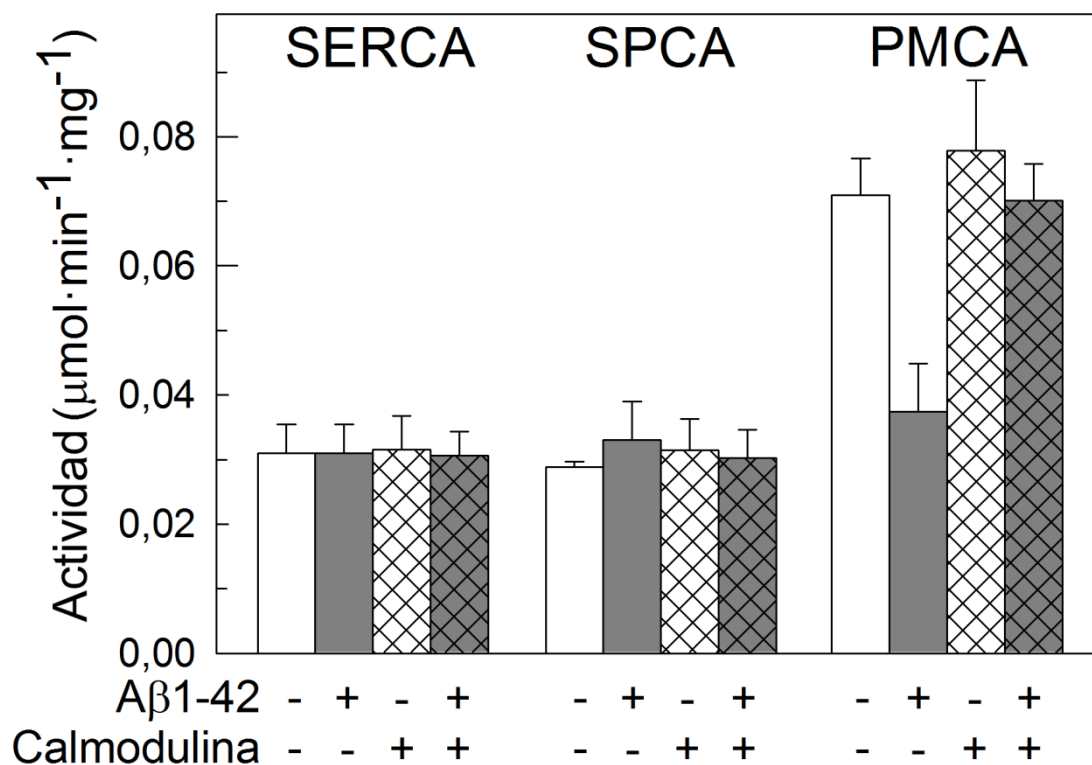


Figura 60 Actividades SERCA, SPCA y PMCA de cultivos primarios en presencia de Aβ1-42 y calmodulina. Las actividades Ca^{2+} -ATPasa de SERCA, SPCA y PMCA se midieron en 10 μg de extractos de membrana preparados a partir de cultivos celulares tras su tratamiento en ausencia o presencia de Aβ1-42 2,5 μM y/o calmodulina 14 nM durante 48h. Los datos se representan como media ± D.E. de tres experimentos diferentes de tres preparaciones diferentes.

Expresión y localización de la PMCA en células tratadas con Aβ1-42 y calmodulina.

Se ha descrito que el tratamiento de las células con péptido amiloide produce cambios en la morfología neuronal, tales como retracción de las dendritas, disrupción de las prolongaciones, pérdida de refringencia del soma, acompañados de cambios en el metabolismo celular (Iversen *et al.* 1995, Sponne *et al.* 2004, Pozueta *et al.* 2012). En los cultivos primarios, realizados en nuestro laboratorio, también se observaron cambios morfológicos por microscopía óptica (Figs. 57 y 59). Para analizar más en detalle estas perturbaciones, así como los posibles cambios en la expresión de la PMCA, se realizaron cultivos de neuronas sobre discos de vidrio que se trataron de igual forma que los empleados para los ensayos de viabilidad y actividad Ca^{2+} -ATPasa. Tras la fijación de las

células, se realizaron ensayos de doble inmunofluorescencia (Fig. 61A) para analizar la morfología celular en detalle y la localización de la PMCA en las neuronas tratadas con $A\beta$ 1-42, o/y calmodulina. Se observó que la PMCA se localiza principalmente en el soma de las neuronas y en las prolongaciones neurales, tanto de las células control, como de las tratadas con $A\beta$ 1-42, con calmodulina o con ambos, lo que indica que no se dan diferencias de localización de la PMCA en las células tratadas con respecto a las células sin tratar. Las células tratadas solamente con $A\beta$ 1-42, mostraron una clara disrupción de las prolongaciones dendríticas y axonales, siendo el axón aproximadamente un 66,7% más corto que el de las células control y las dendritas alrededor de un 40% más cortas (Fig. 61B). Sin embargo, las células cultivadas simultáneamente con $A\beta$ 1-42 y calmodulina, presentaron una longitud similar a las células control, que corresponde, en células de hipocampo de rata de 7 DIV a aproximadamente 300 μ m para el axón y 50 μ m para las dendritas (Dotti *et al.* 1988). Estos resultados sugieren un efecto protector de la calmodulina frente a la toxicidad mediada por $A\beta$ 1-42 en los cultivos primarios.

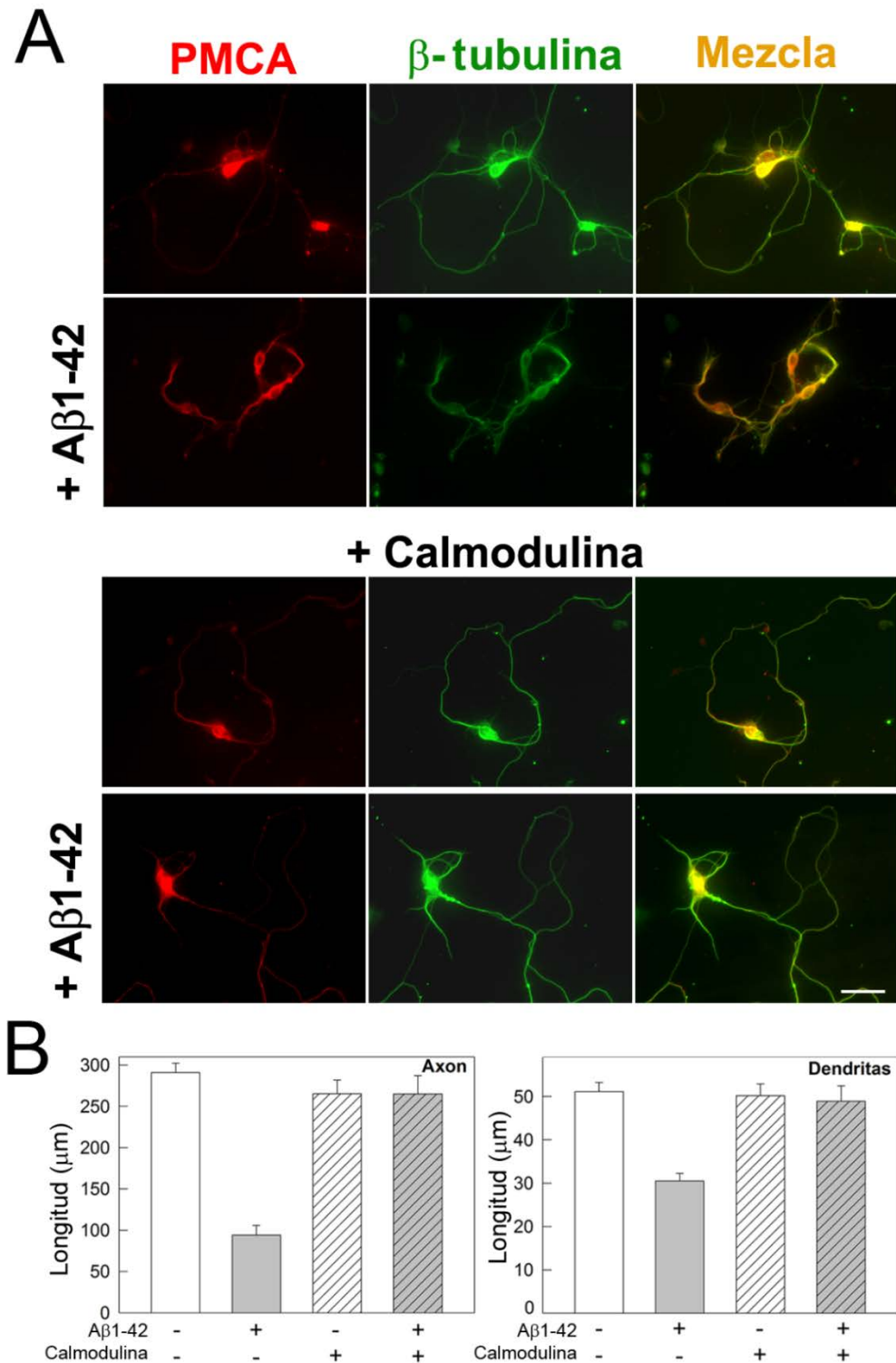


Figura 61 Localización de la PMCA y morfología de neuronas de hipocampo en cultivos tratados con A β 1-42 y calmodulina. A) Doble inmunofluorescencia de neuronas sometidas a los diferentes tratamientos. Se incubaron con el anticuerpo policlonal pbPMCA (1:400) y el monoclonal anti- β tubulina (utilizado como marcador del citoesqueleto) (1:1000). Las figuras de la tercera columna corresponden a la superposición de los canales rojo y verde. Barras de escala: 38 μ m. B) Cuantificación de la longitud de las neuritas. Se tomó como axón aquella prolongación cuya longitud es tres o más veces superior a la del soma, y como dendrita la que es menor. Los datos representan la media \pm DE de dos cultivos diferentes realizados por duplicado.

Interacción del péptido β -amiloide con la PMCA y con la calmodulina

Los ensayos de actividad realizados en los cultivos han mostrado la inhibición específica de la actividad PMCA por el péptido β -amiloide. Para analizar si este efecto es debido a una interacción directa entre la proteína y $A\beta$ se realizaron ensayos de *overlay* en placas ELISA, fijando a las mismas $A\beta$ 1-42, PMCA purificada del hipocampo de cerdo, membranas del hipocampo de cerdo (que contienen PMCA), membranas del retículo sarco(endo)plásmico de músculo de conejo (ricas en SERCA1 y carentes de PMCA) y membranas de células COS que sobreexpresan la isoforma SERCA2b. Posteriormente se incubaron con diferentes concentraciones de $A\beta$ 1-42 durante 30 minutos a 37°C, tras lo cual el péptido no unido se eliminó mediante lavados con PBS-Tween. La unión del $A\beta$ 1-42 a la proteína se reveló empleando el anticuerpo anti- $A\beta$ 1-42 producido en nuestro laboratorio contra el péptido sintético $A\beta$ 1-42, tal como se indica en los Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 62A. Se observó que el péptido se unía preferentemente a la PMCA purificada, pero no a la SERCA2b ni a la SERCA1 existente en las membranas del retículo sarcoplásmico. Se deduce también que la unión del péptido a las membranas del hipocampo es debida, preferentemente, a su interacción con la PMCA y no con la SERCA2b existente en esas membranas. La interacción $A\beta$ -PMCA se corroboró mediante ensayos de *overlay* en geles de poliacrilamida al 7,5%. La PMCA purificada se transfirió del gel a una membrana de PVDF y ésta se cortó en tiras. Una de ellas se incubó con $A\beta$ 1-42 2,5 μ M durante 1h a 37°C (Fig. 62B), tras lo cual la membrana se lavó y se incubó con el anticuerpo anti- $A\beta$ 1-42. Las otras tiras conteniendo PMCA se incubaron con calmodulina biotinilada o con el anticuerpo 5F10. La banda detectada por el anticuerpo anti- $A\beta$ 1-42 mostró que el péptido se unía a una banda de proteína a la que también se une, por *overlay*, la calmodulina, un activador de la PMCA, y el anticuerpo 5F10, que reconoce específicamente a la PMCA. Estos resultados corroboran una interacción directa entre la PMCA y el péptido $A\beta$ 1-42.

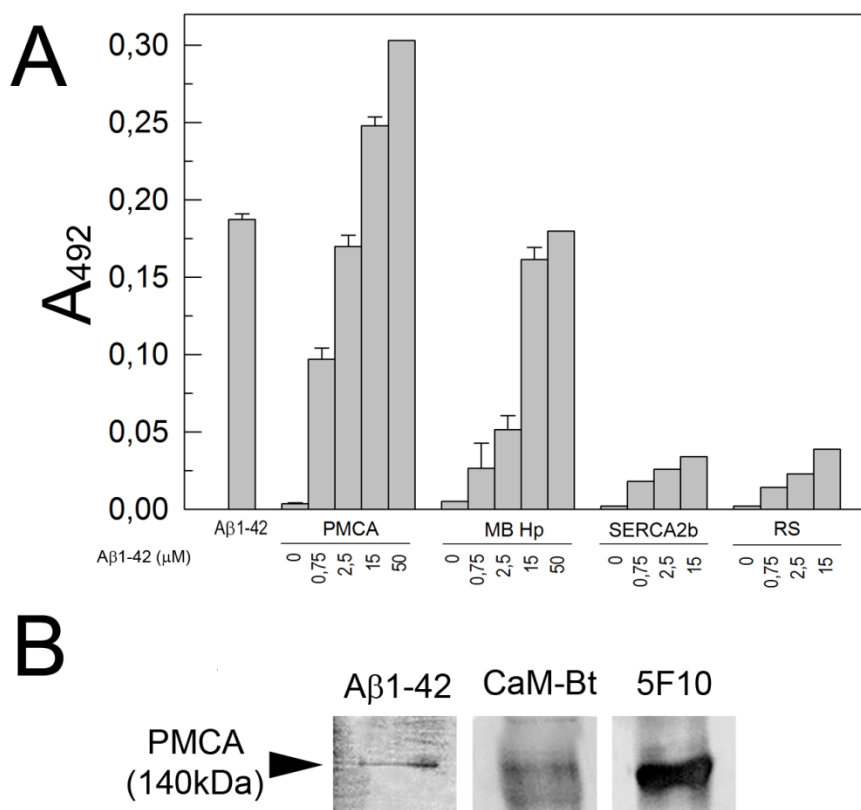


Figura 62 Ensayo de “*overlay*” para analizar la interacción de la PMCA con el péptido Aβ1-42. A) Se fijaron a placas ELISA 0,5 μg de Aβ1-42, 1 μg PMCA purificada del hipocampo de cerdo, 5 μg de membranas del hipocampo de cerdo (MB Hp), 1 μg de membranas de células COS que sobreexpresan la SERCA2b y 1 μg de membranas del retículo sarcoplásmico de conejo (RS), en tampón carbonato 0,05 M, pH 9,6. Posteriormente y tras sucesivos lavados en PBS-Tw se incubaron con las cantidades indicadas de Aβ1-42 durante 30 min a 37°C. Tras varios lavados con PBS-Tw, para eliminar el péptido no unido a las proteínas, se incubó sucesivamente con anti-Aβ1-42 (1:15000) y con un anticuerpo secundario unido a peroxidasa. La unión del anticuerpo anti-Aβ al péptido unido a las proteínas se reveló por color mediante el sustrato OPD. Los resultados representan la media de dos experimentos realizados por duplicado. B) Se cargaron 1,5 μg de PMCA purificada en geles de poliacrilamida al 7,5% y se transfirieron a membranas de PVDF. Estas membranas se cortaron en tiras y una de ellas se incubó con Aβ1-42 2,5 μM durante 1h a 37°C. Tras varios lavados con TBS-Tw, esa misma tira se incubó con anti-Aβ1-42 (1:15000) y las otras dos con calmodulina biotinilada (CaM-Bt) (1:1000) y con 5F10 (1:1300) respectivamente. Tras incubar con los respectivos anticuerpos secundarios la unión se reveló empleando DAB.

Para corroborar la interacción entre la PMCA y el péptido amiloide se realizaron experimentos de co-inmunoprecipitación. Para ello se incubaron extractos de membranas del hipocampo de cerdo con Aβ y posteriormente se inmunoprecipitó la PMCA utilizando el anticuerpo 5F10 unido a proteína A/G-agarosa (Fig. 63). Se observó como en el precipitado procedente de arrastrar la PMCA con su anticuerpo específico 5F10, apareció también el péptido amiloide, lo que sugiere una interacción directa PMCA- Aβ.

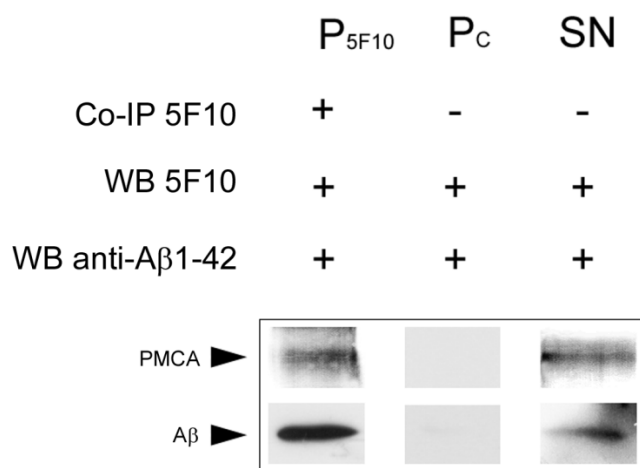


Figura 63 Co-inmunoprecipitación (Co-IP) de la PMCA y $A\beta$. El ensayo de Co-IP se realizó como se describe en la sección de los Materiales y Métodos. Volúmenes 15 μ l de los precipitados resultantes de hacer el ensayo presencia del anticuerpo 5F10 (P_{5F10}) o en ausencia del mismo (control, P_C) y de 20 μ l del sobrenadante de la Co-IP control (SN) se cargaron en geles al 10%. Tras la transferencia de las proteínas, la membrana de PVDF se incubó con los anticuerpos 5F10 (1:3000) o con el anti- $A\beta$ 1-42 (1:15000). La inmunoreacción se reveló por quimioluminiscencia.

Los resultados obtenidos han mostrado un efecto protector de la calmodulina frente a la toxicidad del péptido $A\beta$ en los cultivos primarios. Este efecto protector de la calmodulina podría venir dado por la interacción directa entre esta proteína y el péptido, inhibiendo de esta forma el efecto citotóxico del péptido sobre las células. Para analizar la posible interacción entre la calmodulina y $A\beta$, se fijaron a placas ELISA cantidades crecientes de calmodulina que después se incubaron con cantidades crecientes de $A\beta$ 1-42. Tras lavar los pocillos con PBS-Tw para eliminar el péptido no unido, la posible interacción se reveló con el anticuerpo anti- $A\beta$ 1-42 como se indica en la sección de los Materiales y Métodos. Los resultados, representados en la figura 64, muestran un aumento de absorbancia a medida que se incrementa la cantidad de calmodulina fijada en el pocillo y de péptido amiloide con la que se incubó. Esto sugiere una interacción entre la calmodulina y $A\beta$.

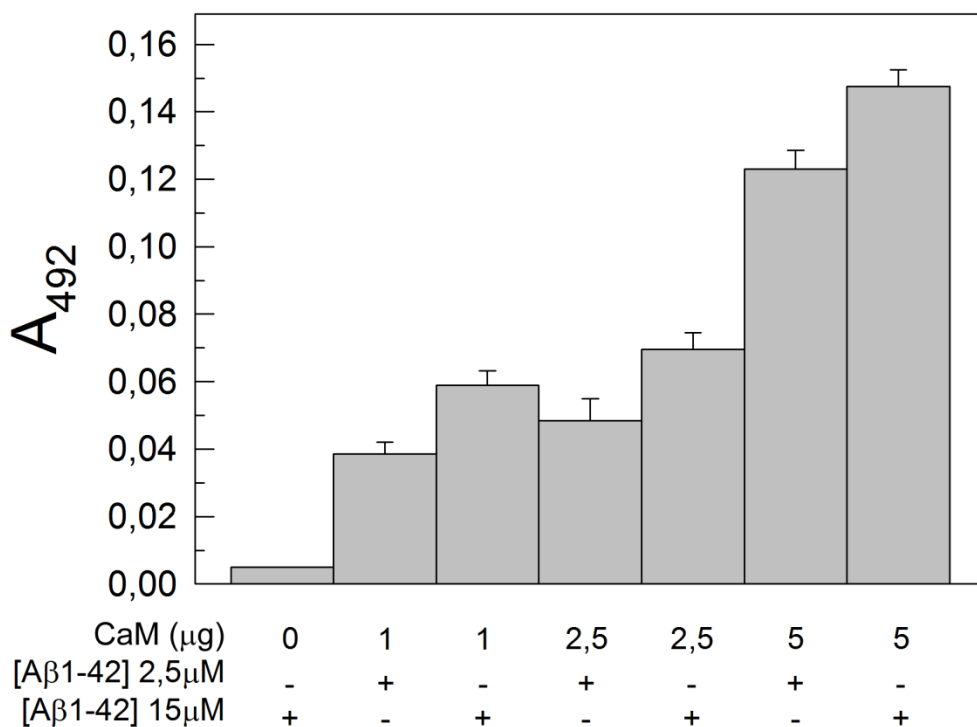


Figura 64 Interacción de la calmodulina con el péptido A β 1-42. La calmodulina de cerebro bovino (1, 2,5 y 5 μ g) se fijó a placas ELISA y posteriormente se incubó con A β 1-42 2,5 μ M o 15 μ M como se indica. Tras sucesivos lavados para eliminar el péptido no unido, se incubó con anti-A β 1-42 (1:15000) y un anticuerpo secundario unido a peroxidasa. La unión de A β a la proteína se reveló por color mediante OPD. Los valores representan la media de dos experimentos realizados por duplicado.

Discusión

Expresión de las tres familias de Ca^{2+} -ATPasas en el encéfalo de diferentes sistemas modelo.

En este trabajo se han caracterizado la presencia, el contenido y la actividad funcional de las bombas intracelulares SERCA2 y SPCA1 localizadas en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi, respectivamente, así como de la bomba de Ca^{2+} de la membrana plasmática, PMCA, y de sus isoformas, en áreas específicas del encéfalo de diversas especies, analizando además su variación durante el desarrollo. En concreto se ha analizado el hipocampo en el cerdo adulto y el ratón en desarrollo, por ser una región especialmente afectada en enfermedades neurodegenerativas que conllevan la alteración de los niveles de Ca^{2+} (Lehotsky *et al.* 2002, Kerchner *et al.* 2012). El análisis se ha realizado también en la corteza y el cerebelo del ratón, regiones implicadas en procesos de memoria, aprendizaje y adquisición de movimientos estereotipados, para compararlos con los resultados obtenidos en el hipocampo. Finalmente, los estudios del hipocampo se han extendido a cultivos primarios de neuronas de ratón, con el fin de realizar un análisis comparativo.

En el hipocampo del cerdo adulto, se encontró que las tres familias de bombas de Ca^{2+} están presentes en los extractos de membranas de esta área, en concreto las isoformas SERCA2, SPCA1 y las PMCA1-4. Igualmente se encontró expresión de estas bombas de Ca^{2+} desde los primeros estadios del desarrollo (P0) del hipocampo, la corteza y el cerebelo del ratón, lo que pone de manifiesto la conservación de estas proteínas entre las especies animales. En el cerdo, la SERCA2 se expresa como una única banda a la altura aproximada de 110 kDa, que corresponde con el peso molecular de esta bomba en el cerebro de cerdo (Salvador *et al.* 2001). Resultados similares se han encontrado para las tres áreas estudiadas del encéfalo del ratón, permaneciendo constante la expresión de la SERCA2 desde el estadio P0 hasta el P30. Estos resultados están de acuerdo con lo descrito previamente en microsomas del cerebro o cerebelo de cerdo, una fracción enriquecida en membranas

celulares internas, siendo coherente con la presencia de esta bomba en el retículo sarco(endo)plásmico (Salvador *et al.* 2001, Sepúlveda *et al.* 2004).

La SPCA1, en extractos de membranas del hipocampo de cerdo, aparece como una banda intensa a 100 kDa, coincidiendo con lo descrito por (Wootton *et al.* 2004) en el cerebro de rata, ya que es la isoforma de esta familia de Ca^{2+} -ATPasas mayoritaria en el sistema nervioso, en relación a la SPCA2 (Vanoevelen *et al.* 2005). Estudios previos han mostrado también la presencia de esta bomba en el cerebelo del cerdo adulto (Sepúlveda *et al.* 2007a) así como en otros sistemas biológicos tales como células epiteliales en cultivo, músculo liso y células de Sertoli (Van Baelen *et al.* 2003, Wootton *et al.* 2004), lo que denota un amplia distribución en diferentes tejidos. Además, los resultados obtenidos en el hipocampo de cerdo adulto concuerdan con los observados en el cerebelo de cerdo (Sepúlveda *et al.* 2007a) y en el hipocampo y la corteza, pero no en el cerebelo del ratón durante el desarrollo. Así, mientras que en el hipocampo y en la corteza del ratón la SPCA1 aparece como una única banda cuya expresión es constante durante el desarrollo, en el cerebelo aparecen dos bandas a partir del estadio P8 como se describe en (Sepúlveda *et al.* 2008). Esta segunda banda podría corresponder con algún tipo de subisoforma o bien deberse a una modificación postraduccional. De hecho, en humanos se han encontrado cuatro subisoformas de la SPCA1 (Fairclough *et al.* 2003).

En cuanto a la PMCA, los resultados obtenidos en el hipocampo del cerdo difieren de los descritos previamente en otras áreas cerebrales usando el mismo anticuerpo 5F10, que reconoce un epítipo común a todas las isoformas de la PMCA (Caride *et al.* 1996). Así, mientras que en extractos de membranas de este área, los Western blots muestran a la PMCA como una banda de proteína, en las fracciones subcelulares obtenidas del cerebelo de cerdo, se distinguen dos bandas (Sepúlveda *et al.* 2004). Esto puede deberse a la presencia mayoritaria de alguna de las isoformas de la PMCA en el hipocampo de cerdo. Sin embargo los resultados obtenidos en el ratón durante el desarrollo se aproximan más a

lo descrito para la PMCA en el cerebelo de cerdo (Sepúlveda *et al.* 2004) o de pollo (Sepúlveda *et al.* 2005). El análisis en profundidad de la expresión de isoformas PMCA en membranas del hipocampo de cerdo adulto y del ratón adulto (P30), mostró la presencia de las cuatro isoformas, siendo la mayoritaria la PMCA4, lo que sugiere una conservación entre especies. Por otra parte, la aparición de dos bandas para la PMCA1 a la altura de 130 y 134 kDa en todas las áreas estudiadas del ratón, parece corresponderse con la presencia de las variantes 1a y 1b de esta bomba, tal y como se ha observado anteriormente en el hipocampo, la corteza y el cerebelo de rata (Filoteo *et al.* 1997). El espectro de bandas, entre los 126 y 150 kDa, correspondiente a la expresión de la PMCA2, así como las tres bandas con las que se expresó la PMCA3, y las dos de PMCA4, correspondientes a las variantes 4a y 4b (Filoteo *et al.* 1997), podría ser indicativo de la presencia de subisoformas concretas en ciertos momentos del desarrollo, tal y como se ha descrito previamente durante el desarrollo del cerebelo de pollo (Sepúlveda *et al.* 2005).

Los niveles de expresión variaron respecto a cada isoforma y entre las dos especies estudiadas. Así, en el hipocampo de cerdo la PMCA4 es la isoforma más abundante, seguida de las PMCA1 y 2. Sin embargo, en ratón las isoformas más abundantes son la 4 y la 2 en todas las áreas analizadas, coincidiendo con lo descrito por (Kip *et al.* 2006) en el hipocampo del ratón, seguidas de las PMCA3 y 1. Lo mismo ocurría en el cerebro de rata adulta, para las isoformas 1 y 2, pero no para la PMCA4, cuyos niveles de expresión eran menores en esta especie (Burette *et al.* 2003). Estas diferencias encontradas podrían deberse a una función concreta de cada isoforma dependiendo de la especie, estadio de desarrollo o área estudiada, pero también a una diferencia en la especificidad de los anticuerpos utilizados frente a cada especie analizada.

La presencia de SERCA2, SPCA1 y de todas las isoformas de la PMCA en el hipocampo de cerdo adulto, así como en el hipocampo, la corteza y el cerebelo de ratón, desde los estadios más tempranos del desarrollo, parece indicar la importancia que tiene la

regulación de los niveles de Ca^{2+} en estas regiones cerebrales. Cada vez hay más indicios que implican a las Ca^{2+} -ATPasas en funciones que traspasan el mero transporte de Ca^{2+} . Estudios realizados con ratones *knockout* y mutaciones identificadas en las diferentes isoformas de la SERCA muestran diferentes fenotipos. Así, la supresión de la expresión de la SERCA1 produce letalidad embrionaria en ratón (Pan *et al.* 2003) y mutaciones en el gen de esta isoforma causan la enfermedad de Brody en humanos (Prasad *et al.* 2004). Por otra parte, las mutaciones encontradas en el gen de la SERCA2 causan la enfermedad de Darier (Sakuntabhai *et al.* 1999), y además parece estar implicada en la aparición de desórdenes neuronales (Jones *et al.* 2002). De igual modo, mutaciones del gen de la SPCA1 en humanos, provocan la enfermedad de Hailey-Hailey (Fairclough *et al.* 2003) y la supresión total de su expresión resulta letal (Okunade *et al.* 2007). En cuanto a la familia de las PMCAs, es la que mayor diversidad de isoformas y variantes posee, estando esta variabilidad asociada a una diversidad funcional de las mismas (Strehler *et al.* 2007a, Strehler *et al.* 2007b). Por ejemplo, se ha descrito la posible implicación de estas proteínas en la desregulación de los niveles de Ca^{2+} producidos en el cerebro del jerbo tras el síndrome de isquemia-reperfusión (Lehotsky *et al.* 1999) y en enfermedades neurodegenerativas como la de Huntington (Kuhn *et al.* 2007). La presencia generalizada de todas las isoformas de la PMCA en el hipocampo del cerdo adulto o del ratón durante el desarrollo, así como en la corteza y el cerebelo del ratón en desarrollo, es indicativo de la particular función que estas proteínas podrían jugar en el sistema nervioso. Así, se ha observado que los ratones *knockout* para la PMCA1 resultan inviábiles, ya que presentan letalidad embrionaria (Okunade *et al.* 2004). Por otra parte investigaciones realizadas en ratones mutantes para la PMCA2 revelaron que estos individuos tenían problemas de equilibrio (Kozel *et al.* 1998). Debido a que esta isoforma es la mayoritaria en las células de Purkinje del cerebelo (Sepúlveda *et al.* 2007b), estos problemas podrían venir dados por una alteración de la función cerebelar (Prasad *et al.* 2004). Además esta isoforma se expresa altamente en el oído

interno del ratón, por lo que su falta agravaría los problemas de estabilidad y sordera (Kozel *et al.* 2002, Ueno *et al.* 2002, Bortolozzi *et al.* 2010). Recientes estudios han descubierto una mutación familiar asociada a la PMCA3 que parece estar implicada en el desarrollo de la ataxia cerebelar congénita (Zanni *et al.* 2012). En cuanto a la PMCA4, estudios realizados en ratones *knockout* para esta isoforma mostraron problemas de esterilidad por disminución de la movilidad de los espermatozoides (Okunade *et al.* 2004, Schuh *et al.* 2004). Por otra parte, el análisis de los cambios ocurridos en la expresión de todas las isoformas durante el desarrollo de diferentes líneas celulares cancerígenas, han puesto de manifiesto la importancia de estas proteínas en la diferenciación celular y el desarrollo de tumores (Lee *et al.* 2005, Aung *et al.* 2007, Roberts-Thomson *et al.* 2010).

Estos resultados corroboran y apoyan la importancia de las Ca^{2+} -ATPasas en la regulación de diversos procesos en el desarrollo de diferentes funciones vitales.

Distribución de la isoforma 4 de la PMCA en microdominios lipídicos (rafts) de membranas del hipocampo de cerdo.

La PMCA4 es la única isoforma que se asocia a los microdominios lipídicos *rafts* enriquecidos en colestesterol y esfingolípidos en cerebelo de cerdo (Sepúlveda *et al.* 2006). Por el contrario, otros autores han descrito la presencia de todas las isoformas PMCA en estos microdominios en neuronas de rata en cultivo (Jiang *et al.* 2007). Los resultados observados en el hipocampo de cerdo coinciden, en parte, con los descritos previamente por (Sepúlveda *et al.* 2006) en el cerebelo. Así, mientras que en el cerebelo de cerdo aparecen dos bandas de PMCA4 en dominios *rafts* (Sepúlveda *et al.* 2006), correspondientes a las variantes PMCA4a y b (Caride *et al.* 1996, Filoteo *et al.* 1997), en el hipocampo aparece una única banda de proteína, lo que indicaría la presencia mayoritaria de una de las dos variantes de la isoformas 4 en los microdominios lipídicos. Además, en el hipocampo, la distribución de la PMCA4 no es exclusiva de estas regiones de la membrana plasmática,

sino que esta isoforma también aparece en las fracciones de alta densidad del gradiente. Estos resultados, sumados a una localización más restringida de esta isoforma en tejido, podrían sugerir su implicación particular en determinados procesos que dependerían del tipo o población celular. Los *rafts* sirven de plataforma de anclaje para focalizar diferentes moléculas implicadas en la señalización celular y centralizar toda la maquinaria de transducción de señales (Simons y Ikonen 1997, Brown y London 2000, Zajchowski y Robbins 2002). La presencia de la PMCA4 en estos microdominios sugiere que esta proteína puede jugar un papel importante en la regulación de la señal mediada por Ca^{2+} en el hipocampo.

Análisis funcional de las Ca^{2+} -ATPasas en los distintos sistemas modelo

Los ensayos cinéticos realizados en extractos de membranas del hipocampo de cerdo mostraron una mayor contribución a la actividad Ca^{2+} -ATPasa total de la PMCA, seguida de la SPCA y después de la SERCA. Estos resultados concuerdan, parcialmente, con los descritos en sinaptosomas del cerebelo de cerdo, en los que la mayor contribución a la actividad Ca^{2+} -ATPasa también correspondía a la PMCA (Sepúlveda *et al.* 2007a), pero la actividad de la SPCA en esta área era menor que la de la SERCA. Estas diferencias sugieren que en el hipocampo la SPCA podría tener una mayor relevancia funcional que en el cerebelo. Por el contrario el comportamiento de las bombas respecto al transporte de Ca^{2+} en el hipocampo fue similar al descrito en sinaptosomas del cerebelo, en el que la mayor contribución al transporte correspondía a la PMCA seguida de la SERCA y la SPCA (Sepúlveda *et al.* 2007a).

En cuanto a la regulación de la PMCA, ensayos funcionales han mostrado que la proteína purificada del hipocampo de cerdo se regula por fosfolípidos de manera semejante a la PMCA aislada del cerebro total de cerdo (Salvador y Mata 1996) y a la de eritrocitos humanos (Niggli y Carafoli 1981). Así, en presencia del fosfolípido neutro PC, la actividad

PMCA se encuentra autoinhibida por plegamiento del dominio regulador sobre la proteína, activándose en presencia de calmodulina (Enyedi *et al.* 1987, Brodin *et al.* 1992). Por el contrario, cuando la PMCA se reconstituye en presencia del fosfolípido ácido PS este dominio autoinhibidor se encuentra totalmente desplegado (Palacios *et al.* 2003, Sepúlveda y Mata 2004), alcanzando de este modo el máximo de actividad Ca^{2+} -ATPasa.

Las medidas de las actividades Ca^{2+} -ATPasas en el hipocampo, la corteza y el cerebelo del ratón realizadas durante el desarrollo mostraron variaciones respecto a la expresión de estas proteínas, en estas áreas, obtenidas por Western blot. Así las actividades de SERCA y SPCA aumentaron con el desarrollo mientras que los niveles de expresión de la SERCA permanecieron constantes en todas las áreas, y los de la SPCA incrementaron en el cerebelo pero no en el hipocampo y la corteza. El incremento en la actividad SPCA en el cerebelo, podría deberse no sólo al incremento en la expresión de esta proteína en esta área, sino también a la presencia de moduladores específicos en esta área cerebral, a pesar de no haber sido descrito aún ninguno. Además, otros estudios, han puesto en evidencia diferencias cinéticas entre la actividad y el transporte de Ca^{2+} en la corteza y el hipocampo de ratón (Sepúlveda *et al.* 2008), lo que sugeriría la existencia de diversos factores que regularan el comportamiento cinético de la proteína.

Analizando en conjunto los dos modelos animales se concluye que de las tres familias de Ca^{2+} -ATPasas, la PMCA es la que presenta mayor actividad en el hipocampo del cerdo y la que más incrementa su actividad durante el desarrollo postnatal del encéfalo del ratón, sobre todo en el hipocampo. Este hecho podría indicar una alta regulación del Ca^{2+} en la región de la membrana plasmática, con respecto a las membranas intracelulares, en esta área cerebral implicada en procesos de aprendizaje y de memoria. Además, esta temprana necesidad de regulación de los niveles de Ca^{2+} en los precursores neuronales está de acuerdo con lo encontrado en el cerebelo de pollo durante el desarrollo pre-natal (Sepúlveda *et al.* 2005), reafirmando así la importancia de las señales de Ca^{2+} durante los

procesos que tienen lugar en el desarrollo neuronal temprano. La mayor contribución de la PMCA a la actividad Ca^{2+} -ATPasa total del hipocampo, podría explicarse por varias vías. Por una parte, el hipocampo es una región muy rica en membrana plasmática, ya que está compuesto por abundantes fibras neuronales, que conforman el neuropilo, y por otra parte es pobre en cuerpos celulares (Amaral y Witter 1989), donde se concentran las bombas de Ca^{2+} intracelulares. Como la PMCA es una proteína de membrana plasmática, es lógico encontrar una alta presencia funcional de esta bomba en las preparaciones de membrana del hipocampo. Además, la PMCA es una proteína altamente regulada por diversos activadores endógenos como la calmodulina, los fosfolípidos ácidos o las proteínas quinastas, que incrementan su afinidad por el ión Ca^{2+} y por tanto su actividad enzimática (Caroni y Carafoli 1981, Salvador y Mata 1996, Zylinska *et al.* 1998). Por otra parte, los activadores funcionales como la calmodulina o la proteína quinasa C, incrementan su expresión durante el desarrollo fetal y postnatal (Weinman *et al.* 1991, Goldberg y Steinberg 1996, Rainteau *et al.* 1988), lo que podría explicar el mayor incremento de la actividad PMCA durante el desarrollo del encéfalo de ratón.

Un aspecto importante a considerar es que la actividad de la PMCA está estrechamente relacionada con el perfil de expresión de sus isoformas, de forma semejante a lo descrito en el cerebelo de pollo (Sepúlveda *et al.* 2005, Sepúlveda *et al.* 2007b). Así, en el hipocampo y el cerebelo de ratón, se produce un incremento de la actividad a partir de la segunda semana del desarrollo, coincidiendo este aumento con el de la expresión de las cuatro isoformas. Por el contrario, en la corteza el aumento de la actividad es más temprano, durante la primera semana del desarrollo, coincidiendo este patrón también con el incremento de la expresión de las isoformas PMCA en esta área. Estas diferencias reflejarían unas necesidades de Ca^{2+} distintas durante el desarrollo de las diferentes regiones cerebrales analizadas.

Localización celular de las tres familias de Ca²⁺-ATPasas neuronales

Los ensayos inmunohistoquímicos permitieron analizar en detalle la localización celular de las distintas Ca²⁺-ATPasas en las diferentes áreas estudiadas. Así, en el hipocampo de cerdo adulto, la SERCA2 se localiza principalmente en el interior del soma de las células piramidales del subículo, en el cuerno de Amón, en la región polimórfica y en las células granulares, siendo en las células piramidales del cuerno de Amón donde la inmunorreacción fue más intensa, al igual que lo descrito en otras especies como el ratón y el gato (Baba-Aissa *et al.* 1998, Baba-Aissa *et al.* 1996). En el hipocampo, la corteza y el cerebelo del ratón en el desarrollo, la SERCA2b también se localizó en el soma de los diferentes tipos celulares. Este tipo de distribución homogénea en el citoplasma concuerda con la presencia de esta proteína en el retículo endoplásmico (Martone *et al.* 1993).

La localización de la SPCA1 en el hipocampo del cerdo adulto difiere de la de SERCA, pues aunque aparece en el citoplasma y troncos dendríticos de las células piramidales de toda la formación hipocámpica y las células granulares del giro dentado, se distribuye a modo de acúmulos dispersos en los somas neuronales. Esto es consecuente con su localización en los complejos del Golgi en las neuronas, como se ha observado en el cerebelo de cerdo (Sepúlveda *et al.* 2007a), a diferencia de otros tipos celulares de origen no neuronal, donde la SPCA1 se localiza de forma compacta en la región perinuclear (Van Baelen *et al.* 2003, Wootton *et al.* 2004). Esta localización encontrada en el hipocampo de cerdo, es similar a la observada en el hipocampo de ratón durante el desarrollo, localizándose igualmente, a modo de acúmulos, en el soma desde P0. Por el contrario, en la corteza y el cerebelo, en estadios tempranos, la SPCA1 se expresa de forma homogénea en el soma de las células piramidales o de las células precursoras de Purkinje. Esta localización es similar a la encontrada en cultivos primarios neuronales procedentes del cerebro de rata (Murin *et al.* 2006). La abundancia de la SPCA1 en estas regiones podría justificarse por la necesidad de regular las concentraciones de Ca²⁺ y Mn²⁺ dentro del Golgi en estos tipos

neuronales. Además, se ha descrito que el Ca^{2+} es esencial para el tráfico de las vesículas en el Golgi (Porat y Elazar 2000), y que la SPCA juega un papel importante en la maduración y glicosilación de proteínas que van a secretarse o que se localizan en el Golgi (Durr *et al.* 1998), proteínas que además, son dependientes de Ca^{2+} y están implicadas en enfermedades neurodegenerativas (Steiner 1998, LaFerla 2002). Pero, también la SPCA podría contribuir junto con la PMCA y la SERCA a la regulación de la transmisión sináptica mediada por Ca^{2+} o en otros procesos de señalización por Ca^{2+} en la neurona. La PMCA presenta una localización en la periferia del soma y el neuropilo (región rica en membrana plasmática) tanto en el hipocampo de cerdo adulto como en todas las áreas estudiadas del encéfalo de ratón, independientemente del estadio de desarrollo. Esto es consecuente con la presencia de esta bomba en la membrana plasmática, tal y como se había descrito previamente en el cerebelo de cerdo (Sepúlveda *et al.* 2004).

Un análisis detallado de las isoformas de PMCA en el hipocampo de cerdo, con anticuerpos específicos, reveló que la isoforma PMCA1 se expresa débilmente en las principales células del hipocampo y más intensamente en el neuropilo de las regiones CA, al igual que ocurre en otras especies como rata o ratón (Burette *et al.* 2003, Kip *et al.* 2006). El intenso marcaje puntuado que se encontró para la PMCA2 en todo el hipocampo coincide con el descrito previamente por (Juhaszova *et al.* 2000, Kip *et al.* 2006, Burette y Weinberg 2007), indicando la presencia de esta bomba en terminaciones sinápticas, en las que podría jugar un papel especial en la extrusión del Ca^{2+} tras la liberación de neurotransmisores en la transmisión química del impulso nervioso. Además, se ha mostrado en el hipocampo de rata, que la isoforma 2b es la mayoritaria (Kip *et al.* 2006). Esta variante “b” se diferencia de la “a” en su regulación por calmodulina y otros efectores. También se ha mostrado que la variante “b” puede interactuar con proteínas con dominios PDZ, como la PSD95/SAP90, SAP97 y PSD93/chapsina-110 (Kim *et al.* 1998, DeMarco y Strehler 2001) pudiendo, estas interacciones, localizar a la proteína en regiones

específicas de la membrana y focalizar las señales de Ca^{2+} . La expresión de la PMCA3 fue muy débil en todo el hipocampo, siendo estos resultados consecuentes con los obtenidos por Western blot, pero no con los descritos previamente por (Burette *et al.* 2003) en rata, pudiendo tratarse de una variación de afinidad de los anticuerpos en unas especies respecto a otras o bien de una expresión distinta en el hipocampo de cerdo. La PMCA4 es la isoforma que se distribuye de forma más restringida respecto a las otras isoformas PMCA, apareciendo en poblaciones discretas de células a lo largo de toda la formación hipocámpica, tal y como se describió en rata (Burette *et al.* 2003, Kip *et al.* 2006).

En cuanto a la localización celular de las Ca^{2+} -ATPasas en el encéfalo del ratón durante el desarrollo, es preciso indicar que los experimentos cinéticos realizados en esta Tesis han mostrado que el incremento en la actividad de la PMCA está acompañado por cambios en la expresión de sus isoformas durante el desarrollo postnatal de diferentes áreas cerebrales del ratón. Todos estos cambios van asociados a la maduración de los diversos tipos celulares; de hecho, el mayor aumento en la actividad de la PMCA tiene lugar durante el momento de mayor desarrollo sináptico. En el encéfalo de ratón se observaron las diferentes isoformas PMCA en el neuropilo desde los estadios de desarrollo más tempranos así como su co-localización con sinaptofisina, indicando una posible implicación de estas bombas de Ca^{2+} en la formación y maduración de la sinapsis. Esta distribución sináptica de la PMCA también se ha observado en el cerebro y cerebelo de rata durante el desarrollo y el estadio adulto (Burette *et al.* 2003, Kip *et al.* 2006, Burette y Weinberg 2007), así como en el cerebelo (Sepúlveda *et al.* 2004), el hipocampo de cerdo adulto y el cerebelo de pollo en el desarrollo (Sepúlveda *et al.* 2005, Sepúlveda *et al.* 2007b), indicando que esta localización está conservada entre especies.

La distribución de todas las isoformas PMCA es similar en el hipocampo y la corteza del ratón, pero difiere en el cerebelo. Así, las PMCAs 1 y 3 se localizan en zonas ricas en membrana plasmática, como el neuropilo de los *stratum oriens* y *radiatum* del

hipocampo o la corteza, de forma semejante a lo observado antes en hipocampo de cerdo. En el cerebelo de ratón se distribuyen de forma similar que en rata adulta (Stauffer *et al.* 1997), pero difiere a lo observado en pollo durante el desarrollo, ya que su localización estaba restringida al soma y la región proximal del tronco dendrítico de las células de Purkinje (Sepúlveda *et al.* 2007b). La PMCA2 se localiza en regiones abundantes en membranas, con un marcaje similar al encontrado previamente en el hipocampo de cerdo adulto, en el cerebelo de pollo (Sepúlveda *et al.* 2007b) y el cerebro de rata (Stauffer *et al.* 1997), mientras que la PMCA4 se distribuía de forma similar a la PMCA3 en el cerebelo de pollo (Sepúlveda *et al.* 2007b). Además la localización de la PMCA4 en el hipocampo de ratón en desarrollo postnatal varía con respecto a la descrita en rata durante su desarrollo, pues en esta especie se localiza en el soma de algunas células aisladas en CA1 (Kip *et al.* 2006) o en el cerdo adulto donde también se localizó en algunas poblaciones discretas de células del CA y del giro dentado.

Estas diferencias podrían deberse a una variación de la expresión entre especies o bien a las variaciones entre el desarrollo neuronal pre y postnatal. Además, Burette y Weinberg en 2007 mostraron una localización postsináptica para la PMCA2 y presináptica para la PMCA3, apoyando los resultados obtenidos.

Esta localización tan restringida para cada una de las isoformas (resumida en la Tabla III) y sus diferentes niveles de expresión, podrían explicarse por el diferente papel que cada una de ellas podría jugar en la homeostasis del Ca^{2+} . De hecho, se ha descrito una distribución espacio-temporal específica de las isoformas PMCA en otros tejidos excitables con otras funciones, como la retina en desarrollo (Renteria *et al.* 2005, Krizaj y Copenhagen 1998) y la cóclea (Dumont *et al.* 2001).

Por otro lado, las isoformas PMCA se diferencian en su comportamiento cinético y por su afinidad por Ca^{2+} y calmodulina (Penniston y Enyedi 1998), así como por su regulación por fosforilación (Penniston y Enyedi 1998), proteólisis (Paszty *et al.* 2002,

Guerini *et al.* 2003) o fosfolípidos ácidos. Así, la expresión de las mismas en un tipo celular o en una región subcelular no implica necesariamente una redundancia funcional, ya que en una misma célula existen diferentes compartimentos y estas proteínas pueden regularse de una forma específica y diferenciada durante el desarrollo. Por otra parte, cada isoforma podría estar integrada en complejos multiproteicos que podrían centralizar las señales de Ca^{2+} . Por ejemplo se ha descrito que las isoformas PMCA2b y 4b interactúan con las proteínas SAPs (*synapse-associated proteins*), de la familia de las MAGUK (Kim *et al.* 1998, DeMarco y Strehler 2001), implicadas en el reclutamiento de proteínas que intervienen en procesos de señalización en dominios específicos de membrana. Igualmente se ha descrito que la PMCA2b interactúa con el factor regulador del intercambiador Na^+/H^+ (DeMarco *et al.* 2002). Estos resultados apoyan la idea de una función no redundante para las isoformas PMCA, poniendo de manifiesto un papel de estas proteínas que va más allá del mero transporte de Ca^{2+} .

Ca^{2+} -ATPasas en cultivos primarios de hipocampo de ratón.

Además de los modelos animales, las Ca^{2+} -ATPasas se han caracterizado en cultivos primarios de hipocampo de ratón, y se ha analizado la relación existente entre estas proteínas y el péptido β -amiloide, una de las proteínas mayoritarias que componen las placas seniles, presentes en los cerebros afectados por la enfermedad de Alzheimer (Selkoe 1989, Selkoe 1998, Castellani *et al.* 2010). El hipocampo de estos cerebros se caracteriza por ser una de las áreas que primero se afecta y que más se altera en los pacientes que padecen esta enfermedad, viéndose reducido como resultado de la degeneración de las sinapsis y de la muerte neuronal (Hof *et al.* 1995b, Hof *et al.* 1995a, Mann 1996, Castellani *et al.* 2010).

La caracterización morfológica y funcional de los cultivos neuronales permitió elegir el momento óptimo para medir la actividad Ca^{2+} -ATPasa y el posterior tratamiento

de las células con el péptido amiloide. El tiempo de mantenimiento óptimo para la caracterización de las actividades SERCA, SPCA y PMCA en los cultivos primarios fue de 7 DIV, ya que la actividad Ca^{2+} -ATPasa total mostró un incremento con el desarrollo *in-vitro* de las células que alcanzaba un máximo en este estadio del desarrollo. Este tiempo está en el intervalo de 5 a 10 DIV considerado por otros autores (Mark *et al.* 1996, Bores *et al.* 1998, Resende *et al.* 2007). En esta Tesis se ha mostrado la expresión de todas las Ca^{2+} -ATPasas desde el estadio P0 en el hipocampo de ratón, por lo que su expresión en cultivos *in-vitro* es consecuente con la presencia de estas proteínas en tejido. Otros autores, además, muestran la expresión de estas proteínas desde el día de la siembra en neuronas de hipocampo de rata en cultivo (Kip *et al.* 2006). Además, a los 7 DIV todas las Ca^{2+} -ATPasas se expresaron en las neuronas de hipocampo, siendo el patrón de actividades semejante al que se había descrito en extractos de membranas de hipocampo de cerdo, ratón, membrana plasmática sinaptosomal (MPS) y sinaptosomas de cerebelo de cerdo (Sepúlveda *et al.* 2007a). La mayor contribución de la PMCA a la actividad total, parece indicar una posible relevancia funcional de esta bomba durante desarrollo celular de las neuronas de hipocampo. Por otra parte, la forma redondeada y la emisión de lamelipodios a las pocas horas de la siembra así como la presencia de una red dendrítica compleja a los 7 DIV, son un indicativo del correcto desarrollo neuronal. Estos resultados coinciden con lo observado en células de hipocampo de rata (Dotti *et al.* 1988, Bartlett y Banker 1984). Los ensayos de doble inmunofluorescencia en las células en cultivo mostraron la localización homogénea de la SERCA2b en el soma celular, de la SPCA1 en acúmulos y la distribución de la PMCA en la periferia, siendo consecuente con la presencia de estas bombas en el retículo sarco(endo)plásmico, el aparato de Golgi y la membrana plasmática, respectivamente. Estos resultados están de acuerdo con los descritos previamente en esta Tesis en el ratón durante el desarrollo y en el hipocampo de cerdo adulto, así como en el

cerebelo de cerdo adulto (Sepúlveda *et al.* 2004, Sepúlveda *et al.* 2007a), el hipocampo de rata, astrogliá, oligodendrocitos y células endimarias de rata (Murin *et al.* 2006).

La presencia de todas las bombas de Ca^{2+} en los cultivos primarios a los 7 DIV, con una actividad similar a la encontrada en tejido, así como una localización correcta, confirman a los cultivos primarios de ratón, como un buen modelo de estudio *in-vitro* de las ATPasas más próximo a las condiciones fisiológicas y ponen de manifiesto la importancia que juegan estas bombas de Ca^{2+} en la regulación de este ión en los procesos del desarrollo neuronal. Sin embargo, esto no quiere decir que desempeñen exactamente una única función. De hecho, en ratones transgénicos en los que se substituyó la isoforma SERCA2a por la 2b, se observaron malformaciones cardiacas y un aumento en el 40% en la mortalidad neonatal (Ver Heyen *et al.* 2001). El silenciamiento de la SERCA2 producía remodelación de la señal de Ca^{2+} en cardiomiocitos en cultivo (Seth *et al.* 2004) y su inhibición en neuronas de corteza de rata en cultivo producía una alteración en la maduración celular, afectando al crecimiento de las neuritas (Ringler *et al.* 2008). Por otra parte, estudios recientes en los que se eliminó la expresión de la SPCA1 en células N2a han mostrado que el silenciamiento de esta proteína impedía la diferenciación de estas células, fenómeno que se veía reflejado en el incremento del número de neuritas pero de menor longitud (Sepúlveda *et al.* 2009). También se ha visto que el silenciamiento parcial de la SPCA1 en neuronas de hipocampo de ratón producía un retraso en el proceso de diferenciación celular, mientras que la inhibición total de la expresión afectaba drásticamente a la supervivencia neuronal (Sepúlveda *et al.* 2009).

Los ensayos de detección y localización de las isoformas PMCA en células en cultivo, mostraron una amplia distribución de estas proteínas en las neuronas piramidales. Esta presencia generalizada podría llevar a pensar en una posible función redundante de las isoformas PMCA. Sin embargo, estudios precedentes han mostrado una especialización funcional de las PMCA interviniendo en funciones diferentes a la regulación de los niveles

intracelulares de Ca^{2+} . Por ejemplo, se ha descrito que el silenciamiento de la PMCA2 en neuronas de corteza e hipocampo de rata, produce una disminución importante en la viabilidad de estas células cuando éstas se ven sometidas a procesos de estrés oxidativo en los que el Ca^{2+} juega un papel crucial (Fernandes *et al.* 2007). Por otra parte, estudios realizados con células PC12 en las que se ha suprimido la expresión de las isoformas 2 y 3 de la PMCA han mostrado una reducción en la longitud de las neuritas y la supervivencia neuronal (Szemraj *et al.* 2004). En estos mismos tipos celulares se ha visto que una supresión total de la expresión de PMCA2 producía una alteración en los niveles de SERCA2 (Zylinska *et al.* 2007), lo que pone de manifiesto el papel que las Ca^{2+} -ATPasas pueden jugar en las vías de señalización. Estos resultados afianzan la idea de que diferentes isoformas PMCA realizan funciones concretas y especializadas en diferentes tipos celulares, participando en procesos que van más allá de la mera regulación de los niveles de Ca^{2+} .

Efecto del péptido β -amiloide en los cultivos primarios y las Ca^{2+} -ATPasas

En la enfermedad de Alzheimer, la desregulación de los niveles intracelulares de Ca^{2+} parece estar altamente influenciada por la presencia del péptido β -amiloide, principal componente de las placas seniles (Bezprozvanny y Mattson 2008), y es de especial relevancia en el hipocampo ya que es el giro dentado de esta área la primera que se afecta durante la enfermedad (Wilhelmsen 1999). En esta Tesis se ha analizado el efecto de $\text{A}\beta$ en los cultivos primarios de hipocampo y su relación con las Ca^{2+} -ATPasas. Los resultados mostraron que la mayor toxicidad del péptido venía dada cuando se incubaban las células durante 48h a 37° C con concentraciones de $\text{A}\beta$ de 2,5 μM . Estos resultados se aproximan a los descritos para células de hipocampo de rata incubadas con $\text{A}\beta$ de diferentes tamaños (Resende *et al.* 2007, Resende *et al.* 2008). Por otra parte, los resultados de los ensayos de actividad Ca^{2+} -ATPasa medida en extractos de membranas de las neuronas crecidas en presencia del péptido amiloide, están de acuerdo con los descritos previamente en los

sinaptosomas de cerebro de cerdo por (Berrocal *et al.* 2009), mostrando una inhibición de la PMCA aproximadamente del 50%, mientras que las actividades de la SERCA y la SPCA permanecían similares al control. Por el contrario, cuando se añade calmodulina conjuntamente con A β a los cultivos, la actividad PMCA permanece similar a la de los cultivos sin adiciones. Estos resultados coinciden con los obtenidos recientemente en nuestro laboratorio con la PMCA purificada del cerebro de cerdo (Berrocal *et al.* 2012), sugiriendo un papel protector de la calmodulina en el efecto tóxico del péptido amiloide sobre la actividad catalítica de la PMCA. Sumado a los efectos de A β sobre la actividad PMCA están los que se producen sobre la morfología celular. Frente a la red dendrítica presente en las células no tratadas, en la que las células presentan una arborización ramificada y lisa, se contrapone la que poseen las células tratadas con A β 1-42, en las que se produce una distrofia en la morfología de esta red, reflejado en el acortamiento, arrugamiento y adelgazamiento de las prolongaciones. Esto coincide con lo descrito por otros autores en células de hipocampo de rata tratadas con los péptidos A β 25-35 y A β 1-40 (Sponne *et al.* 2004, Resende *et al.* 2007). Sin embargo, las células crecidas en presencia de calmodulina y A β presentaron una morfología similar a la de las células control, con un tamaño de axón y dendritas que se corresponde con el de las células de hipocampo de rata con un desarrollo *in-vitro* de 7 días, aproximadamente unas 300 μm para el axón y sobre las 50 μm para las dendritas (Dotti *et al.* 1988). Estos resultados se ven reflejados también en la viabilidad de las células, apoyando la teoría de un posible efecto protector de la calmodulina frente a la toxicidad de A β . Los resultados ponen de manifiesto la importancia de la regulación de los niveles de Ca²⁺ en los procesos del desarrollo y producción de neuritas. De hecho se ha observado, en células de corteza de rata en cultivo, una elongación deficiente de las neuritas tras haber producido una disrupción de la homeostasis del Ca²⁺ durante su desarrollo (Ringler *et al.* 2008). Esta desregulación del Ca²⁺, que desembocaría en un déficit en la elongación o acortamiento de las neuritas en presencia de A β 1-42, podría

ser la causa de la pérdida de la función de las sinapsis y por tanto en fallos durante el proceso cognitivo (Chakroborty y Stutzmann 2011). De hecho, estudios recientes demuestran que el Ca^{2+} es fundamental para la formación de nuevas sinapsis (Wang y Zhang 2012) y que una desregulación temprana de los niveles de este ión es la base para la pérdida de sinapsis y el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (Chakroborty y Stutzmann 2011).

Estudios previos realizados en este laboratorio con membranas de cerebros humanos afectados por la enfermedad de Alzheimer, han mostrado que la actividad PMCA no es sensible a cambios en la concentración de Ca^{2+} , mientras que si lo es en tejido control. Además, cuando a las membranas de tejido control se le añadía péptido amiloide la PMCA perdía su sensibilidad a Ca^{2+} en el intervalo comprendido entre 0,31 y 31 μM (Berrocal *et al.* 2009). Los resultados también se reprodujeron con sinaptosomas y con PMCA purificada de cerdo y reconstituida en fosfolípidos. Las otras Ca^{2+} -ATPasas fueron insensibles al péptido y presentaron la misma dependencia respecto al Ca^{2+} en los tejidos enfermos y sanos. Este estudio propuso que la alteración funcional de la PMCA contribuye a la desregulación del Ca^{2+} intracelular en la enfermedad de Alzheimer, mediado por la acción del péptido β -amiloide (Berrocal *et al.* 2009).

Considerando la complejidad de los cultivos primarios, no podemos descartar la implicación de otros mecanismos en la inhibición de la PMCA cuando a los cultivos se les añadió el péptido β -amiloide. En esta Tesis mostramos una interacción directa de la PMCA con $\text{A}\beta$ mediante ensayos *overlay* realizados en placas ELISA de 96 pocillos o por inmunoblot, o mediante ensayos de co-inmunoprecipitación. Pero además podrían producirse especies reactivas de oxígeno (ROS) por acción del péptido que contribuirían a la inhibición de la PMCA. De hecho se ha descrito que el $\text{A}\beta$ produce un aumento de las ROS en varios tipos celulares (Behl *et al.* 1994, Mattson y Goodman 1995, Sponne *et al.* 2003) y la actividad PMCA se ve inhibida ROS, tanto en vesículas de membrana

sinaptosomal de cerebro de rata (Zaidi y Michaelis 1999), como en preparaciones purificadas de eritrocitos humanos (Zaidi *et al.* 2003) y en neuronas aisladas de la corteza de rata (Zaidi *et al.* 2009). Por tanto, el efecto inhibitor de A β sobre la actividad de la PMCA en células en cultivo, podría deberse también a la formación de ROS en respuesta al péptido. Además, estudios realizados en neuronas de hipocampo de rata en cultivo, muestran una disminución de la expresión de PMCA tras la exposición de las células a peróxido de hidrógeno (Kip y Strehler 2007). Otros autores han descrito que la toxicidad del péptido amiloide puede estar mediada por la disrupción de la membrana plasmática (Demuro *et al.* 2005), o por la peroxidación de los lípidos de membrana (Butterfield *et al.* 2002, Butterfield 2002, Mattson 2007), por lo que la actividad PMCA, que está regulada también por la composición lipídica de la membrana (Palacios *et al.* 2003, Sepúlveda y Mata 2004, Pang *et al.* 2005, Tang *et al.* 2006), podría verse afectada en este proceso, tal y como se ha observado en sinaptosomas de corteza de rata (Pereira *et al.* 1996).

Otro aspecto interesante encontrado en los estudios con cultivos primarios ha sido el papel protector de la calmodulina frente a la toxicidad de A β , tanto en la supervivencia celular como en la actividad de la PMCA. Estudios recientes de nuestro laboratorio han mostrado este efecto protector sobre la PMCA purificada de cerebro de cerdo (Berrocal *et al.* 2012). Ya que no se ha descrito un transportador para la calmodulina que le haga atravesar la membrana celular en las neuronas en cultivo, el efecto protector de la calmodulina, por tanto, podría venir dado por una posible interacción extracelular entre esta proteína y el péptido A β 1-42 como indicarían los resultados del *overlay* en placa ELISA. De hecho, (Berrocal *et al.* 2012) han mostrado, mediante ensayos de *overlay* con calmodulina biotinilada que existe una interacción directa entre calmodulina y A β 1-42. Además, analizando la secuencia del péptido, se ha visto la presencia de residuos hidrofóbicos conservados que conforman los motivos 1-10, 1-14 y 1-16, que poseen las proteínas que se

unen a calmodulina y que además están presentes en otras proteínas implicadas en la enfermedad de Alzheimer como la γ -secretasa, o las presenilina 1 y 2 (O'Day y Myre 2004).

Estos resultados muestran a la PMCA como un posible componente funcional de los mecanismos que intervienen en la enfermedad de Alzheimer por su interacción con el péptido β -amiloide en el hipocampo. Además proponen a la calmodulina como un futuro objetivo en el estudio de esta enfermedad neurodegenerativa, planteando la realización de modelos de protección *in-vitro* o en animales de experimentación.

Conclusiones

Los resultados de esta Tesis permiten obtener las siguientes conclusiones:

- 1- Todas las bombas de Ca^{2+} y sus isoformas se expresan en el hipocampo de cerdo adulto. Estas bombas están presentes conjuntamente en las células granulares, polimórficas y piramidales, pero tienen una distribución subcelular diferente y específica, lo que sugiere una función concreta de cada tipo de bomba en la regulación del Ca^{2+} en esta área cerebral.
- 2- La PMCA es la bomba de Ca^{2+} más activa en el hipocampo de cerdo seguida de la SPCA y la SERCA. Esto podría indicar una mayor necesidad de regulación del Ca^{2+} en regiones de la membrana plasmática en esta área del cerebro.
- 3- En el hipocampo de cerdo adulto la única isoforma de la PMCA que se localiza en *rafts* es la PMCA4, lo que podría sugerir una implicación específica de esta isoforma en procesos de señalización en el hipocampo.
- 4- Las bombas intracelulares SERCA y SPCA y la de membrana plasmática, PMCA, además de todas las isoformas de ésta, se expresan en el hipocampo, la corteza y el cerebelo de ratón, siendo todas funcionales desde los estadios más tempranos del desarrollo. Además la distribución de las bombas está asociada a tipos celulares concretos y a estadios de desarrollo específicos, pudiendo estar relacionada con demandas muy específicas del calcio en ciertos momentos del desarrollo neuronal.

- 5- Los estudios en ratón muestran una regulación de la actividad PMCA y de la expresión de sus isoformas durante el desarrollo postnatal que además está asociada a una localización de isoformas similar en el hipocampo y la corteza pero que difiere en el cerebelo. Esto podría revelar la importancia de las isoformas PMCA en la homeostasis de Ca^{2+} durante la maduración morfológica y funcional de las neuronas.

- 6- Todas las bombas de Ca^{2+} están presentes en los cultivos primarios de hipocampo de ratón y son funcionales, mostrando un comportamiento cinético similar al encontrado "*in-vivo*".

- 7- La incubación de la neuronas con el péptido neurotóxico β -amiloide produce una retracción de las dendritas y disminución de la viabilidad de las células. Además la actividad de la PMCA es la única que se inhibe en presencia del péptido, pudiendo ser una de las causas por las cuales se producen alteraciones en los niveles de Ca^{2+} en pacientes con la enfermedad de Alzheimer.

- 8- El efecto neurotóxico de $A\beta$ se bloquea por la presencia de calmodulina en el medio, debido probablemente a la interacción entre ambos.

Bibliografía

- Akita, T. and Kuba, K. (2000) Functional triads consisting of ryanodine receptors, Ca(2+) channels, and Ca(2+)-activated K(+) channels in bullfrog sympathetic neurons. Plastic modulation of action potential. *J Gen Physiol*, **116**, 697-720.
- Altman, J. and Bayer, S. A. (1990) Mosaic organization of the hippocampal neuroepithelium and the multiple germinal sources of dentate granule cells. *J Comp Neurol*, **301**, 325-342.
- Altman, J. and Das, G. D. (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol*, **124**, 319-335.
- Amaral, D. G. (1978) A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *J Comp Neurol*, **182**, 851-914.
- Amaral, D. G. (1979) Synaptic extensions from the mossy fibers of the fascia dentata. *Anat Embryol (Berl)*, **155**, 241-251.
- Amaral, D. G. and Witter, M. P. (1989) The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*, **31**, 571-591.
- Antkiewicz-Michaluk, L. (1995) Receptor and voltage-operated ion channels in the central nervous system. *Pol J Pharmacol*, **47**, 253-264.
- Arispe, N., Pollard, H. B. and Rojas, E. (1993) Giant multilevel cation channels formed by Alzheimer disease amyloid beta-protein [A beta P-(1-40)] in bilayer membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 10573-10577.
- Arni, S., Keilbaugh, S. A., Ostermeyer, A. G. and Brown, D. A. (1998) Association of GAP-43 with detergent-resistant membranes requires two palmitoylated cysteine residues. *J Biol Chem*, **273**, 28478-28485.
- Aung, C. S., Kruger, W. A., Poronnik, P., Roberts-Thomson, S. J. and Monteith, G. R. (2007) Plasma membrane Ca²⁺-ATPase expression during colon cancer cell line differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*, **355**, 932-936.
- Baba-Aissa, F., Raeymaekers, L., Wuytack, F., De Greef, C., Missiaen, L. and Casteels, R. (1996) 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. and Casteels, R. (1998) Distribution and isoform diversity of the organellar Ca²⁺ pumps in the brain. *Mol Chem Neuropathol*, **33**, 199-208.
- Baron, S., Vangheluwe, P., Sepúlveda, M. R., Wuytack, F., Raeymaekers, L. and Vanoevelen, J. (2010) The secretory pathway Ca(2+)-ATPase 1 is associated with cholesterol-rich microdomains of human colon adenocarcinoma cells. *Biochim Biophys Acta*, **1798**, 1512-1521.
- Bartlett, W. P. and Banker, G. A. (1984) An electron microscopic study of the development of axons and dendrites by hippocampal neurons in culture. II. Synaptic relationships. *J Neurosci*, **4**, 1954-1965.
- Behl, C., Davis, J. B., Lesley, R. and Schubert, D. (1994) Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell*, **77**, 817-827.
- Belan, P. V., Kostyuk, P. G., Snitsarev, V. A. and Tepikin, A. V. (1993) Calcium clamp in single nerve cells. *Cell Calcium*, **14**, 419-425.
- Berridge, M. J. (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*, **361**, 315-325.
- Berridge, M. J. (1995) Calcium signalling and cell proliferation. *Bioessays*, **17**, 491-500.
- Berridge, M. J. (2010) Calcium hypothesis of Alzheimer's disease. *Pflugers Arch*, **459**, 441-449.
- Berridge, M. J., Bootman, M. D. and Roderick, H. L. (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 517-529.
- Berrocal, M., Marcos, D., Sepúlveda, M. R., Perez, M., Avila, J. and Mata, A. M. (2009) Altered Ca²⁺ dependence of synaptosomal plasma membrane Ca²⁺-ATPase in human brain affected by Alzheimer's disease. *FASEB J*, **23**, 1826-1834.

- Berrocal, M., Sepúlveda, M. R., Vazquez-Hernandez, M. and Mata, A. M. (2012) Calmodulin antagonizes amyloid-beta peptides-mediated inhibition of brain plasma membrane Ca(2+)-ATPase. *Biochim Biophys Acta*, **1822**, 961-969.
- Bezprozvanny, I. and Mattson, M. P. (2008) Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci*, **31**, 454-463.
- Blackstad, T. W. and Kjaerheim, A. (1961) Special axo-dendritic synapses in the hippocampal cortex: electron and light microscopic studies on the layer of mossy fibers. *J Comp Neurol*, **117**, 133-159.
- Bobe, R., Bredoux, R., Corvazier, E., Andersen, J. P., Clausen, J. D., Dode, L., Kovacs, T. and Enouf, J. (2004) Identification, expression, function, and localization of a novel (sixth) isoform of the human sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ATPase 3 gene. *J Biol Chem*, **279**, 24297-24306.
- Bobe, R., Bredoux, R., Corvazier, E., Lacabartz-Porret, C., Martin, V., Kovacs, T. and Enouf, J. (2005) How many Ca(2)+ATPase isoforms are expressed in a cell type? A growing family of membrane proteins illustrated by studies in platelets. *Platelets*, **16**, 133-150.
- Bores, G. M., Smith, C. P., Wirtz-Brugger, F. and Giovanni, A. (1998) Amyloid beta-peptides inhibit Na⁺/K⁺-ATPase: tissue slices versus primary cultures. *Brain Res Bull*, **46**, 423-427.
- Bortolozzi, M., Brini, M., Parkinson, N. et al. (2010) The novel PMCA2 pump mutation Tommy impairs cytosolic calcium clearance in hair cells and links to deafness in mice. *J Biol Chem*, **285**, 37693-37703.
- 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.
- Brini, M. and Carafoli, E. (2009) Calcium pumps in health and disease. *Physiol Rev*, **89**, 1341-1378.
- Brodin, P., Falchetto, R., Vorherr, T. and Carafoli, E. (1992) Identification of two domains which mediate the binding of activating phospholipids to the plasma-membrane Ca²⁺ pump. *Eur J Biochem*, **204**, 939-946.
- Brown, D. A. and London, E. (2000) Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem*, **275**, 17221-17224.
- Burette, A., Rockwood, J. M., Strehler, E. E. and Weinberg, R. J. (2003) Isoform-specific distribution of the plasma membrane Ca²⁺ ATPase in the rat brain. *J Comp Neurol*, **467**, 464-476.
- Burette, A. and Weinberg, R. J. (2007) Perisynaptic organization of plasma membrane calcium pumps in cerebellar cortex. *J Comp Neurol*, **500**, 1127-1135.
- Burwell, R. D., Witter, M. P. and Amaral, D. G. (1995) Perirhinal and postrhinal cortices of the rat: a review of the neuroanatomical literature and comparison with findings from the monkey brain. *Hippocampus*, **5**, 390-408.
- Butterfield, D. A. (2002) Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review. *Free Radic Res*, **36**, 1307-1313.
- Butterfield, D. A., Castegna, A., Lauderback, C. M. and Drake, J. (2002) Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death. *Neurobiol Aging*, **23**, 655-664.
- Caputo, A., Sarnataro, D., Campana, V., Costanzo, M., Negro, A., Sorgato, M. C. and Zurzolo, C. (2009) Doppel and PrPC co-immunoprecipitate in detergent-resistant membrane domains of epithelial FRT cells. *Biochem J*, **425**, 341-351.
- Carafoli, E. (1987) Intracellular calcium homeostasis. *Annu Rev Biochem*, **56**, 395-433.

- Carafoli, E. (1994) Biogenesis: plasma membrane calcium ATPase: 15 years of work on the purified enzyme. *FASEB J*, **8**, 993-1002.
- Carafoli, E. and Brini, M. (2000) Calcium pumps: structural basis for and mechanism of calcium transmembrane transport. *Curr Opin Chem Biol*, **4**, 152-161.
- Caride, A. J., Filoteo, A. G., Enyedi, A., Verma, A. K. and 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.
- Caroni, P. and Carafoli, E. (1981) The Ca²⁺-pumping ATPase of heart sarcolemma. Characterization, calmodulin dependence, and partial purification. *J Biol Chem*, **256**, 3263-3270.
- Castellani, R. J., Rolston, R. K. and Smith, M. A. (2010) Alzheimer disease. *Dis Mon*, **56**, 484-546.
- Cens, T., Rousset, M., Leyris, J. P., Fesquet, P. and Charnet, P. (2006) Voltage- and calcium-dependent inactivation in high voltage-gated Ca(2+) channels. *Prog Biophys Mol Biol*, **90**, 104-117.
- Clapham, D. E. (1995) Calcium signaling. *Cell*, **80**, 259-268.
- Chakroborty, S. and Stutzmann, G. E. (2011) Early calcium dysregulation in Alzheimer's disease: setting the stage for synaptic dysfunction. *Sci China Life Sci*, **54**, 752-762.
- Chan, S. L. and Mattson, M. P. (1999) Caspase and calpain substrates: roles in synaptic plasticity and cell death. *J Neurosci Res*, **58**, 167-190.
- Chicurel, M. E. and Harris, K. M. (1992) Three-dimensional analysis of the structure and composition of CA3 branched dendritic spines and their synaptic relationships with mossy fiber boutons in the rat hippocampus. *J Comp Neurol*, **325**, 169-182.
- Chiesi, M. and Inesi, G. (1979) The use of quench reagents for resolution of single transport cycles in sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, **254**, 10370-10377.
- De Jaegere, S., Wuytack, F., Eggermont, J. A., Verboomen, H. and Casteels, R. (1990) Molecular cloning and sequencing of the plasma-membrane Ca²⁺ pump of pig smooth muscle. *Biochem J*, **271**, 655-660.
- de Meis, L. (2003) Brown adipose tissue Ca²⁺-ATPase: uncoupled ATP hydrolysis and thermogenic activity. *J Biol Chem*, **278**, 41856-41861.
- del Monte, F. and Hajjar, R. J. (2003) Targeting calcium cycling proteins in heart failure through gene transfer. *J Physiol*, **546**, 49-61.
- DeMarco, S. J., Chicka, M. C. and Strehler, E. E. (2002) Plasma membrane Ca²⁺ ATPase isoform 2b interacts preferentially with Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor 2 in apical plasma membranes. *J Biol Chem*, **277**, 10506-10511.
- DeMarco, S. J. and 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.
- Demuro, A., Mina, E., Kaye, R., Milton, S. C., Parker, I. and Glabe, C. G. (2005) Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers. *J Biol Chem*, **280**, 17294-17300.
- Denizot, F. and Lang, R. (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods*, **89**, 271-277.
- Di Leva, F., Domi, T., Fedrizzi, L., Lim, D. and Carafoli, E. (2008) The plasma membrane Ca²⁺ ATPase of animal cells: structure, function and regulation. *Arch Biochem Biophys*, **476**, 65-74.
- Dode, L., Vilsen, B., Van Baelen, K., Wuytack, F., Clausen, J. D. and Andersen, J. P. (2002) Dissection of the functional differences between sarco(endo)plasmic reticulum

- Ca²⁺-ATPase (SERCA) 1 and 3 isoforms by steady-state and transient kinetic analyses. *J Biol Chem*, **277**, 45579-45591.
- Dode, L., Vanoevelen, J., Missiaen, L., Raeymaekers, L., Wuytack, F. (2007) Calcium: A matter of life or death; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands; Vol. **41**.
- Domi, T., Di Leva, F., Fedrizzi, L., Rimessi, A. and Brini, M. (2007) Functional specificity of PMCA isoforms? *Ann N Y Acad Sci*, **1099**, 237-246.
- Dotti, C. G., Sullivan, C. A. and Banker, G. A. (1988) The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci*, **8**, 1454-1468.
- Duchen, M. R. (2000) Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *J Physiol*, **529 Pt 1**, 57-68.
- Dumont, R. A., Lins, U., Filoteo, A. G., Penniston, J. T., Kachar, B. and Gillespie, P. G. (2001) Plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoform 2a is the PMCA of hair bundles. *J Neurosci*, **21**, 5066-5078.
- Durr, G., Strayle, J., Plemper, R., Elbs, S., Klee, S. K., Catty, P., Wolf, D. H. and 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.
- East, J. M. and 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. and Casteels, R. (1989) Evidence for two isoforms of the endoplasmic-reticulum Ca²⁺ pump in pig smooth muscle. *Biochem J*, **260**, 757-761.
- Eisner, D. A. and Lederer, W. J. (1985) Na-Ca exchange: stoichiometry and electrogenicity. *Am J Physiol*, **248**, C189-202.
- Enyedi, A., Flura, M., Sarkadi, B., Gardos, G. and Carafoli, E. (1987) The maximal velocity and the calcium affinity of the red cell calcium pump may be regulated independently. *J Biol Chem*, **262**, 6425-6430.
- Fairclough, R. J., Dode, L., Vanoevelen, J., Andersen, J. P., Missiaen, L., Raeymaekers, L., Wuytack, F. and Hovnanian, A. (2003) Effect of Hailey-Hailey Disease mutations on the function of a new variant of human secretory pathway Ca²⁺/Mn²⁺-ATPase (hSPCA1). *J Biol Chem*, **278**, 24721-24730.
- Falchetto, R., Vorherr, T., Brunner, J. and Carafoli, E. (1991) The plasma membrane Ca²⁺ pump contains a site that interacts with its calmodulin-binding domain. *J Biol Chem*, **266**, 2930-2936.
- Falchetto, R., Vorherr, T. and Carafoli, E. (1992) The calmodulin-binding site of the plasma membrane Ca²⁺ pump interacts with the transduction domain of the enzyme. *Protein Sci*, **1**, 1613-1621.
- Fallon, L., Moreau, F., Croft, B. G., Labib, N., Gu, W. J. and 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.
- Fernandes, D., Zaidi, A., Bean, J., Hui, D. and Michaelis, M. L. (2007) RNA--induced silencing of the plasma membrane Ca²⁺-ATPase 2 in neuronal cells: effects on Ca²⁺ homeostasis and cell viability. *J Neurochem*, **102**, 454-465.
- Ficarella, R., Di Leva, F., Bortolozzi, M. et al. (2007) A functional study of plasma-membrane calcium-pump isoform 2 mutants causing digenic deafness. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 1516-1521.
- Filoteo, A. G., Elwess, N. L., Enyedi, A., Caride, A., Aung, H. H. and 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.

- Furuta, H., Luo, L., Hepler, K. and Ryan, A. F. (1998) Evidence for differential regulation of calcium by outer versus inner hair cells: plasma membrane Ca-ATPase gene expression. *Hear Res*, **123**, 10-26.
- 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. and Greenberg, M. E. (1995) Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science*, **268**, 239-247.
- Ginty, D. D. (1997) Calcium regulation of gene expression: isn't that spatial? *Neuron*, **18**, 183-186.
- Giovannelli, L., Scali, C., Faussonne-Pellegrini, M. S., Pepeu, G. and Casamenti, F. (1998) Long-term changes in the aggregation state and toxic effects of beta-amyloid injected into the rat brain. *Neuroscience*, **87**, 349-357.
- Glenner, G. G. and Wong, C. W. (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun*, **120**, 885-890.
- Glenner, G. G., Wong, C. W., Quaranta, V. and Eanes, E. D. (1984) The amyloid deposits in Alzheimer's disease: their nature and pathogenesis. *Appl Pathol*, **2**, 357-369.
- Goldberg, M. and Steinberg, S. F. (1996) Tissue-specific developmental regulation of protein kinase C isoforms. *Biochem Pharmacol*, **51**, 1089-1093.
- Gopinath, R. M. and Vincenzi, F. F. (1977) Phosphodiesterase protein activator mimics red blood cell cytoplasmic activator of (Ca²⁺-Mg²⁺)ATPase. *Biochem Biophys Res Commun*, **77**, 1203-1209.
- Greeb, J. and 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.
- Guerini, D., Pan, B. and Carafoli, E. (2003) Expression, purification, and characterization of isoform 1 of the plasma membrane Ca²⁺ pump: focus on calpain sensitivity. *J Biol Chem*, **278**, 38141-38148.
- Haass, C. and Selkoe, D. J. (1993) Cellular processing of beta-amyloid precursor protein and the genesis of amyloid beta-peptide. *Cell*, **75**, 1039-1042.
- Hao, L., Rigaud, J. L. and 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. and Makinose, M. (1961) [The calcium pump of the "relaxing granules" of muscle and its dependence on ATP-splitting]. *Biochem Z*, **333**, 518-528.
- Hering, H., Lin, C. C. and Sheng, M. (2003) Lipid rafts in the maintenance of synapses, dendritic spines, and surface AMPA receptor stability. *J Neurosci*, **23**, 3262-3271.
- Hernandez, F., Perez, M., Lucas, J. J., Mata, A. M., Bhat, R. and Avila, J. (2004) Glycogen synthase kinase-3 plays a crucial role in tau exon 10 splicing and intranuclear distribution of SC35. Implications for Alzheimer's disease. *J Biol Chem*, **279**, 3801-3806.
- Hof, P. R., Bouras, C., Perl, D. P., Sparks, D. L., Mehta, N. and Morrison, J. H. (1995a) Age-related distribution of neuropathologic changes in the cerebral cortex of patients with Down's syndrome. Quantitative regional analysis and comparison with Alzheimer's disease. *Arch Neurol*, **52**, 379-391.
- Hof, P. R., Nimchinsky, E. A. and Morrison, J. H. (1995b) Neurochemical phenotype of corticocortical connections in the macaque monkey: quantitative analysis of a subset of neurofilament protein-immunoreactive projection neurons in frontal, parietal, temporal, and cingulate cortices. *J Comp Neurol*, **362**, 109-133.
- Howard, A., Legon, S. and Walters, J. R. (1993) Human and rat intestinal plasma membrane calcium pump isoforms. *Am J Physiol*, **265**, G917-925.

- 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. and 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., Lewis, D., Toyoshima, C., Hirata, A. and de Meis, L. (2008) Conformational fluctuations of the Ca²⁺-ATPase in the native membrane environment. Effects of pH, temperature, catalytic substrates, and thapsigargin. *J Biol Chem*, **283**, 1189-1196.
- Inesi, G. and Sagara, Y. (1994) Specific inhibitors of intracellular Ca²⁺ transport ATPases. *J Membr Biol*, **141**, 1-6.
- Iversen, L. L., Mortishire-Smith, R. J., Pollack, S. J. and Shearman, M. S. (1995) The toxicity in vitro of beta-amyloid protein. *Biochem J*, **311 (Pt 1)**, 1-16.
- James, P., Inui, M., Tada, M., Chiesi, M. and Carafoli, E. (1989) Nature and site of phospholamban regulation of the Ca²⁺ pump of sarcoplasmic reticulum. *Nature*, **342**, 90-92.
- James, P., Maeda, M., Fischer, R., Verma, A. K., Krebs, J., Penniston, J. T. and Carafoli, E. (1988) Identification and primary structure of a calmodulin binding domain of the Ca²⁺ pump of human erythrocytes. *J Biol Chem*, **263**, 2905-2910.
- Jarrett, H. W. and Penniston, J. T. (1977) Partial purification of the Ca²⁺-Mg²⁺ ATPase activator from human erythrocytes: its similarity to the activator of 3':5' - cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Biochem Biophys Res Commun*, **77**, 1210-1216.
- Jay, T. M., Glowinski, J. and Thierry, A. M. (1989) Selectivity of the hippocampal projection to the prelimbic area of the prefrontal cortex in the rat. *Brain Res*, **505**, 337-340.
- Jiang, L., Fernandes, D., Mehta, N., Bean, J. L., Michaelis, M. L. and Zaidi, A. (2007) Partitioning of the plasma membrane Ca²⁺-ATPase into lipid rafts in primary neurons: effects of cholesterol depletion. *J Neurochem*, **102**, 378-388.
- Jones, I., Jacobsen, N., Green, E. K., Elvidge, G. P., Owen, M. J. and 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, S., Zhang, X., Parsons, D. W. et al. (2008) Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science*, **321**, 1801-1806.
- Jorgensen, P. L., Jorgensen, J. R. and Pedersen, P. A. (2001) Role of conserved TGDGVND-loop in Mg²⁺ binding, phosphorylation, and energy transfer in Na,K-ATPase. *J Bioenerg Biomembr*, **33**, 367-377.
- Juhaszova, M., Church, P., Blaustein, M. P. and Stanley, E. F. (2000) Location of calcium transporters at presynaptic terminals. *Eur J Neurosci*, **12**, 839-846.
- Kahle, W., Leonhardt, H., Platzer, W. (1988) Atlas de Anatomía para estudiantes y médicos (Tomo III) Sistema nervioso y órganos de los sentidos; Ed. Omega, Barcelona. pp 221-227
- Kaplan, M. S. and Bell, D. H. (1984) Mitotic neuroblasts in the 9-day-old and 11-month-old rodent hippocampus. *J Neurosci*, **4**, 1429-1441.
- Kawahara, M. and Kuroda, Y. (2000) Molecular mechanism of neurodegeneration induced by Alzheimer's beta-amyloid protein: channel formation and disruption of calcium homeostasis. *Brain Res Bull*, **53**, 389-397.
- Keeton, T. P. and Shull, G. E. (1995) Primary structure of rat plasma membrane Ca(2+)-ATPase isoform 4 and analysis of alternative splicing patterns at splice site A. *Biochem J*, **306 (Pt 3)**, 779-785.

- Kerchner, G. A., Deutsch, G. K., Zeineh, M., Dougherty, R. F., Saranathan, M. and Rutt, B. K. (2012) Hippocampal CA1 Apical Neuropil Atrophy and Memory Performance in Alzheimer's Disease. *Neuroimage*.
- Khachaturian, Z. S. (1994) Calcium hypothesis of Alzheimer's disease and brain aging. *Ann N Y Acad Sci*, **747**, 1-11.
- Kim, E., DeMarco, S. J., Marfatia, S. M., Chishti, A. H., Sheng, M. and 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.
- Kip, S. N., Gray, N. W., Burette, A., Canbay, A., Weinberg, R. J. and Strehler, E. E. (2006) Changes in the expression of plasma membrane calcium extrusion systems during the maturation of hippocampal neurons. *Hippocampus*, **16**, 20-34.
- Kip, S. N. and Strehler, E. E. (2007) Rapid downregulation of NCX and PMCA in hippocampal neurons following H₂O₂ oxidative stress. *Ann N Y Acad Sci*, **1099**, 436-439.
- Kirischuk, S. and Verkhratsky, A. (1996) [Ca²⁺]_i recordings from neural cells in acutely isolated cerebellar slices employing differential loading of the membrane-permeant form of the calcium indicator fura-2. *Pflugers Arch*, **431**, 977-983.
- Kosk-Kosicka, D. and 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., Davis, R. R., Krieg, E. F., Shull, G. E. and Erway, L. C. (2002) Deficiency in plasma membrane calcium ATPase isoform 2 increases susceptibility to noise-induced hearing loss in mice. *Hear Res*, **164**, 231-239.
- Kozel, P. J., Friedman, R. A., Erway, L. C. et al. (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.
- Krizaj, D. and Copenhagen, D. R. (1998) Compartmentalization of calcium extrusion mechanisms in the outer and inner segments of photoreceptors. *Neuron*, **21**, 249-256.
- Kuhn, A., Goldstein, D. R., Hodges, A. et al. (2007) Mutant huntingtin's effects on striatal gene expression in mice recapitulate changes observed in human Huntington's disease brain and do not differ with mutant huntingtin length or wild-type huntingtin dosage. *Hum Mol Genet*, **16**, 1845-1861.
- 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.
- 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, S. J., Liyanage, U., Bickel, P. E., Xia, W., Lansbury, P. T., Jr. and Kosik, K. S. (1998) A detergent-insoluble membrane compartment contains A beta in vivo. *Nat Med*, **4**, 730-734.
- Lee, W. J., Roberts-Thomson, S. J. and Monteith, G. R. (2005) Plasma membrane calcium-ATPase 2 and 4 in human breast cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*, **337**, 779-783.
- Legname, G., Nelken, P., Guan, Z., Kanyo, Z. F., DeArmond, S. J. and 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., Kaplan, P., Murin, R. and Raeymaekers, L. (2002) The role of plasma membrane Ca²⁺ pumps (PMCA) in pathologies of mammalian cells. *Front Biosci*, **7**, d53-84.
- Lehotsky, J., Kaplan, P., Racay, P., Mezesova, V. and Raeymaekers, L. (1999) Distribution of plasma membrane Ca²⁺ pump (PMCA) isoforms in the gerbil brain: effect of ischemia-reperfusion injury. *Neurochem Int*, **35**, 221-227.
- Lehotsky, J., Racay, P., Pavlikova, M., Tatarkova, Z., Urban, P., Chomova, M., Kovalska, M. and Kaplan, P. (2009) Cross-talk of intracellular calcium stores in the response to neuronal ischemia and ischemic tolerance. *Gen Physiol Biophys*, **28 Spec No Focus**, F104-114.
- Levi, V., Rossi, J. P., Castello, P. R. and Gonzalez Flecha, F. L. (2000) Oligomerization of the plasma membrane calcium pump involves two regions with different thermal stability. *FEBS Lett*, **483**, 99-103.
- Levi, V., Rossi, J. P., Castello, P. R. and Gonzalez Flecha, F. L. (2002) Structural significance of the plasma membrane calcium pump oligomerization. *Biophys J*, **82**, 437-446.
- Linde, C. I., Di Leva, F., Domi, T., Tosatto, S. C., Brini, M. and Carafoli, E. (2008) Inhibitory interaction of the 14-3-3 proteins with ubiquitous (PMCA1) and tissue-specific (PMCA3) isoforms of the plasma membrane Ca²⁺ pump. *Cell Calcium*, **43**, 550-561.
- Liu, L. H., Paul, R. J., Sutliff, R. L. et al. (1997) Defective endothelium-dependent relaxation of vascular smooth muscle and endothelial cell Ca²⁺ signaling in mice lacking sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase isoform 3. *J Biol Chem*, **272**, 30538-30545.
- Logan-Smith, M. J., Lockyer, P. J., East, J. M. and 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.
- London, E. and Brown, D. A. (2000) Insolubility of lipids in triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts). *Biochim Biophys Acta*, **1508**, 182-195.
- Lopez, J. J., Jardin, I., Bobe, R., Pariente, J. A., Enouf, J., Salido, G. M. and Rosado, J. A. (2008) STIM1 regulates acidic Ca²⁺ store refilling by interaction with SERCA3 in human platelets. *Biochem Pharmacol*, **75**, 2157-2164.
- Lorente De Nó, R. (1934). Studies on the structure of the cerebral cortex. Continuation of the study of the ammonic system. *J. Psychol. Neurol.* **46**, 113-177.
- Lytton, J. and 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. and MacLennan, D. H. (1992) Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps. *J Biol Chem*, **267**, 14483-14489.
- MacLennan, D. H., Brandl, C. J., Korczak, B. and 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. and 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. and Fantini, J. (2002) Identification of a common sphingolipid-binding domain in Alzheimer, prion, and HIV-1 proteins. *J Biol Chem*, **277**, 11292-11296.

- Malenka, R. C., Kauer, J. A., Perkel, D. J. and Nicoll, R. A. (1989) The impact of postsynaptic calcium on synaptic transmission--its role in long-term potentiation. *Trends Neurosci*, **12**, 444-450.
- Mann, D. M. (1996) Pyramidal nerve cell loss in Alzheimer's disease. *Neurodegeneration*, **5**, 423-427.
- Mark, R. J., Blanc, E. M. and Mattson, M. P. (1996) Amyloid beta-peptide and oxidative cellular injury in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*, **12**, 211-224.
- Mark, R. J., Hensley, K., Butterfield, D. A. and Mattson, M. P. (1995) Amyloid beta-peptide impairs ion-motive ATPase activities: evidence for a role in loss of neuronal Ca²⁺ homeostasis and cell death. *J Neurosci*, **15**, 6239-6249.
- Martin, V., Bredoux, R., Corvazier, E., Van Gorp, R., Kovacs, T., Gelebart, P. and Enouf, J. (2002) Three novel sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) 3 isoforms. Expression, regulation, and function of the membranes of the SERCA3 family. *J Biol Chem*, **277**, 24442-24452.
- Martone, M. E., Zhang, Y., Simpliciano, V. M., Carragher, B. O. and Ellisman, M. H. (1993) Three-dimensional visualization of the smooth endoplasmic reticulum in Purkinje cell dendrites. *J Neurosci*, **13**, 4636-4646.
- Masters, C. L., Multhaup, G., Simms, G., Pottgiesser, J., Martins, R. N. and Beyreuther, K. (1985) Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels. *EMBO J*, **4**, 2757-2763.
- Mata, A. M., Berrocal, M. and Sepúlveda, M. R. (2011) Impairment of the activity of the plasma membrane Ca²⁺(+)-ATPase in Alzheimer's disease. *Biochem Soc Trans*, **39**, 819-822.
- Mata, A. M. and Sepúlveda, M. R. (2005) Calcium pumps in the central nervous system. *Brain Res Brain Res Rev*, **49**, 398-405.
- Mata, A. M. and Sepúlveda, M. R. (2010) Plasma membrane Ca-ATPases in the nervous system during development and ageing. *World J Biol Chem*, **1**, 229-234.
- Mattson, M. P. (2003) Excitotoxic and excitoprotective mechanisms: abundant targets for the prevention and treatment of neurodegenerative disorders. *Neuromolecular Med*, **3**, 65-94.
- Mattson, M. P. (2007) Calcium and neurodegeneration. *Aging Cell*, **6**, 337-350.
- Mattson, M. P. and Chan, S. L. (2003) Calcium orchestrates apoptosis. *Nat Cell Biol*, **5**, 1041-1043.
- Mattson, M. P., Cheng, B., Davis, D., Bryant, K., Lieberburg, I. and Rydel, R. E. (1992) beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J Neurosci*, **12**, 376-389.
- Mattson, M. P. and Goodman, Y. (1995) Different amyloidogenic peptides share a similar mechanism of neurotoxicity involving reactive oxygen species and calcium. *Brain Res*, **676**, 219-224.
- Mattson, M. P., LaFerla, F. M., Chan, S. L., Leissring, M. A., Shepel, P. N. and Geiger, J. D. (2000) Calcium signaling in the ER: its role in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci*, **23**, 222-229.
- Michelangeli, F. and East, J. M. (2011) A diversity of SERCA Ca²⁺ pump inhibitors. *Biochem Soc Trans*, **39**, 789-797.
- Miller, R. J. (1991) The control of neuronal Ca²⁺ homeostasis. *Prog Neurobiol*, **37**, 255-285.
- Missiaen, L., De Smedt, H., Parys, J. B. and Casteels, R. (1994) Co-activation of inositol trisphosphate-induced Ca²⁺ release by cytosolic Ca²⁺ is loading-dependent. *J Biol Chem*, **269**, 7238-7242.
- Missiaen, L., Vanoevelen, J., Van Acker, K., Raeymaekers, L., Parys, J. B., Callewaert, G., Wuytack, F. and De Smedt, H. (2002) Ca²⁺ signals in Pmr1-GFP-expressing

- COS-1 cells with functional endoplasmic reticulum. *Biochem Biophys Res Commun*, **294**, 249-253.
- Molander-Melin, M., Blennow, K., Bogdanovic, N., Dellheden, B., Mansson, J. E. and 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.
- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, **65**, 55-63.
- Murchison, D. and Griffith, W. H. (2007) Calcium buffering systems and calcium signaling in aged rat basal forebrain neurons. *Aging Cell*, **6**, 297-305.
- Murin, R., Verleysdonk, S., Raeymaekers, L., Kaplan, P. and Lehotsky, J. (2006) Distribution of secretory pathway Ca²⁺ ATPase (SPCA1) in neuronal and glial cell cultures. *Cell Mol Neurobiol*, **26**, 1355-1365.
- Niggli, V., Adunyah, E. S., Penniston, J. T. and Carafoli, E. (1981) Purified (Ca²⁺-Mg²⁺)-ATPase of the erythrocyte membrane. Reconstitution and effect of calmodulin and phospholipids. *J Biol Chem*, **256**, 395-401.
- Niggli, V. and Carafoli, E. (1981) Interaction of the purified Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase from human erythrocytes with phospholipids and calmodulin. *Acta Biol Med Ger*, **40**, 437-442.
- Nixon, R. A. (2003) The calpains in aging and aging-related diseases. *Ageing Res Rev*, **2**, 407-418.
- O'Day, D. H. and Myre, M. A. (2004) Calmodulin-binding domains in Alzheimer's disease proteins: extending the calcium hypothesis. *Biochem Biophys Res Commun*, **320**, 1051-1054.
- 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. and 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. and 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.
- Ogunbayo, O. A. and Michelangeli, F. (2007) The widely utilized brominated flame retardant tetrabromobisphenol A (TBBPA) is a potent inhibitor of the SERCA Ca²⁺ pump. *Biochem J*, **408**, 407-415.
- Okunade, G. W., Miller, M. L., Azhar, M., Andringa, A., Sanford, L. P., Doetschman, T., Prasad, V. and Shull, G. E. (2007) Loss of the Atp2c1 secretory pathway Ca(2+)-ATPase (SPCA1) in mice causes Golgi stress, apoptosis, and midgestational death in homozygous embryos and squamous cell tumors in adult heterozygotes. *J Biol Chem*, **282**, 26517-26527.
- Okunade, G. W., Miller, M. L., Pyne, G. J. et al. (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.

- Olesen, C., Sorensen, T. L., Nielsen, R. C., Moller, J. V. and Nissen, P. (2004) Dephosphorylation of the calcium pump coupled to counterion occlusion. *Science*, **306**, 2251-2255.
- Padanyi, R., Paszty, K., Penheiter, A. R., Filoteo, A. G., Penniston, J. T. and 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. and 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. and 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.
- Pan, Y., Zvaritch, E., Tupling, A. R., Rice, W. J., de Leon, S., Rudnicki, M., McKerlie, C., Banwell, B. L. and MacLennan, D. H. (2003) Targeted disruption of the ATP2A1 gene encoding the sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ ATPase isoform 1 (SERCA1) impairs diaphragm function and is lethal in neonatal mice. *J Biol Chem*, **278**, 13367-13375.
- Pande, J., Szewczyk, M. M., Kuszczak, I., Grover, S., Escher, E. and Grover, A. K. (2008) Functional effects of caloxin 1c2, a novel engineered selective inhibitor of plasma membrane Ca(2+)-pump isoform 4, on coronary artery. *J Cell Mol Med*, **12**, 1049-1060.
- Pang, Y., Zhu, H., Wu, P. and Chen, J. (2005) The characterization of plasma membrane Ca²⁺-ATPase in rich sphingomyelin-cholesterol domains. *FEBS Lett*, **579**, 2397-2403.
- Parekh, A. B. and Putney, J. W., Jr. (2005) Store-operated calcium channels. *Physiol Rev*, **85**, 757-810.
- Parkin, E. T., Hussain, I., Karran, E. H., Turner, A. J. and Hooper, N. M. (1999) Characterization of detergent-insoluble complexes containing the familial Alzheimer's disease-associated presenilins. *J Neurochem*, **72**, 1534-1543.
- Paszty, K., Verma, A. K., Padanyi, R., Filoteo, A. G., Penniston, J. T. and Enyedi, A. (2002) Plasma membrane Ca²⁺ATPase isoform 4b is cleaved and activated by caspase-3 during the early phase of apoptosis. *J Biol Chem*, **277**, 6822-6829.
- Pedersen, P. L. (2007) Transport ATPases into the year 2008: a brief overview related to types, structures, functions and roles in health and disease. *J Bioenerg Biomembr*, **39**, 349-355.
- Penniston, J. T. and Enyedi, A. (1998) Modulation of the plasma membrane Ca²⁺ pump. *J Membr Biol*, **165**, 101-109.
- Pereira, C., Ferreira, C., Carvalho, C. and Oliveira, C. (1996) Contribution of plasma membrane and endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPases to the synaptosomal [Ca²⁺]_i increase during oxidative stress. *Brain Res*, **713**, 269-277.
- Pike, L. J. (2003) Lipid rafts: bringing order to chaos. *J Lipid Res*, **44**, 655-667.
- Porat, A. and Elazar, Z. (2000) Regulation of intra-Golgi membrane transport by calcium. *J Biol Chem*, **275**, 29233-29237.
- Pozueta, J., Lefort, R. and Shelanski, M. L. (2012) Synaptic changes in Alzheimer's disease and its models. *Neuroscience*.
- Prasad, V., Okunade, G., Liu, L., Paul, R. J. and Shull, G. E. (2007) Distinct phenotypes among plasma membrane Ca²⁺-ATPase knockout mice. *Ann N Y Acad Sci*, **1099**, 276-286.
- Prasad, V., Okunade, G. W., Miller, M. L. and Shull, G. E. (2004) Phenotypes of SERCA and PMCA knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun*, **322**, 1192-1203.

- Putney, J. W., Jr. (2005) Capacitative calcium entry: sensing the calcium stores. *J Cell Biol*, **169**, 381-382.
- Putney, J. W., Jr. (2007) New molecular players in capacitative Ca²⁺ entry. *J Cell Sci*, **120**, 1959-1965.
- Radeva, G. and 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.
- Raffaello, A., De Stefani, D. and Rizzuto, R. (2012) The mitochondrial Ca(2+) uniporter. *Cell Calcium*.
- Rainteau, D. P., Weinman, S. J., Kabaktchis, C. A., Smith, V. L., Kaetzel, M. A., Dedman, J. R. and Weinman, J. S. (1988) The expression of the 35- and 67-kDa calcimedins is dependent on thyroid hormone. *J Biol Chem*, **263**, 12844-12848.
- Reinhardt, T. A., Filoteo, A. G., Penniston, J. T. and Horst, R. L. (2000) Ca(2+)-ATPase protein expression in mammary tissue. *Am J Physiol Cell Physiol*, **279**, C1595-1602.
- Renteria, R. C., Strehler, E. E., Copenhagen, D. R. and Krizaj, D. (2005) Ontogeny of plasma membrane Ca²⁺ ATPase isoforms in the neural retina of the postnatal rat. *Vis Neurosci*, **22**, 263-274.
- Resende, R., Ferreiro, E., Pereira, C. and Resende de Oliveira, C. (2008) Neurotoxic effect of oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptide 1-42: involvement of endoplasmic reticulum calcium release in oligomer-induced cell death. *Neuroscience*, **155**, 725-737.
- Resende, R., Pereira, C., Agostinho, P., Vieira, A. P., Malva, J. O. and Oliveira, C. R. (2007) Susceptibility of hippocampal neurons to Abeta peptide toxicity is associated with perturbation of Ca²⁺ homeostasis. *Brain Res*, **1143**, 11-21.
- Ribak, C. E., Seress, L. and Amaral, D. G. (1985) The development, ultrastructure and synaptic connections of the mossy cells of the dentate gyrus. *J Neurocytol*, **14**, 835-857.
- Ringler, S. L., Aye, J., Byrne, E., Anderson, M. and Turner, C. P. (2008) Effects of disrupting calcium homeostasis on neuronal maturation: early inhibition and later recovery. *Cell Mol Neurobiol*, **28**, 389-409.
- Roberts-Thomson, S. J., Curry, M. C. and Monteith, G. R. (2010) Plasma membrane calcium pumps and their emerging roles in cancer. *World J Biol Chem*, **1**, 248-253.
- Rudolph, H. K., Antebi, A., Fink, G. R., Buckley, C. M., Dorman, T. E., LeVitre, J., Davidow, L. S., Mao, J. I. and 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.
- Sagara, Y., Fernandez-Belda, F., de Meis, L. and Inesi, G. (1992) Characterization of the inhibition of intracellular Ca²⁺ transport ATPases by thapsigargin. *J Biol Chem*, **267**, 12606-12613.
- Sagara, Y. and 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. et al. (1999) Mutations in ATP2A2, encoding a Ca²⁺ pump, cause Darier disease. *Nat Genet*, **21**, 271-277.
- Salamino, F., Sparatore, B., Melloni, E., Michetti, M., Viotti, P. L., Pontremoli, S. and Carafoli, E. (1994) The plasma membrane calcium pump is the preferred calpain substrate within the erythrocyte. *Cell Calcium*, **15**, 28-35.
- Salvador, J. M., Berengena, M., Sepúlveda, M. R. and Mata, A. M. (2001) Distribution of the intracellular Ca(2+)-ATPase isoform 2b in pig brain subcellular fractions and cross-reaction with a monoclonal antibody raised against the enzyme isoform. *J Biochem*, **129**, 621-626.

- Salvador, J. M., Inesi, G., Rigaud, J. L. and 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. and Mata, A. M. (1996) Purification of the synaptosomal plasma membrane (Ca(2+) + Mg(2+))-ATPase from pig brain. *Biochem J*, **315 (Pt 1)**, 183-187.
- Salvador, J. M. and 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.
- Scott, M. R., Supattapone, S., Nguyen, H. O., DeArmond, S. J. and Prusiner, S. B. (2000) Transgenic models of prion disease. *Arch Virol Suppl*, 113-124.
- Schuh, K., Cartwright, E. J., Jankevics, E. et al. (2004) Plasma membrane Ca²⁺ ATPase 4 is required for sperm motility and male fertility. *J Biol Chem*, **279**, 28220-28226.
- Schultz, J. M., Yang, Y., Caride, A. J. et al. (2005) Modification of human hearing loss by plasma-membrane calcium pump PMCA2. *N Engl J Med*, **352**, 1557-1564.
- Seidler, N. W., Jona, I., Vegh, M. and Martonosi, A. (1989) Cyclopiazonic acid is a specific inhibitor of the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, **264**, 17816-17823.
- Selkoe, D. J. (1989) Aging, amyloid, and Alzheimer's disease. *N Engl J Med*, **320**, 1484-1487.
- Selkoe, D. J. (1998) The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol*, **8**, 447-453.
- Selkoe, D. J., Yamazaki, T., Citron, M., Podlisny, M. B., Koo, E. H., Teplow, D. B. and Haass, C. (1996) The role of APP processing and trafficking pathways in the formation of amyloid beta-protein. *Ann N Y Acad Sci*, **777**, 57-64.
- Sepúlveda, M. R., Berrocal-Carrillo, M., Gasset, M. and Mata, A. M. (2006) The plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoform 4 is localized in lipid rafts of cerebellum synaptic plasma membranes. *J Biol Chem*, **281**, 447-453.
- Sepúlveda, M. R., Berrocal, M., Marcos, D., Wuytack, F. and Mata, A. M. (2007a) Functional and immunocytochemical evidence for the expression and localization of the secretory pathway Ca²⁺-ATPase isoform 1 (SPCA1) in cerebellum relative to other Ca²⁺ pumps. *J Neurochem*, **103**, 1009-1018.
- Sepúlveda, M. R., Dresselaers, T., Vangheluwe, P., Everaerts, W., Himmelreich, U., Mata, A. M. and Wuytack, F. (2012) Evaluation of manganese uptake and toxicity in mouse brain during continuous MnCl₂ administration using osmotic pumps. *Contrast Media Mol Imaging*, **7**, 426-434.
- Sepúlveda, M. R., Hidalgo-Sanchez, M., Marcos, D. and Mata, A. M. (2007b) Developmental distribution of plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoforms in chick cerebellum. *Dev Dyn*, **236**, 1227-1236.
- Sepúlveda, M. R., Hidalgo-Sanchez, M. and Mata, A. M. (2004) Localization of endoplasmic reticulum and plasma membrane Ca²⁺-ATPases in subcellular fractions and sections of pig cerebellum. *Eur J Neurosci*, **19**, 542-551.
- Sepúlveda, M. R., Hidalgo-Sanchez, M. and Mata, A. M. (2005) A developmental profile of the levels of calcium pumps in chick cerebellum. *J Neurochem*, **95**, 673-683.
- Sepúlveda, M. R., Marcos, D., Berrocal, M., Raeymaekers, L., Mata, A. M. and Wuytack, F. (2008) Activity and localization of the secretory pathway Ca²⁺-ATPase isoform 1 (SPCA1) in different areas of the mouse brain during postnatal development. *Mol Cell Neurosci*, **38**, 461-473.
- Sepúlveda, M. R. and Mata, A. M. (2004) The interaction of ethanol with reconstituted synaptosomal plasma membrane Ca²⁺ -ATPase. *Biochim Biophys Acta*, **1665**, 75-80.
- Sepúlveda, M. R., Vanoevelen, J., Raeymaekers, L., Mata, A. M. and Wuytack, F. (2009) Silencing the SPCA1 (secretory pathway Ca²⁺-ATPase isoform 1) impairs Ca²⁺ homeostasis in the Golgi and disturbs neural polarity. *J Neurosci*, **29**, 12174-12182.

- Seri, B., Garcia-Verdugo, J. M., McEwen, B. S. and Alvarez-Buylla, A. (2001) Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci*, **21**, 7153-7160.
- Seth, M., Sumbilla, C., Mullen, S. P., Lewis, D., Klein, M. G., Hussain, A., Soboloff, J., Gill, D. L. and Inesi, G. (2004) Sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA) gene silencing and remodeling of the Ca²⁺ signaling mechanism in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 16683-16688.
- Simons, K. and Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature*, **387**, 569-572.
- Simons, K. and Toomre, D. (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **1**, 31-39.
- Simons, K. and Vaz, W. L. (2004) Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **33**, 269-295.
- Sorin, A., Rosas, G. and 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.
- Sponne, I., Fifre, A., Drouet, B., Klein, C., Koziel, V., Pincon-Raymond, M., Olivier, J. L., Chambaz, J. and Pillot, T. (2003) Apoptotic neuronal cell death induced by the non-fibrillar amyloid-beta peptide proceeds through an early reactive oxygen species-dependent cytoskeleton perturbation. *J Biol Chem*, **278**, 3437-3445.
- Sponne, I., Fifre, A., Koziel, V., Oster, T., Olivier, J. L. and Pillot, T. (2004) Membrane cholesterol interferes with neuronal apoptosis induced by soluble oligomers but not fibrils of amyloid-beta peptide. *FASEB J*, **18**, 836-838.
- Squier, T. C. and Bigelow, D. J. (2000) Protein oxidation and age-dependent alterations in calcium homeostasis. *Front Biosci*, **5**, D504-526.
- Stauffer, T. P., Guerini, D. and Carafoli, E. (1995) Tissue distribution of the four gene products of the plasma membrane Ca²⁺ pump. A study using specific antibodies. *J Biol Chem*, **270**, 12184-12190.
- Stauffer, T. P., Guerini, D., Celio, M. R. and 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. and Strehler, E. E. (1993) Quantitative analysis of alternative splicing options of human plasma membrane calcium pump genes. *J Biol Chem*, **268**, 25993-26003.
- Steiner, D. F. (1998) The proprotein convertases. *Curr Opin Chem Biol*, **2**, 31-39.
- Stephan, A., Laroche, S. and Davis, S. (2001) Generation of aggregated beta-amyloid in the rat hippocampus impairs synaptic transmission and plasticity and causes memory deficits. *J Neurosci*, **21**, 5703-5714.
- Sternberger, L. A., Hardy, P. H., Jr., Cuculis, J. J. and Meyer, H. G. (1970) The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem*, **18**, 315-333.
- Strehler, E. E. (2011) Emanuel Strehler's work on calcium pumps and calcium signaling. *World J Biol Chem*, **2**, 67-72.
- Strehler, E. E., Caride, A. J., Filoteo, A. G., Xiong, Y., Penniston, J. T. and Enyedi, A. (2007a) Plasma membrane Ca²⁺ ATPases as dynamic regulators of cellular calcium handling. *Ann N Y Acad Sci*, **1099**, 226-236.
- Strehler, E. E., Filoteo, A. G., Penniston, J. T. and Caride, A. J. (2007b) Plasma-membrane Ca(2+) pumps: structural diversity as the basis for functional versatility. *Biochem Soc Trans*, **35**, 919-922.
- Strehler, E. E. and Zacharias, D. A. (2001) Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps. *Physiol Rev*, **81**, 21-50.

- Swanson, L. W. (1977) The anatomical organization of septo-hippocampal projections. *Ciba Found Symp*, 25-48.
- Swadner, K. J. and Donnet, C. (2001) Structural similarities of Na,K-ATPase and SERCA, the Ca(2+)-ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Biochem J*, **356**, 685-704.
- Szemraj, J., Kawecka, I., Bartkowiak, J. and Zylinska, L. (2004) The effect of antisense oligonucleotide treatment of plasma membrane Ca(+2)-ATPase in PC12 cells. *Cell Mol Biol Lett*, **9**, 451-464.
- Szewczyk, M. M., Pande, J. and Grover, A. K. (2008) Caloxins: a novel class of selective plasma membrane Ca²⁺ pump inhibitors obtained using biotechnology. *Pflugers Arch*, **456**, 255-266.
- Tang, D., Dean, W. L., Borchman, D. and Paterson, C. A. (2006) The influence of membrane lipid structure on plasma membrane Ca²⁺ -ATPase activity. *Cell Calcium*, **39**, 209-216.
- Taraboulos, A., Scott, M., Semenov, A., Avrahami, D., Laszlo, L. and 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.
- Thibault, O., Gant, J. C. and Landfield, P. W. (2007) Expansion of the calcium hypothesis of brain aging and Alzheimer's disease: minding the store. *Aging Cell*, **6**, 307-317.
- Toescu, E. C. and Verkhratsky, A. (2007) Role of calcium in normal aging and neurodegeneration. *Aging Cell*, **6**, 265.
- Toyoshima, C. (2008) Structural aspects of ion pumping by Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *Arch Biochem Biophys*, **476**, 3-11.
- Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H. and Ogawa, H. (2000) Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature*, **405**, 647-655.
- Ueno, T., Kameyama, K., Hirata, M., Ogawa, M., Hatsuse, H., Takagaki, Y., Ohmura, M., Osawa, N. and 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.
- Usachev, Y. M. and Thayer, S. A. (1997) All-or-none Ca²⁺ release from intracellular stores triggered by Ca²⁺ influx through voltage-gated Ca²⁺ channels in rat sensory neurons. *J Neurosci*, **17**, 7404-7414.
- Van Baelen, K., Dode, L., Vanoevelen, J., Callewaert, G., De Smedt, H., Missiaen, L., Parys, J. B., Raeymaekers, L. and 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. and 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. and 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.
- van Groen, T. and Wyss, J. M. (1990) Extrinsic projections from area CA1 of the rat hippocampus: olfactory, cortical, subcortical, and bilateral hippocampal formation projections. *J Comp Neurol*, **302**, 515-528.
- Vangheluwe, P., Sepúlveda, M. R., Missiaen, L., Raeymaekers, L., Wuytack, F. and Vanoevelen, J. (2009) Intracellular Ca²⁺- and Mn²⁺-transport ATPases. *Chem Rev*, **109**, 4733-4759.
- VanHouten, J., Sullivan, C., Bazinet, C., Ryoo, T., Camp, R., Rimm, D. L., Chung, G. and Wysolmerski, J. (2010) PMCA2 regulates apoptosis during mammary gland

- involution and predicts outcome in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 11405-11410.
- Vanoevelen, J., Dode, L., Van Baelen, K., Fairclough, R. J., Missiaen, L., Raeymaekers, L. and Wuytack, F. (2005) The secretory pathway $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -ATPase 2 is a Golgi-localized pump with high affinity for Ca^{2+} ions. *J Biol Chem*, **280**, 22800-22808.
- Varadi, A., Lebel, L., Hashim, Y., Mehta, Z., Ashcroft, S. J. and Turner, R. (1999) Sequence variants of the sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -transport ATPase 3 gene (SERCA3) in Caucasian type II diabetic patients (UK Prospective Diabetes Study 48). *Diabetologia*, **42**, 1240-1243.
- Ver Heyen, M., Heymans, S., Antoons, G. et al. (2001) Replacement of the muscle-specific sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase isoform SERCA2a by the nonmuscle SERCA2b homologue causes mild concentric hypertrophy and impairs contraction-relaxation of the heart. *Circ Res*, **89**, 838-846.
- Verboomen, H., Wuytack, F., Van den Bosch, L., Mertens, L. and Casteels, R. (1994) The functional importance of the extreme C-terminal tail in the gene 2 organellar Ca^{2+} -transport ATPase (SERCA2a/b). *Biochem J*, **303 (Pt 3)**, 979-984.
- Verdile, G., Fuller, S., Atwood, C. S., Laws, S. M., Gandy, S. E. and Martins, R. N. (2004) The role of beta amyloid in Alzheimer's disease: still a cause of everything or the only one who got caught? *Pharmacol Res*, **50**, 397-409.
- Verkhatsky, A. and Shmigol, A. (1996) Calcium-induced calcium release in neurones. *Cell Calcium*, **19**, 1-14.
- Verkhatsky, A. J. and Petersen, O. H. (1998) Neuronal calcium stores. *Cell Calcium*, **24**, 333-343.
- Vertes, R. P. (1992) PHA-L analysis of projections from the supramammillary nucleus in the rat. *J Comp Neurol*, **326**, 595-622.
- Vey, M., Pilkuhn, S., Wille, H., Nixon, R., DeArmond, S. J., Smart, E. J., Anderson, R. G., Taraboulos, A. and 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.
- Wang, H. and Zhang, M. (2012) The role of Ca^{2+} -stimulated adenylyl cyclases in bidirectional synaptic plasticity and brain function. *Rev Neurosci*, **23**, 67-78.
- Wei, Y., Chen, J., Rosas, G., Tompkins, D. A., Holt, P. A. and 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. and Weinman, S. (1991) Developmental regulation of calmodulin gene expression in rat brain and skeletal muscle. *Cell Regul*, **2**, 819-826.
- Wilhelmsen, K. C. (1999) The tangled biology of tau. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 7120-7121.
- Witter, M. P. and Amaral, D. G. (1991) Entorhinal cortex of the monkey: V. Projections to the dentate gyrus, hippocampus, and subicular complex. *J Comp Neurol*, **307**, 437-459.
- Wong, R. O. and 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. and 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.
- Wuytack, F., Eggermont, J. A., Raeymaekers, L., Plessers, L. and Casteels, R. (1989) Antibodies against the non-muscle isoform of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -transport ATPase. *Biochem J*, **264**, 765-769.

- Wuytack, F. and Raeymaekers, L. (1992) The Ca²⁺-transport ATPases from the plasma membrane. *J Bioenerg Biomembr*, **24**, 285-300.
- Wuytack, F., Raeymaekers, L. and Missiaen, L. (2002) Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps. *Cell Calcium*, **32**, 279-305.
- Xiang, M., Mohamalawari, D. and Rao, R. (2005) A novel isoform of the secretory pathway Ca²⁺,Mn²⁺-ATPase, hSPCA2, has unusual properties and is expressed in the brain. *J Biol Chem*, **280**, 11608-11614.
- Yankner, B. A. (1996) Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neuron*, **16**, 921-932.
- Yu, X., Carroll, S., Rigaud, J. L. and Inesi, G. (1993) H⁺ countertransport and electrogenicity of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ pump in reconstituted proteoliposomes. *Biophys J*, **64**, 1232-1242.
- Zacharias, D. A. and Strehler, E. E. (1996) Change in plasma membrane Ca²⁺-ATPase splice-variant expression in response to a rise in intracellular Ca²⁺. *Curr Biol*, **6**, 1642-1652.
- Zaidi, A., Barron, L., Sharov, V. S., Schoneich, C., Michaelis, E. K. and Michaelis, M. L. (2003) Oxidative inactivation of purified plasma membrane Ca²⁺-ATPase by hydrogen peroxide and protection by calmodulin. *Biochemistry*, **42**, 12001-12010.
- Zaidi, A., Fernandes, D., Bean, J. L. and Michaelis, M. L. (2009) Effects of paraquat-induced oxidative stress on the neuronal plasma membrane Ca²⁺-ATPase. *Free Radic Biol Med*, **47**, 1507-1514.
- Zaidi, A. and Michaelis, M. L. (1999) Effects of reactive oxygen species on brain synaptic plasma membrane Ca²⁺-ATPase. *Free Radic Biol Med*, **27**, 810-821.
- Zajchowski, L. D. and Robbins, S. M. (2002) Lipid rafts and little caves. Compartmentalized signalling in membrane microdomains. *Eur J Biochem*, **269**, 737-752.
- Zanni, G., Cali, T., Kalscheuer, V. M. et al. (2012) Mutation of plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoform 3 in a family with X-linked congenital cerebellar ataxia impairs Ca²⁺ homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109**, 14514-14519.
- Zlatkis, A., Zak, B. and 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. and 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.
- Zvaritch, E., James, P., Vorherr, T., Falchetto, R., Modyanov, N. and Carafoli, E. (1990) Mapping of functional domains in the plasma membrane Ca²⁺ pump using trypsin proteolysis. *Biochemistry*, **29**, 8070-8076.
- Zylinska, L., Guerini, D., Gromadzinska, E. and Lachowicz, L. (1998) Protein kinases A and C phosphorylate purified Ca²⁺-ATPase from rat cortex, cerebellum and hippocampus. *Biochim Biophys Acta*, **1448**, 99-108.
- Zylinska, L., Kozaczuk, A., Szemraj, J., Kargas, C. and Kowalska, I. (2007) Functional importance of PMCA isoforms in growth and development of PC12 cells. *Ann N Y Acad Sci*, **1099**, 254-269.