Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Fisiologia

**INTERAÇÃO FUNCIONAL ENTRE O SISTEMA
COLINÉRGICO E ADRENÉRGICO NA MANUTENÇÃO
DA MASSA MUSCULAR E DA PLACA MOTORA**

Danilo Lustrino Borges

Ribeirão Preto

2015

DANILO LUSTRINO BORGES

INTERAÇÃO FUNCIONAL ENTRE O SISTEMA
COLINÉRGICO E ADRENÉRGICO NA MANUTENÇÃO DA
MASSA MUSCULAR E DA PLACA MOTORA

Tese apresentada ao Departamento de Fisiologia
da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto –
USP para obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Área de concentração: Fisiologia

Orientador: Luiz Carlos Carvalho Navegantes

Ribeirão Preto,

2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Borges, Danilo Lustrino

Interação funcional entre o sistema colinérgico e adrenérgico na manutenção da massa muscular e da placa motora/Danilo Lustrino Borges; Orientador: Luiz Carlos Carvalho Navegantes – Ribeirão Preto, 2015.

100f. 30cm

Tese (Doutorado – Programa de Pós Graduação em Fisiologia. Área de concentração: Fisiologia) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

1. Atrofia muscular, 2. AMPc/PKA, 3. β 2-agonista, 4. Acetilcolina, 5. Junção neuromuscular

**BORGES, Danilo Lustrino. Interação funcional entre o sistema colinérgico e
adrenérgico na manutenção da massa muscular e da placa motora.**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

“Do ponto de vista da aparência, o ramo é a origem do fruto, mas em realidade, o ramo veio à existência em função do fruto.”

“Se não tivesse havido um desejo e uma esperança pelo fruto, como o jardineiro teria plantado a raiz da árvore?”

“É por isso que, em realidade, a árvore nasceu do fruto, mesmo que na aparência o fruto tenha sido concebido pela árvore”

RUMI

DEDICATÓRIA

Ao meu irmão Wardsson, pelo constante incentivo e apoio durante toda minha formação acadêmica e por me fornecer ensinamentos valiosos com a sua dedicação, objetividade e sua inteligência imensurável. Sou seu fã número 1.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Luiz Carlos Carvalho Navegantes por me aceitar como seu orientado, por se preocupar com minha formação científica e pessoal e até mesmo quando distante fisicamente se fez presente. Além disso, agradeço por todas as oportunidades concedidas (foram muitas e sempre delineadas por boas surpresas) e por sempre estar um passo à frente para me ajudar a tomar as decisões sobre o meu futuro. Agradeço também pelas constantes palavras de incentivo, pelo carinho dedicado a mim e pelos elogios que foram um motivo adicional para que eu me dedicasse e me davam uma sensação de estar “protegido” pela sua imagem. Término esta etapa muito orgulhoso e muito satisfeito de ter recebido sua orientação e amizade.

À Dra Ísis do Carmo Kettelhut por ter estabelecido nossa linha de pesquisa que permitiu a formação de diversos alunos, mas especialmente por ter me recebido em seu laboratório, por acompanhar o andamento do nosso projeto e sempre tecer comentários valiosos, por me orientar durante os dois últimos anos de pós-graduação e sempre estar disposta às discussões. Contudo, agradeço por se preocupar com minha formação da biologia ao português, por me ensinar a importância de se manter um ambiente de trabalho harmonioso e que as coisas mais importantes na nossa vida são saúde e família. Jamais esquecerei nossa conversa antes de minha viagem para o estágio no exterior e a importância que ela teve durante todo o período que estive fora do país!!!

Ao corpo técnico do Laboratório de Controle do Metabolismo, Elza Filipin, Lilian do Carmo, Maria Antonieta Garófalo, Neusa Zanom e Vitor Galban por serem sempre tão solícitos e por nos proporcionarem diversos momentos agradáveis. Em especial, à Neusa por ter me recebido de braços abertos desde a época do curso de verão em Fisiologia-2010, pela

sua disponibilidade e por ser a mão que eu sempre pude contar. Além disso, pela sua amizade, pelo seu ombro e pelos diversos conselhos e conversas.

Aos amigos do Laboratório de Controle do Metabolismo Dawit, Flávia, Franciele, Graziela, Juliano, Leandro, Natália, Priscila, Rafael, Samira, Silvia e Wilian pelo convívio agradável, pelos momentos de descontração, pelas ajudas constantes e pelo exemplo de dedicação a ciência. Guardarei um pouco de cada um de vocês comigo.

Ao prof. Dr Rüdiger Rudolf e todo seu grupo, Dr Siegfried Strack, Muzamil Khan e Franziska Wild por me acolherem em seu laboratório no Karlsruhe Institute of Technology, Alemanha e por me auxiliarem na condução dos experimentos *in vivo*.

Aos amigos Ailin Lepletier, André Mecawi, Elaine Liporage, Fabricia Fonseca, Iracema Araujo, Victor Tunholi e Vinicius Tunholi. Jamais esquecerei da reunião que tivemos quando eu ainda estava no segundo período de faculdade e traçamos como metas nos tornarmos todos monitores, bolsistas de iniciação científica, mestrandos, doutorandos e por fim uma carreira acadêmica e felizmente todos nós obtivemos êxito e alguns de vocês já chegaram ao objetivo final. Obrigado por terem me propiciado os melhores momentos de toda minha vida!!!

Aos amigos Rodrigo Mencalha, Anderson Silveira, Érica de Freitas e Wesley David. A amizade e o companheirismo de vocês são indiscutíveis e imensuráveis. Agradeço também aos amigos Caio Kashihabara e Marcos Ferreira por me proporcionarem momentos tão felizes em Ribeirão Preto e por serem meu escape do ambiente acadêmico.

Aos amigos Aline, Jéssica, Nayara, Procópio, Teddy e Robertinho pela amizade e por compartilharem as felicidades e as angústias durante as disciplinas da pós-graduação. Gostaria também de agradecer à Marlusa Karen, Melina Pires, Davi Moraes, Pedro Cedraz, João Paulo Sabino e Silvia Ruiz que se tornaram amigos valiosos que a pós-graduação me deu.

Aos professores do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) pelos ensinamentos e pelo compromisso na minha formação como fisiologista;

e aos funcionários da secretaria Cláudia, Eliza e Fernandinho pela dedicação, pela disponibilidade e pela simpatia com a qual eu sempre fui tratado.

Aos meus primeiros orientadores, Dr. Jairo Pinheiro da Silva e Dr. Luis Carlos Reis por terem despertado em mim o interesse pela ciência e por serem um exemplo indiscutível de dedicação à Universidade e a comunidade acadêmica e sem dúvida alguma, uns dos melhores professores que tive. Agradeço pelo crédito que vocês sempre me deram e pelo incentivo, por me mostrarem que muito mais que *paper* é a formação de recursos humanos e por sempre terem um olhar compreensível e cuidadoso com cada aluno. Vocês não foram somente os orientadores que eu procurei, mas também foram os amigos que eu sempre precisei !!!

Agradeço também todos os professores do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro que contribuíram sobremaneira para minha formação e pela amizade a mim depositada. Vocês certamente fazem parte desta conquista.

À minha mãe, Maria Antônia pelo seu amor incondicional. A Sra sempre será minha força motriz. Te amo.

À minha família: meus irmãos Titta, Wallysson, Wardsson e Sheila e ao meu cunhado Jair, vocês são todo meu suporte. Felizmente o destino me levou a vocês e pude compartilhar da convivência de pessoas tão honestas, responsáveis e inteligentes; aos melhores sobrinhos do mundo Lucas, Lúcia e Eduarda vocês são a fonte de minhas energias e são a melhor parte de nossa família; e todos os meus tios e tias em especial, minhas tias Edna e Leonice que desde quando criança me pegaram no colo e me incentivaram a seguir um caminho sempre melhor.

E por fim, mas não menos importante à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa (Processo 2012/05697-7) e pelo auxílio financeiro para realização dos experimentos desta tese (Processos 2012/24524-6 e 2012/51456-1).

RESUMO

BORGES, D.L. Interação funcional entre o sistema colinérgico e adrenérgico na manutenção da massa muscular e da placa motora. 100f. Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Estudos anteriores de nosso laboratório demonstraram que a estimulação aguda dos receptores β_2 -adrenérgicos (β_2 -AR) atenua a perda de massa muscular induzida pela desnervação motora (DEN) por meio de uma via dependente de AMPc/PKA. No entanto os mecanismos moleculares envolvidos na ativação crônica destes receptores ainda são pouco conhecidos. Por outro lado, a ativação desta via de sinalização também está envolvida no controle da estabilidade dos receptores nicotínicos (AChR) na junção neuromuscular (JNM), sugerindo que a densidade dos AChR possa estar sob controle neuro-humoral. Desta forma, aventou-se a possibilidade de que além dos efeitos protetores na massa muscular, a ativação dos receptores β_2 -AR pudesse mediar a estabilização dos AChR na placa motora. Para testar essa hipótese, camundongos foram submetidos à DEN através da secção do nervo ciático, um protocolo clássico de indução de atrofia muscular e desestabilização dos AChR, e tratados com salina ou clenbuterol (CB), um β_2 -agonista seletivo, por até 14 dias. Após 3 dias de DEN, observou-se redução da massa muscular e aumento do conteúdo proteico e expressão do RNAm de genes relacionados à ativação do sistema Ubiquitina-Proteassoma (atrofina-1 e MuRF1) e do sistema autofágico/lisossomal (catepsina L e LC3). A DEN também promoveu aumento no *turnover* dos AChR, no número de vesículas endocíticas e na expressão do RNAm para a subunidade $\alpha 1$ dos AChR. Após 7 dias, a DEN reduziu a expressão dos genes relacionados à atrofia e aumentou a atividade da via do AMPc/PKA independentemente do tratamento com CB. Na tentativa de elucidar os sinais extracelulares que produziam esta resposta adaptativa, foi demonstrado que neurônios catecolaminérgicos trafegam ao longo do

nervo ciático e sua ablação pela DEN reduziu o conteúdo de noradrenalina muscular. Baseados nestes resultados, foi postulado a existência de uma hipersensibilidade às catecolaminas em músculos desnervados cronicamente. O tratamento com CB por 3 dias aboliu o aumento da expressão dos atrogenes induzido pela DEN e este efeito foi associado ao maior conteúdo de AMPc e de substratos fosforilados pela PKA. Além disso, o CB diminuiu a hiperexpressão do RNAm para catepsina L e LC3 induzida pela DEN de 7 dias. Embora o CB não tenha alterado a meia-vida dos AChR em músculos inervados e desnervados, houve um total bloqueio do aumento do número de vesículas endocíticas contendo o AChR em músculos desnervados e tratados com CB. Corroborando estes dados, o CB aumentou a incorporação de AChR “novos” nas JNM e este efeito foi também associado à maior expressão do RNAm para a subunidade $\alpha 1$ -AChR em músculos desnervados. Esta ação do CB no *turnover* dos AChR parece ser direta uma vez que neurônios catecolaminérgicos presentes no nervo ciático ativam receptores β_2 -AR e a produção de AMPc especificamente na JNM.

Em estudos *in vitro*, foi demonstrado que a estimulação colinérgica produzida pelo carbacol (10^{-4} M) diminuiu a velocidade de síntese de proteínas, aumentou a proteólise total e a atividade do sistema proteolítico Ca^{2+} -dependente em músculos *soleus* de ratos por meio da ativação dos receptores nicotínicos. Este efeito catabólico do carbacol foi completamente bloqueado pela adição de CB (10^{-4} M) ao meio de incubação.

Os dados obtidos no presente estudo permitem sugerir que a estimulação crônica dos β_2 -AR no músculo esquelético induz um efeito anti-catabólico pela supressão dos sistemas proteolíticos proteassomal e lisossomal, provavelmente através da via de sinalização do AMPc/PKA. A inibição destes sistemas pode estar relacionada ao aumento do *turnover* dos AChR, uma vez que a velocidade de incorporação destes receptores na JNM foi aumentada pelo CB. Além disso, os achados que mostram a associação entre neurônios noradrenérgicos e colinérgicos no nervo ciático, que conjuntamente inervam as JNM, e a co-localização de

receptores β_2 -AR e AChR na sinapse permitem sugerir a existência de uma *interação funcional entre o sistema colinérgico e adrenérgico na manutenção da massa muscular e da placa motora*.

Palavras-chave: Atrofia muscular, AMPc/PKA, β_2 -agonista, Acetilcolina, Junção neuromuscular.

ABSTRACT

BORGES, D.L. Functional interaction between Cholinergic and Adrenergic systems in the maintenance of muscle mass and motor endplate, 100f. Thesis (Doctorate) - Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Previous studies from our laboratory have shown that the acute stimulation of β_2 -adrenergic receptor (β_2 -AR) attenuates the muscle loss induced by motor denervation (DEN) through a cAMP/PKA dependent pathway. However, the molecular mechanisms involved in the chronic activation of these receptors are poorly understood. Furthermore, the activation of this signaling pathway is also involved in controlling the stability of nicotinic receptors (AChR) at the neuromuscular junction (NMJ), suggesting that the density of AChR may be under neurohumoral control. Thus, we postulated that besides the protective effects on muscle mass the activation of β_2 -AR receptors could mediate the stabilization of AChR in the motor plate. To test this hypothesis, mice were submitted to DEN through of the sciatic nerve section, a classical protocol of induction muscle atrophy and destabilization of AChR, and were treated with saline or clenbuterol (CB), a selective β_2 -agonist for 14 days. DEN decreased the muscle mass and increased the protein content and mRNA expression of genes related to the activation of the ubiquitin-proteasome system (atrogin-1 and MuRF1) and autophagic/lysosomal system (cathepsin L and LC3). DEN also promoted an increase in the turnover of AChR, number of endocytic vesicles and the expression of mRNA for the $\alpha 1$ subunit of AChR. Interestingly, chronic DEN induced down-regulation of atrophy related-genes, and increased the activity of cAMP/PKA pathway independently of CB treatment. In an attempt to elucidate the extracellular signals that produced this adaptive response, it was demonstrated that catecholaminergic neurons travels along the sciatic nerve and its ablation

by DEN reduces muscle norepinephrine content. Based on these results, it was postulated the existence of a muscle adrenergic hypersensitivity to circulating catecholamines induced by chronic DEN. CB treatment for 3 days completely abolished the higher expression of atrogenes and this effect was associated with increased Camp content and PKA phosphorylated substrates. Furthermore, CB decreased the DEN-induced hyperexpression of cathepsin L and LC3 mRNA at 7 days. Although CB has not altered the half-life of AChR in innervated and denervated muscles, it produced a total blockage of the increased number of endocytic vesicles containing the AChR in denervated muscles. Consistently, CB increased the incorporation of “new” AChR and this effect was associated with an increased expression of the $\alpha 1$ -subunit AChR mRNA in denervated muscles. This action of CB on AChR turnover appears to be direct, since catecholaminergic neurons are present in the sciatic nerve stimulating β_2 -AR and cAMP production specifically in the NMJ.

Furthermore, in vitro studies demonstrated that cholinergic stimulation produced by carbachol (10^{-4} M) decreased the rate of protein synthesis and increased the proteolytic activity of Ca^{2+} -dependent system in rat soleus muscle through activation of nicotinic receptors. This catabolic effect of carbachol was completely blocked by the addition of CB (10^{-4} M) to the incubation medium.

These data suggest that chronic stimulation of β_2 -AR in skeletal muscle induces an anti-catabolic effect by suppressing proteasomal and lysosomal proteolytic systems, probably through the cAMP/PKA signaling. The inhibition of these systems seems to be related to the increased AChR incorporation into NMJ induced by CB treatment. Moreover, the association between noradrenergic and cholinergic neurons in the sciatic nerve, both of which innervate the motor endplates, and the co-localization of AChR and β_2 -AR at the synapse suggest the existence of a **functional interaction between cholinergic and adrenergic systems in the maintenance of muscle mass and motor endplate.**

Keywords: muscular atrophy, cAMP / PKA, β_2 -agonist, acetylcholine, neuromuscular junction.

LISTA DE SIGLAS

6-BNZ-cAMP	N ⁶ - Benzoil-3'-5'- Adenosina Monofosfato
6-OH-DOPA	6-hidroxi-dopamina
ACh	Acetilcolina
AChR	Receptores colinérgicos nicotínicos
ADMX	Adrenodemedulação
AF555	Alexafluor 555
AF647	Alexafluor 647
AKAPs	Proteínas ancoradoras de PKA
AKT	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene or protein kinase B</i>
AMPc	3',5'- adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de variância
ARs	Receptores adrenérgicos
BCAA	Aminoácidos de cadeia ramificada
BGT	α -bungarotoxina
Bif-1	Endofilina B1
CB	Clembuterol
CETEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
CFP	<i>Cyan fluorescent protein</i>
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CREB	Proteína de ligação do elemento de resposta do AMPc
DB-AMPc	Dibutiril-AMPc
DEN	Desnervação motora
E1	Enzima ativadora da ubiquitina
E2a	Enzima carreadora da ubiquitina

E3	Enzima ligadora da ubiquitina
E64	Trans-epoxisuccinil-L-leucilamido-(4-guanidino) butano
EDL	Extensor longo dos dedos
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPAC	Proteína trocadora de guanina diretamente ativada pelo AMPc
EPM	Erro padrão da média
ERK1/2	<i>Extracellular signal-regulated kinases1/2</i>
FRET	Fluorescência pela transferência de energia de ressonância
GABARAP	<i>γ-aminobutyric acid receptor-associated protein</i>
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
JNM	Junção neuromuscular
LC3	<i>Microtubule-associated protein 1 light chain 3</i>
MAFbx	<i>Muscle Atrophy F-box</i>
<i>mdx</i>	Distrofia muscular de Duchenne
MG132	N-carboxibenzoxi-Leu-Leu-Leucina
MuRF1	<i>Muscle RING (Really Interesting New Gene) Finger 1</i>
PCARP	Prefeitura do Campus Administrativo da USP de Ribeirão Preto
PDE	Fosfodiesterase
PKA	Proteína quinase dependente de AMPc
PMSF	Fluoreto de Fenilmetilsulfonil
RIα	Subunidade regulatória α
RT-PCR	<i>Real-time reverse-transcription - Polymerase Chain Reaction</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio
TA	Músculo tibial anterior
TCA	Ácido tricloroacético

TyrH	Tirosina hidroxilase
Ub	Ubiquitina
WGA	<i>Wheat germ agglutin</i>
YFP	<i>Yellow fluorescent protein</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo esquemático para realização de fluorescência pela transferência de energia de ressonância (FRET) em músculos transfetados com o plasmídeo contendo o gene para o β_2 -AR-s-pep.	22
Figura 2. Modelo esquemático para realização de fluorescência pela transferência de energia de ressonância (FRET) em músculos transfetados com o plasmídeo contendo o gene para o CFP-rapsina_EPAC-YFP.	23
Figura 3. Esquema representativo da avaliação do efeito do tratamento diário com clenbuterol na taxa de degradação do receptor colinérgico nicotínico (AChR) em músculos esqueléticos de camundongos anestesiados.....	25
Figura 4. Esquema representativo da avaliação do efeito do tratamento diário com clenbuterol na estabilidade do receptor colinérgico nicotínico (AChR) em músculos esqueléticos de camundongos anestesiados.....	26
Figura 5. Efeito do tratamento com clenbuterol (CB; 3 mg/kg/dia, s.c.) ou salina (Sal) na massa de músculos tibialis desnervados (DEN).	37
Figura 6. Efeito do tratamento com clenbuterol (CB; 3mg/kg/dia, s.c.) ou salina (Sal) na expressão do RNAm para atrogina-1 (A) e MuRF1 (D) e no conteúdo das proteínas atrogina-1 (B) e MuRF1 (E) em músculos tibiais desnervados (DEN). As bandas (blots) representativas de atrogina-1 e MuRF1 são mostradas em C e F, respectivamente. Os níveis de expressão gênica foram normalizados utilizando a subunidade de RNA 18S como controle endógeno..	38
Figura 7. Efeito do tratamento com clenbuterol (CB; 3mg/kg/dia, s.c.) ou salina (Sal) na expressão do RNAm para catepsina L (A) e LC3 (B) e no conteúdo proteico de LC3 I e II (C) em músculos tibiais desnervados (DEN).	40
Figura 8. Conteúdo de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC, A) e de substratos fosforilados pela PKA (B) em músculos tibialis desnervados (DEN) obtidos de	

camundongos tratados com salina (Sal) ou clenbuterol (CB; 3mg.kg ⁻¹ .dia ⁻¹ , s.c.) por 14 dias.	
Em C, as imagens (blots) representativas de cada grupo.	42
Figura 9. Esquema representativo do perfil temporal da expressão dos atrogenes (MuRF1 e atrogina-1) e da atividade da via de sinalização do AMPc/PKA em músculos desnervados...	44
Figura 10. Identificação de fibras noradrenérgicas no nervo ciático de camundongos.....	45
Figura 11. Conteúdo de noradrenalina em músculos gastrocnêmicos de camundongos após três dias de desnervação motora (DEN) B: Imagens representativas do conteúdo proteico de atrogina-1 e MuRF1 em músculos tibial anterior de camundongos submetidos previamente à cirurgia de remoção da porção medular da adrenal (ADMX) e à DEN por sete dias. C: Concentração plasmática de corticosterona após sete dias de ADMX.....	46
Figura 12. Identificação de fibras noradrenérgicas na junção neuromuscular (JNM).	49
Figura 13. A: Identificação de receptores β_2 -adrenérgicos (AR) em sinapses musculares de camundongos. B: Após transfecção do plasmídeo contendo o gene β_2 -AR-sPep foi observada co-localização do β_2 -AR e do receptor colinérgico nicotínico (AChR). C: A estimulação elétrica do nervo ciático promoveu a ativação do receptor β_2 -AR mensurada pela técnica de transferência de energia de ressonância por fluorescência (FRET).	50
Figura 14. A: Imagens representativas do aumento da produção de AMPc nas sinapses musculares induzido pela estimulação elétrica do nervo ciático após transfecção do músculo tibial anterior com o plamídeo Rapsina-EPAC. B: Quantificação da produção do AMPc	51
Figura 15. Efeito do tratamento com clenbuterol (CB; 3mg.kg ⁻¹ .dia ⁻¹ , s.c.) ou salina (Sal) na taxa de degradação do receptor colinérgico nicotínico (AChR), avaliado pela taxa de decaimento de ¹²⁵ I-bungarotoxina (BGT), em músculo tibial anterior innervado e desnervado (DEN) de camundongos.	53
Figura 16. Imagens representativas do efeito do tratamento com clenbuterol (CB; 3mg.kg ⁻¹ .dia ⁻¹ , s.c.) ou salina (Sal) na estabilidade do receptor colinérgico nicotínico (AChR) em	

músculo tibial de camundongos submetidos à desnervação motora unilateral (DEN). Os AChR foram marcados com BGT-AlexaFluor 647 (“para visualização dos receptores antigos”) e depois de 10 dias com BGT-AlexaFluor 555 (para visualização dos “receptores novos”).	54
Figura 17. Efeito do tratamento com clenbuterol (CB; 3mg.kg ⁻¹ .dia ⁻¹ , s.c.) ou salina (Sal) na estabilização do receptor colinérgico nicotínico (AChR) em músculo tibial de camundongos submetidos à desnervação motora unilateral (DEN).	55
Figura 18. Efeito do tratamento com clenbuterol (CB; 3mg.kg ⁻¹ .dia ⁻¹ , s.c.) ou salina (Sal) por 14 dias no conteúdo de vesículas endocíticas marcadas com bungarotoxina (BGT-AF647/AF555) (A) e na expressão do RNAm para a subunidade $\alpha 1$ do receptor colinérgico nicotínico ($\alpha 1$ -AChR) (B) em músculo tibial anterior innervado e desnervado (DEN) de camundongo. Os níveis de expressão gênica foram normalizados utilizando a subunidade de RNA 18S como controle endógeno.	57
Figura 19. A: Imagens representativas do efeito do tratamento com clenbuterol (CB; 3mg.kg ⁻¹ .dia ⁻¹ , s.c.) ou salina (Sal) na estabilidade do receptor colinérgico nicotínico (AChR) em músculo tibial anterior de camundongos com a mutação AChR- ϵ L269F. (A) Os AChR foram marcados com BGT-AlexaFluor 647 (“para visualização dos receptores antigos”) e depois de 10 dias com BGT-AlexaFluor 555 (para visualização dos “receptores novos”); barra de escala, 50 μ m. B: Análise quantitativa da relação de pixels dominantes de ambos os sinais dos receptores “novos” e “antigos” por fragmentos de junção neuromuscular (JNM).	58
Figura 20. Efeito in vitro do carbacol (10 ⁻⁷ a 10 ⁻³ M) na atividade proteolítica total de músculos soleus (A) e EDL (B) normais de ratos.	60
Figura 21. Efeito in vitro do carbacol (10 ⁻⁴ M) na presença ou não de D-tubocurarina (10 ⁻⁴ M) na proteólise total em músculos soleus de ratos normais.	61

Figura 22. Efeito in vitro do carbacol (10^{-3}M) na velocidade de síntese proteica em músculos soleus e EDL de ratos..	61
Figura 23. Efeito in vitro do carbacol (10^{-4}M) nas atividades proteolíticas lisossomal (A), dependente de Ubiquitina-Proteassoma (UPS) (B) e dependente de Ca^{2+} (C) em músculos soleus de ratos normais.....	63
Figura 24. Efeito in vitro do carbacol (10^{-4}M) e/ou do clenbuterol (CB, 10^{-4}M) na proteólise total em músculos soleus de ratos normais.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Protocolo utilizado para quantificação da proteólise total e lisossomal.	29
Tabela 2. Protocolo utilizado para quantificação da atividade do sistema proteolítico dependente de Ca^{2+}	30
Tabela 3. Protocolo utilizado para a quantificação da proteólise dependente de Ub-proteassoma	32
Tabela 4. Aminoácidos presentes no meio de incubação para quantificação da velocidade de síntese de proteínas totais.	34

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Características Estruturais e Funcionais da Junção Neuromuscular	3
1.1.1. Manutenção da placa motora pela via do AMPc/PKA	4
1.2. Sistemas proteolíticos	6
1.3. Papel anabólico da inervação adrenérgica na manutenção da massa muscular	9
1.3.1. Mecanismos anti-proteolíticos dependentes da via do AMPc/PKA	10
2. OBJETIVOS	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. Animais, cirurgias e tratamentos.	16
3.2. Análise de proteínas através de Western blot.	18
3.3. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR).	19
3.4. Determinação do conteúdo de AMPc.	19
3.5. Imunohistoquímica	20
3.6. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Radioimunoensaio (RIA)	20
3.7. Transfecção in vivo por eletroporação e fluorescência pela transferência de energia de ressonância (FRET)	21
3.8. Determinação da meia-vida do AChR através da ligação com ¹²⁵ I-α-bungarotoxina (¹²⁵ I – BGT).	24
3.9. Visualização in vivo das sinapses da JNM.	25
3.10. Procedimento para análise das vesículas positivas BGT	26
3.11. Procedimento experimental para o estudo da proteólise em músculos esqueléticos de ratos	27
3.12. Atividade dos Sistemas Proteolíticos	28
3.12.1. Sistema Lisossomal	28
3.12.2. Sistema Dependente de Ca ²⁺	30
3.12.3. Sistema Ubiquitina-Proteassoma	31
3.13. Procedimento experimental para a avaliação da síntese total de proteínas em músculos esqueléticos de ratos	33
3.14. Análise estatística	34

4. RESULTADOS	36
<i>4.1. Efeito do tratamento crônico com CB na massa muscular e na expressão dos genes relacionados à atrofia e autofagia induzidos pela DEN .....</i>	<i>36</i>
<i>4.2. Efeito do tratamento crônico com CB na atividade da via do AMPc/PKA em músculos desnervados .....</i>	<i>41</i>
<i>4.3. Participação do SNS na resposta adaptativa induzida pela desnervação .....</i>	<i>43</i>
<i>4.4. Evidências anatômicas da interação entre o sistema adrenérgico e colinérgico na placa motora .....</i>	<i>47</i>
<i>4.5. Efeito do tratamento com CB no turnover dos AChR .....</i>	<i>52</i>
<i>4.6. Efeito da estimulação colinérgica no metabolismo de proteínas em músculos isolados de ratos .....</i>	<i>59</i>
5. DISCUSSÃO	66
<i>5.1. Efeitos anti-atróficos da estimulação crônica dos receptores β_2-AR em músculos desnervados .....</i>	<i>67</i>
<i>5.2. Mecanismos subsinápticos envolvidos na ativação simpática das JNM .....</i>	<i>72</i>
<i>5.3. Efeito do tratamento com CB no turnover dos AChR na JNM de músculos desnervados .....</i>	<i>74</i>
<i>5.4. Efeito da estimulação colinérgica no metabolismo de proteínas em músculos isolados de ratos .....</i>	<i>77</i>
6. CONCLUSÃO	81
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
8. ANEXO	Erro! Indicador não definido.

1. INTRODUÇÃO

Os músculos esqueléticos são inervados por neurônios motores cujos corpos celulares encontram-se no corno ventral da medula espinal. Cada neurônio envia um axônio através de um plexo de nervos periféricos para um único músculo esquelético. Este axônio ramifica-se para inervar dezenas a centenas de fibras musculares. À medida que cada ramo axonal chega a sua fibra alvo, ele perde sua bainha de mielina formando diversos ramos terminais sobre a superfície da célula muscular em uma região altamente especializada denominada junção neuromuscular (JNM) ou placa motora (HALL; SANES, 1993).

A função clássica da JNM é mediar a contração muscular induzida pela acetilcolina (ACh) liberada pelos neurônios motores e para isso é absolutamente necessária a manutenção da integridade das proteínas miofibrilares assim como a interação do tecido muscular com o sistema nervoso (SCHMALBRUCH; AL-AMOOD; LEWIS, 1991). A perda desta inervação, como ocorre na secção experimental do nervo ciático ou pós-traumatismos, é responsável pela inatividade muscular e é um modelo clássico de indução de atrofia que se caracteriza por uma grande perda de proteínas musculares associada à desestabilização da JNM (ANDREOSE; FUMAGALLI; LØMO, 1995).

Poucas evidências anatômicas indicam que terminais nervosos simpáticos também são distribuídos ao longo das fibras musculares estabelecendo contato direto com fibras intra e extrafusais, independentemente da vasculatura (BARKER; SAITO, 1981). Outros estudos também demonstram que cerca de 23% dos neurônios presentes no nervo ciático são noradrenérgicos (SCHMALBRUCH, 1986) e que a noradrenalina exerce ações de facilitação da transmissão neuromuscular produzindo aumento da liberação de ACh (BUKHARAEVA; NIKOLSKY, 2002). No entanto, *a importância funcional da interação entre as inervações colinérgica e simpática na manutenção da massa muscular e da placa motora ainda é completamente desconhecida.*

1.1. Características Estruturais e Funcionais da Junção Neuromuscular

Os eventos que promovem a contração muscular iniciam a partir da despolarização dos neurônios motores e a propagação do impulso nervoso através dos axônios até os músculos por eles inervados na região da placa motora (HALL; SANES, 1993). Como em toda sinapse, a JNM apresenta os componentes básicos pré- e pós-sinápticos, os quais incluem a porção terminal do neurônio motor e a membrana sarcoplasmática, respectivamente. Quando o impulso nervoso atinge a JNM, o neurônio motor libera vesículas contendo o neurotransmissor ACh, o qual se liga a receptores colinérgicos denominados nicotínicos (AChR) presentes na membrana sarcoplasmática. A ligação da ACh ou outros agonistas colinérgicos aos AChR desencadeia um processo reversível tornando a membrana sarcoplasmática permeável a Na^+ e K^+ (MICHLER; SAKMANN, 1980). Desencadeia-se então o potencial de ação que se propaga ao longo da fibra muscular resultando no aumento do influxo de Ca^{2+} e na contração muscular.

Na JNM, o AChR é um canal iônico que medeia a resposta pós-sináptica excitatória rápida no músculo. Este receptor é um complexo proteico de 250 kDa composto de quatro subunidades homólogas em uma estequiometria de $\alpha_2\beta\gamma\delta$ sendo bem caracterizado estrutural e funcionalmente (TANK et al., 1983). AChR musculares contém dois sítios de ligação para ACh e outros ligantes colinérgicos, que se formam nas interfaces entre uma subunidade α e uma subunidade γ ou δ adjacentes (BLOUNT; MERLIE, 1989).

As características ontogenéticas deste receptor demonstram que durante os estágios iniciais do desenvolvimento, os AChR estão localizados em toda a superfície da membrana de fibras musculares esqueléticas possuindo meia-vida ($t_{1/2}$) de ~1 dia. Com a maturação e subsequente inervação, os AChR desaparecem quase completamente ao longo das fibras musculares, exceto na JNM, onde se tornam metabolicamente mais estáveis ($t_{1/2}$ de ~10 dias)

e atingem densidade característica de cerca de 10.000 receptores por μm^2 (MATTHEWS-BELLINGER; SALPETER, 1983). Hoje, sabe-se que a estabilidade metabólica dos AChR na JNM é regulada pelo neurônio motor. Diferentes estudos mostram que após a desnervação tais receptores são substituídos por AChR com taxa de degradação rápida ($t_{1/2}$ de 1 dia) (SHYNG; SALPETER, 1989). Porém, até o momento, não é conhecido se a alteração na estabilidade dos AChR após a desnervação é resultado da atrofia muscular decorrente das alterações do metabolismo proteico (ativação da proteólise e redução de síntese proteica), atividade mecânica anormal ou ausência de fatores neurotróficos.

1.1.1. Manutenção da placa motora pela via do AMPc/PKA

A via de sinalização do AMPc é muito bem descrita na musculatura esquelética e envolve a ligação do agonista a seu receptor de membrana (β_2 -AR), o qual é um receptor acoplado à proteína-G heterotrimérica ($G\alpha\beta\gamma$). Após estimulação, a subunidade $G\alpha$ estimulatória (Gas), acoplada à enzima adenilato ciclase, leva à formação de AMPc a partir do ATP com subsequente ativação da proteína quinase dependente de AMPc (PKA) (LYNCH; RYALL, 2008). Evidências experimentais indicam a presença de proteínas quinases na JNM que, especificamente, fosforilam as subunidades γ e δ do AChR e aumentam a sua estabilidade. A partir dessas observações, sugeriu-se que tal efeito seria mediado pela PKA, visto que a adição de H89, inibidor desta enzima, abolia tal resposta (HUGANIR; GREENGARD, 1983). Além disso, o dibutilil-AMPc (DB-AMPc), análogo do AMPc ou a forskolina, ativador da enzima adenilato ciclase, foram capazes de estabilizar a acelerada taxa de degradação do receptor (GREEN; ROSS; CLAUDIO, 1991). Neste contexto, a PKA tem sido diretamente envolvida na regulação da dessensibilização do AChR (HUGANIR et al., 1986), bem como na montagem e síntese do mesmo (GREEN; ROSS; CLAUDIO, 1991).

Alternativamente, tal enzima também pode ativar a transcrição de genes responsáveis pela expressão de proteínas que podem se ligar aos AChR ou nas suas imediações e, assim, melhorar a estabilidade deste receptor (XU; SALPETER, 1995). Röder et al. (2010) também demonstraram que a subunidade regulatória RI α da PKA localiza-se na JNM e é essencial para os processos de fosforilação que mantêm a estabilidade dos AChR.

Por outro lado, a estrutura e estabilidade dos AChR são bastante alteradas nos músculos de camundongos *mdx* (modelo animal para distrofia muscular de Duchenne) (GRADY et al., 2000; SHIAO et al., 2004), no qual a sinalização do AMPc é modificada (REYNOLDS et al., 2008). Isto não significa que a sinalização alterada é a causa para os fenômenos na JNM, mas o enriquecimento subsináptico típico da subunidade RI α da PKA somente está presente em metade de todas as fibras musculares dos camundongos *mdx* e é inversamente correlacionado com o *turnover* dos AChR (RÖDER et al., 2012), sugerindo uma correlação entre a organização estrutural dos microdomínios subsinápticos da via do AMPc/PKA nos músculos distróficos e as alterações observadas na morfologia da JNM e na estabilidade dos AChR.

A participação do AMPc na estabilização dos AChR também foi testada em portadores de síndromes miastênicas congênitas. Estas são doenças genéticas raras que afetam componentes pré- ou pós-sinápticos da JNM e levam a alterações na transmissão neuromuscular e fraqueza muscular (PALACE; BEESON, 2008). Muitas formas de miastenias também apresentam densidades reduzidas de AChR (ENGEL et al., 2010). Embora as características moleculares possam variar em função das diferentes mutações, a constatação clínica de que drogas simpatomiméticas, tais como a efedrina (adrenalina sintética) e salbutamol (β_2 -agonista), podem melhorar significativamente os sintomas desses pacientes, sugere um envolvimento das catecolaminas no *turnover* dos AChR (FINLAYSON et al., 2013; LASHLEY et al., 2010; SCHARA et al., 2009). Uma vez que tanto a efedrina como o salbutamol podem ativar os receptores β_2 -adrenérgicos (AR) e, portanto, aumentar a produção

de AMPc, é possível especular que o AMPc seja um segundo mensageiro chave na estabilização e/ou na expressão dos AChR em resposta aos simpatomiméticos. *No entanto, nada se conhece acerca do papel fisiológico de fatores hormonais e neurais que, por meio desta via de sinalização, regulem a estabilidade da JNM em situações in vivo.*

1.2. Sistemas proteolíticos

Além de sua importância funcional na integridade estrutural e funcional da JNM, diferentes estudos indicam que a inervação motora regula o metabolismo de proteínas musculares e com isso contribui diretamente para a manutenção da massa muscular (SACHECK et al., 2007). Embora a perda desta inervação resulte em perda de massa muscular consequente à ativação dos três principais sistemas proteolíticos na musculatura esquelética, i.e. dependente de Ca^{2+} , lisossomal e dependente de ubiquitina (Ub)-proteassoma (GONÇALVES et al., 2012; SACHECK et al., 2007), *muito pouco se conhece sobre o papel específico da ACh na regulação das diferentes vias de degradação de proteínas e nos processos de síntese.*

O sistema proteolítico dependente de Ca^{2+} é formado por cisteína proteases denominadas de calpaínas (CONG et al., 1989). Além de ser regulada pelo Ca^{2+} , a atividade das calpaínas é controlada pela calpastatina, um inibidor endógeno destas proteases (PARR et al., 1992). Uma vez ativadas, as calpaínas são responsáveis por degradar proteínas miofibrilares, assim como outras proteínas do citoesqueleto e de membrana incluindo proteínas associadas aos AChR na JNM. De fato, músculos de camundongos *mdx* apresentam aumento da atividade das calpaínas (XU; SALPETER, 1997) e altas taxas de degradação dos AChR juncionais (SPENCER; CROALL; TIDBALL, 1995). De forma similar, camundongos miastênicos portadores da síndrome do canal-lento que mostram fraqueza muscular,

transmissão neuromuscular disfuncional e alteração da morfologia da JNM apresentam melhoras destes parâmetros quando são submetidos à superexpressão da calpastatina (GROSHONG et al., 2007).

Embora tenha sido o primeiro sistema proteolítico a ser descoberto ainda na década de 1960 (MANTLE; PREEDY, 2002), pouco se estudou a respeito do papel dos lisossomos na atrofia muscular. O lisossomo constitui o sítio de degradação do sistema lisossomal devido a sua alta concentração de proteases conhecidas como catepsinas, que se apresentam em diferentes isoformas: L, B, D e H (BECHET et al., 2005; FINN; DICE, 2006). Essas enzimas são responsáveis por degradar grande parte das proteínas extracelulares e de membrana endocitadas (ex.: receptores), bem como proteínas citoplasmáticas e organelas (SANDRI, 2011). O acesso do substrato às enzimas lisossomais depende de diferentes processos intracelulares, sendo a macroautofagia o mais importante no músculo esquelético. Este processo inicia-se com a formação de uma vesícula limitada por membrana contendo pequenas proteínas como a LC3 (do inglês, *microtubule-associated protein light chain 3*), GABARAP (do inglês, *γ-aminobutyric acid receptor-associated protein*), entre outras, que são importantes para a formação do autofagossomo que, por sua vez, funde-se com o lisossomo e permite que o substrato seja então degradado (SANDRI, 2011). Há evidências de que os lisossomos participem do processo de remodelamento da placa motora. Por exemplo, a inibição do sistema lisossomal pela adição de leupeptina ou cloroquina reduz a taxa de degradação de AChR em culturas de células musculares (HYMAN; FROEHNER, 1983; LIBBY; BURSZTAJN; GOLDBERG, 1980). Em concordância com esses achados, os marcadores do sistema lisossomal/autofágico como Bif-1 (endofilina B1), LC3 e p62 foram colocalizados com AChR em vesículas endocíticas (KHAN et al., 2014).

O principal sistema proteolítico no músculo é o dependente de Ub-proteassoma, o qual é responsável pela degradação de aproximadamente 80% das proteínas miofibrilares

(LECKER et al., 1999). Atualmente, sabe-se que o processo de ubiquitinação das proteínas é finamente regulado e depende da ação de três famílias de enzimas: a E1 ou enzima ativadora da Ub, a E2 ou enzima carreadora e a enzima E3 ou Ub-ligase (JAGOE; GOLDBERG, 2001). Esta última enzima é a limitante desse processo uma vez que ela tem a capacidade de reconhecer, especificamente, os substratos proteicos a serem degradados e de ligá-los à Ub formando complexos poliubiquitinados (GLICKMAN; CIECHANOVER, 2002) que serão reconhecidos e degradados pelo proteassoma. Entre os diferentes tipos de Ub-ligases conhecidas, as mais estudadas são a MuRF1 (do inglês, *Muscle RING Finger 1*) e a atroquina-1 [também conhecida como MAFbx (do inglês, *Muscle Atrophy F-box*)] (Bodine et al. 2001a; Gomes et al. 2001). Tem-se demonstrado que a expressão do RNAm da atroquina-1 e MuRF1 é aumentada em diferentes modelos experimentais de atrofia muscular (Bodine et al. 2001a). Por outro lado, músculos de animais nocautes para estas proteínas apresentam menor velocidade de degradação proteica muscular após a secção do nervo ciático (Bodine et al. 2001a). Além disso, foi observada uma grande quantidade e diversidade de ubiquitinas na JNM de músculos humanos (SERDAROGLU; ASKANAS; ENGEL, 1992). A adição de inibidores do proteassoma aumentou o conteúdo e montagem de AChR em cultura de miotúbulos (CHRISTIANSON; GREEN, 2004). Rudolf et al. (2013) também demonstraram que MuRF1 co-precipita com AChR e a estabilidade deste receptor em resposta à desnervação motora é aumentada em camundongos nocautes para esta Ub-ligase, indicando a participação do sistema Ub-proteassoma na manutenção da placa motora.

Pode-se então concluir que, a ativação patológica dos diferentes sistemas proteolíticos está associada à indução da atrofia muscular e desestruturação das JNM. Desta forma, o conhecimento dos mecanismos fisiológicos que atenuam esta resposta pode fornecer estratégias terapêuticas para o tratamento de diversas patologias relacionadas à perda de proteínas musculares e à instabilidade dos AChR.

1.3. Papel anabólico da inervação adrenérgica na manutenção da massa muscular

Um grande número de evidências demonstra que o sistema nervoso simpático (SNS) é capaz de induzir efeitos anabólicos em músculos esqueléticos de várias espécies animais, por meio da ativação de receptores β_2 -adrenérgicos, os quais estão presentes em alta densidade nestes tecidos (KIM; SAINZ, 1992; MARTIN; MURPHREE; SAFFITZ, 1989). Nesse sentido, nosso laboratório vem se dedicando a desvendar o papel fisiológico do SNS no controle do metabolismo de proteínas em músculos esqueléticos de roedores, em condições basais e atroficas.

Navegantes et al. (1999) relataram que a simpatectomia química induzida por guanetidina, um inibidor pré-sináptico das terminações simpáticas, foi capaz de aumentar a proteólise total em músculos *soleus* de ratos, sendo este efeito correlacionado com redução de 90% do conteúdo de noradrenalina tecidual e aumento da atividade proteolítica da via dependente de Ca^{2+} . Resultados similares foram observados em músculos *soleus* e extensor digital longo (EDL) de ratos submetidos à adrenodemedulação, um modelo de simpatectomia cirúrgica que consiste na remoção da porção medular da adrenal (NAVEGANTES et al., 2001). Neste mesmo estudo, os autores observaram diminuição da atividade proteolítica em músculos de ratos normais incubados na presença de adrenalina, noradrenalina ou clenbuterol, um agonista seletivo de β_2 -AR. A partir dessas evidências foi sugerido que as ações anti-proteolíticas das catecolaminas na musculatura esquelética são mediadas pela ativação de receptores β_2 -AR (NAVEGANTES et al., 2001).

Estudos posteriores demonstraram redução na velocidade de síntese proteica em músculos *soleus* de ratos tratados com guanetidina ou submetidos à desnervação lombar (remoção cirúrgica dos gânglios simpáticos que inervam os músculos das patas inferiores) (NAVEGANTES et al., 2004). Desta forma, postulou-se que os processos de síntese de

proteínas também eram estimulados por esta inervação noradrenérgica direta em músculos oxidativos de roedores. Se esta inervação autonômica termina ou não na JNM é ainda uma questão em aberto e que merece ser investigada. Estudos *in vitro* indicam que a adrenalina ou noradrenalina aumentam o número de AChR na membrana de células musculares (BLOSSER, 1983). *Contudo, a importância funcional da inervação simpática e dos receptores adrenérgicos na manutenção da placa motora e, mais especificamente, na estabilização dos AChR ainda é completamente desconhecida.*

1.3.1. Mecanismos anti-proteolíticos dependentes da via do AMPc/PKA

Grande parte do que se sabe acerca dos mecanismos anti-proteolíticos dependentes da via de sinalização do AMPc/PKA provém de estudos que utilizaram o tratamento com agonistas dos $\beta_{2/3}$ -AR (LYNCH; RYALL, 2008; NAVEGANTES; MIGLIORINI; KETTELHUT, 2002). Embora ainda controverso, acredita-se que o efeito anti-catabólico mediado pela via do AMPc/PKA seja decorrente da inibição da via dependente de Ca^{2+} e da via Ub-proteassoma (LYNCH; RYALL, 2008; NAVEGANTES; BAVIERA; KETTELHUT, 2009). Foi demonstrado que a atividade proteolítica dependente de Ca^{2+} é reduzida em aproximadamente 40% em músculos *soleus* e EDL incubados na presença de clenbuterol (NAVEGANTES et al., 2001). Outros estudos indicam que a PKA ativa a proteína de ligação do elemento de resposta do AMPc (CREB) e esta, ao se ligar na região promotora alvo do DNA, estimula a transcrição da calpastatina, que por sua vez inibe a atividade das calpaínas (NAVEGANTES; BAVIERA; KETTELHUT, 2009).

Além de suas ações sobre as calpaínas e calpastatina, os β_2 -agonistas também estão associados com alterações no processo de ubiquitinação das proteínas. O tratamento crônico de ratos portadores de tumor com clenbuterol diminuiu a expressão do RNAm da Ub

(COSTELLI et al., 1995). Outros estudos têm indicado que os β_2 -agonistas podem reduzir a atividade do proteassoma 26S (BUSQUETS et al., 2004; YIMLAMAI et al., 2005). Trabalhos de nosso laboratório demonstraram que a administração de clenbuterol em camundongos aumentou os níveis de AMPc e suprimiu a expressão induzida pelo jejum do RNAm da atrogina-1 e da MuRF1 na musculatura esquelética (GONÇALVES et al., 2009). Efeitos semelhantes são observados quando músculos de animais normais são perfundidos com rolipram, um inibidor seletivo da fosfodiesterase (PDE) do AMPc do tipo IV, a isoforma predominante na musculatura de roedores (LIRA et al., 2011).

Embora grande parte das ações mediadas pela ativação simpática *in vivo* na musculatura esquelética sejam relacionadas à manutenção da massa muscular, nada se sabe acerca do papel das catecolaminas no controle de proteínas localizadas na membrana sarcoplasmática e, mais especificamente, naquelas envolvidas na manutenção da JNM. Uma explicação aparente para isso é a dificuldade metodológica de avaliar a estabilidade e estrutura da placa motora em condições *in vivo*. Nesse sentido, Strack et al. (2011), padronizaram uma nova abordagem que permite acompanhar a cinética da meia-vida do AChR *in vivo* após a aplicação de α -bungarotoxina marcada com ^{125}I no músculo tibial de camundongos. Este método possibilita a investigação *in vivo* da integridade da JNM, por meio da análise da curva de decaimento do pulso radioativo ao longo do tempo e a posterior quantificação da taxa de degradação dos receptores colinérgicos. Sendo assim, foram identificados três graus de estabilidade dos AChR que variam de acordo com a presença ou ausência de inervação: um conjunto de receptores com meia-vida longa de ~13 dias, um segundo com meia-vida intermediária de ~8 dias, e um terceiro com meia-vida curta de ~1 dia (STRACK et al., 2011). Em relação a outros métodos, este possui a grande vantagem de investigar o músculo do mesmo animal durante um período longo de experimentação. Além disso, a morfologia e estabilidade da placa motora podem também ser estimadas por meio da análise *in vivo* das sinapses

colinérgicas as quais são obtidas por meio da microscopia confocal do músculo tibial de camundongos anestesiados (RÖDER et al., 2010; STRACK et al., 2011). Desta forma, com estas duas abordagens experimentais torna-se possível avaliar o papel do SNS nos processos que regulam o *turnover* proteico na JNM e se estes são similares aos que ocorrem no citosol da fibra muscular.

Tendo em vistas as evidências de que o pacientes portadores de síndromes miastênicas congênitas apresentaram melhora após a terapia com simpatomiméticos (ENGEL et al., 2010) e que o tratamento agudo com clenbuterol (um β_2 -agonista seletivo) previne a perda de massa muscular em ratos desnervados por um mecanismo que atenua a hiperatividade da proteólise proteassomal e lisossomal de forma dependente de AMPc/PKA (GONÇALVES et al., 2012), o presente estudo testará a **hipótese** de que a ativação farmacológica crônica dos β_2 -AR possa estabilizar a placa motora e exercer efeitos anti-atróficos em músculos esqueléticos de camundongos desnervados.

2. OBJETIVOS

O objetivo principal do presente estudo foi investigar o papel da estimulação adrenérgica e colinérgica na manutenção da placa motora e no metabolismo proteico em situações basais e atroficas.

Mais especificamente, os objetivos foram:

- ✓ Avaliar o efeito temporal do tratamento crônico com clenbuterol (CB), um β_2 -agonista seletivo, na massa muscular de animais atrofiados (pela desnervação motora).
- ✓ Correlacionar o efeito do tratamento com CB com a expressão de genes e proteínas relacionados à atrofia e autofagia e a via de sinalização do AMPc/PKA em músculos desnervados.
- ✓ Identificar a presença da inervação noradrenérgica direta, da sua origem anatômica e da via de sinalização ativada na JNM.
- ✓ Avaliar o efeito do tratamento crônico com CB na taxa de degradação de AChR e na integridade da placa motora em músculos de animais desnervados e de animais miastênicos e correlacionar com aqueles obtidos na massa muscular.
- ✓ Identificar o efeito *in vitro* de agonistas colinérgicos nas atividades das diferentes vias proteolíticas e na velocidade de síntese proteica em músculos de animais normais.
- ✓ Avaliar a possível interação entre os agonistas colinérgicos e adrenérgicos no controle da proteólise total em músculos isolados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais, cirurgias e tratamentos.

Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57Bl6J, com massa corporal entre 25-30g, provenientes do Serviço de Biotério da Prefeitura do Campus Administrativo da USP de Ribeirão Preto (PCARP) na maioria dos experimentos e do Biotério do *Karlsruher Institut für Technologie*, Alemanha. Outro grupo de animais transgênicos, que apresentam miastenia congênita, devido a uma mutação na subunidade ϵ do AChR que confere baixa velocidade de abertura deste canal iônico, aqui referido como *slow-channel* AChR- ϵ L269F, foi também usado. Para os experimentos *in vitro* para estudo da proteólise e síntese proteica foram utilizados ratos machos Wistar (~60 a 90g). Todos os animais receberam dieta balanceada para roedores e água *ad libitum* em ambiente com ciclos luz-escuro de 12 horas e temperatura de 25°C. Os experimentos foram realizados pela manhã e os animais sacrificados por deslocamento cervical. Todo protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade de São Paulo (Processo 044/2012) e pelas autoridades alemãs de pesquisa experimental em animais (2010/63/EU).

Uma vez que a desnervação motora (DEN) é capaz de induzir a perda de massa muscular e, concomitantemente, a desestabilização dos AChR (GONÇALVES et al., 2012; STRACK et al., 2011), este modelo de atrofia foi usado para avaliar o efeito da estimulação crônica dos β_2 -AR na manutenção da massa muscular e dos AChR. Assim, sob anestesia (10 mg.kg⁻¹ de ketamina e 85 mg.kg⁻¹ de xilazina), os camundongos foram submetidos à DEN unilateral (secção de ~ 2 mm de nervo ciático) e acompanhados por 3, 7, 14 dias ou 25 dias. No mesmo dia da cirurgia, os animais foram tratados com clenbuterol (CB), um agonista β_2 -AR seletivo (3mg.Kg⁻¹.dia⁻¹, s.c.; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) ou salina. Esta dose foi escolhida pela capacidade de atenuar a perda de massa muscular induzida pela DEN em um tratamento de curta duração (GONÇALVES et al., 2012). Deste modo, no mesmo animal, os

músculos da pata contralateral foram controles da pata desnervada. Os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical e músculos tibiais anteriores (TA) foram utilizados para as análises por *western blot*, RT-PCR e conteúdo de AMPc e músculos gastrocnêmicos foram utilizados para as medidas de catecolaminas.

Para cirurgia de adrenodemulação (ADMX), isto é, remoção da porção medular da adrenal, camundongos anestesiados tiveram o dorso tricotomizado e duas incisões, paralelas à coluna vertebral imediatamente abaixo da última costela, foram feitas. As glândulas adrenais depois de visualizadas foram pinçadas pela gordura peri-renal e cortadas na extremidade superior (córtex) com o auxílio de uma pequena lâmina. Em seguida, a glândula foi suavemente pressionada para retirada somente da medula adrenal. Após a excisão da porção medular, a glândula foi devolvida à cavidade peritoneal, o animal suturado com fio de nylon 4 e o campo cirúrgico limpo com álcool iodado para evitar infecções secundárias. O grupo controle sofreu o mesmo procedimento, exceto a remoção das glândulas adrenais.

Para realização dos experimentos descritos na seção 3.7. (Material e Métodos), um grupo de animais foi simpatectomizado quimicamente através do tratamento com 6-OH-DOPA, uma neurotoxina que inibe irreversivelmente a liberação de noradrenalina pelos terminais neurais (SACHS; JONSSON, 1972), na dose de 100mg.kg^{-1} (0,3% de ácido ascórbico) por via intramuscular em dias alternados durante duas semanas antes da realização das imagens (THOENEN; TRANZER, 1968). Um segundo grupo de animais foi tratado com ICI 118-551, um antagonista seletivo de receptores $\beta_2\text{-AR}$, na dose de 5 mg.kg^{-1} (diluído em tampão salina-fosfato) por dois dias (um dia e 1h antes da realização da microscopia *in vivo*) (MURPHY et al., 1997).

3.2. Análise de proteínas através de Western blot.

Os músculos foram homogeneizados em tampão Tris-HCl (50mM; pH 7,4; 4°C) contendo 150mM de NaCl, 1mM de EDTA, 1% de Triton X-100, 1% de deoxicolato de sódio, 1% de SDS, inibidores de proteases (5µg/ml de aprotinina, 1µg/mL de leupeptina, 1mM de PMSF) e inibidores de fosfatases (10mM de pirofosfato de sódio, 100mM de fluoreto de sódio, 10mM de ortovanadato de sódio). O homogenado foi centrifugado a 14000g e 4°C, o sobrenadante separado para a eletroforese e determinação do conteúdo de proteína. Volumes iguais de sobrenadante e tampão da amostra (20% de glicerol, 125mM de Tris-HCl, 4% SDS, 100mM de ditiotreitol, 0,02% de azul de bromofenol, pH 6,8) foram misturados, fervidos e submetidos à eletroforese em gel de SDS-PAGE de 8 a 16%. A eletrotransferência das proteínas do gel para membrana foi realizada a 20V em aparato de transferência semiseco por 30min. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com anticorpos primários específicos e posteriormente com anticorpo secundário conjugado com HRP. Posteriormente, as membranas foram lavadas para remoção do excesso de anticorpo secundário não ligado e então utilizadas para revelação no aparelho ChemiDoc BioRad® por aproximadamente 40 minutos após a adição de partes iguais dos reagentes do kit de quimioluminescência amplificada (ECL, Amersham®). As bandas reveladas foram quantificadas por densitometria utilizando o software ImageLab BioRad®. Após a quantificação densitométrica das proteínas, o valor obtido na análise foi dividido pela densitometria da β -actina, proteína constitutiva utilizada como referência em todos os experimentos. Os resultados obtidos foram comparados com os respectivos grupos controles, os quais foram considerados como 100%.

Anticorpos policlonais anti-substratos fosforilados pela PKA (diluição: 1:1.000) e anti-LC3 I e II (1:1000) foram adquiridos da Cell Signaling Technology (Danvers, MA); anti-

atrofina-1 (1:500), anti-MuRF1 (1:500) e anti- β -actina (1:1000) foram adquiridos da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA).

3.3. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR).

A extração de RNA total das amostras, bem como a síntese de DNA complementar (cDNA) e a técnica de PCR em tempo real foram realizadas por meio de métodos específicos como descrito por Gonçalves et al. (2009; 2012). O gene de referência utilizado foi o Rn18S. A sequência dos *primers* foi obtida a partir da sequência dos genes depositadas no GenBank para atrofina-1 (*forward* 5'-GCAGAGAGTCGGCAAGTC-3' e *reverse* 5'-CAGGTCGGTGATCGTGAG-3'), MuRF1 (*forward* 5'-TGTGCAAGGAACACGAAG-3' e *reverse* 5'-TGAGAGATGATCGTCTGC-3'), LC3 (*forward* 5'-CGTCCTGGACAAGACCAAGT-3' e *reverse* 5'-ATTGCTGTCCCGAATGTCTC-3'), catepsina L (*forward* 5'-GTG GAC TGT TCT CAC GCT CAAG-3' e *reverse* 5'-TCC GTC CTT CGC TTC ATA GG-3'), α 1-AChR (*forward* 5'-TGCGGAAGGTTTTTATCGAC-3' e *reverse* 5'-CGGAGAGTGAAAGCCCATAG-3'), e Rn18S (*forward* 5'-GAAACGGCTACCATCAAG-3' e *reverse* 5'-CCTCCAATGGATCCTCGTTAA -3').

3.4. Determinação do conteúdo de AMPc.

No dia do experimento, os músculos TA foram imediatamente removidos após o deslocamento cervical, embalados em papel alumínio e congelados a -80°C. Após processamento, o conteúdo de AMPc foi mensurado através do método imunoenzimático comercial da Amersham Biosciences (cAMP Biotrak *Enzyme immunoassay EIA system* – RPN225). Os resultados foram expressos em fmol de AMPc/mg de músculo e plotados como % do controle (músculos inervados de animais tratados com salina).

3.5. Imunohistoquímica

Músculos TA foram lavados duas vezes com PBS e fixados em uma solução de 4% de paraformaldeído a 4°C durante 24h. Posteriormente, foram preparadas seções transversais de 50µm de espessura. Para identificar AChR foi utilizada α -bungarotoxina (BGT) marcada com AlexaFluor 488 (BGT-AF488; Invitrogen, 1:200); para os receptores β_2 -AR, o anticorpo anti- β_2 -AR (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA; 1:200) e para marcar neurônios catecolaminérgicos, anticorpo anti-tirosina hidroxilase (TyrH, Millipore, 1:250), uma enzima específica da síntese de catecolaminas. Secções transversais foram também obtidas do nervo ciático (100µm de espessura). Neste *wheat germ agglutinin* (WGA, Invitrogen, 1:5000) foi usado para marcação de membranas plasmáticas, uma vez que esta toxina se liga a carboidratos presentes nas membranas e anticorpo anti-dopamina- β -hidroxilase (1:200; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) para marcar neurônios catecolaminérgicos. Todas as colorações foram realizadas utilizando protocolos padrões como descrito anteriormente (CHOI et al., 2012; RÖDER et al., 2010).

3.6. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Radioimunoensaio (RIA)

Músculos gastrocnêmicos foram transferidos para tubos de plásticos contendo 50 mg de alumina ativada previamente em estufa a 100°C (30 minutos), 50 mg de metabissulfito de sódio e tampão Tris-HCl 2M (pH 8,9), homogeneizados e então centrifugados por 20 minutos a 3000rpm. Diidroxibenzilamina foi utilizado como padrão interno. Após a aspiração do sobrenadante, a alumina foi lavada repetidamente. A noradrenalina foi extraída da alumina pela adição de solução eluidora contendo ácido perclórico 0,1N por 10 minutos sob agitação mecânica (KRSTULOVIĆ, 1982). Após a extração das catecolaminas, alíquotas de 250µl foram analisadas através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em cromatógrafo modelo LC-74, equipado com uma coluna de fase reversa Spherisorb ODS II (Sigma-

Aldrich), acoplado a um detector eletroquímico modelo L-ESD-6A e a um polígrafo modelo C-R5A, todos de marca Shimadzu (Garófalo et al. 1996). Os resultados foram expressos em ng de noradrenalina/g tecido.

Nos animais que foram submetidos à cirurgia de ADMX, o plasma foi coletado para quantificação dos níveis de corticosterona através da técnica de RIA utilizando Kits comerciais GE Healthcare Life Sciences. Os resultados foram expressos em µg/dl.

3.7. Transfecção in vivo por eletroporação e fluorescência pela transferência de energia de ressonância (FRET)

O sensor de AMPc, rapsina-EPAC associado ao FRET, foi clonado em pcDNA3 (NIKOLAEV et al., 2004) e o sensor β_2 -AR-sPep FRET (plasmídeo # 47438) foi obtido da Addgene (Cambridge, MA, EUA). Após anestesia, o músculo TA foi isolado através de uma pequena incisão na pele e o DNA plasmidial (para o receptor β_2 -AR acoplado aos sensores fluorescentes mCitrina e mCerulean ou para rapsina-EPAC acoplado aos sensores fluorescentes YFP e CFP), foi injetado ao longo do comprimento do músculo com uma seringa de insulina. Foi utilizado o eletroporador CUY21 (Nepagene, Japão) e os pulsos aplicados por meio de dois eletrodos, modelo pinça, dispostos em paralelo às fibras musculares na região do ventre. Após 8-10 dias, os animais foram levados para visualização dos músculos em microscópio confocal e avaliados por meio de um conjunto específico de filtros para emissão dos sensores fluorescentes (mCitrina, mCerulean, YFP e CFP) e submetidos à estimulação elétrica do nervo ciático. Na **figura 1** está representado o modelo esquemático da técnica de FRET para os músculos transfectados com o plasmídeo contendo o gene para o β_2 -AR-sPep (MALIK et al., 2013). Em condições normais, o receptor acoplado a proteína G (GPCR), neste caso o receptor β_2 -AR está inativo e mantém os dois sensores fluorescentes mCitrina (mCit, FRET acceptor) e mCerulean (mCer, FRET doador) afastados.

Quando há ativação deste receptor há uma mudança conformacional que permite a aproximação dos dois sensores resultando no FRET que ocorre devido à diminuição da fluorescência emitida pelo mCer e aumento da emitida pelo mCit.

Figura 1. Modelo esquemático para realização de fluorescência pela transferência de energia de ressonância (FRET) em músculos transfectados com o plasmídeo contendo o gene para o β_2 -AR-s-pep.

Para avaliação da produção de AMPc, foi utilizado o plasmídeo contendo o gene que codifica rapsina-EPAC. Este plasmídeo contém sequências que codificam os sensores YFP (do inglês, *yellow fluorescent protein*; FRET aceptor), CFP (do inglês, *cyan fluorescent protein*, FRET doador), a proteína rapsina que dá especificidade a JNM uma vez que ela está associada aos AChR (CHOI et al., 2012) e por fim, a EPAC (do inglês, *Exchange Protein Directly Activated by cAMP*) que se liga ao AMPc (CHOI et al., 2012; MALIK et al., 2013). Desta forma, com este sensor é possível determinar a produção do AMPc especificamente na JNM. A **Fig. 2** apresenta um modelo esquemático para o funcionamento do sensor rapsina-EPAC. Em condições normais a concentração de AMPc está em níveis basais e os sensores CFP e YFP estão próximos, o que permite o FRET. Após a estimulação ocorre aumento dos níveis do AMPc intracelular. Este AMPc liga-se à EPAC promovendo uma mudança

conformacional que afastará os sensores CFP e YFP resultando em diminuição da fluorescência emitida pelo YFP e aumento da emitida pelo CFP. Essa diferença entre as fluorescências emitidas pelos sensores CFP e YFP permite estimar a formação do AMPc (Choi et al. 2012).

Figura 2. Modelo esquemático para realização de fluorescência pela transferência de energia de ressonância (FRET) em músculos transfectados com o plasmídeo contendo o gene para o CFP-rapsina_EPAC-YFP.

A estimulação do nervo ciático foi realizada utilizando o aparelho A.M.P.I. master-8 CP e microeletrodos obtidos da Harvard Apparatus (Holliston, MA, EUA). A voltagem limite para induzir a contração muscular visível foi de $> 0.2V$ (ALLEN et al., 2011). A estimulação abaixo deste valor não induziu a contração muscular e foi denominada como "estimulação fraca". Cada estímulo elétrico (fraco ou acima do limiar) consistiu de 10 pulsos tetânicos como descrito anteriormente (ALLEN et al., 2011).

3.8. Determinação da meia-vida do AChR através da ligação com ^{125}I - α -bungarotoxina (^{125}I -BGT).

Para avaliação da meia-vida do AChR foi utilizada a técnica descrita por Strack et al. (2011). Brevemente, cinco dias após a desnervação motora unilateral, 10 μl da solução contendo ^{125}I -BGT (0,46 MBq [2,5 mCi] de ^{125}I) foram injetados nos músculos TA dos dois membros posteriores dos camundongos. O intervalo de cinco dias entre a cirurgia e a injeção da BGT foi usado devido a capacidade da desnervação aumentar a densidade de AChR nesta faixa temporal, sendo assim a população de receptores de meia-vida curta também poderia ser estimada, por outro lado eles não seriam detectados caso a BGT fosse injetada no dia da cirurgia (RUDOLF et al., 2013; STRACK et al., 2011). Estes mesmo princípio foi usado nos experimentos descritos na seção 3.9. de Material e Métodos.

O músculo da pata contralateral, innervado, serviu de controle para o músculo desnervado, no mesmo animal, durante todo o período experimental. Considerando que a α -BGT liga-se de forma irreversível ao receptor colinérgico, o curso temporal descrito pela taxa de decaimento da radioatividade emitida pela ^{125}I - γ -BGT, prediz a taxa de degradação dos AChR presentes na JNM no momento da injeção deste ligante. Para isso, a radioatividade emitida por cada pata foi mensurada através de *Germanium semiconductor counter* (modelo GX3018, Canberra, Bélgica). Um resumo deste protocolo é apresentado na **Fig. 3**. Na parte superior é demonstrada uma representação do procedimento para mensuração da radioatividade emitida pelo músculo injetado com α -bungarotoxina- I^{125} .

Figura 3. Esquema representativo da avaliação do efeito do tratamento diário com clenbuterol na taxa de degradação do receptor colinérgico nicotínico (AChR) em músculos esqueléticos de camundongos anestesiados.

3.9. Visualização *in vivo* das sinapses da JNM

A estabilidade do AChR foi mensurada como descrito anteriormente (CHOI et al., 2012; RÖDER et al., 2009, 2010). Para isso, BGT- AlexaFluor 647 (1:200, Life Technologies, # B35450) e BGT - AlexaFluor 555 (1:200, Life Technologies, # B35451) foram injetadas sequencialmente em uma distância temporal de 10 dias, para marcar o "*pool* de receptores antigos e os novos", respectivamente. Após a segunda injeção, os músculos foram examinados *in vivo* com o uso de um microscópio confocal Leica SP2 equipado com uma objetiva de imersão em 63x/1.2NA. As análises automatizadas do conteúdo de AChR foram realizadas como descrito anteriormente (RÖDER et al., 2010). Resumidamente, imagens 3D de 512 x 512 pixels de resolução foram segmentadas, assim os valores de intensidade de sinal em pixels para AlexaFluor-555 e AlexaFluor-647 foram extraídos. Em

seguida, a fração de pixels por JNM, tendo BGT-AF555 intensidade de sinal mais elevada do que a de BGT-AF647 foi calculada. A **fig. 4** representa um resumo deste protocolo experimental. Na parte superior é demonstrada uma representação do procedimento de microscopia confocal para mensuração da fluorescência emitida pela α -bungarotoxina (BGT)-AF647 e -AF555.

Figura 4. Esquema representativo da avaliação do efeito do tratamento diário com clenbuterol na estabilidade do receptor colinérgico nicotínico (AChR) em músculos esqueléticos de camundongos anestesiados.

3.10. Procedimento para análise das vesículas positivas BGT

As imagens obtidas do experimento descrito no item 3.9. de Material e Métodos foram utilizadas para quantificação das vesículas endocíticas. Assim, as sinapses foram analisadas com software FiJi-ImageJ, para cada filtro (AF555 ou AF647), e em seguida, o número de pontos ao redor das sinapses foram contados, assumindo que os mesmos seriam os carreadores/vesículas do receptor que foi previamente marcado com BGT.

3.11. Procedimento experimental para o estudo da proteólise em músculos esqueléticos de ratos

Para avaliar o papel da estimulação colinérgica na proteólise total de ratos normais, os músculos *soleus* e EDL foram incubados na presença de carbacol (um agonista colinérgico, 10^{-9} - 10^{-3} M), D-tubocurarina (um antagonista nicotínico, 10^{-4} M) e CB (10^{-4} M) por três horas. Todos os reagentes foram obtidos da Sigma-Aldrich. Nos experimentos utilizando D-tubocurarina, os músculos foram incubados com essa droga 1 hora antes da adição do carbacol.

A preparação de músculos isolados de pequenos roedores foi utilizada para avaliar o metabolismo de proteínas *in vitro*. Imediatamente após a eutanásia dos animais por deslocamento cervical, os músculos *soleus* e EDL de ratos foram rapidamente extraídos e fixados por meio dos seus tendões em suportes de alumínio (*soleus*) ou de acrílico (EDL), mantendo-os no comprimento de repouso, incubados em tampão Krebs Ringer bicarbonato (0,120M de NaCl; 0,015M de NaHCO₃; 4,828mM de KCl; 1,2mM de MgSO₄; 1,212mM de KH₂PO₄; 2,4mM de CaCl₂ - pH 7,4) e aerados com carbogênio (95% de O₂ e 5% de CO₂). Estas condições permitem que todas as fibras musculares estejam na mesma condição nutricional, evitando-se o comprometimento das fibras musculares centrais. Esta preparação garante a manutenção dos níveis intracelulares de ATP, fosfocreatina e glicogênio, reproduzindo *in vitro* o estado energético *in vivo* do músculo, tornando este ensaio viável por até 9 horas de incubação para o estudo do metabolismo proteico (KETTELHUT; WING; GOLDBERG, 1988). Os músculos foram incubados por 1 hora em banho-maria a 37°C (pré-incubação), sob agitação constante, a fim de estabelecer o equilíbrio da velocidade de liberação da tirosina para o meio de incubação. Após a pré-incubação, os meios foram renovados e incubados com o mesmo meio por 2 horas. No final do período de incubação, 1

ml do meio foi coletado e adicionado a 0,25 ml de ácido perclórico (1,5 N) para a determinação da tirosina liberada.

A degradação de proteínas musculares *in vitro* foi estimada pela liberação de tirosina no meio de incubação na presença de cicloheximida, um inibidor de síntese proteica. Este aminoácido é usado como referência para avaliação do metabolismo de proteínas, uma vez que não é metabolizado e nem sintetizado *de novo* pela célula muscular, além de ser facilmente dosado e com grande sensibilidade pelo método fluorimétrico (WAALKES; UDENFRIEND, 1957). De tal modo que a concentração de tirosina presente no meio de incubação reflete diretamente a velocidade de degradação de proteínas totais pela célula muscular esquelética (JEFFERSON; LI; RANNELS, 1977).

3.12. Atividade dos Sistemas Proteolíticos

A preparação *in vitro* com músculos isolados de pequenos roedores permite avaliar a participação individual dos principais sistemas proteolíticos no músculo esquelético. Para isto, inibidores específicos dos sistemas lisossomal (metilamina e os aminoácidos de cadeia ramificada leucina, isoleucina e valina), dependente de Ca^{2+} (leupeptina e o E64) e Ub-proteassoma (MG132, inibidor específico da atividade do proteassoma 26S) foram usados no meio de incubação de acordo com o objetivo específico de cada experimento. A diferença da liberação de tirosina pelo músculo incubado na presença e na ausência destes inibidores reflete a atividade proteolítica do sistema de interesse.

3.12.1. Sistema Lisossomal

O sistema lisossomal foi inibido com a incubação dos músculos *soleus* na presença da metilamina e aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA). A metilamina (base fraca) se acumula nos lisossomos, elevando o pH desta organela a valores próximos da neutralidade

(pH 5,9-6,2), inibindo a atividade das proteases lisossomais, as catepsinas e as hidrolase ácidas (KETTELHUT; WING; GOLDBERG, 1988; MORTIMORE, 1982). Os BCAA bloqueiam a formação dos vacúolos autofágicos e reduzem a instabilidade lisossomal. Em conjunto, esses inibidores bloqueiam a degradação proteica lisossomal, sem modificar o conteúdo total das enzimas lisossomais (JEFFERSON; LI; RANNELS, 1977; KETTELHUT; WING; GOLDBERG, 1988; RANNELS; KAO; MORGAN, 1975). A tabela abaixo ilustra o protocolo experimental utilizado para determinar a proteólise total, a qual representa a atividade de todos os sistemas proteolíticos e a proteólise lisossomal.

A liberação de tirosina dos músculos da pata direita, incubados na ausência dos inibidores farmacológicos, corresponde à proteólise total. Logo, a diferença entre a liberação de tirosina das patas direita e esquerda reflete a participação do sistema lisossomal na proteólise muscular (**tabela 1**).

Tabela 1. Protocolo utilizado para quantificação da proteólise total e lisossomal.

Músculos <i>soleus</i> retirados das 2 patas e fixados pelos tendões a suportes apropriados para incubação <i>in vitro</i>		
Componentes do meio de incubação	Músculos	
	Pata direita	Pata esquerda
Tampão Krebs Ringer Bicarbonato (pH 7,4)	+	+
Glicose (5mM)	+	+
Cicloheximida (0,5mM)	+	+
Metilamina (10mM) e *BCAA	-	+

*Leucina (0,5mM); Isoleucina (0,85mM) e Valina (1,0mM).

3.12.2. Sistema Dependente de Ca^{2+}

Para avaliação deste sistema proteolítico, todos os dois músculos *soleus* de cada pata foram fixados a suportes, sendo um deles incubado em meio Krebs sem Ca^{2+} e com a adição de inibidores das proteases do grupo tiol como o E64 e a leupeptina. O objetivo desse procedimento é inibir as calpaínas *in vitro*. Assim, a diferença entre os valores de proteólise do músculo incubado em condições basais (pata direita) com o músculo apresentando o sistema enzimático das calpaínas inibido (pata esquerda) reflete a participação do sistema proteolítico dependente de Ca^{2+} . A diferença na liberação de tirosina dos músculos incubados com ou sem os inibidores representa a atividade do sistema dependente de cálcio (**tabela 2**).

Tabela 2. Protocolo utilizado para quantificação da atividade do sistema proteolítico dependente de Ca^{2+} .

Músculos <i>soleus</i> retirados das 2 patas incubados <i>in vitro</i>		
Componentes do meio de incubação	Músculos	
	Pata Direita	Pata Esquerda
Tampão Krebs Ringer Bicarbonato (pH 7,4)	+	+
Glicose (5mM)	+	+
Cicloheximida (0,5mM)	+	+
Metilamina (10mM) e *BCAA	+	+
E64 ¹ (25 μM) e leupeptina (50 μM)	-	+
Cálcio	-	+

*Leucina (0,5mM); Isoleucina (0,85mM) e Valina (1,0mM).

¹trans-epoxisuccinil-L-leucilamido-(4-guanidino) butano

3.12.3. Sistema Ubiquitina-Proteassoma

Foram utilizados músculos *soleus* fixados pelos tendões a suportes apropriados e incubados em meio sem cálcio e na presença dos inibidores metilamina, BCAA, E64 e leupeptina para o bloqueio concomitante dos sistemas proteolíticos lisossomal e dependente de Ca^{2+} , respectivamente. Para inibir a atividade direta do proteassoma 20S, subpartícula do proteassoma 26S, onde acontece efetivamente a degradação de proteínas por ação das proteases deste sistema, foi utilizado o MG132 (N-carboxibenzoxi-Leu-Leu-Leucina).

A liberação de tirosina dos músculos incubados na presença de todos os inibidores reflete a proteólise não lisossomal e independente de Ca^{2+} , denominada basal. A diferença entre a tirosina liberada na proteólise basal e aquela liberada dos músculos incubados na presença do MG132 representa a atividade do sistema Ub-proteassoma (**tabela 3**).

Este protocolo ainda permite avaliar a liberação de tirosina pela proteólise não lisossomal, independe de Ca^{2+} e do sistema Ub-proteassoma, denominada residual, cujos mecanismos de controle ainda são pouco conhecidos.

Tabela 3. Protocolo utilizado para a quantificação da proteólise dependente de Ub-proteassoma

Músculos <i>soleus</i> retirados das 2 patas e fixados pelos tendões a suportes apropriados para incubação <i>in vitro</i>		
Componentes do meio de incubação	Músculos	
	Pata Direita	Pata Esquerda
Tampão Krebs Ringer Bicarbonato (pH 7,4)	+	+
Glicose (5mM)	+	+
Cicloheximida (0,5mM)	+	+
Metilamina (10mM) e *BCAA	+	+
**E64 (25µM), leupeptina (50 µM)	+	+
***MG132 (20µM)	-	+
*Leucina (0,5mM); Isoleucina (0,85mM) e Valina (1,0mM).		
**Trans-epoxisuccinil-L-leucilamido-(4-guanidino) butano.		
*** N-carboxibenzoxi-Leu-Leu-Leucinal		

3.13. Procedimento experimental para a avaliação da síntese total de proteínas em músculos esqueléticos de ratos

A síntese de proteínas totais foi determinada em músculos *soleus* e EDL de ratos após 3 horas de incubação com carbacol (10^{-4} M). Os músculos foram incubados com os tendões fixos a suportes próprios para manutenção do comprimento de repouso em tampão Krebs Ringer Bicarbonato, contendo glicose (5mM) e todos os 20 aminoácidos, em concentrações semelhantes ao plasma, conforme apresentado na **tabela 4**.

Após um período de 1 hora de pré-incubação, o meio de incubação foi substituído por meio idêntico acrescido de tirosina marcada ([U- ^{14} -C] tirosina; 0,05 μ Ci/ml). Após a incubação de 2 horas, os músculos foram lavados com água destilada, secos em papel de filtro e colocados em 2ml de ácido tricloroacético (TCA) 10% para homogeneização. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3.000g por 15 minutos a 24°C e 1ml do sobrenadante foi recolhido para avaliação da tirosina total livre no músculo. Uma alíquota de 100 μ l foi utilizada para quantificação da radioatividade e determinação da atividade específica da tirosina de cada músculo separadamente. Na etapa seguinte, a amostra foi lavada 3 vezes com 2 ml de TCA 10%. O precipitado restante foi solubilizado com dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% *overnight* em banho-maria a 40°C. A seguir, foram adicionados 10 ml de coquetel de cintilação para contagem da radioatividade em espectrômetro de cintilação líquida (TRI-CARB 2100TR, Packard BioScience Company, EUA).

Tabela 4. Aminoácidos presentes no meio de incubação para quantificação da velocidade de síntese de proteínas totais.

Aminoácidos	Concentração (mM)	Aminoácidos	Concentração (mM)
Ácido aspártico	0,035	Isoleucina	0,100
Ácido glutâmico	0,174	Leucina	0,170
Alanina	0,450	Lisina	0,400
Arginina	0,200	Metionina	0,070
Asparagina	0,061	Prolina	0,180
Cisteína	0,070	Serina	0,280
Fenilalanina	0,500	Tirosina	0,100
Glicina	0,400	Treonina	0,300
Glutamina	0,350	Triptofano	0,070
Histidina	0,080	Valina	0,200

3.14. Análise estatística

A análise das imagens foi realizada utilizando o programa ImageJ (NIH, Bethesda, MD) ou como descrito (RÖDER et al., 2010). Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM (erro padrão da média). Para a análise estatística dos resultados foi empregado o teste “t” de Student ou teste de Welch e a análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Bonferroni. O nível de significância aceito foi de 5% (i.e., $P \leq 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1. Efeito do tratamento crônico com CB na massa muscular e na expressão dos genes relacionados à atrofia e autofagia induzidos pela DEN

A desnervação motora por 3 dias não alterou a massa dos músculos TA. No entanto, a partir do sétimo dia, foi observada perda significativa (13%) de massa nos músculos desnervados do grupo tratado com salina tornando-se gradativamente maior até o décimo quarto dia quando então os animais perderam 34% de massa (**Fig. 5**). No grupo desnervado e tratado com CB por 3 dias observou-se aumento de 7% na massa muscular que foi significativamente diferente dos desnervados tratados com salina. Este efeito anti-atrófico do CB foi mantido até o décimo quarto dia após a desnervação

A atrofia induzida pela DEN foi associada ao aumento do RNAm das duas Ub-ligases músculo-específicas, atrogina-1 e MuRF1, após 3 dias de desnervação (243% e 453%, respectivamente). Como pode ser observado na **Fig. 6A**, o pico de ativação de atrogina-1 acontece no terceiro dia de desnervação sendo este efeito completamente revertido para níveis de expressão semelhantes aos músculos inervados já após o sétimo dia. Um perfil semelhante de resposta foi observado para o RNAm de MuRF1 (**Fig. 6B**). Entretanto, o tratamento com CB completamente aboliu o aumento da expressão destes genes (**Fig. 6A e D**) 3 dias após a cirurgia e reduziu para valores abaixo dos controles o RNAm para atrogina-1 em todo o período analisado. Efeitos semelhantes foram observados no conteúdo proteico de ambos atrogenes (**Fig. 6C-F**)

Figura 5. Efeito do tratamento com clenbuterol (CB; 3 mg/kg/dia, s.c.) ou salina (Sal) na massa de músculos tibialis desnervados (DEN). Os resultados são expressos como médias percentuais $\pm$ EPM ($n=7-10$) das massas de músculos desnervados em relação aos controles inervados (considerados como 100%). * $P<0,05$; *** $P<0,001$ DEN + Sal vs. inervado. [#] $P<0,05$ DEN + CB vs. DEN + Sal. Os valores médios das massas dos músculos inervados foram $18,19 \pm 0,54$ mg/10g de massa corporal.

Figura 6. Efeito do tratamento com clenbuterol (CB; 3mg/kg/dia, s.c.) ou salina (Sal) na expressão do RNAm para atrogina-1 (A) e MuRF1 (D) e no conteúdo das proteínas atrogina-1 (B) e MuRF1 (E) em músculos tibiais desnervados (DEN). As bandas (blots) representativas de atrogina-1 e MuRF1 são mostradas em C e F, respectivamente. Os níveis de expressão gênica foram normalizados utilizando a subunidade de RNA 18S como controle endógeno. Os resultados são expressos como Média $\pm$ EPM. * $P < 0,01$ - *** $P < 0,01$ DEN + Sal vs. controle, innervado (100%); # $P < 0,05$ - & $P < 0,05$ - ### $P < 0,01$ DEN+CB vs. DEN + Sal.

Além da modulação do sistema Ub-proteassoma, nossos resultados mostram que a desnervação promoveu *up-regulation* dos genes relacionados ao sistema autofágico/lisossomal, isto é, catepsina L e LC3b (**Fig. 7 A e B**). No entanto, o pico de expressão destes genes autofágicos ocorreu sete dias após a cirurgia demonstrando que durante o processo catabólico induzido pela desnervação há um programa atrófico que coordena temporalmente a ativação dos diferentes sistemas proteolíticos celulares (SACHECK et al., 2007). Por sua vez, o CB bloqueou o pico de expressão da catepsina L (**Fig. 7A**) e atenuou o de LC3 (**Fig. 7B**) aos 7 dias pós-DEN. Embora não tenha sido observado alterações no conteúdo proteico da catepsina L (dados não mostrados), o conteúdo de LC3I e II aumentou 288% e 400% após sete e quatorze dias de DEN, respectivamente e o tratamento com CB atenuou esta resposta em ambos os períodos (**Fig. 7C**).

Figura 7. Efeito do tratamento com clenbuterol (CB; 3mg/kg/dia, s.c.) ou salina (Sal) na expressão do RNAm para catepsina L (A) e LC3 (B) e no conteúdo proteico de LC3 I e II (C) em músculos tibiais desnervados (DEN). Os níveis de expressão gênica foram normalizados utilizando a subunidade de RNA 18S como controle endógeno. Os resultados são expressos como Média $\pm$ EPM. *** $P < 0,01$ DEN + Sal vs. controle, inervado (100%); # $P < 0,05$, ### $P < 0,001$ CB + DEN vs. DEN + Sal.

4.2. Efeito do tratamento crônico com CB na atividade da via do AMPc/PKA em músculos desnervados

A via de sinalização clássica ativada pelos β_2 -ARs é a do AMPc/PKA e esta parece ser a responsável pelos efeitos hipertróficos induzidos pelos β_2 -agonistas (LYNCH; RYALL, 2008). Nesse sentido, foram analisados o conteúdo de AMPc e de substratos fosforilados pela PKA em músculos desnervados de camundongos tratados com salina ou CB. O tratamento com CB durante 3 dias aumentou o conteúdo de AMPc (**Fig. 8A**) em músculos desnervados. Em concordância com estes resultados, o conteúdo de substratos fosforilados pela PKA também foi aumentado (165%) pelo CB (**Fig. 8B-C**), indicando de forma indireta que a atividade desta quinase foi elevada pelo AMPc. De forma bastante interessante, nossos dados mostram que o próprio estado da desnervação, independentemente do tratamento com CB, foi capaz de induzir aumento (25%) do AMPc intracelular (**Fig. 8A**) e do conteúdo de substratos fosforilados pela PKA (110%) após o 7º dia (**Fig. 8B**). Vale a pena ressaltar que neste mesmo período foi também observado *down-regulation* dos atrogenes, atrogina-1 e MuRF1 (**Fig. 6A-F**) em músculos desnervados e tratados com salina. Com base nesses resultados, especulou-se que a via do AMPc/PKA poderia fazer parte de um mecanismo intrínseco de autoproteção do tecido muscular no sentido de atenuar a hiperexpressão dos atrogenes induzida pela perda da inervação motora. Um resumo destes achados é apresentado esquematicamente na **Fig.9**.

Figura 8. Conteúdo de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc, **A**) e de substratos fosforilados pela PKA (**B**) em músculos tibialis desnervados (DEN) obtidos de camundongos tratados com salina (Sal) ou clenbuterol (CB; $3\text{mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, s.c.) por 14 dias. Em **C**, as imagens (blots) representativas de cada grupo ilustram os valores expressos como Média $\pm$ EPM ($n=5-6$) no histograma B. $^*P<0,05$, $^{***}P<0,001$ DEN + Sal vs. controle inervado; $^{\#}P<0,05$, $^{###}P<0,001$ DEN + CB vs. DEN + Sal. Os valores médios do conteúdo de AMPc dos músculos inervados foram $863,62 \pm 71,78$ fmol/mg de músculo.

4.3. Participação do SNS na resposta adaptativa induzida pela desnervação

Com base nos resultados anteriores, especulou-se que fibras simpáticas poderiam estar associadas a neurônios motores do nervo ciático e sua ablação pela DEN aumentaria a sensibilidade do tecido muscular às catecolaminas circulantes culminando no aumento de AMPc. Utilizando-se métodos de imunohistoquímica, observou-se no nervo ciático uma alta densidade de neurônios catecolaminérgicos identificados pela presença de dopamina- β -hidroxilase, uma enzima responsável pela síntese de catecolaminas (**Fig. 10**). Em concordância com esses resultados, a secção do nervo ciático promoveu uma redução (80%) do conteúdo de noradrenalina muscular **Fig. 11A**). Para testar a hipótese da sensibilidade adrenérgica induzida pela desnervação motora, um grupo de animais desnervados por 7 dias foi previamente submetido à cirurgia de ADMX (3 dias antes da cirurgia de DEN). O tempo de 7 dias de desnervação motora foi selecionado pois neste momento o conteúdo dos atrogenes nos músculos desnervados está retornando aos valores normais e a atividade da via do AMPc/PKA está elevada. Embora trabalhos anteriores de nosso laboratório já tenham demonstrado que a ADMX é um procedimento eficaz na redução drástica da adrenalina circulante em ratos (GRAÇA et al., 2013; NAVEGANTES et al., 2001), não foi possível determinar a concentração plasmática desta catecolamina nos camundongos adrenodemedulados em virtude da alta quantidade de plasma exigida pelo método do CLAE. A concentração plasmática de corticosterona não foi afetada pela ADMX (**Fig. 11C**). Como pode ser observado na **Fig 11B**, a ADMX promoveu um leve aumento adicional no conteúdo de atrogina-1 e MuRF1 nos músculos desnervados sugerindo que a adrenalina circulante possa estar contribuindo para a atenuação da resposta catabólica nos músculos que perdem a inervação motora, no entanto a quantificação do conteúdo de AMPc e atividade da PKA neste modelo é fundamental para comprovar esta hipótese.

Figura 9. Esquema representativo do perfil temporal da expressão dos atrogenes (MuRF1 e atrogina-1) e da atividade da via de sinalização do AMPc/PKA em músculos desnervados. A seta indica o momento no qual ambos os fenômenos possam estar interagindo e a linha pontilhada representa os valores obtidos no grupo de músculos innervado, considerados como 100%.

Figura 10. Identificação de fibras noradrenérgicas no nervo ciático de camundongos. Nervos ciáticos foram fixados em solução contendo 4% de paraformaldeído a 4 °C. Secções transversais de 100μm de espessura foram preparadas. Para identificar os neurônios simpáticos foi utilizado anticorpo anti-dopamina-β-hidroxilase (DβH), uma enzima responsável pela síntese de catecolaminas. Wheat germ agglutinin (WGA) foi também utilizada para marcar as membranas celulares e, em seguida, as imagens foram obtidas através de microscopia confocal. Escala = 200 μm. As setas azuis identificam os neurônios noradrenérgicos marcados para DβH.

Figura 11. Conteúdo de noradrenalina em músculos gastrocnêmicos de camundongos após três dias de desnervação motora (DEN) **B:** Imagens representativas do conteúdo proteico de atrogina-1 e MuRF1 em músculos tibial anterior de camundongos submetidos previamente à cirurgia de remoção da porção medular da adrenal (ADMX) e à DEN por sete dias. **C:** Concentração plasmática de corticosterona após sete dias de ADMX em camundongos. *** $P < 0,001$ DEN vs. controle inervado, $n=5$.

4.4. Evidências anatômicas da interação entre o sistema adrenérgico e colinérgico na placa motora

Com a identificação de fibras noradrenérgicas no nervo motor (**Fig. 10**) tornou-se interessante investigar se esta inervação pudesse também alcançar a região da placa motora. Para isso foram utilizados diferentes métodos de imagens para investigar: i) a presença da inervação noradrenérgica por meio da localização da tirosina hidroxilase (TyrH) que é a proteína chave no processo de síntese de noradrenalina, ii) a expressão dos β_2 -AR e iii) a produção de AMPc na JNM de músculos TA de camundongos normais. Foi observado uma grande marcação para TyrH na região subjacente às JNM pela técnica de imunohistoquímica (**Fig. 12A-C**), indicando que neurônios simpáticos fazem contato direto com a placa motora e também com as fibras musculares.

Utilizando-se técnicas de imunohistoquímica, foi possível observar uma grande densidade de β_2 -AR ao longo de toda a membrana sarcoplasmática (**Fig. 13A**). Posteriormente, músculos TA foram transfectados com plasmídeos contendo o gene que codifica β_2 -AR-sPep acoplado aos sensores fluorescentes mCit (FRET aceptor) e mCer (FRET doador). Com esta técnica foi possível confirmar que o β_2 -AR está realmente presente na JNM, como demonstrado pela co-localização com AChR (**Fig. 13B**). Após estimulação elétrica do nervo ciático (< 1 V) estes receptores tornaram-se ativos (**Fig. 13C**), apresentando um aumento máximo de ~10% da razão entre F535/F485 (maior fluorescência emitida por mCit e diminuição da fluorescência emitida pelo mCer).

Com o objetivo de identificar a produção e localização do AMPc especificamente na JNM, o plasmídeo contendo o gene para rapsina-EPAC associado aos sensores YFP e CFP foi superexpresso em músculos TA de camundongos. Após estimulação elétrica do nervo ciático foi observado um aumento da produção de AMPc (**Fig. 14A**). Este efeito foi bloqueado pelo tratamento prévio com 6-OH-DOPA, uma neurotoxina que

bloqueia a liberação de noradrenalina pelo terminal pré-sináptico e pelo tratamento com ICI 118-551, um antagonista dos β_2 -AR (**Fig. 14B**).

Em conjunto, esses dados mostram que fibras noradrenérgicas que trafegam pelo nervo motor de músculos de camundongos estabelecem contato direto com os receptores nicotínicos por meio da ativação dos β_2 -AR e consequente aumento da produção do AMPc.

Figura 12. Identificação de fibras noradrenérgicas na junção neuromuscular (JNM). As JNM foram identificadas por meio da localização do receptor colinérgico nicotínico (AChR, verde). Para a identificação dos terminais noradrenérgicos utilizou-se anticorpo anti-tirosina hidroxilase (TyrH, vermelho), enzima chave na síntese das catecolaminas. As setas mostram a marcação de fibras noradrérgicas adjacentes as fibras musculares (A) e a co-localização com AChR em músculo tibial anterior de camundongos (B-C). A) escala = 100 µm, B) escala = 50 µm e C) escala = 20 µm.

Figura 13. **A:** Identificação de receptores $\beta 2$ -adrenérgicos (AR) em sinapses musculares de camundongos. **B:** Após transfecção do plasmídeo contendo o gene $\beta 2$ -AR-sPep foi observada co-localização do $\beta 2$ -AR e do receptor colinérgico nicotínico (AChR). **C:** A estimulação elétrica do nervo ciático promoveu a ativação do receptor $\beta 2$ -AR mensurada pela técnica de transferência de energia de ressonância por fluorescência (FRET). Os valores representam as Médias $\pm$ EPM da razão entre mCit/mCer ou $F(535\text{nm})/F(485\text{nm})$). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ ($n = 5$).

Figura 14. A: Imagens representativas do aumento da produção de AMPc nas sinapses musculares induzido pela estimulação elétrica do nervo ciático após transfecção do músculo tibial anterior com o plamídeo Rapsina-EPAC. **B:** Quantificação da produção do AMPc em músculos controles (●). O aumento do AMPc foi bloqueado pelo pré-tratamento com 6-hidroxidopamina (6-OH-DOPA; 100mg.kg⁻¹) (●) e pelo IC1 118-551 (5mg.kg⁻¹), um antagonista dos receptores β 2-adrenergicos (●). Os valores representam as Médias $\pm$ EPM da razão entre CFP/YFP ou $F(485nm)/F(535nm)$. * P < 0,05; ** P < 0,01 (n = 5-7).

4.5. Efeito do tratamento com CB no turnover dos AChR

Considerando a importância funcional da via do AMPc/PKA na regulação do *turnover* do AChR (GREEN; ROSS; CLAUDIO, 1991) e as evidências anatômicas da interação entre o sistema adrenérgico e colinérgico na placa motora postulou-se que os β 2-AR fossem funcionalmente importantes para manter a estabilidade do AChR nas JNM. Neste contexto, foi realizada a desnervação motora unilateral e os animais foram tratados diariamente com CB. A taxa de degradação do AChR foi avaliada, inicialmente, pelo método radioativo como descrito na seção 3.8. de Material e Métodos. Como esperado, a DEN induziu redução na meia-vida do *pool* de receptores de longa vida de 14,5 para 8,5 dias (**Fig. 15**). No entanto, o tratamento com CB foi insuficiente para induzir qualquer alteração detectável na meia-vida dos AChR, em músculos inervados e desnervados (**Fig. 15**).

Em seguida, a integridade da placa motora foi estimada por meio da análise *in vivo* das imagens das sinapses colinérgicas, as quais foram obtidas por meio da microscopia confocal do músculo TA de camundongos anestesiados. Por meio deste método é possível identificar dois *pools* de receptores de acetilcolina, diferencialmente acoplados à bungarotoxina marcada a diferentes fluoróforos: um *pool* de receptores de meia-vida longa (antigos, marcados em verde) e os recém sintetizados (novos, marcados em vermelho). A análise quantitativa da relação entre as duas cores (“em pixels”) em uma determinada sinapse indica o grau de estabilização da mesma. Em concordância com os achados anteriores, verificou-se que a DEN induziu aumento de ~310% ($P < 0,05$; $n=4-5$) no *pool* de receptores de “novos” indicando assim o aumento do *turnover* de AChR. O tratamento com CB por 14 dias produziu um aumento adicional no *pool* de receptores de “novos” tanto nos músculos inervados (~208%) como nos DEN (~46%) (**Fig. 16 e 17**).

Figura 15. Efeito do tratamento com clenbuterol (CB; 3mg.kg-1.dia-1, s.c.) ou salina (Sal) na taxa de degradação do receptor colinérgico nicotínico (AChR), avaliado pela taxa de decaimento de ^{125}I -bungarotoxina (BGT), em músculo tibial anterior inervado e desnervado (DEN) de camundongos. $t_{1/2}$ = tempo de meia vida, n=5-7.

Figura 16. Imagens representativas do efeito do tratamento com clenbuterol (CB; $3\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$, s.c.) ou salina (Sal) na estabilidade do receptor colinérgico nicotínico (AChR) em músculo tibial de camundongos submetidos à desnervação motora unilateral (DEN). Os AChR foram marcados com BGT-AlexaFluor 647 (“para visualização dos receptores antigos”) e depois de 10 dias com BGT-AlexaFluor 555 (para visualização dos “receptores novos”). Escala= 50 μm .

Figura 17. Efeito do tratamento com clenbuterol (CB; $3\text{mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, s.c.) ou salina (Sal) na estabilização do receptor colinérgico nicotínico (AChR) em músculo tibial de camundongos submetidos à desnervação motora unilateral (DEN). Os resultados são expressos como Média $\pm$ EPM da fração de *pixels* da marcação feita por BGT-AF555 em função do número médio de fragmentos/junção neuromuscular (JNM). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ vs. músculos controles (inervados tratados com salina); # $P < 0,05$ vs músculos DEN + Sal; (n = 4-5 para cada grupo).

Com a finalidade de investigar a incorporação do AChR na membrana sarcoplasmática, avaliou-se a presença de vesículas endocíticas marcadas para BGT na JNM. Como esperado, foi observado aumento de cerca de 2,5 vezes no número de vesículas contendo o AChR em músculos DEN em relação aos músculos inervados (**Fig. 18A**). Este efeito da desnervação foi completamente abolido pelo tratamento com CB (**Fig. 18 A**). Nestes animais foi também avaliada por RT-PCR a expressão gênica da subunidade $\alpha 1$ -AChR. Observou-se aumento de ~90 vezes na expressão do RNAm da subunidade $\alpha 1$ -AChR em músculos DEN em comparação com o inervado (**Fig. 18B**). O tratamento com CB promoveu um aumento adicional (~200 vezes) nesta resposta (**Fig. 18 B**). Não foi observada diferença entre os grupos inervados tratados com salina ou CB em ambas as análises.

Figura 18. Efeito do tratamento com clenbuterol (CB; $3\text{mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, s.c.) ou salina (Sal) por 14 dias no conteúdo de vesículas endocíticas marcadas com bungarotoxina (BGT-AF647/AF555) (A) e na expressão do RNAm para a subunidade $\alpha 1$ do receptor colinérgico nicotínico ($\alpha 1$ -AChR) (B) em músculo tibial anterior innervado e desnervado (DEN) de camundongo. Os níveis de expressão gênica foram normalizados utilizando a subunidade de RNA 18S como controle endógeno. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. ** $P < 0,01$ DEN vs. controle, innervado (100%); # $P < 0,05$, DEN + CB vs. DEN + Sal.

Além do modelo catabólico induzido pela DEN, foi também analisado o efeito do tratamento crônico com CB na estabilização dos AChR em animais miastênicos que apresentam uma mutação na subunidade ϵ do receptor nicotínico (AChR- ϵ L269F). Estes animais exibem miopatia específica na placa motora (GROSHONG et al., 2007), sendo assim, nestes animais não foi realizada a cirurgia de desnervação. Em comparação com os camundongos ϵ L269F tratados com salina, o tratamento com CB produziu aumento adicional do *pool* de AChR de meia vida curta na placa motora (Fig. 19A-B).

Figura 19. A: Imagens representativas do efeito do tratamento com clenbuterol (CB; $3\text{mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, s.c.) ou salina (Sal) na estabilidade do receptor colinérgico nicotínico (AChR) em músculo tibial anterior de camundongos com a mutação AChR- ϵ L269F. (A) Os AChR foram marcados com BGT-AlexaFluor 647 ("para visualização dos receptores antigos") e depois de 10 dias com BGT-AlexaFluor 555 (para visualização dos "receptores novos"); barra de escala, $50\mu\text{m}$. B: Análise quantitativa da relação de pixels dominantes de ambos os sinais dos receptores "novos" e "antigos" por fragmentos de junção neuromuscular (JNM). Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM ($n = 6$). * $P < 0,05$.

4.6. Efeito da estimulação colinérgica no metabolismo de proteínas em músculos isolados de ratos

Embora a ACh seja o principal neurotransmissor presente na sinapse neuromuscular (Chen et al. 2007), muito pouco se conhece sobre o efeito da estimulação colinérgica no metabolismo de proteínas em músculos esqueléticos. Com esta finalidade, músculos *soleus* (oxidáticos) e EDL (glicolíticos) de ratos foram utilizados nesses estudos *in vitro*, uma vez que eles são facilmente removidos e há menor probabilidade de lesão quando comparados a músculos de camundongos.

Para avaliar o efeito da estimulação colinérgica na degradação de proteínas totais, músculos *soleus* e EDL de animais normais foram incubados na presença de diferentes concentrações de carbacol (10^{-7} a 10^{-3} M), um agonista colinérgico. A **Fig. 20A** mostra que o carbacol aumentou a proteólise total de forma concentração-dependente em músculos *soleus*. O efeito máximo na proteólise causado pelo carbacol (10^{-4} M) foi de 52% (**Fig. 20A**) no *soleus*. Este aumento da atividade proteolítica foi completamente bloqueado quando os músculos *soleus* foram incubados na presença de concentrações equimolares de carbacol e D-tubocurarina, um antagonista de receptores nicotínicos, (**Fig. 21**). Concentrações menores de carbacol (10^{-7} – 10^{-6} M) não alteraram a proteólise total. Não houve qualquer alteração na degradação proteica em músculos EDL incubados com as diferentes concentrações de carbacol (**Fig. 20B**). Para confirmar se os dados obtidos acima não eram decorrentes de alterações do transporte do aminoácido foi mensurado o *pool* de tirosina em músculos *soleus* e EDL após incubação com 10^{-3} M de carbacol. Não houve diferença no *pool* de tirosina em nenhum dos músculos incubados em relação ao controle (dados não apresentados).

Posteriormente, a velocidade de síntese proteica foi avaliada em músculos *soleus* e EDL incubados com carbacol (10^{-4} M), sendo observada uma redução de cerca de 24%

na incorporação de tirosina marcada em proteínas totais de músculos *soleus*, mas não em EDL (**Fig. 22**).

Figura 20. Efeito *in vitro* do carbacol (10^{-7} a 10^{-3} M) na atividade proteolítica total de músculos *soleus* (A) e EDL (B) normais de ratos. Os resultados são expressos como médias percentuais $\pm$ EPM (n=4-5) dos valores de liberação de tirosina (nmol Tyr.mg $^{-1}$ .2h $^{-1}$) de músculos incubados na presença de carbacol em relação aos controles (considerados como 100%). *P<0.05; **P<0.01; ****P<0.001 controle (100%) vs. carbacol. Os valores médios do grupo controle foram $0,330 \pm 0,023$ nmol Tyr.mg $^{-1}$ .2h $^{-1}$ para *soleus* e $0,245 \pm 0,017$ nmol Tyr.mg $^{-1}$ .2h $^{-1}$ para EDL.

Figura 21. Efeito *in vitro* do carbacol (10^{-4} M) na presença ou não de D-tubocurarina (10^{-4} M) na proteólise total em músculos *soleus* de ratos normais. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM ($n=7$). **** $P<0,0001$ Controle vs Carbacol. O valor médio do grupo controle foi $0,380 \pm 0,021$ nmol Tyr.mg músculo $^{-1}$ .2h $^{-1}$.

Figura 22. Efeito *in vitro* do carbacol (10^{-3} M) na velocidade de síntese proteica em músculos soleus e EDL de ratos. Os dados são expressos como média $\pm$ EPM. * $P<0,05$ controle vs carbacol; $n=5-7$.

Após a demonstração do efeito proteolítico exercido pela estimulação colinérgica nicotínica *in vitro*, este estudo teve como objetivo investigar qual (quais) das diferentes vias proteolíticas seria (m) a(s) responsável (eis) por tal resposta biológica em situações basais. Para isto, foram investigadas as participações das vias lisossomal, dependente de Ub-proteassoma e dependente de Ca^{2+} em músculos *soleus* de ratos incubados na presença do carbacol (10^{-3}M).

A figura 23 mostra que a incubação de músculos de ratos normais na presença do carbacol aumentou a atividade proteolítica do sistema dependente de Ca^{2+} (140%) sem produzir qualquer alteração na atividade dos sistemas Ub-proteassoma e lisossomal (**Fig. 23A-C**). Em conjunto, esses resultados demonstram que a acetilcolina é capaz de induzir efeitos catabólicos no metabolismo de proteínas musculares por meio da ativação da proteólise dependente de Ca^{2+} e da diminuição da síntese proteica através da estimulação de receptores nicotínicos.

Figura 23. Efeito *in vitro* do carbacol (10⁻⁴M) nas atividades proteolíticas lisossomal (A), dependente de Ubiquitina-Proteassoma (UPS) (B) e dependente de Ca²⁺ (C) em músculos *soleus* de ratos normais. Os resultados são expressos como média ± EPM. ****P<0,0001 Controle vs Carbacol; n=5-7.

Considerando que os β_2 -AR estão presentes na JNM (**Fig.13**) e que a ativação dos mesmos diminui a degradação proteica por meio da inibição da proteólise Ca^{2+} -dependente em músculos *soleus* de ratos (NAVEGANTES et al., 2001), tornou-se interessante investigar se o CB seria capaz de atenuar a resposta proteolítica induzida pela ativação colinérgica muscular *in vitro*. Para isto, músculos *soleus* normais de ratos foram incubados na presença de 10^{-4}M de carbacol e/ou de 10^{-4}M de CB. Como pode ser observado na **Fig. 24**, o carbacol adicionado isoladamente aumentou drasticamente a proteólise, enquanto o CB a diminuiu. Quando os músculos foram co-incubados com os dois fármacos, observou-se que o CB foi capaz de bloquear completamente os efeitos do carbacol na indução da proteólise total.

Figura 24. Efeito *in vitro* do carbacol (10^{-4}M) e/ou do clenbuterol (CB, 10^{-4}M) na proteólise total em músculos *soleus* de ratos normais. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ Carbacol vs controle (100%); ** $P < 0,001$ Carbacol vs controle (100%); # $P < 0,001$ Carbacol vs carbacol + CB; $n=4-5$. A média obtida do grupo controle foi $0,290 \pm 0,015 \text{ nmol Tyr. mg músculo}^{-1} \cdot 2\text{h}^{-1}$.

5. DISCUSSÃO

Há um interesse crescente no desenvolvimento de estratégias terapêuticas para combater a perda de massa muscular e a desestruturação da placa motora afim de melhorar a função do músculo e reduzir as complicações desta condição.

Neste sentido, os β_2 -agonistas emergem como potenciais candidatos para atenuar a atrofia e a desestabilização da JNM uma vez que: i) os β_2 -AR são os receptores adrenérgicos mais expressos na fibra muscular esquelética (KIM et al., 1991); ii) a estimulação aguda e/ou crônica destes receptores pode atenuar a perda de massa muscular em diversas condições atroficas (Ryall & Lynch 2008) e melhorar a função contrátil muscular em pacientes miastênicos (ENGEL et al., 2010; LIEWLUCK; SELCEN; ENGEL, 2011) ; iii) a sinalização canônica ativada pelos β_2 -AR é a via do AMPc/PKA que está envolvida com a inibição da atividade dos sistemas proteolíticos Ub-proteassoma e lisossomal (COSTELLI et al., 1995; GONÇALVES et al., 2012) e com a manutenção da placa motora (KHAN et al., 2014; LIBBY; BURSZTAJN; GOLDBERG, 1980; RUDOLF et al., 2013). Assim, o principal objetivo deste trabalho foi elucidar o papel do SNS na manutenção da massa muscular e da placa motora e sua possível interação funcional com a inervação colinérgica motora.

Nossos resultados confirmaram que o tratamento **crônico** com CB, um β_2 -agonista seletivo, foi capaz de diminuir a perda de massa muscular e controlar a expressão dos genes relacionados à atrofia e autofagia em músculos desnervados e, concomitantemente, aumentar a síntese/incorporação de AChR na JNM. Além disso, foi demonstrado que neurônios catecolaminérgicos estabelecem contato direto com a JNM sugerindo que os AChR podem estar sob controle neuro-humoral das catecolaminas, as

quais parecem contra regular os efeitos catabólicos induzidos pela estimulação colinérgica no metabolismo de proteínas musculares em condições *in vitro*.

*5.1. Efeitos anti-atróficos da estimulação **crônica** dos receptores β_2 -AR em músculos desnervados*

Embora o tratamento com drogas simpatomiméticas seja uma terapia bastante conhecida por induzir aumento de massa muscular em diversas espécies animais (LYNCH; RYALL, 2008; NAVEGANTES; MIGLIORINI; KETTELHUT, 2002; RYALL; CHURCH; LYNCH, 2010), o efeito do tratamento crônico com β_2 -agonistas e os mecanismos moleculares envolvidos nesta resposta ainda precisam ser melhor elucidados. Sendo assim, camundongos foram submetidos à DEN unilateral e tratados com salina ou CB por até 14 dias. A perda desta inervação motora induzida pela secção do nervo isquiático é um modelo experimental com uma importância clínica relevante, uma vez que induz atrofia muscular e, ao mesmo tempo, desestabiliza os AChR e reduz a sua meia vida (KHAN et al., 2014; RUDOLF et al., 2013; STRACK et al., 2011). Como esperado a DEN induziu perda de massa muscular gradativa ao longo do tempo em animais tratados com salina (**Fig. 5**) e este efeito foi atenuado pelo tratamento diário com CB. Tendo em vista que a DEN induz diminuição da massa muscular por meio da redução da síntese e aumento da degradação proteica (MALTIN et al., 1989), ainda não é conhecido qual desses eventos metabólicos é o determinante para a ação anabólica dos β_2 -agonistas. A dificuldade para a compreensão deste mecanismo pode ser devido à utilização de músculos com diferentes perfis metabólicos, uma vez que a atrofia induzida pela desnervação, por razões desconhecidas, apresenta diferentes magnitudes de respostas em músculos oxidativos e glicolíticos (HUEY; BODINE, 1998; MORGAN; LOUGHNA, 1999). Por exemplo, músculos de contração lenta e

tipicamente oxidativos, como o *soleus* de ratos, são mais afetados pela desnervação quando comparados a músculos glicolíticos como o *extensor digitorum longus* (EDL). Mas, curiosamente, as fibras musculares oxidativas têm uma maior densidade de β_2 -AR do que a fibras glicolíticas de contração lenta (WILLIAMS; CARON; DANIEL, 1984).

Considerando que a estimulação neural é um dos determinantes mais importantes para a expressão gênica nos músculos esqueléticos e a perda da inervação motora culmina com a ativação de diferentes vias de degradação proteica, foi avaliado a expressão de genes e o conteúdo proteico de diferentes componentes dos principais sistemas proteolíticos na musculatura esquelética, isto é, o Ub-proteassoma e lisossomal. A participação destes sistemas tem sido amplamente associada à perda de massa muscular e levou à identificação de um sub-conjunto de genes conhecidos como atrogenes ou genes relacionados à atrofia. Os principais atrogenes são aqueles que codificam as Ub-ligases específicas da musculatura estriada, a atrogina-1/MAFbx e MuRF1, que são as proteínas responsáveis pelo processo de ubiquitinação de proteínas e, consequente, degradação pelo proteassoma (BODINE et al., 2001a; GOMES et al., 2001). De fato, camundongos nocautes para atrogina-1 ou MuRF1 são parcialmente resistentes à perda de massa muscular induzida pela desnervação motora (BODINE et al., 2001a).

Neste estudo, foi observado que após três dias de DEN houve uma superexpressão de atrogina-1 e MuRF1 tanto em nível gênico como no conteúdo proteico indicando aumento da atividade do sistema dependente de Ub-proteassoma em músculos desnervados. Estes resultados estão de acordo àqueles descritos por Medina et al. (1995), os quais foram um dos primeiros a demonstrar que a desnervação atrofica aumenta a atividade proteolítica dependente de Ub-proteassoma, o conteúdo de proteínas miofibrilares conjugadas à Ub e os níveis de RNAm da Ub e das subunidades

C3 e C9 do proteassoma. Nossos resultados demonstram que o CB completamente aboliu o aumento na expressão destes genes induzidos pela DEN e estão de acordo com aqueles obtidos por Gonçalves et al. (2009; 2012), os quais observaram que o tratamento agudo com β_2 -agonista foi capaz de atenuar a expressão dos atrogenes em músculos de animais jejuados ou submetidos à DEN.

Após sete dias de DEN, a expressão de ambos atrogenes foi reduzida e se equiparou aos valores obtidos em músculos inervados. Este perfil bifásico da expressão dos atrogenes foi descrito desde a descoberta do envolvimento de MuRF1 e atrogina-1 na indução do processo atrófico (Bodine et al. 2001a; Gomes et al. 2001). Sackey et al. (2007) foram os primeiros a associar este fenômeno com a rápida perda de massa muscular que ocorre nos períodos iniciais de DEN e, posteriormente, com a sua diminuição, sugerindo que outros mecanismos possam estar envolvidos com a atrofia em períodos tardios da desnervação. De fato, vários outros genes relacionados à atrofia apresentam interesse, incluindo os genes que codificam os componentes do sistema lisossomal/autofágico como a LC3 e o da protease catepsina L.

Foi observado que a desnervação promoveu aumento da expressão dos genes da LC3 e da catepsina L (**Fig. 7**). No entanto, o pico de expressão destes genes autofágicos ocorreu sete dias após a cirurgia, o que demonstra que durante o processo catabólico induzido pela desnervação há um programa atrófico que coordena temporalmente a ativação dos diferentes sistemas proteolíticos celulares (SACHECK et al., 2007). Por outro lado, o tratamento com CB foi capaz de reduzir a atividade transcricional destes genes. Embora não se tenha investigado o processo de síntese em nosso modelo experimental, é possível sugerir que a atenuação da atrofia induzida pelo CB em músculos desnervados é, pelo menos em parte, mediada pela inibição dos sistemas Ub-proteassoma e lisossomal.

A sinalização do AMPc/PKA é a via clássica ativada pelos β_2 -agonistas na musculatura esquelética e é geralmente associada aos efeitos anabólicos e anticatabólicos induzidos pelas catecolaminas (LYNCH; RYALL, 2008). Estudos anteriores do nosso laboratório demonstraram que o tratamento *in vivo* e *in vitro* de ratos diabéticos (BAVIERA et al., 2007) ou sépticos (LIRA et al., 2011) com drogas que aumentam o conteúdo de AMPc reduz a atividade do sistema Ub-proteassoma. Mais recentemente, foi demonstrado que o tratamento em curto-prazo com CB suprimiu a hiperexpressão induzida pela DEN do RNAm para MuRF1, atrogina-1 e catepsina L. Este efeito parece ser dependente da via de sinalização do AMPc/PKA, uma vez que o 6-BNZ-cAMP, um antagonista seletivo da PKA, aboliu os efeitos inibitórios do CB na expressão das Ub-ligases e na proteólise (GONÇALVES et al., 2012). Para melhor compreender o papel da via do AMPc em nosso modelo experimental, o conteúdo de AMPc e a atividade da PKA foram avaliados em músculos desnervados de animais tratados com salina ou CB. Observou-se aumento do conteúdo de AMPc e fosfo-substratos de PKA em músculos de camundongos desnervados por 3 dias e tratados com CB. Neste mesmo período de desnervação, o conteúdo dos atrogenes foi reduzido pelo CB (**Fig. 6**), sugerindo que esta via de sinalização pode ser a responsável pelo efeito anticatabólico do β_2 -agonista. De fato, o aumento do AMPc produzido pelo tratamento com inibidores não seletivos da PDE do AMPc bloqueou completamente a hiperexpressão da atrogina-1 induzida pela dexametasona em linhagens de células C₂C₁₂ (GONÇALVES et al., 2009). Estes mesmos autores demonstraram que a ativação dos β_2 -AR pelo tratamento *in vivo* com CB e o consequente aumento do AMPc resultam em inibição da atividade do sistema Ub-proteassoma e da expressão da atrogina-1 em músculo gastrocnêmio de camundongos jejuados (GONÇALVES et al., 2009). Em concordância com estes resultados, foi demonstrado que a expressão de atrogina-1 e

MuRF1, tanto basal como a induzida pela desnervação, é inibida por ativadores sintéticos da PKA *in vitro* (GONÇALVES et al., 2012). Em conjunto, esses resultados indicam que a via do AMPc/PKA participa da modulação inibitória do sistema Ub-proteassoma em situações basais e atroficas.

Foi também observado que, após sete dias de cirurgia, houve aumento da atividade da via do AMPc/PKA induzida pela própria DEN, sem efeito adicional evidente produzido pelo CB. Neste mesmo período foi observado diminuição da expressão de MuRF1 e atrogina-1 (**Fig. 9**), indicando que, independentemente do tratamento com CB, a DEN *per se* pode induzir aumento do AMPc. Resultados semelhantes foram descritos de forma isolada por outros autores que demonstraram que a DEN aumentava a atividade da adenilato ciclase e concomitante a atividade da PKA e do conteúdo de uma de suas subunidades regulatórias, a RI alfa em músculos gastrocnêmios de ratos (HOOVER et al., 2001; SUZUKI et al., 1998). Aventou-se, então, a possibilidade de que o aumento deste segundo mensageiro pudesse fazer parte de um mecanismo adaptativo muscular de hipersensibilidade às catecolaminas circulantes que pudesse levar à supressão dos atrogenes em períodos tardios da DEN. Esta hipótese foi baseada nas evidências anatômicas apresentadas nesse estudo de que fibras simpáticas noradrenérgicas trafegam ao longo do nervo ciático e que a DEN reduz o conteúdo de noradrenalina muscular. Além disso, um estudo recente de nosso laboratório demonstrou que a simpatectomia lombar (remoção seletiva dos gânglios simpáticos que inervam os músculos da pata posterior) aumentou a atividade enzimática da adenilato ciclase e o conteúdo do AMPc muscular e, em paralelo, diminuiu a atividade proteolítica do sistema Ub-proteassoma (SILVEIRA et al., 2014). Os experimentos realizados neste estudo com animais adrenodemedulados e desnervados indicam que a adrenalina plasmática pode ser a responsável por mediar as respostas

adaptativas induzidas pela DEN, uma vez que a remoção da medula da adrenal potencializou os efeitos da desnervação no conteúdo proteico de MuRF1 e atroquina-1. No entanto, experimentos adicionais precisam ser realizados para confirmar a hipótese da hipersensibilidade adrenérgica em resposta à secção do nervo motor.

5.2. Mecanismos subsinápticos envolvidos na ativação simpática das JNM

É bem estabelecido que a estimulação simpática pode ocorrer por meio da liberação de adrenalina no plasma pela medula da adrenal ou a partir da liberação de noradrenalina pelos neurônios catecolaminérgicos diretamente em tecidos-alvo (MASON, 1968). Porém, pouco se sabe acerca da real contribuição destes dois componentes simpáticos nos diferentes tecidos e, mais especificamente, no músculo esquelético (BARKER; SAITO, 1981; TADAKI et al., 1995). Poucos estudos relatam a presença da inervação direta das fibras musculares esqueléticas por fibras não mielinizadas, noradrenérgicas sugerindo que as ações simpáticas no músculo esquelético podem ser mediadas por mecanismos neurais (BARKER; SAITO, 1981). O presente estudo confirma estas observações prévias e mostra, convincentemente, que neurônios noradrenérgicos, identificados pela presença da enzima tirosina-hidroxilase, também fazem contato direto com AChR nas JNM. Embora o papel fisiológico desta inervação ainda permaneça completamente obscuro, diversos relatos na literatura demonstram que simpatomiméticos são capazes de aumentar a força de contração (BOWMAN; RAPER, 1967) e a liberação de ACh pelos neurônios motores (BUKHARAEVA; NIKOLSKY, 2002), indicando que a interação entre o sistema adrenérgico e colinérgico pode ser importante durante situações de “luta e fuga”.

Uma vez que o principal alvo da noradrenalina nas fibras musculares esqueléticas são os β_2 -AR (LYNCH; RYALL, 2008), avaliou-se a presença destes receptores nas fibras musculares e nas sinapses de músculos de camundongos em condições *in vivo*. Como esperado, foi observada por técnicas de imunohistoquímica uma alta densidade de β_2 -AR em secções longitudinais musculares, muito provavelmente presentes na região do sarcolema e na vasculatura muscular. Com a superexpressão de um biossensor molecular (β_2 -AR-sPep) produziu-se evidência adicional da presença de β_2 -AR pós-sinápticos na porção da JNM (**Fig. 13**). A imagem microscópica do músculo do camundongo anestesiado expressando β_2 -AR-sPep demonstrou que os β_2 -AR podem ser ativados pela estimulação elétrica do nervo ciático. Posteriormente, com um auxílio de um segundo biossensor para produção de AMPc especificamente na JNM foi demonstrado que a estimulação elétrica do nervo ciático levou a um aumento significativo no conteúdo de AMPc subsináptico. Este aumento é provavelmente mediado por fibras noradrenérgicas que trafegam ao longo do nervo motor (Fig. 14) uma vez que tanto a simpatectomia local induzida pela administração de 6-hidroxidopamina, bem como o tratamento com ICI-118551, um antagonista seletivo dos β_2 -AR reduziu o aumento na produção de AMPc induzido pela estimulação do nervo ciático. Em conjunto, estes resultados demonstram, pela primeira vez na literatura, que a presença de conexões simpáticas funcionais nas JNM são capazes de ativar os β_2 -AR e produzir AMPc.

5.3. Efeito do tratamento com CB no turnover dos AChR na JNM de músculos desnervados

Tendo em vista que a JNM possui β_2 -AR e o CB é capaz de atenuar a ativação dos dois principais sistemas proteolíticos no músculo esquelético, investigou-se o possível efeito benéfico da estimulação crônica dos β_2 -AR no *turnover* dos AChR em músculos desnervados. Esta ideia é consistente com a redução na taxa de degradação de AChR promovida pela inibição dos sistemas proteassomal ou lisossomal em cultura de células musculares (CHRISTIANSON; GREEN, 2004; LIBBY; BURSZTAJN; GOLDBERG, 1980). Além disso, camundongos nocautes para MuRF1 apresentam aumento da meia-vida dos AChR em músculos desnervados (RUDOLF et al., 2013).

Como indicado pelo experimento com ^{125}I -BGT, o tratamento com CB não alterou a cinética de meia-vida curta ou longa da população de AChR tanto em músculos innervados como em desnervados. Em estudos com diafragmas desnervados de ratos, os análogos de AMPc apenas diminuíram a taxa de degradação de receptores de meia-vida longa sem alterar aqueles de meia-vida curta (SHYNG; XU; SALPETER, 1991). Nossos resultados também mostram que a população de AChR de meia-vida curta em músculos desnervados aumentou substancialmente, sendo este um efeito bastante conhecido na literatura (AXELSSON; THESLEFF, 1959; HARTZELL; FAMBROUGH, 1972) e creditado à maior expressão da subunidade γ (fetal) em relação a subunidade ϵ presente em músculos adultos (MISSIAS et al., 1996; VILLARROEL; SAKMANN, 1996). Embora a relevância biológica da troca de subunidades ϵ/γ no músculo desnervado não possa ser explicada a nível molecular, sabe-se que todos os subtipos de AChR são essenciais para a função sináptica normal. Por exemplo, animais nocautes para subunidade γ morrem ao nascimento (TAKAHASHI et al., 2002), enquanto que

camundongos nocautes para subunidade ϵ morrem prematuramente devido à grave fraqueza muscular (WITZEMANN et al., 1996). Além disso, estudos prévios demonstraram que o gene que codifica a subunidade α do AChR apresenta região promotora responsiva à CREB (KANG et al., 2003), indicando que o aumento do conteúdo do AChR observado em músculos desnervados pode ser também resultado do aumento intrínseco da via de sinalização do AMPc/PKA.

Vale lembrar que embora nosso método de estudo com o ^{125}I -BGT permita determinar a cinética da meia-vida dos AChR *in vivo* (STRACK et al., 2011) e tenha a vantagem de investigar os músculos do mesmo animal durante todo o período experimental, o mesmo não é capaz de discriminar a população de AChR na membrana celular ou em compartimentos intracelulares. Isto se deve ao fato de que o receptor, para ser degradado, deve ser internalizado. Como a BGT é uma toxina de ligação irreversível, ela permanece acoplada ao receptor no interior da célula até ser clivada. Portanto, para confirmar ou não os resultados obtidos com este protocolo foram realizados experimentos de microscopia confocal *in vivo*.

Consistente com os efeitos da desnervação motora na hiperexpressão das subunidades do AChR, observou-se um aumento significativo de “novos” receptores nos músculos DEN, porém este aumento foi ainda mais evidente após o tratamento com CB. Resultados similares também foram observados nos músculos de animais com a mutação AChR- ϵ L269F. Por outro lado, observou-se aumento da expressão do RNAm para $\alpha 1$ -AChR nos músculos DEN tratados com CB. Este resultado está de acordo com o aumento da expressão do RNAm para as subunidades α -, β -, γ -, ϵ - e δ - AChR induzida pela forskolina (um ativador da adenilato ciclase), CPT-AMPc (um análogo do AMPc) ou isobutil-1-metilxantina (um inibidor não seletivo da PDE do AMPc) em cultura primária de músculo de ratos (Green et al. 1991; Chahine et al. 1993).

Corroborando estes dados, foi descrito que o isoproterenol, adrenalina ou noradrenalina produziram efeitos semelhantes nos conteúdos de AChR em cultura de miotubos sem alterar a taxa de degradação do receptor (BLOSSER, 1983). Considerando estes resultados e o fato de que indivíduos miastênicos, em geral, apresentam menor expressão do AChR (ENGEL et al., 2010) é possível sugerir que a eficácia da terapia simpatomimética neste grupo de pacientes não se deva à diminuição da degradação dos AChR, mas sim ao aumento da expressão deste receptor (LIEWLUCK; SELCEN; ENGEL, 2011).

O presente trabalho também demonstra que o número de vesícula endocíticas presentes nas JNM de músculos desnervados e tratados com CB foi diminuída em relação aos músculos DEN. Uma vez que LC3 e MuRF1 estão localizadas em vesículas endocíticas contendo o AChR e que a desnervação motora aumenta o número de vesículas sendo este efeito completamente inibido em animais nocautes para MuRF1 (KHAN et al., 2014), é possível sugerir que a diminuição do conteúdo de MuRF1 e LC3 (**Figs. 6-7**) produzida pelo tratamento crônico com CB em músculos desnervados também esteja relacionada com a diminuição do número de vesículas endocíticas na JNM promovida por este β -agonista.

Este conjunto de dados permitem sugerir que o tratamento *in vivo* com CB em músculos desnervados, através da via de sinalização do AMPc/PKA, aumenta a transcrição da subunidade α -AChR e reduz o número de vesículas endocíticas nas JNM aumentando a incorporação de receptores nas membranas sarcoplasmáticas.

5.4. Efeito da estimulação colinérgica no metabolismo de proteínas em músculos isolados de ratos

A função primária da neurotransmissão colinérgica em músculos esqueléticos é a geração da contração muscular, a qual possibilita a realização de movimentos e promove locomoção. Esta função está diretamente associada à manutenção da massa muscular uma vez que a perda da inervação motora ou a imobilização leva à atrofia devido à inatividade das fibras musculares. Para melhor compreender o papel da ACh no controle do metabolismo de proteínas em músculos esqueléticos, um dos objetivos desse trabalho foi investigar o efeito direto da estimulação colinérgica, através do uso do carbacol, na degradação total e na velocidade de síntese proteica em músculos *soleus* e EDL normais de ratos *in vitro*.

Foi observado que o carbacol aumentou de forma concentração-dependente a proteólise total em músculos *soleus* através da estimulação de receptores nicotínicos, uma vez que o antagonista deste receptor, D-tubocurarina, inibiu completamente a indução da proteólise promovida por este agonista colinérgico. Curiosamente, não houve alteração em nenhum dos parâmetros estudados em músculos EDL. Esta falta de resposta do músculo EDL ao carbacol é difícil de ser compreendida uma vez que, morfológicamente, a inervação colinérgica e a sinapse neuromuscular é mais vasta em EDL do que em músculos oxidativos como o *soleus* (PADYKULA; GAUTHIER, 1970; SCHIAFFINO; REGGIANI, 2011). Por outro lado, em músculos de contração rápida como o EDL há um maior conteúdo e atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) (SKETELJ et al., 1997), da bomba para Ca^{2+} , SERCA (SMITH et al., 2013) e o retículo sarcoplasmático mais desenvolvido que em músculos *soleus* (SCHIAFFINO;

MARGRETH, 1969) o que permite especular que a alta velocidade de remoção da estimulação colinérgica em músculos de EDL seja uma das explicações deste fenômeno (CHUA; DULHUNTY, 1988),

O efeito catabólico do carbacol foi associado a uma potente estimulação da proteólise dependente de Ca^{2+} sem alteração das atividades proteolíticas dos sistemas Ub-proteassoma e lisossomal. Considerando que a ação contrátil da ACh depende do aumento do Ca^{2+} intracelular no músculo é coerente observar ativação de um sistema proteolítico que dependa do aumento citosólico deste íon. De fato, Chen et al. (2007) demonstraram que miotubos C_2C_{12} incubados com carbacol apresentaram alta atividade das calpaínas e este efeito foi associado à maior dispersão dos aglomerados dos AChR. Além de promover aumento do Ca^{2+} , há evidências de que a ativação colinérgica possa reduzir o conteúdo intracelular do AMPc, um segundo mensageiro que está envolvido na inibição tônica do sistema proteolítico dependente de Ca^{2+} (Navegantes et al. 2001). Murad et al. (1962) demonstraram que a incubação de agonistas colinérgicos em células cardíacas foi capaz de inibir a atividade da adenilato ciclase e, conseqüentemente, a produção de AMPc. Além disso, Menezes-Rodrigues et al. (2013) demonstraram que o aumento do Ca^{2+} intracelular em diafragma de camundongos, como aquele produzido pela estimulação colinérgica, era responsável pela inibição das isoformas 5 e 6 da adenilato ciclase. Por outro lado, Garber, et al. (1978a;b) sugeriram que parte das ações catabólicas da ACh na musculatura estriada seja mediada pelo GMPc, o qual acredita-se regular positivamente diversas PDEs do AMPc (ZACCOLO; MOVSESIAN, 2007). Embora não haja evidências diretas de um possível papel catabólico do GMPc no controle do metabolismo proteico, Takimoto et al. (2005) observaram que o tratamento crônico com sildenafil, um inibidor da PDE do GMPc e AMPc, bloqueou a hipertrofia cardíaca induzida pela terapia simpatomimética em camundongos. Além disso, o

aumento de GMPc cardíaco diminuiu os níveis de fosforilação da AKT e ERK1/2 (TAKIMOTO et al., 2005), duas enzimas chaves no processo de síntese proteica (Bodine et al. 2001b; Haddad & Adams 2004) e que são, pelo menos parcialmente, responsáveis pelas ações anabólicas das catecolaminas em músculos esqueléticos (BAVIERA et al., 2010; SHI et al., 2009).

Em estudos prévios de nosso laboratório, foi demonstrado que parte do efeito anti-proteolítico das catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) em músculos *soleus* de ratos normais era mediado pela inibição da proteólise dependente de Ca^{2+} através de uma via dependente de AMPc sem alteração na atividade dos sistemas Ub-proteassoma e lisossomal. Em concordância com estes resultados, foi demonstrado neste estudo que a estimulação simpatomimética com o CB *in vitro* diminuiu a proteólise basal e bloqueou completamente o efeito proteolítico do carbachol em músculos *soleus*. Embora experimentos adicionais sejam necessários para elucidar os mecanismos intracelulares envolvidos na inibição da proteólise muscular induzida pelo CB em músculos co-incubados com carbachol, é possível sugerir que o aumento do AMPc produzido pelo β_2 -agonista possa ativar a PKA a qual é responsável por fosforilar proteínas presentes no retículo sarcoplasmático aumentando o influxo de Ca^{2+} para esta organela (SCHWARTZ et al., 1976) e diminuindo sua concentração no sarcoplasma. Além disso, o CB via AMPc/PKA poderia fosforilar a calpastatina (SALAMINO et al., 1994) e a calpaína (SHIRAHARA et al., 2002) aumentando e diminuindo suas atividades, respectivamente. Desta forma, estes resultados indicam que o aumento do Ca^{2+} e/ou a diminuição do conteúdo de AMPc pode ser um dos mecanismos pelo qual a estimulação colinérgica *in vitro* aumenta a degradação de proteínas dependente de Ca^{2+} em músculos *soleus* de ratos.

6. CONCLUSÃO

Considerando as evidências anteriores de experimentos realizados em nosso laboratório e os resultados obtidos neste trabalho, podemos sugerir que:

- a) O aumento do AMPc induzido pela estimulação dos receptores β_2 -AR no músculo esquelético e a consequente redução da expressão das E₃ ligases (atrofina-1 e MuRF-1) e dos genes autofágicos/lisossomais (catepsina L e LC3) é um dos mecanismos envolvidos na atenuação do catabolismo proteico induzido pelo CB em músculos desnervados;
- b) A ativação intrínseca da via de sinalização do AMPc/PKA e concomitantemente atenuação da expressão dos atrogenes durante períodos tardios de desnervação indicam a existência de um mecanismo adaptativo de controle da perda de massa muscular em músculos desnervados;
- c) A resposta adaptativa observada em músculos cronicamente desnervados parece ser mediada pela hipersensibilidade à adrenalina circulante, uma vez que a secção do nervo ciático produz diminuição do conteúdo de noradrenalina muscular e a ADMX potencializa o efeito da DEN na expressão dos atrogenes;
- d) Neurônios simpáticos estão associados a neurônios colinérgicos motores no nervo ciático e são capazes de ativar os β_2 -AR e a via de sinalização do AMPc na região da JNM;
- e) A ativação crônica dos β_2 -AR através do tratamento diário com CB é capaz de aumentar o *turnover* dos AChR em músculos inervados e

desnervados de camundongos normais e/ou miastênicos, por meio do aumento da sua síntese e incorporação nas JNM;

- f) Em situações *in vitro*, a estimulação dos AChR em músculos *soleus* normais de ratos produz ações catabólicas no metabolismo de proteínas através da diminuição da síntese e aumento da atividade proteolítica Ca^{2+} -dependente, sem nenhum efeito em músculos EDL nas condições testadas;
- g) A estimulação dos β_2 -AR *in vitro* é capaz de contra regular a ativação da proteólise induzida pelo carbacol, sugerindo que os sistemas simpático e colinérgico produzem ações antagônicas no metabolismo de proteínas em músculos esqueléticos.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, D. G. et al. Interactions between intracellular calcium and phosphate in intact mouse muscle during fatigue. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 111, n. 2, p. 358–366, 2011.

ANDREOSE, J. S.; FUMAGALLI, G.; LØMO, T. Number of junctional acetylcholine receptors: control by neural and muscular influences in the rat. **The Journal of physiology**, v. 483 (Pt 2, n. 8, p. 397–406, 1995.

AXELSSON, J.; THESLEFF, S. A study of supersensitivity in denervated mammalian skeletal muscle. **The Journal of physiology**, v. 147, n. 1, p. 178–193, 1959.

BARKER, D.; SAITO, M. Autonomic innervation of receptors and muscle fibres in cat skeletal muscle. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a Biological character. Royal Society (Great Britain)**, v. 212, n. 1188, p. 317–332, 1981.

BAVIERA, A. M. et al. Pentoxifylline inhibits Ca²⁺-dependent and ATP proteasome-dependent proteolysis in skeletal muscle from acutely diabetic rats. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 292, n. 3, p. E702–E708, 2007.

BAVIERA, A. M. et al. Involvement of cAMP/Epac/PI3K-dependent pathway in the antiproteolytic effect of epinephrine on rat skeletal muscle. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 315, n. 1-2, p. 104–112, 2010.

BECHET, D. et al. Lysosomal proteolysis in skeletal muscle. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, 2005.

BLOSSER, J. C. beta-Adrenergic receptor activation increases acetylcholine receptor number in cultured skeletal muscle myotubes. **Journal of neurochemistry**, v. 40, n. 4, p. 1144–1149, 1983.

- BLOUNT, P.; MERLIE, J. P. Molecular basis of the two nonequivalent ligand binding sites of the muscle nicotinic acetylcholine receptor. **Neuron**, v. 3, n. 3, p. 349–357, 1989.
- BODINE, S. C. et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. **Science (New York, N.Y.)**, v. 294, n. 5547, p. 1704–1708, 2001a.
- BODINE, S. C. et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. **Nature cell biology**, v. 3, n. 11, p. 1014–1019, 2001b.
- BOWMAN, W. C.; RAPER, C. Adrenotropic receptors in skeletal muscle. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 139, n. 3, p. 741–753, 1967.
- BUKHARAEVA, E.; NIKOLSKY, E. Effects of Noradrenaline on End-Plate Currents and the Kinetics of Transmitter Release under Long-Lasting Repetitive Stimulation. **Neurophysiology**, v. 34, p. 120–122, 2002.
- BUSQUETS, S. et al. Anticachectic effects of formoterol: A drug for potential treatment of muscle wasting. **Cancer Research**, v. 64, n. 18, p. 6725–6731, 2004.
- CHAHINE, K. G.; BARACCHINI, E.; GOLDMAN, D. Coupling muscle electrical activity to gene expression via a cAMP-dependent second messenger system. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 4, p. 2893–2898, 1993.
- CHEN, F. et al. Rapsyn Interaction with Calpain Stabilizes AChR Clusters at the Neuromuscular Junction. **Neuron**, v. 55, n. 2, p. 247–260, 2007.
- CHOI, K.-R. et al. Rapsyn mediates subsynaptic anchoring of PKA type I and stabilisation of acetylcholine receptor in vivo. 2012.
- CHRISTIANSON, J. C.; GREEN, W. N. Regulation of nicotinic receptor expression by the ubiquitin-proteasome system. **The EMBO journal**, v. 23, n. 21, p. 4156–4165, 2004.

CHUA, M.; DULHUNTY, A. F. Inactivation of excitation-contraction coupling in rat extensor digitorum longus and soleus muscles. **The Journal of general physiology**, v. 91, n. 5, p. 737–757, 1988.

CONG, J. et al. The role of autolysis in activity of the Ca^{2+} -dependent proteinases (α -calpain and m-calpain). **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 17, p. 10096–10103, 1989.

COSTELLI, P. et al. Muscle protein waste in tumor-bearing rats is effectively antagonized by a β_2 -adrenergic agonist (clenbuterol): Role of the ATP-ubiquitin-dependent proteolytic pathway. **Journal of Clinical Investigation**, v. 95, n. 5, p. 2367–2372, 1995.

ENGEL, A. G. et al. What have we learned from the congenital myasthenic syndromes. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 40, n. 1-2, p. 143-53, 2010.

FINLAYSON, S. et al. Slow channel congenital myasthenic syndrome responsive to a combination of fluoxetine and salbutamol. **Muscle and Nerve**, v. 47, n. 2, p. 279–282, 2013.

FINN, P. F.; DICE, J. F. Proteolytic and lipolytic responses to starvation. **Nutrition**, v. 22, n. 7-8, p. 830-44 2006.

GARBER, A. J.; ENTMAN, M. L.; BIRNBAUMER, L. Cholinergic stimulation of skeletal muscle alanine and glutamine formation and release. Evidence for mediation by a nicotinic cholinergic receptor and guanosine 3':5'-monophosphate. **Journal of Biological Chemistry**, v. 253, n. 21, p. 7924–7930, 1978.

GARBER, A. J.; HARARI, Y.; ENTMAN, M. L. Cholinergic stimulation of alanine and glutamine formation and release from skeletal muscle. **Journal of Biological Chemistry**, v. 253, n. 21, p. 7918–7923, 1978.

GARÓFALO, M. A. et al. Effect of acute cold exposure on norepinephrine turnover rates in rat white adipose tissue. **Journal of the autonomic nervous system**, v. 60, n. 3, p. 206–208, 1996.

GLICKMAN, M. H.; CIECHANOVER, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. **Physiological reviews**, v. 82, n. 2, p. 373–428, 2002.

GOMES, M. D. et al. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 25, p. 14440–14445, 2001.

GONÇALVES, D. A. P. et al. Mechanisms involved in 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-mediated inhibition of the ubiquitin-proteasome system in skeletal muscle. **Endocrinology**, v. 150, n. 12, p. 5395–5404, 2009.

GONÇALVES, D. A. P. et al. Clenbuterol suppresses proteasomal and lysosomal proteolysis and atrophy-related genes in denervated rat soleus muscles independently of Akt. **AJP: Endocrinology and Metabolism**, v. 302, n. 1, p. E123–E133, 2012.

GRAÇA, F. A. et al. Epinephrine depletion exacerbates the fasting-induced protein breakdown in fast-twitch skeletal muscles. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 305, n. 12, p. E1483–94, 2013.

GRADY, R. M. et al. Maturation and maintenance of the neuromuscular synapse: genetic evidence for roles of the dystrophin--glycoprotein complex. **Neuron**, v. 25, n. 2, p. 279–293, 2000.

GREEN, W. N.; ROSS, A. F.; CLAUDIO, T. cAMP stimulation of acetylcholine receptor expression is mediated through posttranslational mechanisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 3, p. 854–858, 1991.

GROSHONG, J. S. et al. Calpain activation impairs neuromuscular transmission in a mouse model of the slow-channel myasthenic syndrome. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 10, p. 2903–2912, 2007.

HADDAD, F.; ADAMS, G. R. Inhibition of MAP/ERK kinase prevents IGF-I-induced hypertrophy in rat muscles. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 96, n. 1, p. 203–210, 2004.

HALL, Z. W.; SANES, J. R. Synaptic structure and development: the neuromuscular junction. **Cell**, v. 72 Suppl, p. 99–121, 1993.

HARTZELL, H. C.; FAMBROUGH, D. M. Acetylcholine receptors. Distribution and extrajunctional density in rat diaphragm after denervation correlated with acetylcholine sensitivity. **The Journal of general physiology**, v. 60, n. 3, p. 248–262, 1972.

HOOVER, F. et al. Differential expression and regulation of the PKA signalling pathway in fast and slow skeletal muscle. **Anatomy and embryology**, v. 203, n. 3, p. 193–201, 2001.

HUEY, K. A.; BODINE, S. C. Changes in myosin mRNA and protein expression in denervated rat soleus and tibialis anterior. **European Journal of Biochemistry**, v. 256, n. 1, p. 45–50, 1998.

HUGANIR, R. L. et al. Phosphorylation of the nicotinic acetylcholine receptor regulates its rate of desensitization. **Nature**, v. 321, n. 6072, p. 774–776, 1986.

HUGANIR, R. L.; GREENGARD, P. cAMP-dependent protein kinase phosphorylates the nicotinic acetylcholine receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 80, n. 4, p. 1130–1134, 1983.

HYMAN, C.; FROEHNER, S. C. Degradation of acetylcholine receptors in muscle cells: Effect of leupeptin on turnover rate, intracellular pool sizes, and receptor properties. **Journal of Cell Biology**, v. 96, n. 5, p. 1316–1324, 1983.

JAGOE, R. T.; GOLDBERG, A. L. What do we really know about the ubiquitin-proteasome pathway in muscle atrophy? **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, v. 4, n. 3, p. 183–190, 2001.

JEFFERSON, L. S.; LI, J. B.; RANNELS, S. R. Regulation by insulin of amino acid release and protein turnover in the perfused rat hemicorpus. **The Journal of biological chemistry**, v. 252, n. 4, p. 1476–1483, 1977.

KANG, B. H. et al. Cyclic AMP-dependent protein kinase A and CREB are involved in neuregulin-induced synapse-specific expression of acetylcholine receptor gene. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 304, n. 4, p. 758–765, 2003.

KETTELHUT, I. C.; WING, S. S.; GOLDBERG, A. L. Endocrine regulation of protein breakdown in skeletal muscle. **Diabetes/metabolism reviews**, v. 4, n. 8, p. 751–772, 1988.

KHAN, M. M. et al. Role of autophagy, SQSTM1, SH3GLB1, and TRIM63 in the turnover of nicotinic acetylcholine receptors. **Autophagy**, v. 10, n. 1, p. 123–136, 2014.

KIM, Y. S. et al. Characterization of beta 1- and beta 2-adrenoceptors in rat skeletal muscles. **Biochemical pharmacology**, v. 42, n. 9, p. 1783–1789, 1991.

KIM, Y. S.; SAINZ, R. D. Beta-adrenergic agonists and hypertrophy of skeletal muscles. **Life sciences**, v. 50, n. 6, p. 397–407, 1992.

KRSTULOVIĆ, A. M. Investigations of catecholamine metabolism using high-performance liquid chromatography: analytical methodology and clinical applications. **Journal of chromatography**, v. 229, n. 1, p. 1–34, 1982.

LASHLEY, D. et al. Ephedrine treatment in congenital myasthenic syndrome due to mutations in DOK7(LOE Classification). **Neurology**, v. 74, n. 19, p. 1517–1523, 2010.

- LECKER, S. H. et al. Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. **The Journal of nutrition**, v. 129, n. 1S Suppl, p. 227S–237S, 1999.
- LIBBY, P.; BURSZTAJN, S.; GOLDBERG, A. L. Degradation of the acetylcholine receptor in cultured muscle cells: selective inhibitors and the fate of undegraded receptors. **Cell**, v. 19, n. 2, p. 481–491, 1980.
- LIEWLUCK, T.; SELCEN, D.; ENGEL, A. G. Beneficial effects of albuterol in congenital endplate acetylcholinesterase deficiency and dok-7 myasthenia. **Muscle and Nerve**, v. 44, n. 5, p. 789–794, 2011.
- LIRA, E. C. et al. Phosphodiesterase-4 inhibition reduces proteolysis and atrogenes expression in rat skeletal muscles. **Muscle and Nerve**, v. 44, n. 3, p. 371–381, 2011.
- LYNCH, G. S.; RYALL, J. G. Role of beta-adrenoceptor signaling in skeletal muscle: implications for muscle wasting and disease. **Physiological reviews**, v. 88, n. 2, p. 729–767, 2008.
- MALIK, R. U. et al. Detection of G protein-selective G protein-coupled receptor (GPCR) conformations in live cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 24, p. 17167–17178, 2013.
- MALTIN, C. A et al. The action of the beta-agonist clenbuterol on protein metabolism in innervated and denervated phasic muscles. **The Biochemical journal**, v. 261, n. 3, p. 965–971, 1989.
- MANTLE, D.; PREEDY, V. R. Adverse and beneficial functions of proteolytic enzymes in skeletal muscle. An overview. **Adverse drug reactions and toxicological reviews**, v. 21, n. 1-2, p. 31–49, 2002.

- MARTIN, W. H.; MURPHREE, S. S.; SAFFITZ, J. E. Beta-adrenergic receptor distribution among muscle fiber types and resistance arterioles of white, red, and intermediate skeletal muscle. **Circulation research**, v. 64, n. 6, p. 1096–1105, 1989.
- MASON, J. W. A review of psychoendocrine research on the sympathetic-adrenal medullary system. **Psychosomatic medicine**, v. 30, n. 5, p. Suppl:631–653, 1968.
- MATTHEWS-BELLINGER, J. A.; SALPETER, M. M. Fine structural distribution of acetylcholine receptors at developing mouse neuromuscular junctions. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 3, n. 3, p. 644–657, 1983.
- MEDINA, R.; WING, S. S.; GOLDBERG, A. L. Increase in levels of polyubiquitin and proteasome mRNA in skeletal muscle during starvation and denervation atrophy. **The Biochemical journal**, v. 307 (Pt 3, p. 631–637, 1995.
- MENEZES-RODRIGUES, F. S. et al. Calcium influx through L-type channels attenuates skeletal muscle contraction via inhibition of adenylyl cyclases. **European Journal of Pharmacology**, v. 720, n. 1-3, p. 326–334, 2013.
- MICHLER, A.; SAKMANN, B. Receptor stability and channel conversion in the subsynaptic membrane of the developing mammalian neuromuscular junction. **Developmental biology**, v. 80, n. 1, p. 1–17, 1980.
- MISSIAS, A. C. et al. Maturation of the acetylcholine receptor in skeletal muscle: regulation of the AChR gamma-to-epsilon switch. **Developmental biology**, v. 179, n. 1, p. 223–238, 1996.
- MORGAN, M. J.; LOUGHNA, P. T. Passive stretch modulates denervation induced alterations in skeletal muscle myosin heavy chain mRNA levels. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 439, n. 1-2, p. 52–55, 1999.

MORTIMORE, G. E. Mechanisms of cellular protein catabolism. **Nutrition Reviews**, v. 40, p. 1–12, 1982.

MURAD, F. et al. Adenyl cyclase. III. The effect of catecholamines and choline esters on the formation of adenosine 3',5'-phosphate by preparations from cardiac muscle and liver. **The Journal of biological chemistry**, v. 237, p. 1233–1238, 1962.

MURPHY, R. J. L. et al. Chronic β -blockade increases skeletal muscle β -adrenergic-receptor density and enhances contractile force. **Journal of Applied Physiology**, v. 83, n. 2, p. 459–465, 1997.

NAVEGANTES, L. C. et al. Effect of guanethidine-induced adrenergic blockade on the different proteolytic systems in rat skeletal muscle. **The American journal of physiology**, v. 277, n. 5 Pt 1, p. E883–E889, 1999.

NAVEGANTES, L. C. et al. Catecholamines inhibit Ca^{2+} -dependent proteolysis in rat skeletal muscle through β_2 -adrenoceptors and cAMP. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 281, n. 3, p. E449–E454, 2001.

NAVEGANTES, L. C. C. et al. Effect of sympathetic denervation on the rate of protein synthesis in rat skeletal muscle. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 286, n. 4, p. E642–E647, 2004.

NAVEGANTES, L. C. C.; BAVIERA, A M.; KETTELHUT, I. C. The inhibitory role of sympathetic nervous system in the Ca^{2+} -dependent proteolysis of skeletal muscle. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 42, n. 1, p. 21–8, 2009.

NAVEGANTES, L. C. C.; MIGLIORINI, R. H.; KETTELHUT, I. C. Adrenergic control of protein metabolism in skeletal muscle. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, v. 5, n. 3, p. 281–286, 2002.

NIKOLAEV, V. O. et al. Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 36, p. 37215–37218, 2004.

- PADYKULA, H. A.; GAUTHIER, G. F. The ultrastructure of the neuromuscular junctions of mammalian red, white, and intermediate skeletal muscle fibers. **Journal of Cell Biology**, v. 46, n. 1, p. 27–41, 1970.
- PALACE, J.; BEESON, D. The congenital myasthenic syndromes. **Journal of Neuroimmunology**, v. 201-202, n. C, p. 2–5, 2008.
- PARR, T. et al. Changes in calpain and calpastatin mRNA induced by beta-adrenergic stimulation of bovine skeletal muscle. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 208, n. 2, p. 333–339, 1992.
- RANNELS, D. E.; KAO, R.; MORGAN, H. E. Effect of insulin on protein turnover in heart muscle. **The Journal of biological chemistry**, v. 250, n. 5, p. 1694–1701, 1975.
- REYNOLDS, J. G. et al. Deregulated protein kinase A signaling and myospryn expression in muscular dystrophy. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 13, p. 8070–8074, 2008.
- RÖDER, I. V. et al. PKA microdomain organisation and cAMP handling in healthy and dystrophic muscle in vivo. **Cellular Signalling**, v. 21, n. 5, p. 819–826, 2009.
- RÖDER, I. V. et al. Participation of Myosin Va and Pka type I in the regeneration of neuromuscular junctions. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, 2012.
- RÖDER, I. V et al. Myosin Va cooperates with PKA RIalpha to mediate maintenance of the endplate in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 5, p. 2031–2036, 2010.
- RUDOLF, R. et al. Regulation of nicotinic acetylcholine receptor turnover by MuRF1 connects muscle activity to endo/lysosomal and atrophy pathways. **Age**, v. 35, n. 5, p. 1663–1674, 2013.

RYALL, J. G.; CHURCH, J. E.; LYNCH, G. S. Novel role for β -adrenergic signalling in skeletal muscle growth, development and regeneration. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, v. 37, n. 3, p. 397–401, 2010.

RYALL, J. G.; LYNCH, G. S. The potential and the pitfalls of beta-adrenoceptor agonists for the management of skeletal muscle wasting. **Pharmacology & therapeutics**, v. 120, n. 3, p. 219–232, 2008.

SACHECK, J. M. et al. Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic diseases. **The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 21, n. 1, p. 140–155, 2007.

SACHS, C.; JONSSON, G. Degeneration of central and peripheral noradrenaline neurons produced by 6-hydroxy-DOPA. **Journal of neurochemistry**, v. 19, n. 6, p. 1561–1575, 1972.

SALAMINO, F. et al. Modulation of calpastatin specificity in rat tissues by reversible phosphorylation and dephosphorylation. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 199, n. 3, p. 1326–1332, 1994.

SANDRI, M. New findings of lysosomal proteolysis in skeletal muscle. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, v. 14, n. 3, p. 223–229, 2011.

SCHARA, U. et al. Ephedrine therapy in eight patients with congenital myasthenic syndrome due to DOK7 mutations. **Neuromuscular disorders : NMD**, v. 19, n. 12, p. 828–832, 2009.

SCHIAFFINO, S.; MARGRETH, A. Coordinated development of the sarcoplasmic reticulum and T system during postnatal differentiation of rat skeletal muscle. **Journal of Cell Biology**, v. 41, n. 3, p. 855–875, 1969.

SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Fiber Types in Mammalian Skeletal Muscles. **Physiological Reviews**, v. 91, n. 4, p.1447-5312011.

SCHMALBRUCH, H. Fiber composition of the rat sciatic nerve. **The Anatomical record**, v. 215, n. 1, p. 71–81, 1986.

SCHMALBRUCH, H.; AL-AMOOD, W. S.; LEWIS, D. M. Morphology of long-term denervated rat soleus muscle and the effect of chronic electrical stimulation. **The Journal of physiology**, v. 441, p. 233–241, 1991.

SCHWARTZ, A et al. The rate of calcium uptake into sarcoplasmic reticulum of cardiac muscle and skeletal muscle. Effects of cyclic AMP-dependent protein kinase and phosphorylase b kinase. **Biochimica et biophysica acta**, v. 426, n. 1, p. 57–72, 1976.

SERDAROGLU, P.; ASKANAS, V.; ENGEL, W. K. Immunocytochemical localization of ubiquitin at human neuromuscular junctions. **Neuropathology and applied neurobiology**, v. 18, n. 3, p. 232–236, 1992.

SHI, H. et al. Mitogen-activated protein kinase signaling is necessary for the maintenance of skeletal muscle mass. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 296, n. 5, p. C1040–C1048, 2009.

SHIAO, T. et al. Defects in neuromuscular junction structure in dystrophic muscle are corrected by expression of a NOS transgene in dystrophin-deficient muscles, but not in muscles lacking ??- and ??1-syntrophins. **Human Molecular Genetics**, v. 13, n. 17, p. 1873–1884, 2004.

SHIRAHARA, H. et al. Activation of m-calpain (calpain II) by epidermal growth factor is limited by protein kinase A phosphorylation of m-calpain. **Molecular and cellular biology**, v. 22, n. 8, p. 2716–2727, 2002.

SHYNG, S. L.; SALPETER, M. M. Degradation rate of acetylcholine receptors inserted into denervated vertebrate neuromuscular junctions. **Journal of Cell Biology**, v. 108, n. 2, p. 647–651, 1989.

SHYNG, S. L.; XU, R.; SALPETER, M. M. Cyclic AMP stabilizes the degradation of original junctional acetylcholine receptors in denervated muscle. **Neuron**, v. 6, n. 3, p. 469–475, 1991.

SILVEIRA, W. A et al. Activating cAMP/PKA signaling in skeletal muscle suppresses the ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis: implications for sympathetic regulation. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 117, n. 1, p. 11–9, 2014.

SKETELJ, J. et al. Specific impulse patterns regulate acetylcholinesterase activity in skeletal muscles of rats and rabbits. **Journal of neuroscience research**, v. 47, n. 1, p. 49–57, 1997.

SMITH, I. C. et al. ATP Consumption by Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Pumps Accounts for 40-50% of Resting Metabolic Rate in Mouse Fast and Slow Twitch Skeletal Muscle. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, 2013.

SPENCER, M. J.; CROALL, D. E.; TIDBALL, J. G. Calpains are activated in necrotic fibers from mdx dystrophic mice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 18, p. 10909–10914, 1995.

STRACK, S. et al. A novel labeling approach identifies three stability levels of acetylcholine receptors in the mouse neuromuscular junction in vivo. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, 2011.

SUZUKI, Y. et al. Expression of adenylyl cyclase mRNAs in the denervated and in the developing mouse skeletal muscle. **The American journal of physiology**, v. 274, n. 6 Pt 1, p. C1674–C1685, 1998.

- TADAKI, N. et al. Neurotransmitters for the canine inferior pharyngeal constrictor muscle. **Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery**, v. 113, n. 6, p. 755–759, 1995.
- TAKAHASHI, M. et al. Spontaneous muscle action potentials fail to develop without fetal-type acetylcholine receptors. **EMBO Reports**, v. 3, n. 7, p. 674–681, 2002.
- TAKIMOTO, E. et al. Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophy. **Nature medicine**, v. 11, n. 2, p. 214–222, 2005.
- TANK, D. W. et al. Patch-recorded single-channel currents of the purified and reconstituted Torpedo acetylcholine receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 80, n. 16, p. 5129–5133, 1983.
- THOENEN, H.; TRANZER, J. P. Chemical sympathectomy by selective destruction of adrenergic nerve endings with 6-hydroxydopamine. **Naunyn-Schmiedebergs Archiv für Pharmakologie und Experimentelle Pathologie**, v. 261, n. 3, p. 271–288, 1968.
- VILLARROEL, A.; SAKMANN, B. Calcium permeability increase of endplate channels in rat muscle during postnatal development. **The Journal of physiology**, v. 496 (Pt 2, p. 331–338, 1996.
- WAALKES, T. P.; UDENFRIEND, S. A fluorometric method for the estimation of tyrosine in plasma and tissues. **The Journal of laboratory and clinical medicine**, v. 50, n. 5, p. 733–736, 1957.
- WILLIAMS, R. S.; CARON, M. G.; DANIEL, K. Skeletal muscle beta-adrenergic receptors: variations due to fiber type and training. **The American journal of physiology**, v. 246, n. 2 Pt 1, p. E160–E167, 1984.
- WITZEMANN, V. et al. Acetylcholine receptor epsilon-subunit deletion causes muscle weakness and atrophy in juvenile and adult mice. **Proceedings of the National**

Academy of Sciences of the United States of America, v. 93, n. 23, p. 13286–13291, 1996.

XU, R.; SALPETER, M. M. Protein kinase A regulates the degradation rate of Rs acetylcholine receptors. **Journal of cellular physiology**, v. 165, n. 1, p. 30–39, 1995.

XU, R.; SALPETER, M. M. Acetylcholine receptors in innervated muscles of dystrophic mdx mice degrade as after denervation. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 17, n. 21, p. 8194–8200, 1997.

YIMLAMAI, T. et al. Clenbuterol induces muscle-specific attenuation of atrophy through effects on the ubiquitin-proteasome pathway. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 99, n. 1, p. 71–80, 2005.

ZACCOLO, M.; MOVSESIAN, M. A. cAMP and cGMP signaling cross-talk: Role of phosphodiesterases and implications for cardiac pathophysiology. **Circulation Research**, v. 100, n.11, p.1569-78, 2007.

Alterations of cAMP-dependent signaling in dystrophic skeletal muscle

Rüdiger Rudolf^{1,2*}, Muzamil M. Khan², Danilo Lustrino³, Siegfried Labeit⁴, Ísis C. Kettelhut³ and Luiz C. C. Navegantes³

¹ Institute of Molecular and Cell Biology, University of Applied Sciences Mannheim, Mannheim, Germany

² Institute of Toxicology and Genetics, Karlsruhe Institute of Technology, Eggenstein-Leopoldshafen, Germany

³ Departments of Physiology and Biochemistry and Immunology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

⁴ Department of Integrative Pathophysiology, Universitätsmedizin Mannheim, Mannheim, Germany

Edited by:

Rasna Sabharwal, University of Iowa, USA

Reviewed by:

Yutang Wang, James Cook

University, Australia

Abdu Adem, United Arab Emirates

University, United Arab Emirates

*Correspondence:

Rüdiger Rudolf, Institute of Molecular and Cell Biology, University of Applied Sciences Mannheim, Paul-Wittsack-Strasse 10, 68163 Mannheim, Mannheim, Germany
e-mail: r.rudolf@hs-mannheim.de

Autonomic regulation processes in striated muscles are largely mediated by cAMP/PKA-signaling. In order to achieve specificity of signaling its spatial-temporal compartmentation plays a critical role. We discuss here how specificity of cAMP/PKA-signaling can be achieved in skeletal muscle by spatio-temporal compartmentation. While a microdomain containing PKA type I in the region of the neuromuscular junction (NMJ) is important for postsynaptic, activity-dependent stabilization of the nicotinic acetylcholine receptor (AChR), PKA type I and II microdomains in the sarcomeric part of skeletal muscle are likely to play different roles, including the regulation of muscle homeostasis. These microdomains are due to specific A-kinase anchoring proteins, like rapsyn and myospryn. Importantly, recent evidence indicates that compartmentation of the cAMP/PKA-dependent signaling pathway and pharmacological activation of cAMP production are aberrant in different skeletal muscles disorders. Thus, we discuss here their potential as targets for palliative treatment of certain forms of dystrophy and myasthenia. Under physiological conditions, the neuropeptide, α -calcitonin-related peptide, as well as catecholamines are the most-mentioned natural triggers for activating cAMP/PKA signaling in skeletal muscle. While the precise domains and functions of these first messengers are still under investigation, agonists of β_2 -adrenoceptors clearly exhibit anabolic activity under normal conditions and reduce protein degradation during atrophic periods. Past and recent studies suggest direct sympathetic innervation of skeletal muscle fibers. In summary, the organization and roles of cAMP-dependent signaling in skeletal muscle are increasingly understood, revealing crucial functions in processes like nerve-muscle interaction and muscle trophicity.

Keywords: adrenoceptors, AKAP, endplate, dystrophy, PKA, metabolism, neuromuscular junction, skeletal muscle

INTRODUCTION

A variety of hormones and other first messengers employ cAMP-dependent signal transduction to exert their effects (Beavo and Brunton, 2002). Sympathetic activation of adrenergic receptors (or adrenoceptors) by catecholamines is the classical paradigm in this context. In skeletal muscle, catecholamines regulate many physiological functions, including force production (Oliver and Schäfer, 1895; Arreola et al., 1987; Cairns and Dulhunty, 1993a,b; Decostre et al., 2000), blood flow (Marshall, 1982; Saltin et al., 1998; Joyner and Casey, 2009), and metabolism (Gross et al., 1976; Navegantes et al., 2000, 2002). These effects might be mediated through endocrine delivery of epinephrine from the adrenal medulla, but adrenergic nerve terminals make also close contact with striated muscle fibers (Barker and Saito, 1981; Tadaki et al., 1995), suggesting direct release of norepinephrine onto muscle fibers in a neurotransmitter-like or paracrine fashion as it occurs at the heart (Zaglia et al., 2013). However, these aspects of adrenergic signaling on skeletal muscle are far from being established and are currently under investigation (see also below).

In skeletal muscle, catecholamines stimulate primarily β_2 -adrenergic receptors (β_2 -ARs). These are G protein-coupled receptors (GPCRs), which mostly couple to G_{α_s} and thus activate adenylyl cyclase (AC) (Liggett and Raymond, 1993), leading to an increase in cAMP levels, activation of cAMP-dependent protein kinase (PKA) and cAMP response element-binding protein (CREB) (Beavo and Brunton, 2002; Altarejos and Montminy, 2011). In parallel, cAMP signals through the “exchange protein activated directly by cAMP” (Epac) (Bos, 2003), and it regulates cyclic-nucleotide gated (CNGs) channels (Beavo and Brunton, 2002). The attenuation of cAMP effects is coordinated by the activation of cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs), which are classified into 11 major families (PDE1-11) (Bloom, 2002; Omori and Kotera, 2007). In skeletal muscle, PDE4 appears to contribute to the majority of cAMP hydrolysis, accounting for more than 80% of the total PDE activity in this tissue (Bloom, 2002). Notably, a couple of different cAMP-regulating GPCRs are typically co-expressed in one and the same cell raising the evident issue of how the small inconspicuous molecule, cAMP, can

trigger specific responses upon activation of a certain GPCR. This is also true for striated muscle where a plethora of physiological functions are subject to cAMP-dependent signaling. For skeletal muscle, Berdeaux and Stewart have recently reviewed the different functions of this pathway very nicely (Berdeaux and Stewart, 2012). Furthermore, lists of GPCRs (albeit likely not complete) expressed in heart and skeletal muscles can be found in reviews from Tang (Tang and Insel, 2004) and Jean-Baptiste (Jean-Baptiste et al., 2005), respectively. So, how is specificity gained in cAMP-dependent signaling pathways? The strongest current line of evidence supports a microdomain hypothesis, wherein spatial and temporal segregation of local rises of cAMP plus scaffolding of essential downstream effectors and targets of cAMP play pivotal roles (Steinberg and Brunton, 2001; Zaccolo et al., 2002; Zaccolo, 2011; Edwards et al., 2012). Central players in this scenario are variability of PKA isoforms, A kinase-anchoring proteins (AKAPs), and PDEs. In its inactive state, PKA is comprised of four subunits, i.e., two regulatory (PKA-R) and two catalytic subunits (PKA-C) (Taylor et al., 2008). Upon binding of cAMP to regulatory subunits, catalytic subunits are activated and detach from regulatory subunits in order to phosphorylate targets. In mammals, four isoforms of PKA-R are present, named as type I α , I β , II α , II β . While PDEs impair cAMP from spreading all over the cell through hydrolysis of the second messenger (Conti and Beavo, 2007; Francis et al., 2011), AKAPs serve as scaffolds integrating and anchoring many relevant partners of a GPCR-linked signaling pathway (Scott et al., 2013). Indeed, AKAPs not only bind to PKA (hence their name) but often also to GPCRs, ACs, PDEs, protein phosphatases, and target molecules (Edwards et al., 2012). Thereby, they integrate entire signaling complexes and guarantee high efficiency and fidelity of signal transduction. AKAPs belong to a large heterogeneous group of proteins, which do not share sequence homology but a set of functional properties. They typically exhibit a subcellular targeting domain, interaction domains with other components of signal pathways, and an amphipathic α -helical domain that serves as interaction terminal with PKA-R (Scott et al., 2013). Indeed, the PKA-R expose an N-terminal stretch called dimerization/docking- (D/D-) domain that combines with the AKAP α -helical parts at varying intensities and specificities. A typical and widely used means to test the functional impact of AKAP-PKA interaction is by introducing “AKAP disruptor peptides” which mimic the AKAP interaction domain and thereby release PKA-R from its normal microdomain (Scott et al., 2013). In summary, a large part of cAMP-dependent signaling specificity appears to arise from the interplay between PDEs and AKAPs and is sometimes subsumed under the term “PKA microdomain hypothesis,” recently described in depth in a couple of excellent reviews (Zaccolo, 2011; Edwards et al., 2012; Scott et al., 2013). The present contribution first addresses, how the “PKA microdomain hypothesis” applies to skeletal muscle and what are potential links to skeletal muscle diseases. In a second part, we review the current knowledge on how catecholamines regulate muscle trophicity.

PKA MICRODOMAINS IN SKELETAL MUSCLE

Investigations dealing with the PKA microdomain hypothesis usually address differential distribution patterns of distinct

PKA-R isoforms. Owing to its highly regular striated patterning of sarcomeres, the contractile units of striated muscle, this tissue is particularly amenable to investigating the distribution of PKA-R isoforms relative to sarcomeric marker proteins. Another region of interest is the nerve-muscle synapse, termed as endplate or neuromuscular junction (NMJ), which instructs the rest of the muscle fiber to contract upon stimulation. For both parts there is now information concerning PKA-R distribution, alterations in diseased muscle, as well as causes underlying and consequences of these alterations. In the following we will describe the current state of knowledge regarding these points.

SUBSYNAPTIC PKA MICRODOMAINS

The NMJ is the synapse between motoneuron and muscle fiber and as such exerts the control over skeletal muscle contraction. The latter is triggered upon release of the neurotransmitter, acetylcholine, which activates postsynaptic nicotinic acetylcholine receptors (AChR) leading to an endplate potential and ultimately to muscle contraction. Notably, AChR reaches extremely high densities at the postsynaptic membrane of about 10,000 molecules per square micron and under normal conditions AChRs are metabolically very stable with a half-life of about 13 days (Fambrough, 1979). Principal functions attributed to cAMP/PKA-dependent signaling at the NMJ are synapse stabilization and the metabolic control of AChR stability and function (Li et al., 2001; Lanuza et al., 2002; Li et al., 2002; Nelson et al., 2003). *In situ* hybridization showed a peculiar accumulation of PKA-R I α transcripts in the NMJ region (Imaizumi-Scherrer et al., 1996) and immunohistochemical analyses found both, PKA-R I α and PKA-R II α to be enriched close to the postsynaptic membrane (Perkins et al., 2001). However, different studies using fusions of different PKA-R D/D-domains with fluorescent proteins only revealed PKA-R I α but not PKA-R II α in numerous punctiform structures just beneath the postsynaptic membrane (Barradeau et al., 2001, 2002; Röder et al., 2010; Choi et al., 2012). What do these puncta represent? The involvement of PKA signaling in AChR stabilization suggested them to be intracellular AChR carriers. As bona fide transmembrane proteins, the subunits of the pentameric AChR are generated and assembled in the endoplasmic reticulum, from where they are routed over the Golgi apparatus to the plasma membrane (Marchand et al., 2000, 2002; Marchand and Cartaud, 2002; Wanamaker and Green, 2005, 2007). Using different elegant labeling approaches with the highly AChR-selective snake venom, α -bungarotoxin, Engel et al. showed by electron microscopy that AChR is endocytosed in membrane-bound carriers (Engel et al., 1977; Fumagalli et al., 1982) and several groups established an activity-dependent metabolic stabilization of AChR (Fambrough, 1979; Levitt et al., 1980; Loring and Salpeter, 1980; Levitt and Salpeter, 1981; Stanley and Drachman, 1981, 1983; Salpeter and Loring, 1985; Shyng et al., 1991; Xu and Salpeter, 1997, 1999). Next, Akaaboune et al. demonstrated that AChR is recycled to the postsynaptic membrane in an activity-dependent manner (Akaaboune et al., 1999; Bruneau et al., 2005; Bruneau and Akaaboune, 2006). At this point a large part of the lifecycle of AChRs was described phenomenologically. However, amongst other open questions it remained unclear, what molecules underlie the regulatory

decision-making (e.g., dwell at postsynaptic membrane vs. endocytosis; recycle vs. degrade) and which machinery would support these processes. Most knowledge was gathered regarding the clustering of AChRs at the membrane, which is mediated by the release of neuronal agrin (Nitkin et al., 1987), binding of agrin to the MuSK co-receptor, LRP4, and activation of the receptor-tyrosine kinase MuSK (Kim et al., 2008; Zhang et al., 2008; Zong et al., 2012; Burden et al., 2013; Hubbard and Gnanasambandan, 2013). This then triggers AChR clustering by a yet ill-defined mechanism, which involves the receptor-associated protein of the synapse, rapsyn (Gillespie et al., 1996; Apel et al., 1997; Glass and Yancopoulos, 1997; Ruegg and Bixby, 1998; Fuhrer et al., 1999; Gautam et al., 1999).

As for the metabolic stabilization of AChRs different lines of evidence indicate the involvement of the neuropeptide, α -calcitonin-gene related peptide (α CGRP), and of cAMP/PKA-dependent pathways (Poyner, 1992). α CGRP was found to raise postsynaptic cAMP levels in the PKA-RI α microdomain (Röder et al., 2010) and to rapidly phosphorylate the α - and δ -subunit of AChR (Miles et al., 1987, 1989). Furthermore, α CGRP treatment changed the electrophysiological characteristics of AChR (Mulle et al., 1988) and it rescued denervation-induced fragmentation of NMJs (Röder et al., 2010). Furthermore, α CGRP was described to counteract PKC-induced destabilization of AChRs (Li et al., 2001, 2002) and to stimulate AChR gene expression (New and Mudge, 1986; Fontaine et al., 1987) as well as synaptic strength (Lu et al., 1993). Experiments using AKAP disruptor peptides suggested that the proper localization of PKA-RI α on the aforementioned subsynaptic puncta is essential for AChR stabilization (Röder et al., 2010) and *in vivo* imaging and biochemical assays revealed that many of these structures indeed contain endocytosed AChR (Röder et al., 2010). Altogether these findings suggest that the PKA-RI α positive puncta represent α CGRP-sensitive PKA microdomains on endocytic carriers containing AChR. The actin-dependent motor protein, myosin Va, was found to be crucial for tethering these carriers in close proximity to the NMJ (Röder et al., 2010) (for schematic, see Figure 1), but which is the AKAP used for anchoring PKA-RI α to the AChR-laden carriers? Previous reports suggested D-AKAP1 (Barradeau et al., 2001, 2002; Perkins et al., 2001) as a candidate. However, this was purely based on the general enrichment of this protein underneath the NMJ. A recent study followed another rationale and looked for a protein that would (1) target to AChR, (2) exhibit an AKAP-typical α -helical coiled-coil domain and (3) have interaction domains with other signaling components, and, based on these pre-requisites, tested the hypothesis that rapsyn serves as AKAP at this place. Rapsyn is a 43 kDa protein, that was originally co-purified with AChR from Torpedo electroplax and that quantitatively and strongly interacts with AChR (Sobel et al., 1977; Neubig et al., 1979; Porter and Froehner, 1985; Froehner, 1993). From N- to C-terminus, rapsyn contains a myristoylation site, seven tetratricopeptide repeats, an amphipathic α -helical region, a RING-domain, and PKA- and PKC-phosphorylation consensus sites (Ramarao and Cohen, 1998; Ramarao et al., 2001). Notably, full-length rapsyn but not rapsyn lacking its α -helical domain co-precipitated with PKA-RI α (Choi et al., 2012). *In silico* modeling identified functional sequence homology of that

region with PKA-interaction domains of different AKAPs, and rapsyn interacted with PKA-RI α in a bimolecular fluorescence complementation assay both, in cells and *in vivo* (here in subsynaptic puncta) (Choi et al., 2012). Finally, over-expression of a peptide derived from the rapsyn α -helical coiled-coil domain displaced PKA-RI α from the NMJ puncta and severely impaired AChR stability (Choi et al., 2012), strongly arguing for rapsyn as the AKAP responsible for linking PKA-RI α to the subsynaptic PKA microdomain (for schematic, see Figure 1).

NMJ structure and stability of AChR strongly suffer in muscles from the *mdx* mouse model for Duchenne muscular dystrophy (DMD) (Torres and Duchon, 1987; Lyons and Slater, 1991; Xu and Salpeter, 1997; Grady et al., 2000; Shiao et al., 2004), in which cAMP signaling is aberrant (Reynolds et al., 2008). That does, of course, not mean that the altered signaling is the underlying cause for the NMJ phenomena, but the typical subsynaptic enrichment of PKA-RI α was lacking in about half of all fibers in *mdx* muscles, microdomain specificity to different GPCR agonists was subverted, and AChR turnover was inversely correlated with PKA-RI α accumulation beneath the NMJ (Röder et al., 2012). Altogether this set of data suggests a link between defect subsynaptic microdomain formation of PKA-RI α in dystrophic muscles and the observed alterations in NMJ morphology and

AChR stability. In general, the concept of an AChR stabilizing role of cAMP was also tested in the context of another devastating group of muscle diseases, i.e., congenital myasthenic syndromes (CMS). These are rare genetic diseases that affect either pre- or postsynaptic components of the NMJ and lead to impaired neuromuscular transmission and muscle weakness (Palace and Beeson, 2008). Many forms of CMS also present low levels of AChR at the NMJ. Although the underlying mechanisms for that might differ between distinct mutations, the finding that sympathomimetic substances, such as ephedrine and salbutamol, can significantly improve these patients' symptoms (Edgeworth, 1930; Schara et al., 2009; Lashley et al., 2010; Liewluck et al., 2011; Finlayson et al., 2013), suggests an involvement of catecholamines in AChR turnover. Since ephedrine and salbutamol both can activate β_2 -ARs and thus affect cAMP production, this could point to a possible role of cAMP in stabilizing AChR and/or leading to higher AChR expression. Certainly, further research is needed to better understand these effects.

PKA MICRODOMAINS AT THE SARCOMERIC REGION

Sarcomeric PKA microdomain organization was addressed either by immunohistochemical staining of PKA-R isoforms (Perkins et al., 2001) or by expression studies using fluorescent protein-labeled Epac-based cAMP biosensors (Nikolaev et al., 2004) targeted to PKA microdomains by virtue of D/D domains (Di Benedetto et al., 2008) specific for either PKA-RI α (RI α -EPAC-camps) or PKA-RII α (RII α -EPAC-camps) (Röder et al., 2009). Both approaches yielded essentially identical results (for schematic, see **Figure 2**). While PKA-RI α was found in a broad band overlapping with the sarcomeric actin filaments, PKA-RII α exhibited highly confined striated localization that coincided with both, the m-band and the z-line. Experiments using over-expression of AKAP disruptor peptides showed that this peculiar distribution pattern is largely based on AKAP-dependent subcellular targeting (Röder et al., 2009). Harnessing the cAMP-sensor domain of the EPAC-camps biosensors furthermore showed a

differential sensitivity of the two microdomains. While the cAMP concentration in the RI α -microdomain was elevated in the presence of the agonist, α CGRP, the RII α -microdomain responded to norepinephrine with increased cAMP levels (Röder et al., 2009). Both effects were ablated by AKAP disruptor peptides (Röder et al., 2009). These data demonstrate that the sarcomeric region of skeletal muscle exhibits clearly defined and functionally distinct PKA microdomains, which are organized by specific AKAPs. At present, it is unclear which AKAP(s) mediate the anchoring of PKA-RI α and PKA-RII α to the different domains in the sarcomeric region but one eminent protein, myospryn, is certainly carrying out a part of this function. This 449 kDa heavy protein with the official gene name CMYA5 (cardiomyopathy-associated 5) was identified by expression profiling of a cardiac muscle library and has since been found to interact specifically with PKA-RII α but not (or hardly) with the other PKA-R isoforms (Reynolds et al., 2007). Intriguingly, endogenous myospryn localization in the sarcomere exhibited the expected m- and z-line expression pattern fitting to PKA-RII α distribution (Reynolds et al., 2007) while in another study myospryn showed only faint m-line and strong I-band distribution (Sarparanta et al., 2010). Whether this could indicate natural variability or be due to other factors is unclear, but myospryn is now widely considered to be an important determinant for PKA microdomain formation in skeletal and heart muscle. In the recent past, more and more proteins were found to interact with myospryn, including the structural proteins α -actinin (Durham et al., 2006), desmin (Kouloumenta et al., 2007), dystrophin (Reynolds et al., 2008), and titin (Sarparanta et al., 2010), as well as proteolytic enzymes such as the muscle-specific protease, calpain 3 (Sarparanta et al., 2010), and the protein phosphatase calcineurin (Kielbasa et al., 2011). Notably, these proteins all play important roles in muscle integrity and metabolic adaptations suggesting a mediator role of myospryn in these processes (Sarparanta, 2008). This is corroborated by feedback loops: Expression of myospryn is modulated by the cAMP-dependent CREB pathway, and it is known to be a direct target of the myocyte enhancer factor MEF2A (Durham et al., 2006). Furthermore, absence or malfunction of myospryn is observed in a couple of muscle diseases including tibial and limb-girdle muscular dystrophies (TMD and LGMD2J, respectively) (Sarparanta et al., 2010) as well as the most abundant and severe form of muscular dystrophies, i.e., DMD (Reynolds et al., 2008). Notably, in the DMD mouse model, *mdx*, myospryn showed altered subcellular distribution and specific PKA activity was strongly reduced (Reynolds et al., 2008). This also fits to another study, where PKA-RI α distribution in the sarcomeres was altered and, in particular, the microdomain selectivity to respond to the specific agonists, norepinephrine and α CGRP, was completely subverted (Röder et al., 2009). In summary, although the precise function of cAMP microdomain organization in skeletal muscle sarcomeres is still elusive, there are correlations between aberrant cAMP signaling and severe muscle diseases. Based on this rationale, urocortins were tested as therapeutics against muscular dystrophy (Hinkle et al., 2007; Reutenauer-Patte et al., 2012). Urocortins are neuropeptides that bind to the GPCRs, corticotropin-releasing factor (CRF) receptors (CRFR), of which CRF $_2$ R is highly abundant in skeletal muscle. Notably, in

dystrophic *mdx* mice treatment with urocortins significantly ameliorated a set of symptoms, ranging from fiber necrosis to muscle function. Possible mechanisms of action might include cAMP-induced activation of PKA and Epac, which in turn may address altered Ca^{2+} handling in skeletal muscle fibers (Reutenauer-Patte et al., 2012).

MECHANISMS OF cAMP-INDUCED EFFECTS ON SKELETAL MUSCLE PROTEIN METABOLISM

Skeletal muscle constitutes about 40–60% of our body masses. It is, thus, not only driving locomotion but also represents a major metabolic organ due to its enormous energy expenditure, its capability to take up glucose in an insulin-dependent manner, and its role as amino acid-source during catabolic conditions (Sandri, 2008; Glass, 2010). All these functions are intimately linked to the sarcomeres, which constitute the vast excess of skeletal muscle tissue. GPCR- and cAMP-mediated signaling can act on different time scales, ranging from the seconds to days range, correlating to either direct activation of targets (e.g., by PKA-dependent phosphorylation) or to changes in transcriptional profiles (e.g., by modulation of CREB activity). In contrast to their catabolic effects on lipids and carbohydrate metabolism, catecholamines exert an anabolic effect on skeletal muscle protein metabolism (Navegantes et al., 2002). This effect is mediated by β_2 -ARs and involves cAMP signaling (Navegantes et al., 2000, 2002). Numerous studies have shown that β_2 -adrenergic agonists, such as clenbuterol (“older” generation) and formoterol (“newer” generation), induce hypertrophy of skeletal muscle in rodents, large animals and humans (Lynch and Ryall, 2008). β -agonist-induced hypertrophy seems to be specific for striated muscle, since smooth muscles do not increase in size in response to these agents (Reeds et al., 1986) and β_2 -adrenergic agonists inhibit smooth muscle cell proliferation (Southgate and Newby, 1990; Tomlinson et al., 1994; Indolfi et al., 1997). Experiments conducted in β_2 -AR^{-/-} mice (Hinkle et al., 2002) have convincingly shown that β_2 -AR is responsible for this anabolic effect. Indeed, β_2 -AR^{-/-} mice display decreased cross-sectional area of type I and IIA fibers compared with age-matched wildtype mice (Bacurau et al., 2009), an effect that is associated with lower muscle cAMP levels (Gonçalves et al., 2009).

The molecular mechanisms by which cAMP signaling induces growth and muscle-sparing responses are uncertain and may involve an increase in the rate of protein synthesis and/or a decrease in protein degradation (Navegantes et al., 2002; Lynch and Ryall, 2008). A large body of evidence indicates that the *in vivo* effects of cAMP-inducing agents are in part due to inhibition of muscle proteolysis (Figure 3). Indeed, both chemical and surgical sympathectomy in fed rats lead to an increase in the activity of the Ca^{2+} -dependent proteolytic system, which suggests the existence of an adrenergic tonus on skeletal muscle that keeps this pathway inhibited under normal conditions (Navegantes et al., 1999, 2001). Accordingly, the administration of β_2 -adrenergic agonists is accompanied by a reduction in calpain 1 activity and an increase in the activity of calpastatin, an endogenous inhibitor of calpains (Bardsley et al., 1992; Parr et al., 1992). More recently, it has been demonstrated that β_2 -adrenergic agonists might attenuate muscle atrophy through inhibitory effects on the ubiquitin-proteasome system, the main

FIGURE 3 | Hypothetical model of the mechanisms involved with the inhibition of the Ca^{2+} -dependent and Ubiquitin-proteasome proteolytic systems in skeletal muscle by catecholamines and β_2 -agonists. AC, adenylate cyclase; CREB, cAMP response element binding protein; IBMX, isobutylmethylxanthine; PKA*, activated PKA; PTX, pentoxifylline; ?, unknown effect.

intracellular pathway for protein degradation in skeletal muscle (Yimlamai et al., 2005; Gonçalves et al., 2012). This effect is mediated through a cAMP/Akt-dependent pathway (Kline et al., 2007; Gonçalves et al., 2009, 2012), which leads to the phosphorylation of Foxo3a and, consequently, the suppression of atrogen-1/MAFbx and MuRF1, two ubiquitin E3-ligases involved in muscle atrophy (Bodine et al., 2001; Centner et al., 2001; Lecker et al., 2004; Sandri et al., 2004). Moreover, treatment with PDE inhibitors increased muscle cAMP levels and decreased the rate of total protein degradation in muscles from diabetic (Baviera et al., 2007) and fasted rodents (Lira et al., 2007) through a clear reduction in the activity of the Ca^{2+} -dependent proteolytic system and the ubiquitin-proteasome system. The fact that the antiproteolytic effect of both β_2 agonists (Gonçalves et al., 2012) and PDE inhibitors (Baviera et al., 2007) *in vitro* was inhibited by H89, a PKA inhibitor, and mimicked by 6-BNZ-cAMP, a PKA activator, further supports the idea that activation of the cAMP cascade via a PKA-dependent pathway is one of the regulatory mechanism(s) to prevent excessive skeletal muscle protein breakdown. Given that in dystrophic muscle the Ca^{2+} -dependent proteolytic system and the ubiquitin-proteasomal system are activated on the one hand (Kar and Pearson, 1976; Spencer and Tidball, 1996; Kumamoto et al., 2000) and PKA signaling, on the other hand, is disturbed (Reynolds et al., 2008; Röder et al., 2009), it is reasonable to suggest that increased calpain and proteasome activities contribute to dystrophic pathology and, by extension, that protease inhibition by cAMP-inducing agents could be a treatment strategy for DMD.

ON THE ORIGIN AND DESTINATION OF CATECHOLAMINES IN SKELETAL MUSCLE

It is general knowledge that sympathetic first messengers can be released from either adrenal medulla as hormones or from

sympathetic neurons as neurotransmitters directly onto target tissues (Mason, 1968). However, surprisingly little is known about the real contributions of these different modes of sympathetic activities in most tissues (Daly and McGrath, 2011) and this holds true also for skeletal muscle. Yet, to our knowledge, there are a few studies reporting on direct innervation of skeletal muscle fibers by non-myelinated, noradrenergic fibers (Boeke, 1909a,b, 1913; Barker and Saito, 1981; Tadaki et al., 1995), suggesting that sympathetic actions on skeletal muscle are at least partially mediated by neural mechanisms. Accordingly, a study using surgical ablation of sympathetic ganglia, which innervate hind limb muscles have shown that direct innervation of skeletal muscles by autonomic nerves is critical for muscle homeostasis (Navegantes et al., 2004) and a wealth of investigations has dealt with the effects of sympathetic agonists on skeletal muscle force potentiation and release of acetylcholine from motoneurons (see, e.g., Oliver and Schäfer, 1895; Goffart and Ritchie, 1952; Krnjevic and Miledi, 1958; Bowman and Raper, 1967). The latter are processes, which are likely to need fast regulation in the course of fight-or-flight situations. This triggered us to reinvestigate the distribution of sympathetic innervation in skeletal muscle and to address differences between sympathetic targets in healthy and dystrophic muscles. Thus, we first studied the distribution of the sympathetic neuron marker, tyrosine hydroxylase (TOH) in longitudinal sections of mouse hindlimb muscle and found this marker protein to be concentrated on top of most NMJs (Figure 4A). This is

in accordance with previous studies carried out in several vertebrate species, including man (Chan-Palay et al., 1982a,b). In many cases, enrichments of TOH immunostaining in proximity to NMJs were connected to pearl chain-like processes, which are

likely to represent sympathetic axons (**Figure 4B**). Notably, while previous investigators performed immunostainings on transverse muscle sections and thus proposed TOH to be present in the motoneuronal presynaptic portion of NMJs (Chan-Palay et al., 1982a,b), the analysis of our longitudinal slices revealed that TOH immunofluorescence does not match postsynaptic AChR staining as it would be typical for motoneuronal markers, but was mostly just in the gaps between the NMJ pretzel structure (**Figure 4C**). That fits to the older observations from Boeke based on tissue silver impregnation (Boeke, 1909a,b, 1913) and corroborates his suggestion that sympathetic neurons run and terminate next to motoneurons. Future investigations should be carried out to further strengthen this finding.

Next, we addressed the expression pattern of β_2 -AR in hindlimb muscle. This showed immunohistochemical signals of β_2 -AR in at least four different locations: (1) larger blood vessels (not depicted), (2) motoneurons (**Figures 5A,B**), (3) muscle fibers (**Figure 5E**, left panel), and (4) ill-defined anastomotic fibers (**Figure 5E**, on left panel see central part of the picture). Since the presence of β_2 -AR had been found by staining and anticipated to be present due to functional roles in blood vessels (Daly and McGrath, 2011), motoneurons (Melamed et al., 1976; Wohlberg et al., 1986; Bondok et al., 1988; Adachi et al., 1992; Parkis et al., 1995; Zeman et al., 2004; Tartas et al., 2010; Noga et al., 2011; Baker and Baker, 2012) and muscle fibers (Gross et al., 1976; Cairns and Dulhunty, 1993a,b; Cairns et al., 1993; Kokate et al., 1993; Navegantes et al., 1999, 2000, 2001, 2002, 2003, 2004; Prakash et al., 1999; Decostre et al., 2000; Gonçalves et al., 2012), our findings in wildtype muscles were

corroborating previous reports. However, the difference between wildtype and dystrophic *mdx* muscles was striking, both with respect to neuronal as well as muscle staining: First, while the typical pretzel-shaped postsynaptic AChR signals in wildtype muscle were perfectly mirrored by presynaptic β_2 -AR staining (**Figures 5A,B**) in almost fibers, this was much rarer the case in *mdx* synapses (**Figures 5C,D**), which were also highly fragmented as reported previously (Torres and Duchon, 1987; Lyons and Slater, 1991; Grady et al., 2000). Second, while β_2 -AR immunofluorescence displayed a highly regular striated patterning in wildtype muscle (**Figure 5E**, left panel), it was almost uniformly distributed in many fibers from *mdx* muscles (**Figure 5E**, right panel). In summary, these data show that there are significant differences in distribution of β_2 -AR between healthy and dystrophic muscles. In the context of the PKA microdomain hypothesis this could be an additional level of dysregulation leading to alterations of cAMP with all the sequelae as discussed before.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Dr. M. Mongillo (Padua/Italy), Dr. S. Schiaffino (Padua/Italy), and Dr. M. Zaccolo (Oxford/UK) for helpful discussions. Rüdiger Rudolf is supported by DFG grants RU923/7-1 and RU923/8-1, Siegfried Labeit by EU-network SarcoSI and DFG grant LA668/15-1, and Danilo Lustrino, Ísis C. Kettelhut and Luiz C. C. Navegantes by CNPQ (305149/2012-1) and FAPESP (12/05697-7 and 12/24524-6.) grants. We acknowledge support by Deutsche Forschungsgemeinschaft and Open Access Publishing Fund of Karlsruhe Institute of Technology.

REFERENCES

- Adachi, S., Oka, J., Nagao, T., and Fukuda, H. (1992). Activation of beta-adrenergic receptor induces Na(+)-dependent inward currents in acutely dissociated motoneurons of bullfrog spinal cord. *Brain Res.* 571, 79–88. doi: 10.1016/0006-8993(92)90511-7
- Akaaboune, M., Culican, S. M., Turney, S. G., and Lichtman, J. W. (1999). Rapid and reversible effects of activity on acetylcholine receptor density at the neuromuscular junction *in vivo*. *Science* 286, 503–507. doi: 10.1126/science.286.5439.503
- Altarejos, J. Y., and Montminy, M. (2011). CREB and the CREB co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 141–151. doi: 10.1038/nrm3072
- Apel, E. D., Glass, D. J., Moscoso, L. M., Yancopoulos, G. D., and Sanes, J. R. (1997). Rapsyn is required for MuSK signaling and recruits synaptic components to a MuSK-containing scaffold. *Neuron* 18, 623–635. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80303-7
- Arreola, J., Calvo, J., Garcia, M. C., and Sanchez, J. A. (1987). Modulation of calcium channels of twitch skeletal muscle fibres of the frog by adrenaline and cyclic adenosine monophosphate. *J. Physiol.* 393, 307–330.
- Bacurau, A. V., Jardim, M. A., Ferreira, J. C., Bechara, L. R., Bueno, C. R. Jr., Alba-Loureiro, T. C., et al. (2009). Sympathetic hyperactivity differentially affects skeletal muscle mass in developing heart failure: role of exercise training. *J. Appl. Physiol.* 106, 1631–1640. doi: 10.1152/jap-physiol.91067.2008
- Baker, M. R., and Baker, S. N. (2012). Beta-adrenergic modulation of tremor and corticospinal coherence in humans. *PLoS ONE* 7:e49088. doi: 10.1371/journal.pone.0049088
- Bardsley, R. G., Allcock, S. M., Dawson, J. M., Dumelow, N. W., Higgins, J. A., Lasslett, Y. V., et al. (1992). Effect of beta-agonists on expression of calpain and calpastatin activity in skeletal muscle. *Biochimie* 74, 267–273. doi: 10.1016/0300-9084(92)90125-X
- Barker, D., and Saito, M. (1981). Autonomic innervation of receptors and muscle fibres in cat skeletal muscle. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 212, 317–332. doi: 10.1098/rspb.1981.0042
- Barradeau, S., Imaizumi-Scherrer, T., Weiss, M. C., and Faust, D. M. (2001). Muscle-regulated expression and determinants for neuromuscular junctional localization of the mouse R1alpha regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 5037–5042. doi: 10.1073/pnas.081393598
- Barradeau, S., Imaizumi-Scherrer, T., Weiss, M. C., and Faust, D. M. (2002). Intracellular targeting of the type-I alpha regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Trends Cardiovasc. Med.* 12, 235–241. doi: 10.1016/S1050-1738(02)00167-6
- Baviera, A. M., Zanon, N. M., Carvalho Navegantes, L. C., Migliorini, R. H., and Do Carmo Kettelhut, I. (2007). Pentoxifylline inhibits Ca²⁺-dependent and ATP proteasome-dependent proteolysis in skeletal muscle from acutely diabetic rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 292, E702–E708. doi: 10.1152/ajpendo.00147.2006
- Beavo, J. A., and Brunton, L. L. (2002). Cyclic nucleotide research – still expanding after half a century. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 710–718. doi: 10.1038/nrm911
- Berdeaux, R., and Stewart, R. (2012). cAMP signaling in skeletal muscle adaptation: hypertrophy, metabolism, and regeneration. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 303, E1–E17. doi: 10.1152/ajpendo.00555.2011
- Bloom, T. J. (2002). Cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes expressed in mouse skeletal muscle. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 80, 1132–1135. doi: 10.1139/y02-149
- Bodine, S. C., Latres, E., Baumhueter, S., Lai, V. K., Nunez, L., Clarke, B. A., et al. (2001). Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 294, 1704–1708. doi: 10.1126/science.1065874
- Boeke, J. (1909a). Die motorische Endplatte bei den höheren Vertebraten, ihre Entwicklung, Form und Zusammenhang mit der Muskelfaser. *Anat. Anz.* 35, 240–256.
- Boeke, J. (1909b). Ueber eine aus marklosen Fasern hervorgehende zweite Art von hypolemmalen Nervenendplatten bei den

- quergestreiften Muskelfasern der Vertebraten. *Anat. Anz.* 35, 481–484.
- Boeke, J. (1913). Die doppelte (motorische und sympathische) efferente Innervation der quergestreiften Muskelfasern. *Anat. Anz.* 44, 343–356.
- Bondok, A. A., Botros, K. G., and El-Mohandes, E. A. (1988). Fluorescence histochemical study of the localisation and distribution of beta-adrenergic receptor sites in the spinal cord and cerebellum of the chicken. *J. Anat.* 160, 167–174.
- Bos, J. L. (2003). Epac: a new cAMP target and new avenues in cAMP research. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 733–738. doi: 10.1038/nrm1197
- Bowman, W. C., and Raper, C. (1967). Adrenotropic receptors in skeletal muscle. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 139, 741–753. doi: 10.1111/j.1749-6632.1967.tb41241.x
- Bruneau, E., Sutter, D., Hume, R. I., and Akaaboune, M. (2005). Identification of nicotinic acetylcholine receptor recycling and its role in maintaining receptor density at the neuromuscular junction *in vivo*. *J. Neurosci.* 25, 9949–9959. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3169-05.2005
- Bruneau, E. G., and Akaaboune, M. (2006). The dynamics of recycled acetylcholine receptors at the neuromuscular junction *in vivo*. *Development* 133, 4485–4493. doi: 10.1242/dev.02619
- Burden, S. J., Yumoto, N., and Zhang, W. (2013). The Role of MuSK in Synapse Formation and Neuromuscular Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5:a009167. doi: 10.1101/cshperspect.a009167
- Cairns, S. P., and Dulhunty, A. F. (1993a). Beta-adrenergic potentiation of E-C coupling increases force in rat skeletal muscle. *Muscle Nerve* 16, 1317–1325. doi: 10.1002/mus.880161208
- Cairns, S. P., and Dulhunty, A. F. (1993b). The effects of beta-adrenoceptor activation on contraction in isolated fast- and slow-twitch skeletal muscle fibres of the rat. *Br. J. Pharmacol.* 110, 1133–1141. doi: 10.1111/j.1476-5381.1993.tb13932.x
- Cairns, S. P., Westerblad, H., and Allen, D. G. (1993). Changes of tension and $[Ca^{2+}]_i$ during beta-adrenoceptor activation of single, intact fibres from mouse skeletal muscle. *Pflügers Arch.* 425, 150–155. doi: 10.1007/BF00374515
- Centner, T., Yano, J., Kimura, E., McElhinny, A. S., Pelin, K., Witt, C. C., et al. (2001). Identification of muscle specific ring finger proteins as potential regulators of the titin kinase domain. *J. Mol. Biol.* 306, 717–726. doi: 10.1006/jmbi.2001.4448
- Chan-Palay, V., Engel, A. G., Palay, S. L., and Wu, J. Y. (1982a). Synthesizing enzymes for four neuroactive substances in motor neurons and neuromuscular junctions: light and electron microscopic immunocytochemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 6717–6721. doi: 10.1073/pnas.79.21.6717
- Chan-Palay, V., Engel, A. G., Wu, J. Y., and Palay, S. L. (1982b). Coexistence in human and primate neuromuscular junctions of enzymes synthesizing acetylcholine, catecholamine, taurine, and gamma-aminobutyric acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 7027–7030. doi: 10.1073/pnas.79.22.7027
- Choi, K. R., Berrera, M., Reischl, M., Strack, S., Albrizio, M., Roder, I. V., et al. (2012). Rapsyn mediates subsynaptic anchoring of PKA type I and stabilisation of acetylcholine receptor *in vivo*. *J. Cell Sci.* 125, 714–723. doi: 10.1242/jcs.092361
- Conti, M., and Beavo, J. (2007). Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 481–511. doi: 10.1146/annurev.biochem.76.060305.150444
- Daly, C. J., and McGrath, J. C. (2011). Previously unsuspected widespread cellular and tissue distribution of beta-adrenoceptors and its relevance to drug action. *Trends Pharmacol. Sci.* 32, 219–226. doi: 10.1016/j.tips.2011.02.008
- Decostre, V., Gillis, J. M., and Gailly, P. (2000). Effect of adrenaline on the post-tetanic potentiation in mouse skeletal muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 21, 247–254. doi: 10.1023/A:1005685900196
- Di Benedetto, G., Zoccarato, A., Lissandron, V., Terrin, A., Li, X., Houslay, M. D., et al. (2008). Protein kinase A type I and type II define distinct intracellular signaling compartments. *Circ. Res.* 103, 836–844. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.174813
- Durham, J. T., Brand, O. M., Arnold, M., Reynolds, J. G., Muthukumar, L., Weiler, H., et al. (2006). Myospryn is a direct transcriptional target for MEF2A that encodes a striated muscle, alpha-actinin-interacting, costamere-localized protein. *J. Biol. Chem.* 281, 6841–6849. doi: 10.1074/jbc.M510499200
- Edgeworth, H. (1930). A report of progress on the use of ephedrine in a case of myasthenia gravis. *J. Am. Med. Assoc.* 94, 1136. doi: 10.1001/jama.1930.27120410003009c
- Edwards, H. V., Christian, F., and Baillie, G. S. (2012). cAMP: novel concepts in compartmentalised signalling. *Semin. Cell Dev. Biol.* 23, 181–190. doi: 10.1016/j.semcdb.2011.09.005
- Engel, A. G., Lindstrom, J. M., Lambert, E. H., and Lennon, V. A. (1977). Ultrastructural localization of the acetylcholine receptor in myasthenia gravis and in its experimental autoimmune model. *Neurology* 27, 307–315. doi: 10.1212/WNL.27.4.307
- Fambrough, D. M. (1979). Control of acetylcholine receptors in skeletal muscle. *Physiol. Rev.* 59, 165–227.
- Finlayson, S., Spillane, J., Kullmann, D. M., Howard, R., Webster, R., Palace, J., et al. (2013). Slow channel congenital myasthenic syndrome responsive to a combination of fluoxetine and salbutamol. *Muscle Nerve* 47, 279–282. doi: 10.1002/mus.23534
- Fontaine, B., Klarsfeld, A., and Changeux, J. P. (1987). Calcitonin gene-related peptide and muscle activity regulate acetylcholine receptor alpha-subunit mRNA levels by distinct intracellular pathways. *J. Cell Biol.* 105, 1337–1342. doi: 10.1083/jcb.105.3.1337
- Francis, S. H., Blount, M. A., and Corbin, J. D. (2011). Mammalian cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular mechanisms and physiological functions. *Physiol. Rev.* 91, 651–690. doi: 10.1152/physrev.00030.2010
- Froehner, S. C. (1993). Regulation of ion channel distribution at synapses. *Annu. Rev. Neurosci.* 16, 347–368. doi: 10.1146/annurev.ne.16.030193.002023
- Fuhrer, C., Gautam, M., Sugiyama, J. E., and Hall, Z. W. (1999). Roles of rapsyn and agrin in interaction of postsynaptic proteins with acetylcholine receptors. *J. Neurosci.* 19, 6405–6416.
- Fumagalli, G., Engel, A. G., and Lindstrom, J. (1982). Ultrastructural aspects of acetylcholine receptor turnover at the normal end-plate and in autoimmune myasthenia gravis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 41, 567–579. doi: 10.1097/00005072-198211000-00001
- Gautam, M., Dechiara, T. M., Glass, D. J., Yancopoulos, G. D., and Sanes, J. R. (1999). Distinct phenotypes of mutant mice lacking agrin, MuSK, or rapsyn. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 114, 171–178. doi: 10.1016/S0165-3806(99)00013-9
- Gillespie, S. K., Balasubramanian, S., Fung, E. T., and Haganir, R. L. (1996). Rapsyn clusters and activates the synapse-specific receptor tyrosine kinase MuSK. *Neuron* 16, 953–962. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80118-X
- Glass, D. J. (2010). Signaling pathways perturbing muscle mass. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 13, 225–229. doi: 10.1097/MCO.0b013e32833862df
- Glass, D. J., and Yancopoulos, G. D. (1997). Sequential roles of agrin, MuSK and rapsyn during neuromuscular junction formation. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7, 379–384. doi: 10.1016/S0959-4388(97)80066-9
- Goffart, M., and Ritchie, J. M. (1952). The effect of adrenaline on the contraction of mammalian skeletal muscle. *J. Physiol.* 116, 357–371.
- Gonçalves, D. A., Lira, E. C., Baviera, A. M., Cao, P., Zanon, N. M., Arany, Z., et al. (2009). Mechanisms involved in 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-mediated inhibition of the ubiquitin-proteasome system in skeletal muscle. *Endocrinology* 150, 5395–5404. doi: 10.1210/en.2009-0428
- Gonçalves, D. A., Silveira, W. A., Lira, E. C., Graca, F. A., Paula-Gomes, S., Zanon, N. M., et al. (2012). Clenbuterol suppresses proteasomal and lysosomal proteolysis and atrophy-related genes in denervated rat soleus muscles independently of Akt. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 302, E123–E133. doi: 10.1152/ajpendo.00188.2011
- Grady, R. M., Zhou, H., Cunningham, J. M., Henry, M. D., Campbell, K. P., and Sanes, J. R. (2000). Maturation and maintenance of the neuromuscular synapse: genetic evidence for roles of the dystrophin-glycoprotein complex. *Neuron* 25, 279–293. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80894-6
- Gross, S. R., Mayer, S. E., and Longshore, M. A. (1976). Stimulation of glycogenolysis by beta adrenergic agonists in skeletal muscle of mice with the phosphorylase kinase deficiency mutation (I strain). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 198, 526–538.
- Hinkle, R. T., Hodge, K. M., Cody, D. B., Sheldon, R. J., Kobilka, B. K., and Isfort, R. J. (2002). Skeletal muscle hypertrophy and anti-atrophy effects of clenbuterol are mediated by the beta2-adrenergic receptor. *Muscle Nerve* 25, 729–734. doi: 10.1002/mus.10092

- Hinkle, R. T., Lefever, F. R., Dolan, E. T., Reichart, D. L., Dietrich, J. A., Gropp, K. E., et al. (2007). Corticotrophin releasing factor 2 receptor agonist treatment significantly slows disease progression in mdx mice. *BMC Med.* 5:18. doi: 10.1186/1741-7015-5-18
- Hubbard, S. R., and Gnanasambandan, K. (2013). Structure and activation of MuSK, a receptor tyrosine kinase central to neuromuscular junction formation. *Biochim. Biophys. Acta* 1834, 2166–2169. doi: 10.1016/j.bbapap.2013.02.034
- Imaizumi-Scherrer, T., Faust, D. M., Benichou, J. C., Hellio, R., and Weiss, M. C. (1996). Accumulation in fetal muscle and localization to the neuromuscular junction of cAMP-dependent protein kinase A regulatory and catalytic subunits RI alpha and C alpha. *J. Cell Biol.* 134, 1241–1254. doi: 10.1083/jcb.134.5.1241
- Indolfi, C., Avvedimento, E. V., Di Lorenzo, E., Esposito, G., Rapacciuolo, A., Giuliano, P., et al. (1997). Activation of cAMP-PKA signaling *in vivo* inhibits smooth muscle cell proliferation induced by vascular injury. *Nat. Med.* 3, 775–779. doi: 10.1038/nm0797-775
- Jean-Baptiste, G., Yang, Z., Khoury, C., Gaudio, S., and Greenwood, M. T. (2005). Peptide and non-peptide G-protein coupled receptors (GPCRs) in skeletal muscle. *Peptides* 26, 1528–1536. doi: 10.1016/j.peptides.2005.03.011
- Joyner, M. J., and Casey, D. P. (2009). The catecholamines strike back. What NO does not do. *Circ. J.* 73, 1783–1792. doi: 10.1253/circj.CJ-09-0559
- Kar, N. C., and Pearson, C. M. (1976). A calcium-activated neutral protease in normal and dystrophic human muscle. *Clin. Chim. Acta* 73, 293–297. doi: 10.1016/0009-8981(76)90175-3
- Kielbasa, O. M., Reynolds, J. G., Wu, C. L., Snyder, C. M., Cho, M. Y., Weiler, H., et al. (2011). Myospryn is a calcineurin-interacting protein that negatively modulates slow-fiber-type transformation and skeletal muscle regeneration. *FASEB J.* 25, 2276–2286. doi: 10.1096/fj.10-169219
- Kim, N., Stiegler, A. L., Cameron, T. O., Hallock, P. T., Gomez, A. M., Huang, J. H., et al. (2008). Lrp4 is a receptor for Agrin and forms a complex with MuSK. *Cell* 135, 334–342. doi: 10.1016/j.cell.2008.10.002
- Kline, W. O., Panaro, F. J., Yang, H., and Bodine, S. C. (2007). Rapamycin inhibits the growth and muscle-sparing effects of clenbuterol. *J. Appl. Physiol.* 102, 740–747. doi: 10.1152/japplphysiol.00873.2006
- Kokate, T. G., Heiny, J. A., and Sperelakis, N. (1993). Stimulation of the slow calcium current in bullfrog skeletal muscle fibers by cAMP and cGMP. *Am. J. Physiol.* 265, C47–C53.
- Kouloumenta, A., Mavroidis, M., and Capetanaki, Y. (2007). Proper perinuclear localization of the TRIM-like protein myospryn requires its binding partner desmin. *J. Biol. Chem.* 282, 35211–35221. doi: 10.1074/jbc.M704733200
- Krnjevic, K., and Miledi, R. (1958). Some effects produced by adrenaline upon neuromuscular propagation in rats. *J. Physiol.* 141, 291–304.
- Kumamoto, T., Fujimoto, S., Ito, T., Horinouchi, H., Ueyama, H., and Tsuda, T. (2000). Proteasome expression in the skeletal muscles of patients with muscular dystrophy. *Acta Neuropathol.* 100, 595–602. doi: 10.1007/s004010000229
- Lanuza, M. A., Garcia, N., Santafe, M., Gonzalez, C. M., Alonso, I., Nelson, P. G., et al. (2002). Pre- and post-synaptic maturation of the neuromuscular junction during neonatal synapse elimination depends on protein kinase C. *J. Neurosci. Res.* 67, 607–617. doi: 10.1002/jnr.10122
- Lashley, D., Palace, J., Jayawant, S., Robb, S., and Beeson, D. (2010). Ephedrine treatment in congenital myasthenic syndrome due to mutations in DOK7. *Neurology* 74, 1517–1523. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181dd43bf
- Lecker, S. H., Jagoe, R. T., Gilbert, A., Gomes, M., Baracos, V., Bailey, J., et al. (2004). Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB J.* 18, 39–51. doi: 10.1096/fj.03-0610com
- Levitt, T. A., Loring, R. H., and Salpeter, M. M. (1980). Neuronal control of acetylcholine receptor turnover rate at a vertebrate neuromuscular junction. *Science* 210, 550–551. doi: 10.1126/science.7423205
- Levitt, T. A., and Salpeter, M. M. (1981). Denervated endplates have a dual population of junctional acetylcholine receptors. *Nature* 291, 239–241. doi: 10.1038/291239a0
- Li, M. X., Jia, M., Jiang, H., Dunlap, V., and Nelson, P. G. (2001). Opposing actions of protein kinase A and C mediate Hebbian synaptic plasticity. *Nat. Neurosci.* 4, 871–872. doi: 10.1038/nn0901-871
- Li, M. X., Jia, M., Yang, L. X., Dunlap, V., and Nelson, P. G. (2002). Pre- and postsynaptic mechanisms in Hebbian activity-dependent synapse modification. *J. Neurobiol.* 52, 241–250. doi: 10.1002/neu.10089
- Liewluck, T., Selcen, D., and Engel, A. G. (2011). Beneficial effects of albuterol in congenital endplate acetylcholinesterase deficiency and Dok-7 myasthenia. *Muscle Nerve* 44, 789–794. doi: 10.1002/mus.22176
- Liggett, S. B., and Raymond, J. R. (1993). Pharmacology and molecular biology of adrenergic receptors. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.* 7, 279–306. doi: 10.1016/S0950-351X(05)80178-8
- Lira, E. C., Graca, F. A., Gonçalves, D. A., Zanon, N. M., Baviera, A. M., Strindberg, L., et al. (2007). Cyclic adenosine monophosphate-phosphodiesterase inhibitors reduce skeletal muscle protein catabolism in septic rats. *Shock* 27, 687–694. doi: 10.1097/SHK.0b013e31802e43a6
- Loring, R. H., and Salpeter, M. M. (1980). Denervation increases turnover rate of junctional acetylcholine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 2293–2297. doi: 10.1073/pnas.77.4.2293
- Lu, B., Fu, W. M., Greengard, P., and Poo, M. M. (1993). Calcitonin gene-related peptide potentiates synaptic responses at developing neuromuscular junction. *Nature* 363, 76–79. doi: 10.1038/363076a0
- Lynch, G. S., and Ryall, J. G. (2008). Role of beta-adrenoceptor signaling in skeletal muscle: implications for muscle wasting and disease. *Physiol. Rev.* 88, 729–767. doi: 10.1152/physrev.00028.2007
- Lyons, P. R., and Slater, C. R. (1991). Structure and function of the neuromuscular junction in young adult mdx mice. *J. Neurocytol.* 20, 969–981. doi: 10.1007/BF01187915
- Marchand, S., Bignami, F., Stetzkowski-Marden, F., and Cartaud, J. (2000). The myristoylated protein rapsyn is cotargeted with the nicotinic acetylcholine receptor to the postsynaptic membrane via the exocytic pathway. *J. Neurosci.* 20, 521–528.
- Marchand, S., and Cartaud, J. (2002). Targeted trafficking of neurotransmitter receptors to synaptic sites. *Mol. Neurobiol.* 26, 117–135. doi: 10.1385/MN:26:1:117
- Marchand, S., Devillers-Thiery, A., Pons, S., Changeux, J. P., and Cartaud, J. (2002). Rapsyn escorts the nicotinic acetylcholine receptor along the exocytic pathway via association with lipid rafts. *J. Neurosci.* 22, 8891–8901.
- Marshall, J. M. (1982). The influence of the sympathetic nervous system on individual vessels of the microcirculation of skeletal muscle of the rat. *J. Physiol.* 332, 169–186.
- Mason, J. W. (1968). A review of psychoendocrine research on the sympathetic-adrenal medullary system. *Psychosom. Med.* 30(Suppl.), 631–653.
- Melamed, E., Lahav, M., and Atlas, D. (1976). Histochemical evidence for beta-adrenergic receptors in the rat spinal cord. *Brain Res.* 116, 511–515. doi: 10.1016/0006-8993(76)90499-6
- Miles, K., Anthony, D. T., Rubin, L. L., Greengard, P., and Haganir, R. L. (1987). Regulation of nicotinic acetylcholine receptor phosphorylation in rat myotubes by forskolin and cAMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 6591–6595. doi: 10.1073/pnas.84.18.6591
- Miles, K., Greengard, P., and Haganir, R. L. (1989). Calcitonin gene-related peptide regulates phosphorylation of the nicotinic acetylcholine receptor in rat myotubes. *Neuron* 2, 1517–1524. doi: 10.1016/0896-6273(89)90198-0
- Mulle, C., Benoit, P., Pinsat, C., Roa, M., and Changeux, J. P. (1988). Calcitonin gene-related peptide enhances the rate of desensitization of the nicotinic acetylcholine receptor in cultured mouse muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 5728–5732. doi: 10.1073/pnas.85.15.5728
- Navegantes, L. C., Machado, C. R., Resano, N. M., Migliorini, R. H., and Kettelhut, I. C. (2003). Beta2-agonists and cAMP inhibit protein degradation in isolated chick (*Gallus domesticus*) skeletal muscle. *Br. Poult. Sci.* 44, 149–154. doi: 10.1080/0007166031000085355
- Navegantes, L. C., Migliorini, R. H., and Do Carmo Kettelhut, I. (2002). Adrenergic control of protein metabolism in skeletal muscle. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 5, 281–286. doi: 10.1097/00075197-200205000-00007
- Navegantes, L. C., Resano, N. M., Baviera, A. M., Migliorini, R. H., and Kettelhut, I. C. (2004). Effect of sympathetic denervation on the rate of protein synthesis in rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 286, E642–E647. doi: 10.1152/ajpendo.00371.2003
- Navegantes, L. C., Resano, N. M., Migliorini, R. H., and Kettelhut, I. C. (1999). Effect of guanethidine-induced adrenergic blockade on the different proteolytic systems in rat

- skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 277, E883–E889.
- Navegantes, L. C., Resano, N. M., Migliorini, R. H., and Kettelhut, I. C. (2000). Role of adrenoceptors and cAMP on the catecholamine-induced inhibition of proteolysis in rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 279, E663–E668.
- Navegantes, L. C., Resano, N. M., Migliorini, R. H., and Kettelhut, I. C. (2001). Catecholamines inhibit Ca^{2+} -dependent proteolysis in rat skeletal muscle through beta(2)-adrenoceptors and cAMP. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 281, E449–E454.
- Nelson, P. G., Lanuza, M. A., Jia, M., Li, M. X., and Tomas, J. (2003). Phosphorylation reactions in activity-dependent synapse modification at the neuromuscular junction during development. *J. Neurocytol.* 32, 803–816. doi: 10.1023/B:NEUR.0000020625.70284.a6
- Neubig, R. R., Krodell, E. K., Boyd, N. D., and Cohen, J. B. (1979). Acetylcholine and local anesthetic binding to Torpedo nicotinic postsynaptic membranes after removal of nonreceptor peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 690–694. doi: 10.1073/pnas.76.2.690
- New, H. V., and Mudge, A. W. (1986). Calcitonin gene-related peptide regulates muscle acetylcholine receptor synthesis. *Nature* 323, 809–811. doi: 10.1038/323809a0
- Nikolaev, V. O., Bunemann, M., Hein, L., Hannawacker, A., and Lohse, M. J. (2004). Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation. *J. Biol. Chem.* 279, 37215–37218. doi: 10.1074/jbc.C400302200
- Nitkin, R. M., Smith, M. A., Magill, C., Fallon, J. R., Yao, Y. M., Wallace, B. G., et al. (1987). Identification of agrin, a synaptic organizing protein from Torpedo electric organ. *J. Cell Biol.* 105, 2471–2478. doi: 10.1083/jcb.105.6.2471
- Noga, B. R., Johnson, D. M., Riesgo, M. I., and Pinzon, A. (2011). Locomotor-activated neurons of the cat. II. Noradrenergic innervation and colocalization with NEalpha 1a or NEalpha 2b receptors in the thoraco-lumbar spinal cord. *J. Neurophysiol.* 105, 1835–1849. doi: 10.1152/jn.00342.2010
- Oliver, G., and Schäfer, E. A. (1895). The physiological effects of the extracts of the suprarenal capsules. *J. Physiol.* 18, 230–276.
- Omori, K., and Kotera, J. (2007). Overview of PDEs and their regulation. *Circ. Res.* 100, 309–327. doi: 10.1161/01.RES.0000256354.95791.fl
- Palace, J., and Beeson, D. (2008). The congenital myasthenic syndromes. *J. Neuroimmunol.* 201–202, 2–5. doi: 10.1016/j.jneuroim.2008.05.030
- Parkis, M. A., Bayliss, D. A., and Berger, A. J. (1995). Actions of norepinephrine on rat hypoglossal motoneurons. *J. Neurophysiol.* 74, 1911–1919.
- Parr, T., Bardsley, R. G., Gilmour, R. S., and Buttery, P. J. (1992). Changes in calpain and calpastatin mRNA induced by beta-adrenergic stimulation of bovine skeletal muscle. *Eur. J. Biochem.* 208, 333–339. doi: 10.1111/j.1432-1033.1992.tb17191.x
- Perkins, G. A., Wang, L., Huang, L. J., Humphries, K., Yao, V. J., Martone, M., et al. (2001). PKA, PKC, and AKAP localization in and around the neuromuscular junction. *BMC Neurosci.* 2:17. doi: 10.1186/1471-2202-2-17
- Porter, S., and Froehner, S. C. (1985). Interaction of the 43K protein with components of Torpedo postsynaptic membranes. *Biochemistry* 24, 425–432. doi: 10.1021/bi00323a028
- Poyner, D. R. (1992). Calcitonin gene-related peptide: multiple actions, multiple receptors. *Pharmacol. Ther.* 56, 23–51. doi: 10.1016/0163-7258(92)90036-Y
- Prakash, Y. S., Van Der Heijden, H. F., Gallant, E. M., and Sieck, G. C. (1999). Effect of beta-adrenoceptor activation on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ regulation in murine skeletal myotubes. *Am. J. Physiol.* 276, C1038–C1045.
- Ramarao, M. K., Bianchetta, M. J., Lanken, J., and Cohen, J. B. (2001). Role of rapsyn tetratricopeptide repeat and coiled-coil domains in self-association and nicotinic acetylcholine receptor clustering. *J. Biol. Chem.* 276, 7475–7483. doi: 10.1074/jbc.M009888200
- Ramarao, M. K., and Cohen, J. B. (1998). Mechanism of nicotinic acetylcholine receptor cluster formation by rapsyn. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 4007–4012. doi: 10.1073/pnas.95.7.4007
- Reeds, P. J., Hay, S. M., Dorwood, P. M., and Palmer, R. M. (1986). Stimulation of muscle growth by clenbuterol: lack of effect on muscle protein biosynthesis. *Br. J. Nutr.* 56, 249–258. doi: 10.1079/BJN19860104
- Reutenauer-Patte, J., Boittin, F. X., Pathy-Vuadens, O., Ruegg, U. T., and Dorchies, O. M. (2012). Urocortins improve dystrophic skeletal muscle structure and function through both PKA- and Epac-dependent pathways. *Am. J. Pathol.* 180, 749–762. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.10.038
- Reynolds, J. G., McCalmon, S. A., Donaghey, J. A., and Naya, F. J. (2008). Deregulated protein kinase A signaling and myospryn expression in muscular dystrophy. *J. Biol. Chem.* 283, 8070–8074. doi: 10.1074/jbc.C700221200
- Reynolds, J. G., McCalmon, S. A., Tomczyk, T., and Naya, F. J. (2007). Identification and mapping of protein kinase A binding sites in the costameric protein myospryn. *Biochim. Biophys. Acta* 1773, 891–902. doi: 10.1016/j.bbamcr.2007.04.004
- Röder, I. V., Choi, K. R., Reischl, M., Petersen, Y., Diefenbacher, M. E., Zaccolo, M., et al. (2010). Myosin Va cooperates with PKA R1alpha to mediate maintenance of the end-plate *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 2031–2036. doi: 10.1073/pnas.0914087107
- Röder, I. V., Lissandron, V., Martin, J., Petersen, Y., Di Benedetto, G., Zaccolo, M., et al. (2009). PKA microdomain organisation and cAMP handling in healthy and dystrophic muscle *in vivo*. *Cell. Signal.* 21, 819–826. doi: 10.1016/j.cellsig.2009.01.029
- Röder, I. V., Strack, S., Reischl, M., Dahley, O., Khan, M. M., Kassel, O., et al. (2012). Participation of myosin Va and Pka type I in the regeneration of neuromuscular junctions. *PLoS ONE* 7:e40860. doi: 10.1371/journal.pone.0040860
- Ruegg, M. A., and Bixby, J. L. (1998). Agrin orchestrates synaptic differentiation at the vertebrate neuromuscular junction. *Trends Neurosci.* 21, 22–27. doi: 10.1016/S0166-2236(97)01154-5
- Salpeter, M. M., and Loring, R. H. (1985). Nicotinic acetylcholine receptors in vertebrate muscle: properties, distribution and neural control. *Prog. Neurobiol.* 25, 297–325. doi: 10.1016/0301-0082(85)90018-8
- Saltin, B., Radegran, G., Koskolou, M. D., and Roach, R. C. (1998). Skeletal muscle blood flow in humans and its regulation during exercise. *Acta Physiol. Scand.* 162, 421–436. doi: 10.1046/j.1365-201X.1998.0293e.x
- Sandri, M. (2008). Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. *Physiology (Bethesda)* 23, 160–170. doi: 10.1152/physiol.00041.2007
- Sandri, M., Sandri, C., Gilbert, A., Skurk, C., Calabria, E., Picard, A., et al. (2004). Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* 117, 399–412. doi: 10.1016/S0092-8674(04)00400-3
- Sarparanta, J. (2008). Biology of myospryn: what's known? *J. Muscle Res. Cell Motil.* 29, 177–180. doi: 10.1007/s10974-008-9165-6
- Sarparanta, J., Blandin, G., Charton, K., Vihola, A., Marchand, S., Milic, A., et al. (2010). Interactions with M-band titin and calpain 3 link myospryn (CMYA5) to tibial and limb-girdle muscular dystrophies. *J. Biol. Chem.* 285, 30304–30315. doi: 10.1074/jbc.M110.108720
- Schara, U., Barisic, N., Deschauer, M., Lindberg, C., Straub, V., Strigl-Pill, N., et al. (2009). Ephedrine therapy in eight patients with congenital myasthenic syndrome due to DOK7 mutations. *Neuromuscul. Disord.* 19, 828–832. doi: 10.1016/j.nmd.2009.09.008
- Scott, J. D., Dessauer, C. W., and Tasken, K. (2013). Creating order from chaos: cellular regulation by kinase anchoring. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 53, 187–210. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-011112-140204
- Shiao, T., Fond, A., Deng, B., Wehling-Henricks, M., Adams, M. E., Froehner, S. C., et al. (2004). Defects in neuromuscular junction structure in dystrophic muscle are corrected by expression of a NOS transgene in dystrophin-deficient muscles, but not in muscles lacking alpha- and beta1-syntrophins. *Hum. Mol. Genet.* 13, 1873–1884. doi: 10.1093/hmg/ddh204
- Shyng, S. L., Xu, R., and Salpeter, M. M. (1991). Cyclic AMP stabilizes the degradation of original junctional acetylcholine receptors in denervated muscle. *Neuron* 6, 469–475. doi: 10.1016/0896-6273(91)90254-W
- Sobel, A., Weber, M., and Changeux, J. P. (1977). Large-scale purification of the acetylcholine-receptor protein in its membrane-bound and detergent-extracted forms from Torpedo marmorata electric organ. *Eur. J. Biochem.* 80, 215–224. doi: 10.1111/j.1432-1033.1977.tb11874.x
- Southgate, K., and Newby, A. C. (1990). Serum-induced proliferation of rabbit aortic smooth muscle cells from the contractile state is inhibited by 8-Br-cAMP but not 8-Br-cGMP. *Atherosclerosis* 82, 113–123. doi: 10.1016/0021-9150(90)90150-H
- Spencer, M. J., and Tidball, J. G. (1996). Calpain translocation during muscle fiber necrosis and regeneration in dystrophin-deficient mice.

- Exp. Cell Res.* 226, 264–272. doi: 10.1006/excr.1996.0227
- Stanley, E. F., and Drachman, D. B. (1981). Denervation accelerates the degradation of junctional acetylcholine receptors. *Exp. Neurol.* 73, 390–396. doi: 10.1016/0014-4886(81)90274-0
- Stanley, E. F., and Drachman, D. B. (1983). Rapid degradation of “new” acetylcholine receptors at neuromuscular junctions. *Science* 222, 67–69. doi: 10.1126/science.6623057
- Steinberg, S. F., and Brunton, L. L. (2001). Compartmentation of G protein-coupled signaling pathways in cardiac myocytes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41, 751–773. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.41.1.751
- Tadaki, N., Hisa, Y., Uno, T., Koike, S., Okamura, H., and Ibata, Y. (1995). Neurotransmitters for the canine inferior pharyngeal constrictor muscle. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 113, 755–759. doi: 10.1016/S0194-5998(95)70016-1
- Tang, C. M., and Insel, P. A. (2004). GPCR expression in the heart; “new” receptors in myocytes and fibroblasts. *Trends Cardiovasc. Med.* 14, 94–99. doi: 10.1016/j.tcm.2003.12.007
- Tartas, M., Morin, F., Barriere, G., Goillandeau, M., Lacaille, J. C., Cazalets, J. R., et al. (2010). Noradrenergic modulation of intrinsic and synaptic properties of lumbar motoneurons in the neonatal rat spinal cord. *Front. Neural Circuits* 4:4. doi: 10.3389/neuro.04.004.2010
- Taylor, S. S., Kim, C., Cheng, C. Y., Brown, S. H., Wu, J., and Kannan, N. (2008). Signaling through cAMP and cAMP-dependent protein kinase: diverse strategies for drug design. *Biochim. Biophys. Acta* 1784, 16–26. doi: 10.1016/j.bbapap.2007.10.002
- Tomlinson, P. R., Wilson, J. W., and Stewart, A. G. (1994). Inhibition by salbutamol of the proliferation of human airway smooth muscle cells grown in culture. *Br. J. Pharmacol.* 111, 641–647. doi: 10.1111/j.1476-5381.1994.tb14784.x
- Torres, L. F., and Duchen, L. W. (1987). The mutant mdx: inherited myopathy in the mouse. Morphological studies of nerves, muscles and endplates. *Brain* 110(Pt. 2), 269–299. doi: 10.1093/brain/110.2.269
- Wanamaker, C. P., and Green, W. N. (2005). N-linked glycosylation is required for nicotinic receptor assembly but not for subunit associations with calnexin. *J. Biol. Chem.* 280, 33800–33810. doi: 10.1074/jbc.M501813200
- Wanamaker, C. P., and Green, W. N. (2007). Endoplasmic reticulum chaperones stabilize nicotinic receptor subunits and regulate receptor assembly. *J. Biol. Chem.* 282, 31113–31123. doi: 10.1074/jbc.M705369200
- Wohlberg, C. J., Davidoff, R. A., and Hackman, J. C. (1986). Analysis of the responses of frog motoneurons to epinephrine and norepinephrine. *Neurosci. Lett.* 69, 150–155. doi: 10.1016/0304-3940(86)90594-X
- Xu, R., and Salpeter, M. M. (1997). Acetylcholine receptors in innervated muscles of dystrophic mdx mice degrade as after denervation. *J. Neurosci.* 17, 8194–8200.
- Xu, R., and Salpeter, M. M. (1999). Rate constants of acetylcholine receptor internalization and degradation in mouse muscles. *J. Cell. Physiol.* 181, 107–112. doi: 10.1002/(SICI)1097-4652(199910)181:1<107::AID-JCP11>3.3.CO;2-0
- Yimlamai, T., Dodd, S. L., Borst, S. E., and Park, S. (2005). Clenbuterol induces muscle-specific attenuation of atrophy through effects on the ubiquitin-proteasome pathway. *J. Appl. Physiol.* 99, 71–80. doi: 10.1152/japplphysiol.00448.2004
- Zaccolo, M. (2011). Spatial control of cAMP signalling in health and disease. *Curr. Opin. Pharmacol.* 11, 649–655. doi: 10.1016/j.coph.2011.09.014
- Zaccolo, M., Magalhaes, P., and Pozzan, T. (2002). Compartmentalisation of cAMP and Ca(2+) signals. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 160–166. doi: 10.1016/S0955-0674(02)00316-2
- Zaglia, T., Milan, G., Franzoso, M., Bertaggia, E., Pianca, N., Piasentini, E., et al. (2013). Cardiac sympathetic neurons provide trophic signal to the heart via beta2-adrenoceptor-dependent regulation of proteolysis. *Cardiovasc. Res.* 97, 240–250. doi: 10.1093/cvr/cvs320
- Zeman, R. J., Peng, H., and Etlinger, J. D. (2004). Clenbuterol retards loss of motor function in motor neuron degeneration mice. *Exp. Neurol.* 187, 460–467. doi: 10.1016/j.expneurol.2004.03.006
- Zhang, B., Luo, S., Wang, Q., Suzuki, T., Xiong, W. C., and Mei, L. (2008). LRP4 serves as a coreceptor of agrin. *Neuron* 60, 285–297. doi: 10.1016/j.neuron.2008.10.006
- Zong, Y., Zhang, B., Gu, S., Lee, K., Zhou, J., Yao, G., et al. (2012). Structural basis of agrin-LRP4-MuSK signaling. *Genes Dev.* 26, 247–258. doi: 10.1101/gad.180885.111

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 25 June 2013; paper pending published: 18 August 2013; accepted: 24 September 2013; published online: 17 October 2013.

Citation: Rudolf R, Khan MM, Lustrino D, Labeit S, Kettelhut IC and Navegantes LCC (2013) Alterations of cAMP-dependent signaling in dystrophic skeletal muscle. *Front. Physiol.* 4:290. doi: 10.3389/fphys.2013.00290

This article was submitted to *Integrative Physiology*, a section of the journal *Frontiers in Physiology*.

Copyright © 2013 Rudolf, Khan, Lustrino, Labeit, Kettelhut and Navegantes. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Title

Direct Sympathetic Input Promotes Neuromuscular Synapse Homeostasis

Authors

Muzamil Majid Khan^{a,b,c}, Danilo Lustrino^d, Willian A. Silveira^d, Franziska Wild^{a,b,c}, Yasmin Issop^e, Emily O'Connor^e, Dan Cox^e, Markus Reischl^f, Till Marquardt^g, Dittmar Labeit^h, Siegfried Labeit^h, Evelyne Benoitⁱ, Jordi Molgóⁱ, Hanns Lochmüller^e, Veit Witzemann^j, Ísis C. Kettelhut^d, Luiz C. C. Navegantes^d, and Rüdiger Rudolf^{a,b,c}

Affiliations

a: Interdisciplinary Center for Neurosciences, University of Heidelberg, 69120 Heidelberg, Germany.

b: Institute of Molecular and Cell Biology, Mannheim University of Applied Sciences, 68163 Mannheim, Germany.

c: Institute of Toxicology and Genetics, Karlsruhe Institute of Technology, 76344 Eggenstein-Leopoldshafen, Germany.

d: Departments of Physiology and Biochemistry & Immunology, Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 14049-900 Ribeirão Preto, Brazil.

e: John Walton Centre for Muscular Dystrophy Research, MRC Centre for Neuromuscular Diseases, Institute of Genetic Medicine, Newcastle University, Newcastle upon Tyne, NE1 3BZ, UK.

f: Institute of Applied Informatics, Karlsruhe Institute of Technology, 76344 Eggenstein-Leopoldshafen, Germany.

g: Developmental Neurobiology Group, European Neuroscience Institute, 37077 Göttingen, Germany.

h: Department of Integrative Pathophysiology, Universität Heidelberg, 68167 Mannheim, Germany.

i: CNRS, Centre de Recherche de Gif – FRC3115, Institut de Neurobiologie Alfred Fessard – FRC2118, 91198 Gif Sur Yvette, France.

j: Max-Planck Institute of Medical Research, 69120 Heidelberg, Germany

Contact

Correspondence to: r.rudolf@hs-mannheim.de

Running Title

Dual Innervation of Adult Neuromuscular Junction

Abstract

Vertebrate neuromuscular junctions, which are necessary for generating muscle movements, are paradigm chemical synapses that have been considered as exclusively cholinergic. Recent data show that sympathicomimetics are successful in the clinical treatment of neuromuscular transmission disorders, but how they operate in this context remains unclear. We here demonstrate that in mice, neuromuscular junctions normally receive dual innervation by cholinergic motor neurons and noradrenergic sympathetic neurons. The sympathetic neurons activate postsynaptic beta2-adrenoceptors and cAMP production and function to maintain neuromuscular synapse homeostasis. Deterioration of neuromuscular junctions is similar upon sympathectomy and in neuromuscular transmission disorder phenotypes and is corrected in both cases by sympathicomimetics. These findings provide new insights into the organization of the neuromuscular synapse and may have clinical relevance beyond neuromuscular transmission disorders, as synaptic failure has been implicated in various processes such as motor neuron disease, muscle atrophy and ageing.

Main Text

Increased susceptibility to muscle fatigue is a well-known side effect of beta-blockers ¹. Furthermore, beta-blockers like esmolol modulate neuromuscular activity of drugs used during anesthesia ². Conversely, sympathicomimetics (SM) such as beta2-adrenergic agonists belong to the most efficient anabolic pharmacological agents ³ and have recently gained particular appreciation as clinical treatment of a set of neuromuscular transmission defects, in particular, congenital myasthenic syndromes (CMS) ⁴⁻⁸. Combined with earlier findings, that skeletal muscle fibers can be directly innervated by sympathetic neurons ⁹ and that removal of lumbar ganglia severely affects skeletal muscle metabolism ¹⁰, these observations suggest that skeletal muscle and, particularly, neuromuscular junctions (NMJs) might be targets of direct sympathetic input. A few previous studies are consistent with the concepts of dual input ¹¹ and the presence of catecholaminergic marker enzymes at the NMJ ^{12,13}. However, while the first work lacked any functional insight ¹¹, the latter stuck to the single-innervation model of NMJ and interpreted their findings as evidence for a secondary catecholaminergic metabolism of α -motor neurons ^{12,13}. Here, we addressed the role of sympathetic innervation to skeletal muscle from a morphological, biochemical, and functional point of view. Our study revealed dual innervation of NMJs by both, alpha motor neurons and noradrenergic sympathetic neurons. Further, the sympathetic activity triggers postsynaptic adrenoceptor and cAMP signaling and leads to postsynaptic gene expression changes. Notably, sympathectomy mimics the phenotype of myasthenic NMJs and sympathicomimetics are efficient in rescuing NMJ and movement phenotypes in mouse and fish myasthenic models. This data nicely reflects the recently described enormous success of sympaticomimetics in the pharmacological treatment of myasthenic patients and, thus, delivers a straightforward explanation of these poorly understood clinical results and paves the street for further refinements of treatment strategies in myasthenia and other neuromuscular transmission disorders.

Results

NMJs receive direct sympathetic innervation

We first investigated the scarcely explored distribution of sympathetic nervous system in skeletal muscle with special emphasis on NMJs. As expected, axons positive for the sympathetic neuron marker protein, tyrosine hydroxylase (TH) were primarily associated with blood vessels (Fig. 1A). However, NMJ regions showed additional, intriguing accumulations of TH-immunoreactivity that were directly linked to TH-positive axons (Fig. 1A and B) and which vanished upon peripheral denervation (Fig. S1). Using β III-tubulin as a general neuronal marker, two incoming axons were found at individual NMJs (Fig. 1B), and often TH staining was detected in the empty spaces between synaptic branches enriched in the major postsynaptic ion channel, nicotinic acetylcholine receptor (AChR, asterisks in Fig. 1B'). While some axons directly approached NMJs (Fig. 1B), also *en passant* contacts could be seen (Fig. 1A). Finally, axonal tracing experiments using DiI injection of sciatic nerve of mice expressing mito-Dendra in α -motor neurons also revealed dual axonal input (Fig. S2). These morphological data were supported by biochemical evidence. Indeed, TH protein was present and absent in innervated and denervated muscle lysates, respectively (Fig. 1C). The same was true for the catecholamine, norepinephrine, which was almost completely lacking in leg muscles with prior cut of sciatic nerve or removal of lumbar ganglia (Fig. 1D). Together, this data shows that in contrast to current thinking, the sympathetic nervous system makes intense connections with mammalian skeletal muscle fibers and particularly at the NMJ region.

Sympathetic input at NMJs activates postsynaptic adrenoceptor signaling

Given, that we here postulate the existence of a direct sympathetic input to NMJs, we addressed the functional significance of the connections between sympathetic neurons and NMJs. Most abundant targets of norepinephrine in skeletal muscle fibers are beta2-adrenoceptors^{14,15}. Immunofluorescence labeling of muscle longitudinal sections revealed beta2-adrenoceptor signals in axon-like structures and in congruency with AChR staining at NMJs (Fig. 2A), suggesting the presence of beta2-adrenoceptors in pre- or postsynaptic regions. Expression of a genetically encoded molecular biosensor for beta2-adrenoceptor activity, β 2-AR-s-pep¹⁶, yielded additional evidence for a strong enrichment of β 2-adrenoceptors in the postsynaptic portion of NMJs (Fig. 2B). Two-photon microscopic imaging of live mouse muscle expressing β 2-AR-s-pep revealed

activation of beta2-adrenoceptor upon electrical stimulation of sciatic nerve that was too weak to trigger muscle contraction (in the following termed as “weak stimuli”; Fig. 2C, black arrows indicate time of stimulation). Conversely, stronger nerve stimulation that caused hindlimb muscle contraction did not lead to further activation of beta2-adrenoceptor (Fig. 2C, see red dashed arrow). Signal transduction mediated by beta2-adrenoceptors mostly evokes production of the second messenger, cAMP, that can trigger a plethora of different physiological effects. To test if sympathetic stimulation can induce muscle cAMP production, we constructed a novel, NMJ-specific cAMP sensor based on EPAC-camps¹⁷, here termed as ‘rapsyn-EPAC’. In this sensor, the AChR-binding protein, rapsyn¹⁸, was cloned N-terminally to EPAC-camps. Heterologous expression in live skeletal muscle showed efficient and specific localization of the sensor at NMJs, and direct stimulation of lumbar sympathetic ganglion (Fig. 2D and E, arrows in Fig. 2E indicate time of stimulation) as well as weak stimulation of sciatic nerve led to a significant increase in subsynaptic cAMP levels (Fig. 2F, arrows indicate time of stimulation). Notably, both, local sympathectomy by means of 6-hydroxydopamine (6OH-DOP) as well as treatment with an inhibitor of beta2-adrenoceptor, ICI118551, strongly lowered the stimulation-induced increase in second messenger levels (Fig. 2F). This demonstrates the presence of α -motor neuron-independent, sympathetic connections at NMJs that activate beta2-adrenoceptors and cAMP production.

Postsynaptic gene expression is modulated by direct sympathetic input to NMJ

What are putative functions of this input? As recently reviewed¹⁹, several studies imply both, pre- and postsynaptic roles of sympathetic stimuli, and suggest therapeutic efficacy of sympathetic agonists in the treatment of neuromuscular transmission disorders such as congenital myasthenic syndromes^{4,20}. To investigate this further, we tested the effect of SM on *CHRNA1* gene activity and found a strong up-regulation of the major postsynaptic ion channel AChR (*CHRNA1* mRNA) after 10 days of treatment (Fig. 2G). Thus, beta2-adrenergic stimulation can modulate NMJ-relevant gene transcription. Similarly, SM had a positive effect on the size of AChR clusters in C2C12 myotubes (Fig. S3), suggesting that muscle adrenoceptor stimulation suffices triggering of postsynaptic gene regulation. Furthermore, peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α (PGC-1 α) is a

transcriptional coactivator of nuclear receptors and other transcription factors that regulate a set of NMJ-specific genes, including different AChR subunits, in an activity-dependent manner²¹. Given that expression of PGC-1 α is up-regulated upon beta2-adrenergic receptor activation²², we addressed the immediate effect of weak sciatic stimulation on cytoplasm-to-nucleus shuttling of PGC-1 α . Thus, PGC-1 α coupled to GFP was expressed in hindlimb muscle and its amount in nuclei upon stimulation was observed in vivo. This revealed a rapid increase in nuclear accumulation of the PGC-1 α upon stimulation (Fig. 2H and I), suggesting that this could be a route by which sympathetic input exerts its gene-regulatory function at the NMJ.

Sympathectomy mimics a neuromuscular transmission disorder phenotype

To further test the hypothesis of a trophic role of sympathetic input at NMJ, next we induced local chemical sympathectomy in hindlimbs and observed a strong reduction in NMJ sizes, NMJ complexity and AChR α protein (CHRNA1; Fig. 3A-C) after two weeks of local sympathectomy. Co-treatment of sympathectomized muscles with SM partially rescued this phenotype (Fig. 3A-C), demonstrating the central role of sympathetic activity for regulating NMJ stability. Several recent studies highlight the successful use of SM for many CMS patients^{4,6,7,23}, in particular, in cases where a reduced amount of postsynaptic AChR or a change to synapse size and structure might be causative. We used a myasthenic *CHRNA1* L269F mouse model to test effects of SM on NMJ morphology and AChR expression. Similar to sympathectomized muscles of wild type mice, myasthenic muscles showed strongly reduced NMJ sizes, NMJ complexity and visibly less AChR at the NMJ than wild type animals (Fig. 3D-F). Due to scarce amounts of AChR, many NMJs were hardly visible (Fig. 3D central panel, arrowheads). This was also reflected by a low AChR α protein content in muscle lysates from myasthenic muscle as compared to wild type (Fig. 3F). Treatment of myasthenic mice with SM for ten days significantly recovered the NMJ phenotype (Fig. 3D, lower panel), and rescued NMJ size (Fig. 3D-E) as well as AChR α protein content (Fig. 3F). Interestingly, TH was enriched in untreated myasthenic mice compared to wild type and further increased upon SM treatment (Fig. 3F). This data shows that SM can partially restore NMJ phenotypes of sympathectomized and myasthenic mice and suggests an involvement of sympathetic

innervation in NMJ maintenance. Do these changes ameliorate synaptic function? To address this question, we recorded in vivo compound muscle action potentials (CMAPs) of myasthenic mice in the course of SM treatment. While repetitive CMAPs were typical for myasthenic muscles prior to treatment (Fig. 3G, middle trace, see arrow for repetitive CMAP), prolonged application of SM showed a complete and persistent correction to normal single CMAPs (Fig. 3G-H).

Sympathomimetics rescue neurotransmission disorder in Zebrafish

Patients with congenital myasthenic syndromes currently treated in clinic with SM often carry mutations in the *DOK7* gene²⁴ and exhibit aberrant small NMJs²⁵. Since corresponding mouse models are lethal in the early postnatal period²⁶ limiting the use of these animals in pharmacological assays, and to address the general importance of our findings across phylogenetic groups, we tested the effect of SM on a previously established *DOK-7* knockdown Zebrafish model, which exhibits strongly reduced motility²⁷. Incubation with SM led to increased size, increased presynaptic ramifications and more postsynaptic AChR plaques (Fig. 4A) in both wild type and *DOK-7* morphants. Furthermore, SM treatment corrected the severe swim phenotype in a dose-dependent manner (Fig. 4B).

Discussion

Altogether, this study demonstrates the existence and physiological relevance of direct sympathetic innervation of vertebrate NMJs. These findings deliver a likely explanation for the usefulness of SM in the treatment of certain neuromuscular transmission disorders as well as for the opposite effects of beta-blockers and SM on muscle function. Of course, many questions remain open. First, the relative contributions of adrenal medulla versus direct sympathetic innervation regarding the control of muscle function have been recently addressed^{10,28} but need to be worked out further. Second, it is unclear whether therapeutic activity of SM is primarily due to an improvement of sarcomeric function or neuromuscular transmission, or a mixture of both. Indeed, our experiments involving sympathectomy and SM treatment invariably led to atrophy and hypertrophy, respectively. Given the intimate causal relationship between synaptic function, muscle

activity and muscle trophicity, it is unlikely, that these factors can be fully separated. Yet, the effects of beta-blockers on muscle fatigue¹ and anesthesia² suggest that at least an important component of the sympathetic activity directly affects synaptic integrity and function. Furthermore, while SM work in some forms of myasthenic syndromes (NMJ pathology)^{4,5,8,24} and spinal muscular atrophy (motor neuron defect involving the NMJ)²⁹, they do not seem to work in a trial for facio-scapulo-humeral muscular dystrophy (primary muscle pathology)³⁰. Our findings of an enhanced nuclear import of PGC-1 α upon sympathetic nerve stimulation provide an explanation for the transcriptional changes mediated by sympathetic agonists post exercise³¹. Given that PGC-1 α plays a pivotal role in exercise-induced mitochondrial biogenesis³², reduced levels of mitochondrial protein synthesis post exercise after treatment with beta blockers³³ could be explained, too. Furthermore, given a direct sympathetic input to skeletal muscles via sciatic nerve, various documented effects using sciatic denervation as atrophy model system might have an important sympathetic contribution as well. Consistent with this hypothesis, treatment of rat skeletal muscles with norepinephrine reduces mRNA levels of atrogens such as atrogin-1 and MuRF1¹⁰. In summary, our novel finding of a direct sympathetic input to the synapses of skeletal muscles provide an explanation to the various effects of beta-adrenergic agonists and antagonists on skeletal muscle gene expression as well as changes in electrical properties of muscle fibers documented so far. Consequently, sympathetic stimulation appears as a logical strategy to treat several neuromuscular transmission defects as shown for models of myasthenia gravis²⁰ and in the clinical context of CMS^{4,24}.

online Methods

Animals: All animals were kept, bred and treated according to ethical guidelines adopted by Brazilian College of Animal Experimentation and the EU directive 2010/63/EU. Experimental protocols were approved by the commission of ethics in animal research from School of Medicine of Ribeirão Preto and the National authorities in France, Germany, and UK. Adult (> 4 and < 12 months of age) male and female C57BL/10J, CHRNE L269F and MitoDendra-Olig2 mice and Golden strain (slc24a5^{b1/+}) Zebrafish (Zebrafish International Resource Center, Oregon) were used for experiments.

Anaesthesia and preperation of mice for microscopy and electrophysiology was done as described previously^{34–36}. Zebrafish embryos were raised and staged in hours post-fertilization (hpf) according to standard protocols as described previously²⁷. Given that all treated animals, unless excluded for having reached predetermined exclusion criteria, were used for data analysis, randomization and blinding were not applied.

Stimulation of lumbar sympathetic ganglionic chain and sciatic nerve: Stimulation of sciatic nerve was performed using the A.M.P.I. master-8 CP stimulator and Harvard Apparatus microelectrodes. The voltage threshold for inducing visible muscle contraction was $> 0.2V$ ³⁷. Stimulation below this value did not induce muscle contraction and was termed as ‘weak stimulation’. Each train of stimuli (weak or above threshold) consisted of 10 tetanic pulses as described previously³⁷. Stimulation of the sympathetic ganglionic chain involved the following preparation: The lumbar sympathetic chain is surrounded by connective tissue in front of the vertebral column, behind the aorta and vena cava. The chain was exposed via a midline laparotomy approach. Connective tissue surrounding the chain was carefully removed and microelectrodes were placed with caution around the chain. Weak stimulation intensity as explained above was used.

Pharmacological Treatments of mice: Figs. 2 and 3A-F: Freshly prepared clenbuterol (CB, sympathicomimetics, SM, in PBS) solution was injected subcutaneously (3mg/kg) for 10 days prior to microscopy. ICI118551 (β_2 -adrenoceptor antagonist, in PBS) was injected subcutaneously (5mg/kg) for two days (a day prior to microscopy and 1 hour before microscopy). Chemical sympathectomy was performed using 6-hydroxydopamine (6OH-DOP)³⁸. 6OH-DOP (in 0.3% ascorbic acid oxygen free water) was injected locally in the hindlimbs (100mg/kg) on alternate days for two weeks prior to imaging. Fig. 3G-H: Ephedrine treatment (SM) was carried out at a dosage of 25 $\mu g/g$ of mouse for 30 to 45 days as indicated in Fig. 3G.

Molecular biosensors, electroporation and *in vivo* imaging: Rapsyn–EPAC cAMP FRET sensor was cloned into pcDNA3 using PCR. pcDNA3/ β_2AR -s-pep FRET sensor, and GFP-PGC1alpha were obtained from Addgene. cDNAs encoding for heterologous

fusion proteins were transfected into tibialis anterior muscle as described previously^{34,39,40} and 8-10 days later, the transfected muscle was exposed and subjected to microscopic analysis. AChRs were marked with AlexaFluor conjugates of α -bungarotoxin (BGT-AF555 or 647) by injection of 50 μ l of BGT-AF (Invitrogen, 1:200 in PBS) into the hindlimb. For analysis of the size of NMJs, the tibialis anterior muscles were injected with BGT-AF647 as explained above 10 days prior to imaging. For DiI anterograde labeling of neurons in sciatic nerve 10 μ l solution of 1 μ g/ μ l DiI (N22880, LifeTechnologies) in PBS were injected 5 days prior to imaging into the sciatic nerve of MitoDendra-Olig2 mice. NMJs of tibialis anterior muscles were labeled with BGT-AF647 as explained above. In vivo imaging was performed using a DMRE TCS SP2 confocal microscope as described³⁴.

Compound muscle action potential measurement: CMAPs were recorded in vivo on time intervals indicated in Fig. 3H, by means of a minimally-invasive electrophysiological method, using the Qtrac© software, as detailed previously^{36,41}. In brief, the mice were kept under isoflurane (AErrane®, Belgium) anesthesia inhalation and electrical stimulations were delivered to the tibial branch of sciatic motor nerve, by means of surface electrodes, and the compound muscle action potential (CMAP) was recorded using needle electrodes inserted into the plantar muscle.

Immunohistochemistry (IHC), Western blot (WB) and HPLC analysis: IHC of chemically fixed EDL muscles and WB analysis of snap frozen gastrocnemius muscles were performed as described previously⁴². Primary antibodies used for IHC and WB: rabbit anti-tyrosine hydroxylase (AB152, Millipore, 1:250), rabbit anti-tyrosine hydroxylase (sc-14007, Santa Cruz, 1:500), rabbit anti- β_2 -adrenoceptor (sc-569, Santa Cruz, 1:200), mouse anti- α -actinin (A7811, Sigma Aldrich, 1:5000), mouse anti-GAPDH (MA5-15738, ThermoScientific, 1:10000), rabbit anti-AChR (sc-292790, Santa Cruz, 1:500), mouse anti- β III-tubulin (T8578, Sigma Aldrich 1:200), mouse anti-SV2 (SV2, Developmental Studies Hybridoma Bank, 1:200), Alexa Fluor (AF) 488-conjugated wheat-germ agglutinin (W11261, Invitrogen, 1:500), BGT-AF488, BGT-AF555, BGT-AF594, BGT-AF647 (all Invitrogen, 1:200). Secondary antibodies: AlexaFluor 546

conjugated anti-rabbit (A11010, Invitrogen, 1:1000). AlexaFluor 488 conjugated anti-mouse (A11001, Invitrogen, 1:200). WB secondary antibodies: anti-rabbit-HRP (P0448, Daco, 1:1000), anti-mouse-HRP (P0260, Daco, 1:1000). HPLC: Wild type gastrocnemius muscle 3 days post sciatic denervation were harvested and snap frozen with the contralateral innervated muscle acting as control. Noradrenaline was assayed using HPLC (LC-7A, Shimadzu Instruments) with Spherisorb ODS-2 (5µm; Sigma-Aldrich) reversed phase column, as previously described⁴³.

qPCR: Messenger RNA from mouse tibialis anterior muscles was isolated using TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) and the quantitative PCR was performed as described elsewhere¹⁰ using following primers; *CHNRA1* forward 5'TGCGGAAGGTTTTTATCGAC^{3'} and reverse 5'CGGAGAGTGAAAGCCCATAG^{3'}, and *Rn18S* forward 5'GAAACGGCTACCACATCCAAG^{3'} and reverse 5'CCTCCAATGGATCCTCGTTAA^{3'}. For Zebrafish analyses reverse transcription was performed with 1 µg total embryonic Zebrafish RNA as template with the Superscript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen) and MolTaq DNA polymerase (Molzym). Regions of interest were amplified with DOK-7 forward 5'GAGTTTGCGTGTGTGTTACAGC^{3'} and reverse 5'CTGTCATGCTGGGTTTCGACA^{3'}. Elongation factor 1 alpha forward 5'CTGGAGGCCAGCTCAAACATGG^{3'} and reverse 5'CTTGCTGTCTCCAGCCACATTAC^{3'} as described previously²⁷.

Antisense Morpholino Oligonucleotide Knockdown approach and swim phenotype analysis:

Antisense morpholino oligonucleotides (MO, Gene Tools LLC) were injected into the yolk of one to two cell stage Zebrafish embryos as described earlier²⁷. MO amounts ranging from 15 ng to 20 ng were used. zDok-7 MO (5'ATTATAGGATTACCTGCTACCGG^{3'}) and control, human β-hemoglobin gene MO (5'CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA^{3'}) were suspended in 1x Danieau buffer (58 mM NaCl, 0.7 mM KCl, 0.4 mM MgSO₄, 0.6 mM Ca(NO₃)₂, 5 mM HEPES; pH 7.6) with phenol red as an injection indicator. Touch-evoked swimming response was observed by touching the head or tail of the Zebrafish with a fine pipette tip. Alternating

tail movements were observed under Leica stereomicroscope equipped with a digital camera (model LEICA DFC 420C) and were analyzed as described previously ²⁷.

C2C12 AChR cluster formation assay: C2C12 cells (ATCC), recently authenticated and tested for mycoplasma, were seeded at a density of 0.3×10^6 cells per 9.5 cm^3 well and cultured for 24 hours at 37°C and 5 % CO_2 in DMEM supplemented with antibiotics and 10 % fetal bovine serum. To obtain myotubes differentiation medium containing DMEM, 3 % horse serum and antibiotics was used for 6 days at 37°C and 5 % CO_2 . After 6 days of differentiation cells were treated with salbutamol (sympathomimetic, SM, $100 \mu\text{M}$) for 48 hrs at 37°C . Agrin was added to the cells on day 7 for 24 hrs. Cells were fixed for 30 minutes in PBS containing 4 % paraformaldehyde (PFA). 1 mM BGT-AF594, DAPI (Vector Laboratories) and Vectashield mounting medium was used for immunocytochemistry. The length of AChR clusters was measured from 5 fields for each condition and data are expressed as the average length of AChRs per field view.

Image analysis, 3D projections: Image composition used Adobe Photoshop and Adobe Illustrator (both Adobe Systems Software). Analysis of FRET imaging data used ImageJ v.2.0.0.-rc-15 and involved serial steps as described before ³⁹. In brief, postsynaptic areas enriched in either rapsyn-EPAC or $\beta 2\text{AR-s-pep}$ fluorescence were segmented in median filtered YFP-emission image stacks. Binarized masks were made from segmented areas and these were applied to mean filtered CFP- and YFP-image stacks. Ratio-images (CFP/YFP and YFP/CFP for rapsyn-EPAC and $\beta 2\text{AR-s-pep}$, respectively) were made and average ratios determined for each postsynaptic area on at least 5 up to 10 subsequent optical slices. All values obtained from one muscle per time point were averaged. Data show mean values of several individual experiments. For PGC1alpha data, maximum-z-projections were made. Then, GFP-positive nuclei were segmented in the first image stack (before stimulation). These segments were shifted in the following image stacks to best fit the region of corresponding nuclei. From each segment mean grey value was measured. Graph shows average of many nuclei per experiment normalized for bleaching from 5 different experiments. For 3D projections, fluorescence signals were segmented

and converted to a binarized mask, which was applied to original images. Masked data sets were imported into ImageJ plugin VolumeViewer to produce 3D surface projections.

Statistical analysis: Graphic representation of data was achieved by Microsoft Excel:mac2008 and subsequent incorporation into Adobe Illustrator composites. Significance was tested with Student t-test or Welch test, where applicable. Therefore, Kolmogorov-Smirnow-test for normal distribution and F-test for homo/heteroscedasticity were performed. Sample sizes were calculated to reach 80 % power and $\beta < 0.2$ on the basis of previous experiments and titrations. Exclusion of animal samples were as predefined in corresponding applications to ethical committees.

References

1. Hunter, A. M. *et al.* The effect of selective beta1-blockade on EMG signal characteristics during progressive endurance exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* **88**, 275–81 (2002).
2. Kim, K. S., Kim, K. H., Shin, W. J. & Yoo, H. K. Neuromuscular interactions between mivacurium and esmolol in rabbits. *Anaesthesia* **53**, 140–5 (1998).
3. Lynch, G. S. & Ryall, J. G. Role of beta-adrenoceptor signaling in skeletal muscle: implications for muscle wasting and disease. *Physiol Rev* **88**, 729–767 (2008).
4. Liewluck, T., Selcen, D. & Engel, A. G. Beneficial effects of albuterol in congenital endplate acetylcholinesterase deficiency and Dok-7 myasthenia. *Muscle Nerve* **44**, 789–794 (2011).
5. Burke, G. *et al.* Salbutamol benefits children with congenital myasthenic syndrome due to DOK7 mutations. *Neuromuscul. Disord.* **23**, 170–5 (2013).
6. Lashley, D., Palace, J., Jayawant, S., Robb, S. & Beeson, D. Ephedrine treatment in congenital myasthenic syndrome due to mutations in DOK7. *Neurology* **74**, 1517–23 (2010).
7. Lorenzoni, P. J. *et al.* Salbutamol therapy in congenital myasthenic syndrome due to DOK7 mutation. *J. Neurol. Sci.* **331**, 155–7 (2013).
8. Schara, U. *et al.* Ephedrine therapy in eight patients with congenital myasthenic syndrome due to DOK7 mutations. *Neuromuscul Disord* **19**, 828–832 (2009).

9. Barker, D. & Saito, M. Autonomic innervation of receptors and muscle fibres in cat skeletal muscle. *Proc R Soc L. B Biol Sci* **212**, 317–332 (1981).
10. Silveira, W. A. *et al.* Activating cAMP/PKA signaling in skeletal muscle suppresses the ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis: implications for sympathetic regulation. *J. Appl. Physiol.* (2014).
doi:10.1152/jappphysiol.01055.2013
11. Boeke, J. Die doppelte (motorische und sympathische) efferente Innervation der quergestreiften Muskelfasern. *Anat Anz* **44**, 343–356 (1913).
12. Chan-Palay, V., Engel, A. G., Palay, S. L. & Wu, J. Y. Synthesizing enzymes for four neuroactive substances in motor neurons and neuromuscular junctions: light and electron microscopic immunocytochemistry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 6717–6721 (1982).
13. Chan-Palay, V., Engel, A. G., Wu, J. Y. & Palay, S. L. Coexistence in human and primate neuromuscular junctions of enzymes synthesizing acetylcholine, catecholamine, taurine, and gamma-aminobutyric acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 7027–7030 (1982).
14. Kim, Y. S., Sainz, R. D., Molenaar, P. & Summers, R. J. Characterization of beta 1- and beta 2-adrenoceptors in rat skeletal muscles. *Biochem. Pharmacol.* **42**, 1783–9 (1991).
15. Williams, R. S., Caron, M. G. & Daniel, K. Skeletal muscle beta-adrenergic receptors: variations due to fiber type and training. *Am. J. Physiol.* **246**, E160–7 (1984).
16. Malik, R. U. *et al.* Detection of G protein-selective G protein-coupled receptor (GPCR) conformations in live cells. *J. Biol. Chem.* **288**, 17167–78 (2013).
17. Nikolaev, V. O., Bunemann, M., Hein, L., Hannawacker, A. & Lohse, M. J. Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation. *J Biol Chem* **279**, 37215–37218 (2004).
18. Frail, D. E., McLaughlin, L. L., Mudd, J. & Merlie, J. P. Identification of the mouse muscle 43,000-dalton acetylcholine receptor-associated protein (RAPsyn) by cDNA cloning. *J Biol Chem* **263**, 15602–15607 (1988).

19. Rudolf, R. *et al.* Alterations of cAMP-dependent signaling in dystrophic skeletal muscle. *Front. Physiol.* **4**, 290 (2013).
20. Ghazanfari, N., Morsch, M., Tse, N., Reddel, S. W. & Phillips, W. D. Effects of the β 2-adrenoceptor agonist, albuterol, in a mouse model of anti-MuSK myasthenia gravis. *PLoS One* **9**, e87840 (2014).
21. Handschin, C. *et al.* PGC-1alpha regulates the neuromuscular junction program and ameliorates Duchenne muscular dystrophy. *Genes Dev.* **21**, 770–83 (2007).
22. Miura, S. *et al.* An increase in murine skeletal muscle peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha (PGC-1alpha) mRNA in response to exercise is mediated by beta-adrenergic receptor activation. *Endocrinology* **148**, 3441–8 (2007).
23. Lashley, D., Palace, J., Jayawant, S., Robb, S. & Beeson, D. Ephedrine treatment in congenital myasthenic syndrome due to mutations in DOK7. *Neurology* **74**, 1517–1523 (2010).
24. Cruz, P. M. R., Palace, J. & Beeson, D. Congenital myasthenic syndromes and the neuromuscular junction. *Curr. Opin. Neurol.* **27**, 566–75 (2014).
25. Slater, C. R. *et al.* Pre- and post-synaptic abnormalities associated with impaired neuromuscular transmission in a group of patients with “limb-girdle myasthenia”. *Brain* **129**, 2061–76 (2006).
26. Arimura, S. *et al.* Neuromuscular disease. DOK7 gene therapy benefits mouse models of diseases characterized by defects in the neuromuscular junction. *Science* **345**, 1505–8 (2014).
27. Müller, J. S. *et al.* Dok-7 promotes slow muscle integrity as well as neuromuscular junction formation in a zebrafish model of congenital myasthenic syndromes. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 1726–40 (2010).
28. Graça, F. A. *et al.* Epinephrine depletion exacerbates the fasting-induced protein breakdown in fast-twitch skeletal muscles. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **305**, E1483–94 (2013).
29. Pane, M. *et al.* Daily salbutamol in young patients with SMA type II. *Neuromuscul. Disord.* **18**, 536–40 (2008).

30. Kissel, J. T. *et al.* Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of albuterol in facioscapulohumeral dystrophy. *Neurology* **57**, 1434–40 (2001).
31. Bruno, N. E. *et al.* Creb coactivators direct anabolic responses and enhance performance of skeletal muscle. *EMBO J.* **33**, 1027–43 (2014).
32. Geng, T. *et al.* PGC-1alpha plays a functional role in exercise-induced mitochondrial biogenesis and angiogenesis but not fiber-type transformation in mouse skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **298**, C572–9 (2010).
33. Robinson, M. M. *et al.* Beta-Adrenergic receptor blockade blunts postexercise skeletal muscle mitochondrial protein synthesis rates in humans. 327–334 (2011). doi:10.1152/ajpregu.00160.2011.
34. Röder, I. V *et al.* Role of Myosin va in the plasticity of the vertebrate neuromuscular junction in vivo. *PLoS One* **3**, e3871 (2008).
35. Choi, K. R. *et al.* Rapsyn mediates subsynaptic anchoring of PKA type I and stabilisation of acetylcholine receptor in vivo. *J Cell Sci* **125**, 714–723 (2012).
36. Marrouchi, R., Rome, G., Kharrat, R., Molgó, J. & Benoit, E. Analysis of the action of gymnodimine-A and 13-desmethyl spirolide C on the mouse neuromuscular system in vivo. *Toxicon* **75**, 27–34 (2013).
37. Allen, D. G. *et al.* Interactions between intracellular calcium and phosphate in intact mouse muscle during fatigue. *J. Appl. Physiol.* **111**, 358–66 (2011).
38. Thoenen, H. & Tranzer, J. P. Chemical sympathectomy by selective destruction of adrenergic nerve endings with 6-Hydroxydopamine. *Naunyn. Schmiedeberg's. Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* **261**, 271–88 (1968).
39. Röder, I. V *et al.* Myosin Va cooperates with PKA RIalpha to mediate maintenance of the endplate in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 2031–2036 (2010).
40. Rudolf, R., Hafner, M. & Mongillo, M. Investigating second messenger signaling in vivo. *Methods Enzymol.* **505**, 363–82 (2012).
41. Boërio, D., Greensmith, L. & Bostock, H. Excitability properties of motor axons in the maturing mouse. *J. Peripher. Nerv. Syst.* **14**, 45–53 (2009).
42. Khan, M. M. *et al.* Role of autophagy, SQSTM1, SH3GLB1, and TRIM63 in the turnover of nicotinic acetylcholine receptors. *Autophagy* **10**, 123–36 (2014).

43. Garofalo, M. A., Kettelhut, I. C., Roselino, J. E. & Migliorini, R. H. Effect of acute cold exposure on norepinephrine turnover rates in rat white adipose tissue. *J. Auton. Nerv. Syst.* 60, 206–8 (1996).

Author Contributions

Experiment Planning: MMK, DL, WAS, FW, YI, EOC, DC, TM, DL, SL, EB, JM, HL, VW, ICK, LCCN, RR. Experiment Execution: MMK, DL, WAS, FW, YI, EOC, DC, EB, LCCN, RR. Data Analysis: MMK, DL, WAS, FW, YI, EOC, DC, MR, EB, RR. Contribution of Material: TM, DL, SL, VW, LCCN, RR. Writing: MMK, DL, TM, SL, JM, HL, VW, LCCN, RR.

Acknowledgements

RR and SL were supported by EU IRSES grant SarcoSi and DFG grants La668/15-1, RU923/7-1 and RU923/8-1, and a grant from Hector Stiftung. HL is supported by the Medical Research Council UK (reference G1002274, grant ID 98482), and by the European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement No. 305444 (RD-Connect) and 305121 (Neuromics). ICK and LCCN were supported by (FAPESP 2012/51456-1; 2012/24524-6); DL is supported by the FAPESP 2012/05697-7), WAS is supported by the (FAPESP 2010/11083-6). We thank Dr. Steve H Laval for critical discussion. We acknowledge the help of animal facilities at host institutes.

Figure legends

Figure 1: Sympathetic neurons innervate NMJs. **A.** 3D-projections of wt muscle stained with BGT-AF647 (AChR, blue), wheat germ agglutinin-AF488 (blood vessels, nerve fibers and NMJs, green) and anti-TH antibody (red). Arrowheads point to a TH-positive axon, lining a blood vessel and deviating to touch NMJ. **B.** 3D-projections of wt muscle stained with BGT-AF647 (AChR, blue), anti- β III tubulin (axonal marker, green) and anti-TH antibodies (red). Note β III tubulin and TH-double positive axon (filled arrowheads) that enters the same NMJ as a β III tubulin single positive α -motor neuron (open arrowheads). Boxed regions indicate areas shown in blow-ups in **B'**. **B'**. Asterisks point to regions where TH-staining lines band-like ramifications of the presynaptic terminal of the α -motor neuron. Filled arrowheads, TH- and β III tubulin double-positive neuron;

open arrowhead, β III tubulin single-positive α -motor neuron **C**. Western blot signals of innervated (i.) and denervated (d.) muscle lysates stained against indicated proteins. **D**. Quantitative HPLC analysis of muscle lysates for norepinephrine levels in mouse. *** $P < 0.001$, error bars depict S.E.M. Samples from innervated, denervated, and sympathectomized muscles were abbreviated as i., d., and s., respectively.

Figure 2: Neuronal, sympathetic input modulates adrenergic signal transduction, gene expression and PGC1 α localization in muscle. **A**. 3D-projections of EDL longitudinal sections stained with BGT-AF488 (AChR, blue) and anti- β_2 adrenergic receptor antibody (green). **B**. β_2 AR-s-peptide FRET sensor (green) is enriched at NMJ (blue). **C**. Weak stimulation of sciatic nerve increases the activity of β_2 -adrenoceptor as seen by increased FRET response of biosensor. Black and red arrows indicate weak and strong nerve stimulation, respectively. Only the latter led to muscle contraction. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, Mean $\pm$ S.E.M. (n = 5) **D**. Rapsyn-EPAC cAMP-sensor expression is confined to NMJ. Upper panels, rapsyn-EPAC distribution; lower panels, pseudo-colored images indicating FRET response before (left) and after lumbar stimulation (right). **E. and F**. Quantification of the changes in FRET signals upon: no stimulation, stimulation of lumbar ganglion (l.s.), or weak sciatic stimulation (w.s.) in the absence or presence of ICI118511 or 6-hydroxydopamine (6OH-DOP). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, Mean $\pm$ S.E.M. (E: n = 7, F: n = 5 (w.s.), 7 (w.s.+6OH-DOP), 8 (w.s.+ ICI118511)). **G**. Quantification of the effect of SM on levels of CHRNA1 mRNA. ** $P < 0.01$, Mean $\pm$ S.E.M. (n = 5). **H. and I**. Exemplary confocal images and quantification of PGC-1 α -GFP in myonuclei upon weak stimulation of sciatic nerve. Numbers in images indicate time after start of experiment. Dashed columns in graph show times of stimulation. Mean $\pm$ S.E.M. (n = 5).

Figure 3: SM treatment rescues NMJ phenotype of sympathectomized and myasthenic muscle. **A-F**. Wild type (wt) and myasthenic mice expressing the L269F mutation of CHRNE (ϵ L269F) were injected for ten days daily with saline or SM as indicated. SE, local sympathectomy induced by 6OH-DOP. **A. and D**. Confocal projections show muscle AChRs in NMJs stained with BGT-AF647. Note, that NMJs in saline-treated sympathectomized and myasthenic muscles mostly exhibit structural deficits and low

AChR density (arrowheads). **B. and E.** Quantification reveals a significant rescue of NMJ size in SM-treated sympathectomized and myasthenic muscles. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, Mean $\pm$ S.E.M. (n-numbers in B: 6 (wt), 10 (SE), 9 (SE-SM). n-numbers in E: 5 (wt), 6 (ϵ L269F), 6 (ϵ L269F+SM)). **C. and F.** Western blots of lysates from muscles as indicated. Protein content of AChR α subunit, CHRNA1, is low in saline-treated sympathectomized as well as myasthenic muscles and rescued upon SM-treatment. TH is absent upon SE but strongly up-regulated in myasthenic muscle and further boosted by SM. GAPDH, loading control. Tick marks indicate position of molecular weight markers (top to bottom, in kDa): 55, 100, 55, 55. **G. and H.** Nerve-evoked compound muscle action potentials (CMAPs) recorded *in vivo*. **G.** Representative traces of CMAPs of maximal amplitude recorded from wt, and at 0 or 30 days after ephedrine treatment of ϵ L269F mice. The main difference in excitability between wt and ϵ L269F animals is a repetitive CMAP (arrow). **H.** Histogram of data obtained on ϵ L269F mice, expressed as percent of the total ϵ L269F animals studied (n = 7), showing either single (light grey) or repetitive (dark grey) CMAPs, before and during SM treatment. Note that all ϵ L269F mice showed a single CMAP after 30 and 45 days of treatment.

Figure 4: SM treatment induces synaptic ramification and corrects swim deficit of myasthenic Zebrafish. Wild type and Dok-7 morphants were incubated in the absence or presence of SM (+SM) for 48 h. **A.** Embryos were stained for AChR (BGT, red in overlays) and presynaptic nerve endings (SV2, green in overlays). Dok-7 MO-injected embryos exhibited much less distributed and myoseptal AChR clusters than controls. Size and number of presynaptic nerve endings increased in embryos treated with SM. **B.** Prior SM treatment, DOK-7 MO-injected embryos demonstrated half normal and abnormal touch-evoked response to stimuli. Upon SM treatment, motility improved leading to an increase in normal swim behavior in a dose-dependent manner. Mean $\pm$ S.E.M. (n = 6).

Figure 1

Figure 2

Figure 3

Figure 4

A

B

Supplementary Display Items

Legends

Fig. S1: TH immunostaining shows nerve-dependent direct sympathetic neuronal input to NMJs. Longitudinal sections from innervated (A) or denervated (B) hindleg muscles were stained with anti-TH antibody and BGT-AF647 to label sympathetic neurons (red) and NMJs (blue), respectively. Note almost complete loss of TH staining in denervated sample.

Fig. S2: Neuronal DiI tracing in Olig2:mitoDendra mice reveals dual NMJ innervation. In vivo 3D-projections of muscle from Olig2:mitoDendra mice stained with BGT-AF647 (AChR, blue), Dendra (mitochondria of α -motor neurons, green) and DiI (axons, red). DiI was applied 5 days prior to imaging to sciatic nerve *in vivo*. **A.** Note two DiI-positive inputs to NMJ indicated by open and filled arrowheads. Inputs of sympathetic and α -motor neurons are lined by filled and open arrowheads, respectively. **B.** The lower right panel shows an overlay of all three color channels. Each panel consists of a top view (x-y, upper right in each panel) and two side views (y-z and x-z, left and lower right in each panel, respectively) of the same image stack. Dendra- and DiI-double positive axons of α -motor neurons (lined by open arrowheads) branch out from the nerve bundle that runs in parallel to the NMJs and can be particularly well seen in the y-z views. As judged from the distance, this nerve bundle appears to be spaced from the visible NMJs by one layer of muscle fibers. Conversely, a Dendra-negative and DiI-positive connection (lined by filled arrowheads) between the two visible NMJs that continues beyond the field of view runs at the height of the NMJs. This connection can be well seen in the x-y and x-z views.

Fig. S3: SM treatment of C2C12 myotubes causes an increase in AChR cluster length. **A-B.** Fluorescence micrographs of C2C12 myotubes labeled with BGT-AF594 (red) and DAPI for nuclei staining (blue) before (A) and after 48 h of SM treatment (B). **C.** Analysis of AChR clusters revealed a statistically significant increase in AChR cluster length in SM-treated cells when compared to controls ($P < 0.001$). Each data point

represents the mean length of AChR clusters. *** $P < 0.001$, error bars depict S.E.M. (n = 5).

Figure S1

Figure S2

A

B

Figure S3