

研究论文

慢性间断性低氧诱导大鼠前包钦格复合体磷酸化PKC底物表达增加

亢君君, 魏晓燕, 刘莹莹*

空军军医大学神经生物学教研室, 西安 710032

摘要: 延髓腹外侧前包钦格复合体(pre-Bötzing complex, pre-BötC)被认为是呼吸节律产生中枢。间断性低氧可诱导呼吸长时程易化(long-term facilitation, LTF), 是呼吸可塑性的电生理特征。本研究组前期研究显示慢性间断性低氧(chronic intermittent hypoxia, CIH)诱导大鼠pre-BötC磷酸化蛋白激酶C θ (phospho-protein kinase C θ , P-PKC θ)表达上调。本研究旨在探讨磷酸化-蛋白激酶C底物(P-PKC substrates, P-PKCsub)在大鼠pre-BötC的超微结构分布以及CIH干预后的表达变化。应用神经激肽1受体(neurokinin-1 receptor, NK1R)免疫反应(immunoreactive, ir)产物作为pre-BötC神经元的标志, 并用抗P-PKCsub抗体双标记进行免疫荧光和免疫电镜观察, 用Western blot分析延髓腹外侧区(包含pre-BötC) P-PKCsub蛋白的表达变化。结果显示, 光镜下, NK1R-ir标记主要沿pre-BötC神经元胞膜分布, 清晰勾勒胞体和突起。P-PKCsub-ir标记多呈点状分布在胞体和突起, 膜下亦有分布。大部分P-PKCsub-ir神经元共表达NK1R。CIH干预诱导延髓腹外侧区P-PKCsub蛋白表达水平上调。电镜下, NK1R-ir产物主要分布在pre-BötC神经元胞体和树突的胞膜内表面。P-PKCsub-ir金颗粒分布在pre-BötC神经元胞体和树突, 在细胞膜下有较多分布, 内质网和突触后致密体亦可见。以上结果提示, CIH干预可能通过激活PKC θ , 上调P-PKCsub蛋白表达, 参与pre-BötC的呼吸可塑性调控。

关键词: 前包钦格复合体; 蛋白激酶C底物; 慢性间断性低氧; 呼吸可塑性; 超微结构

中图分类号: R331.3; Q463

Chronic intermittent hypoxia induces expression of phospho-PKC substrates in rat pre-Bötzing complex

KANG Jun-Jun, WEI Xiao-Yan, LIU Ying-Ying*

Department of Neurobiology, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China

Abstract: The pre-Bötzing complex (pre-BötC) residing in the ventrolateral medulla oblongata, is thought to be the kernel of respiratory rhythmogenesis. Episodic hypoxia exerts respiratory long-term facilitation, being recognized as electrophysiological characteristic of respiratory motor neuroplasticity. Our previous study demonstrated up-regulated expression of phospho-protein kinase C θ (P-PKC θ) in the pre-BötC of rats receiving chronic intermittent hypoxic (CIH) challenge. The present study was aimed to examine subcellular distribution of P-PKC substrates (P-PKCsub) and explore PKC down-stream targeting proteins in the pre-BötC in normoxic and CIH rats. Using neurokinin-1 receptor (NK1R) as a marker of the pre-BötC, P-PKCsub immunoreactivity was revealed by immunofluorescence and immuno-electron microscopic double-labeling in the pre-BötC. Western blot was applied to analyze P-PKCsub proteins in ventrolateral medulla, containing the pre-BötC. The results showed that NK1R immunoreactivity (NK1R-ir) was expressed mainly along plasma membranes of somata and processes, outlining pre-BötC neurons under the light microscope. P-PKCsub immunoreactive (P-PKCsub-ir) fluorophores in dot-like appearance appeared in somata and processes. Some were in close apposition to plasma membranes. A majority of P-PKCsub-ir neurons was found with NK1R-ir. CIH challenge up-regulated the expression of P-PKCsub proteins in the ventrolateral medulla. Under the electron microscope, NK1R-ir product was found to distribute along the inner mem-

Received 2019-10-24 Accepted 2020-03-19

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31171102, 31471097).

*Corresponding author. Tel: +86-29-84712318; E-mail: yingyliu@fmmu.edu.cn

brane surfaces of somata and dendrites. P-PKCsub-ir gold particles were located in somata and dendrites, and some were distributed along the inner membrane surfaces, as well as in the endoplasmic reticulum and postsynaptic dense body. These results suggest that CIH challenge up-regulates the expression of P-PKCsub proteins, probably including some receptor proteins in the postsynaptic membrane, which may contribute to respiratory neuroplasticity via activation of PKC θ in the pre-BötC.

Key words: pre-Bötzing complex; PKC substrates; chronic intermittent hypoxia; respiratory plasticity; ultrastructure

呼吸不仅是自主节律性运动, 还表现为可塑性变化。机体为应答内、外环境变化而发生的持续性呼吸节律的改变称为呼吸可塑性^[1], 例如运动员的深大呼吸不同于常人, 体现了呼吸可塑性变化。研究呼吸可塑性最常用的动物模型是间断性低氧大鼠模型, 间断性低氧可诱导膈神经或舌下神经产生持续强烈的放电效应, 该效应称为长时程易化 (long-term facilitation, LTF), 是呼吸可塑性表达的电生理特征^[1]。目前有关呼吸可塑性的研究主要集中在脊髓颈段膈核、膈神经, 人们关注这些部位 LTF 的表达及其发生机制, 以探讨高位脊髓截瘫呼吸衰竭患者潜在的治疗对策^[2,3]。

前包钦格复合体 (pre-Bötzing complex, pre-BötC) 位于延髓腹外侧, 被认为是呼吸节律产生中枢。pre-BötC 神经元高表达神经激肽 1 受体 (neurokinin 1 receptor, NK1R), 双侧损毁 80% 以上的 NK1R- 免疫反应 (immunoreactive, ir) 神经元可严重干扰呼吸节律, 导致血气异常, NK1R-ir 产物已被用做 pre-BötC 神经元的形态学标志物^[4,5]。我们关注 pre-BötC 神经元的神经化学成分、神经递质和受体特征以及突触联系, 认为 pre-BötC 不仅主导呼吸节律产生, 同时参与呼吸可塑性调控。我们前期应用间断性低氧大鼠模型进行了形态学和电生理研究, 发现 pre-BötC 神经元磷酸化蛋白激酶 C θ (phosphoprotein kinase C θ , P-PKC θ) 信号通路参与呼吸可塑性调控, 可特异性阻断 P-PKC θ , 阻断膈神经 LTF 产生^[6,7]。目前尚不清楚磷酸化 PKC 底物 (P-PKC substrates, P-PKCsub) 在 pre-BötC 的表达变化。本研究应用慢性间断性低氧 (chronic intermittent hypoxia, CIH) 大鼠模型, 探讨 pre-BötC 神经元 P-PKCsub 的超微结构分布及表达变化, 为 PKC/PKCsub 系统参与 pre-BötC 呼吸可塑性调控提供形态学依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器 豚鼠抗 NK1R 抗体 (AB5800, Chemicon); 兔抗 P-PKCsub 抗体 (2261, Cell Signaling Technology); 生物素标记的抗豚鼠 IgG (Jackson);

Texas Red (TR) 标记卵白素、FITC 标记抗兔 IgG (Molecular Probes); ABC 试剂盒 (Sigma); 1.4 nm 金标记抗兔 IgG、银加强试剂盒 (Nanoprobes); Super-Signal West Pico 试剂盒 (Pierce Biotechnology)。CM1900 恒冷箱切片机 (Leica); Fluoview 300 激光共聚焦显微镜 (Olympus); 化学发光成像仪 (上海欧翔科学仪器有限公司); UC6 超薄切片机 (Leica); JEM-1230 电子显微镜 (JEOL)。

1.2 大鼠 CIH 模型制备 实验方案获得西北实验动物保护委员会及空军军医大学动物实验伦理委员会批准, 遵守中华人民共和国国家卫生健康委员会《实验动物管理条例》和空军军医大学实验动物管理条例。雌性成年 SD 大鼠 (体重 250~300 g) 18 只, 由空军军医大学实验动物中心提供, 随机分为常氧对照组和 CIH 组, 每组 9 只, 分别用于免疫荧光和免疫电镜实验。将 CIH 组大鼠置于密闭容器 (自制) 中 (54 cm \times 45 cm \times 45 cm), 进行空气抽提, 使容器内气压减压到相当于海拔 8~9 km 高度大气压 (约 18~15 kPa), 持续 5 min 后, 迅速恢复至海平面大气水平, 持续 5 min, 每天重复循环 12 h, 持续 7 d。

1.3 免疫荧光双标法 大鼠用 1% 戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 腹腔注射麻醉后, 经升主动脉插管灌注生理盐水 150 mL, 再用冷 4% 多聚甲醛 500 mL 灌注固定 1.5 h, 取脑干置入 30% 蔗糖的 0.01 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4) 中 4 $^{\circ}$ C 过夜。12 μ m 连续恒冷箱切片, 切片晾干后, PBS 清洗 30 min, 封闭 3 h (5% 牛血清白蛋白 + 5% 正常羊血清 + 0.5% Triton X-100), 然后分别加入抗 NK1R 抗体 1:800 和抗 P-PKCsub 抗体 (1:300, 稀释液为 1% 牛血清白蛋白 + 1% 正常羊血清 + 0.5% Triton X-100), 室温孵育过夜。切片经 PBS 清洗后, 加入生物素标记的 IgG, 室温下孵育 3 h, 再经 PBS 清洗后, 加入 TR 标记的卵白素和 FITC 标记的 IgG, 室温下避光孵育 3 h, PBS 清洗, 用含防淬灭剂的 PBS- 甘油封片, 激光共聚焦显微镜观察。

1.4 Western blot 分别取常氧对照和 CIH 大鼠 ($n = 5$), 剪头处死, 迅速取出延髓腹外侧区并称重。

应用 RIPA 裂解液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5、0.1% 十二烷基硫酸钠、0.5% 脱氧胆酸钠、150 mmol/L NaCl、1% NP-40 和 0.1% 苯基甲磺酰氟) 提取细胞总蛋白, 离心 10 min (12 000 r/min、4 °C), 收集上清。用 BCA 蛋白质检测试剂盒检测蛋白质浓度。取等量蛋白质样品进行 SDS-PAGE 电泳, 并转移至 PVDF 膜。经 5% 脱脂奶粉封闭, 洗脱后用抗 P-PKCsub 抗体 (1:300) 和 β -actin 抗体 (1:5 000) 4 °C 孵育过夜, 洗膜后与辣根过氧化物酶标记的 IgG 室温孵育 1 h, 洗膜后, 用 SuperSignal West Pico 试剂盒化学发光, X 光胶片成像, 应用 Image-Pro Plus 软件进行条带灰度分析。

1.5 免疫电镜双标技术 将大鼠灌注固定, 固定液含 4% 多聚甲醛和 0.05% 戊二醛。取脑干, 置于上述固定液中固定 2 h。做 50 μ m 连续振动切片, 室温下封闭 3 h, 封闭液含 5% 牛血清白蛋白 + 5% 正常羊血清 + 0.05% Triton X-100。PBS 清洗, 切片入抗 P-PKCsub 抗体 (1:300) 和抗 NK1R 抗体 (1:800), 室温下孵育过夜。PBS 清洗, 加入生物素标记 IgG

和 1.4 nm 金标记 IgG, 室温过夜, PBS 清洗, 2% 戊二醛固定 45 min, 去离子水清洗 4~5 次, 进行银加强反应, 避光, 室温下孵育 8~10 min。去离子水、PBS 依次清洗 4~5 次, 加入 ABC, 室温下孵育 3 h, DAB 显色 15~20 min, 清洗后入 0.5% 锇酸后固定 2 h, 经梯度酒精脱水及丙酮置换后, Epon 812 平板包埋、聚合。在光镜下选取 NK1R 免疫反应标记的 pre-BötC 区域, 粘贴于空白包埋块上, 做超薄切片, 经铅、铀双染后, 电镜下观察。

1.6 统计学分析 所有数据以 mean \pm SEM 形式, 采用 SPSS13.0 软件进行统计分析, 两组间比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 时认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 pre-BötC 神经元表达 P-PKCsub

光镜下 pre-BötC NK1R-ir 标记主要分布在神经元胞膜和突起, 勾勒出神经元轮廓, 胞质内也可见 NK1R 表达 (图 1, 红色荧光)。P-PKCsub-ir 标记呈点状分布在胞体和突起 (图 1, 绿色荧光), 胞膜

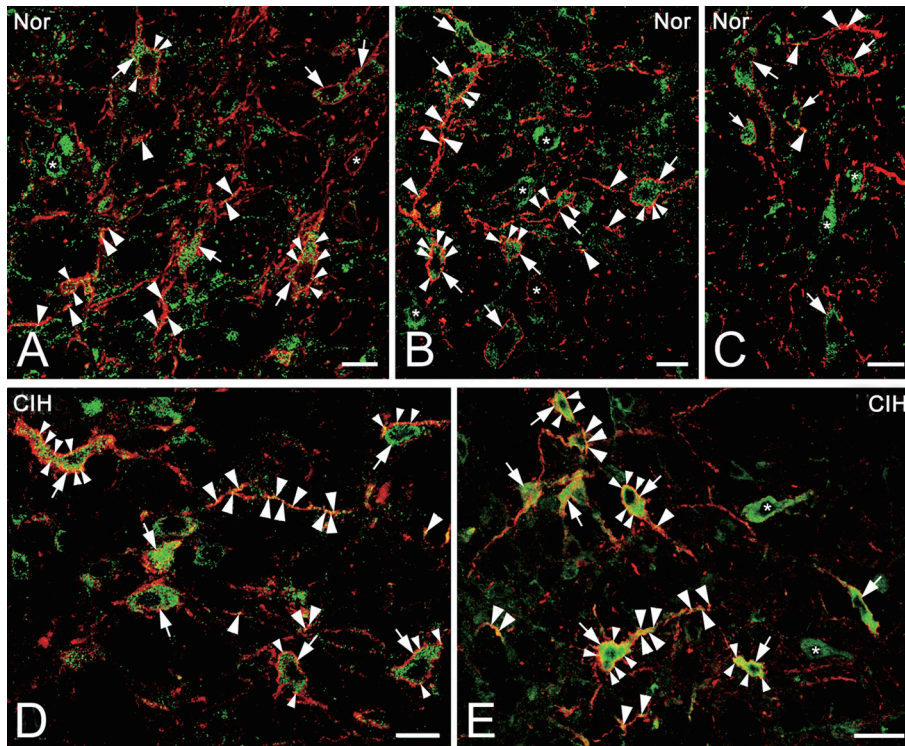


图 1. 常氧和慢性间断性低氧 (CIH) 大鼠 pre-BötC NK1R-ir 神经元表达 P-PKCsub

Fig. 1. Expression of P-PKCsub in NK1R-immunoreactive (ir) neurons in the pre-BötC in normoxic (Nor, A-C) and chronic intermittent hypoxic (CIH, D, E) rats detected by immunofluorescence staining. NK1R immunoreactivity was visualized in red, and P-PKCsub in green. Most of NK1R-ir neurons were found with P-PKCsub immunoreactivity (arrow). Yellow indicated the colocalization of two different fluorophores in somata (white small triangle) and processes (white large triangle). Stars indicated NK1R- or P-PKCsub-ir single-labeled neurons. Scale bar, 20 μ m.

下分布明显 (图 1A、B)。大部分 NK1R-ir 神经元表达 P-PKCsub, 二者在胞体和突起均有共存 (图 1, 黄色荧光)。也可见少量 P-PKCsub-ir 单标神经元 (图 1A、B、C)。和对照组相比, CIH 组 P-PKCsub-ir 标记明显增强, 点状分布聚集成团, 胞膜下分布更加明显 (图 1D、E)。

2.2 CIH诱导延髓腹外侧区P-PKCsub表达增加

P-PKCsub 抗体可特异性识别丝氨酸残基 (在 -2 和 +2 位点被精氨酸和赖氨酸残基包围, 且在 +1 位点有疏水性残基) 磷酸化的多种 PKCsub 蛋白。Western blot 结果显示, 大鼠延髓腹外侧区域 (包含 pre-BötC 神经元) 表达多种 P-PKCsub 蛋白, 分布在 97.2~29 kDa 区间, 与正常对照组比较, CIH 组 P-PKCsub 蛋白表达水平显著上调 ($P < 0.01$, 图 2B), 提示 CIH 干预上调了 pre-BötC 区域多种 P-PKCsub 蛋白的表达。

2.3 pre-BötC神经元P-PKCsub的超微结构分布

与我们以往研究一致^[6], NK1R-ir 高电子密度

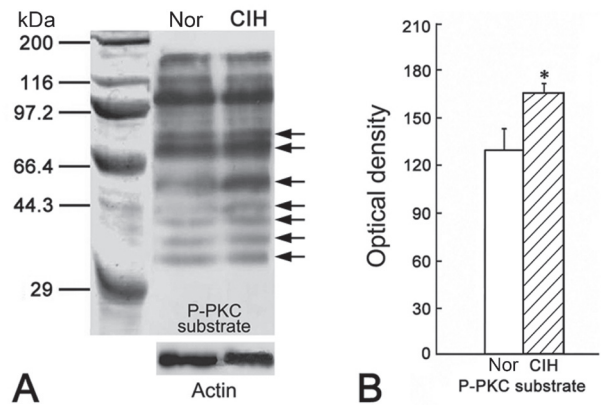


图 2. 正常和慢性间断性低氧大鼠延髓腹外侧区P-PKCsub蛋白的表达

Fig. 2. Expressions of P-PKCsub proteins in the ventrolateral medulla in normoxic and CIH rats detected by Western blot. A: P-PKCsub antibody recognized multiple protein bands in the pre-BötC region. Arrows pointed to bands in CIH group. B: Optical density analysis showed a significant increase of P-PKCsub in CIH group as compared to the normoxic control (Nor). Mean \pm SEM, $n = 5$. * $P < 0.01$ vs Nor.

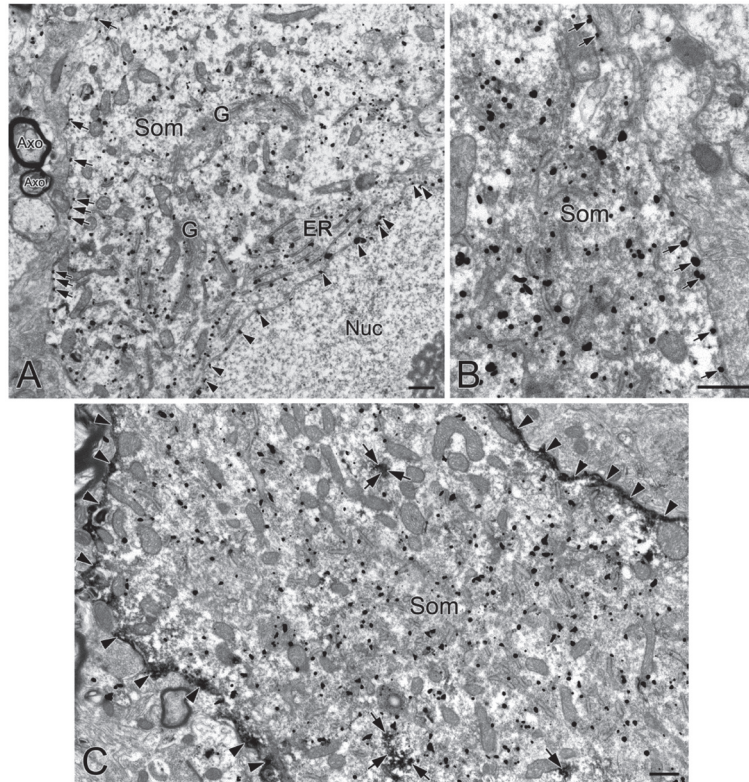


图 3. P-PKCsub-ir金颗粒在pre-BötC神经元胞体的分布

Fig. 3. Distribution of P-PKCsub-ir gold particles in somata in the pre-BötC detected by immuno-electron microscopic double-labeling technique. NK1R-immunoperoxidase reaction product was distributed mainly along the inner surface of the plasma membrane (\blacktriangle , C) and also within the plasma (\uparrow , C). P-PKCsub-ir gold particles were found in association with the inner surface of the plasma membrane (thin \uparrow , A, B) and the nuclear membrane (\blacktriangle , A). The endoplasmic reticulum was with P-PKCsub immunoreactivity. Som: soma; ER: endoplasmic reticulum; G: Golgi complex. Axo, axon; Nuc, nuclei. Scale bar, 0.5 μm .

DAB 产物主要分布在 pre-BötC 神经元胞体和树突的胞膜内表面 (图 3C、4D)，胞质内也可见 NK1R-ir 标记 (图 3C)。金颗粒指示的 P-PKCsub-ir 标记主要分布于神经元胞体 (图 3) 和树突 (图 4)。在胞膜内表面有较多金颗粒标记,呈单个或几个聚集分布 (图

3A、B, 图 4A~C), 核膜内表面也可见金颗粒分布 (图 3A), 内质网可见金颗粒分布, 高尔基体可见少量金颗粒散在分布 (图 3A)。轴突未见有 P-PKCsub-ir 金颗粒分布 (图 4A~D)。

NK1R-ir 神经元可见 P-PKCsub 表达, 在胞体 (图

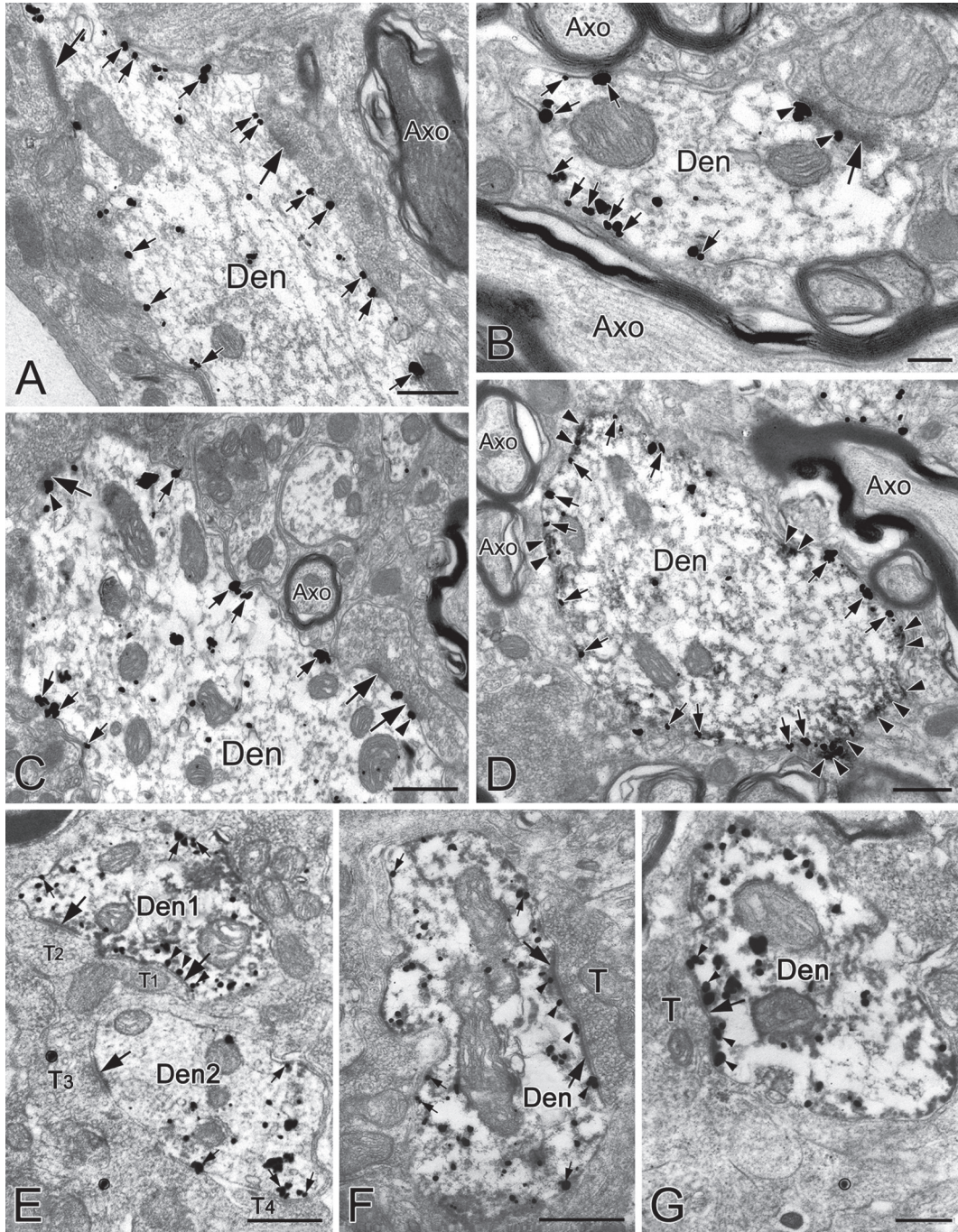


图 4. P-PKCsub-ir 金颗粒在 pre-BötC 神经元树突的分布

Fig. 4. Distribution of P-PKCsub-ir gold particles in dendrites in the pre-BötC. The particles were found along the inner surface of the plasma membrane (small \uparrow , A-F). Some of them were in association with the postsynaptic density (\blacktriangle , B, E-G). Arrowheads in D indicated NK1R-ir product. The particles in circles (E, G) showed non-specific background labeling. Den: dendrite; T: terminal; Axo: axon. Scale bar, 0.5 μ m.

3C) 和树突 (图 4D~G) 均可见二者的共表达。尤其值得注意的是, 部分突触后致密体可见 P-PKCsub 金颗粒分布 (图 4B, E~G), 无论是兴奋性突触 (图 4F) 或抑制性突触 (图 4E、G) 突触后致密体均可见 P-PKCS-ir 金颗粒标记。

3 讨论

本研究应用免疫荧光、免疫电镜、Western blot 技术对 pre-BötC 神经元 P-PKCsub 蛋白的表达以及 CIH 干预后的表达变化进行了形态学观察, 结果显示: (1) P-PKCsub 多分布在胞膜和核膜内表面; (2) P-PKCsub 在突触后致密体有分布; (3) CIH 干预上调了延髓腹外侧 (包含 pre-BötC 神经元) P-PKCsub 蛋白的表达。以往研究显示, PKCsub 蛋白多分布于胞膜, 当 PKC 被激活进行膜转位时, 对胞膜含有丝氨酸或苏氨酸残基的 PKCsub 蛋白进行磷酸化, 使底物蛋白发挥作用^[8]。P-PKCsub 抗体特异性识别处于活性状态的 PKCsub 蛋白。在中枢神经系统中, 人们已发现有多种 PKCsub 蛋白, 包括 AMPA、NMDA 等受体蛋白^[9, 10]、Ca²⁺ ATPase^[11]、Neurogranin、GAP-43、MARCKS^[12] 等, 这些底物蛋白可参与神经元内 Ca²⁺ 调控, 与突触可塑性密切相关, 在神经元递质释放、突触传递及可塑性调控、学习和记忆等过程中发挥重要作用^[13-15]。本研究组前期研究显示 pre-BötC 神经元表达 P-PKC θ , 而 CIH 干预可上调 P-PKC θ 的表达水平^[6]。系统应用 PKC 特异性阻断剂 Staurosporine 可阻断膈神经 LTF 产生^[7]。Neverova 等研究也显示, 鞘内注射 PKC θ 抑制剂或胸膜内用 siRNA 敲低 PKC θ mRNA 和蛋白表达水平均可阻断膈神经 LTF 产生^[16]。激活的 PKC 可能通过磷酸化突触后 NMDA、AMPA 受体, 增加突触强度, 参与呼吸 LTF 表达。Devinney 等近期研究显示, 除了 PKC θ 外, 其它经典或新型 PKC 亚型也可诱导呼吸运动易化^[17]。

CIH 不仅诱导 P-PKC θ 表达上调, 本研究结果显示其靶蛋白 P-PKCsub 也表达上调, 提示 CIH 可能通过 PKC θ 激活 PKCsub, 参与 pre-BötC 呼吸可塑性调控。本研究的超微结构观察结果显示, P-PKCsub 主要分布在 pre-BötC 神经元胞膜内表面, 核膜内表面, 内质网池也有分布, 这与 Neurogranin 的分布相似^[18]。Neurogranin 是钙调素结合蛋白, 在丝氨酸 36 位点被 PKC 磷酸化后, Neurogranin 与钙调素分离, 使得钙调素与 Ca²⁺ 结合, 参与 Ca²⁺/

钙调素依赖的蛋白激酶信号转导以及突触可塑性调控^[19]。但目前尚不清楚 Neurogranin 在 pre-BötC 的表达变化, 这有待进一步实验揭示。本研究结果显示, P-PKCsub 特异性分布在 NK1R-ir 神经元突触后致密体, 且在兴奋性和抑制性突触均有表达。已知突触后致密体包含多种受体蛋白、钙调蛋白、细胞骨架蛋白等。我们前期研究已经证实 pre-BötC 神经元表达谷氨酸兴奋性 AMPA 和 NMDA 受体以及抑制性 GABA 和甘氨酸受体^[20], 因此我们推测 CIH 干预可能激活 PKC 信号通路, 磷酸化突触后 AMPA 和 NMDA 受体, 增加突触传递效能, 实现呼吸可塑性调控。P-PKCsub 表达于抑制性突触后致密体, 提示其可能发挥对兴奋性突触的制衡作用, 以维持适度的呼吸调控。

综上所述, 本研究揭示了 P-PKCsub 在 pre-BötC 的超微结构分布, 证实 CIH 干预可上调 P-PKCsub 蛋白表达, 为深入探讨 PKC θ 调控 PKCsub, 参与呼吸可塑性调控的功能研究提供了形态学依据。

参考文献

- 1 Feldman JL, Mitchell GS, Nattie EE. Breathing: rhythmicity, plasticity, chemosensitivity. *Annu Rev Neurosci* 2003; 26: 239–266.
- 2 Dale-Nagle EA, Hoffman MS, MacFarlane PM, Satriotomo I, Lovett-Barr MR, Vinit S, Mitchell GS. Spinal plasticity following intermittent hypoxia: implications for spinal injury. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1198: 252–259.
- 3 Dougherty BJ, Terada J, Springborn SR, Vinit S, MacFarlane PM, Mitchell GS. Daily acute intermittent hypoxia improves breathing function with acute and chronic spinal injury via distinct mechanisms. *Respir Physiol Neurobiol* 2018; 256: 50–57.
- 4 Gray PA, Janczewski WA, Mellen N, McCrimmon DR, Feldman JL. Normal breathing requires preBötzing complex neurokinin-1 receptor-expressing neurons. *Nat Neurosci* 2001; 4: 927–930.
- 5 Gray PA, Janczewski WA, Mellen N, McCrimmon DR, Feldman JL. Developmental origin of preBötzing complex respiratory neurons. *J Neurosci* 2010; 30: 14883–14895.
- 6 Wei XY, Liu JP, Zhao CH, Ju G, Wong-Riley MT, Liu YY. Expressions of 5-HT/5-HT_{2A} receptors and phospho-protein kinase C θ in the pre-Bötzing complex in normal and chronic intermittent hypoxic rats. *Neuroscience* 2010; 168: 61–73.
- 7 Liu J, Wei X, Zhao C, Hu S, Duan J, Ju G, Wong-Riley MT, Liu Y. 5-HT induces enhanced phrenic nerve activity via

- 5-HT_{2A} receptor/PKC mechanism in anesthetized rats. *Eur J Pharmacol* 2011; 657: 67–75.
- 8 Steinberg SF. Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiol Rev* 2008; 88: 1341–1378.
- 9 Boehm J, Kang MG, Johnson RC, Esteban J, Haganir RL, Malinow R. Synaptic incorporation of AMPA receptors during LTP is controlled by a PKC phosphorylation site on GluR1. *Neuron* 2006; 51: 213–225.
- 10 Balu D, Larson JR, Schmidt JV, Wirtshafter D, Yevtdiyenko A, Leonard JP. Behavioral and physiological characterization of PKC-dependent phosphorylation in the *Grin2aΔPKC* mouse. *Brain Res* 2016; 1646: 315–326.
- 11 Brini M, Carafoli E, Cali T. The plasma membrane calcium pumps: focus on the role in (neuro) pathology. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 483: 1116–1124.
- 12 Kim SH, Kim MK, Yu HS, Kim HS, Park IS, Park HG, Kang UG, Kim YS. Electroconvulsive seizure increases phosphorylation of PKC substrates, including GAP-43, MARCKS, and neurogranin in rat brain. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2010; 34: 115–121.
- 13 Sun MK, Alkon DL. The “memory kinases”: roles of PKC isoforms in signal processing and memory formation. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2014; 122: 31–59.
- 14 Rekart JL, Meiri K, Routtenberg A. Hippocampal-dependent memory is impaired in heterozygous GAP-43 knockout mice. *Hippocampus* 2005; 15: 1–7.
- 15 Colgan LA, Hu M, Mislser JA, Parra-Bueno P, Moran CM, Leitges M, Yasuda R. PKC α integrates spatiotemporally distinct Ca²⁺ and autocrine BDNF signaling to facilitate synaptic plasticity. *Nat Neurosci* 2018; 21: 1027–1037.
- 16 Devinney MJ, Fields DP, Huxtable AG, Peterson TJ, Dale EA, Mitchell GS. Phrenic long-term facilitation requires PKC θ activity within phrenic motor neurons. *J Neurosci* 2015; 35: 8107–8117.
- 17 Devinney MJ, Mitchell GS. Spinal activation of protein kinase C elicits phrenic motor facilitation. *Respir Physiol Neurobiol* 2018; 256: 36–42.
- 18 Garrido-García A, de Andrés R, Jiménez-Pompa A, Soriano P, Sanz-Fuentes D, Martínez-Blanco E, Díez-Guerra FJ. Neurogranin expression is regulated by synaptic activity and promotes synaptogenesis in cultured hippocampal neurons. *Mol Neurobiol* 2019; 56: 7321–7337.
- 19 Díez-Guerra FJ. Neurogranin, a link between calcium/calmodulin and protein kinase C signaling in synaptic plasticity. *IUBMB Life* 2010; 62: 597–606.
- 20 Liu YY, Ju G, Wong-Riley MT. Distribution and colocalization of neurotransmitters and receptors in the pre-Böttinger complex of rats. *J Appl Physiol* (1985) 2001; 91: 1387–1395.