

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Departamento de Biología Celular
(Morfología Microscópica)**



**COMPOSICIÓN Y MECANISMOS MOLECULARES
IMPLICADOS EN EL DESARROLLO DEL SEGMENTO
INICIAL DEL AXÓN**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Diana Sánchez Ponce

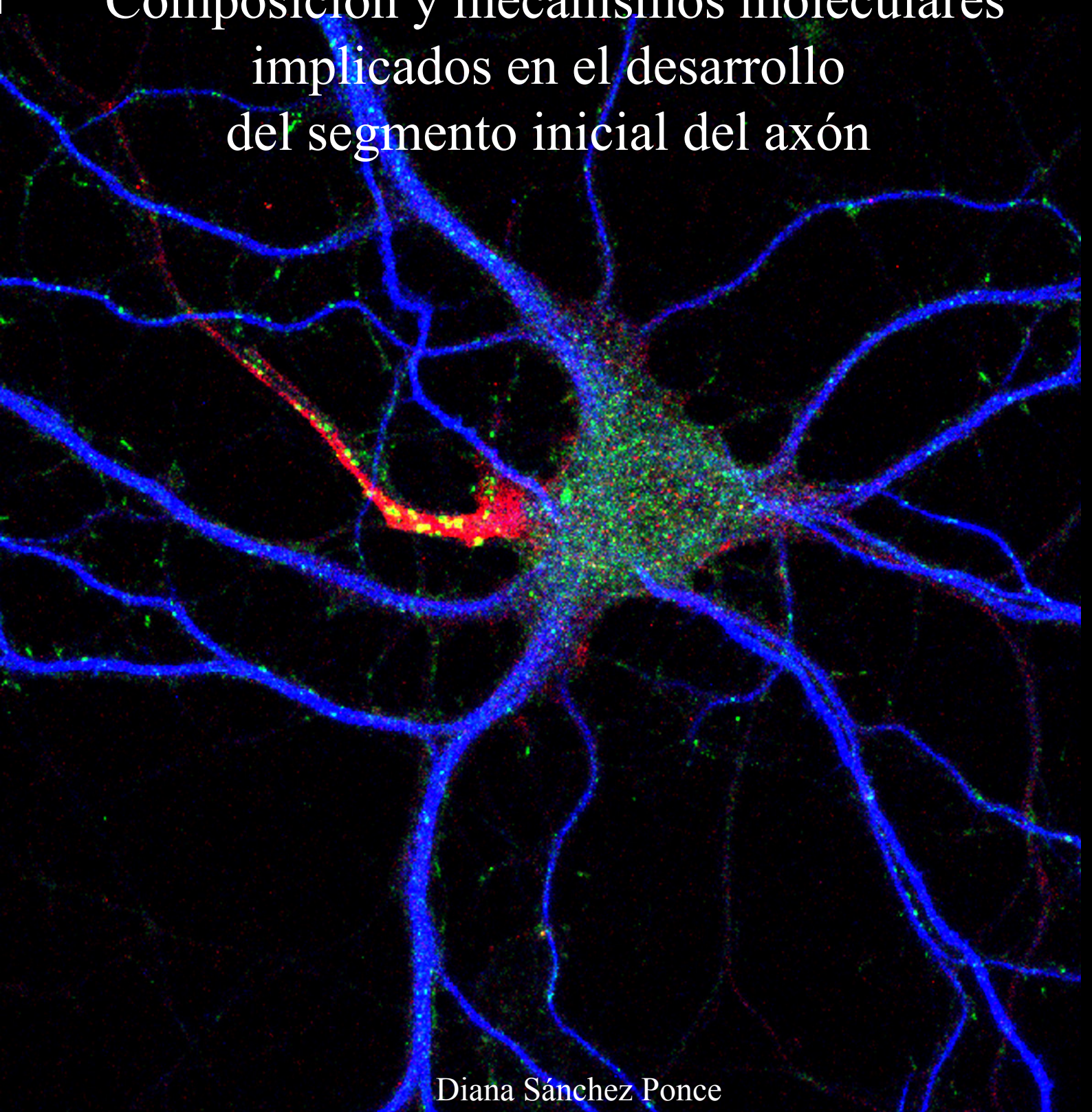
Bajo la dirección de los doctores

Alberto Muñoz Céspedes
Juan José Garrido Jurado

Madrid, 2012

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Ciencias Biológicas

Composición y mecanismos moleculares implicados en el desarrollo del segmento inicial del axón



Diana Sánchez Ponce
Tesis Doctoral
2012

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



Composición y mecanismos moleculares implicados en el desarrollo del segmento inicial del axón

TESIS DOCTORAL

Diana Sánchez Ponce
2012

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



Memoria de Investigación presentada por

Diana Sánchez Ponce

Para optar al grado de

Doctor en Biología
por la Universidad Complutense de Madrid

Trabajo dirigido por el Dr. Alberto Muñoz Céspedes (UCM- CTB)
y por el Dr. Juan José Garrido Jurado (Instituto Cajal –CSIC)

Vº.Bº de los directores de la Tesis,

Alberto Muñoz Céspedes

Juan José Garrido Jurado

La doctoranda,

Diana Sánchez Ponce

Este trabajo ha sido realizado en los laboratorios del Dr. Alberto Muñoz Céspedes, en el Departamento de Biología Celular de la Universidad Complutense de Madrid y el Centro de Tecnología Biomédica (CTB) de la Universidad Politécnica de Madrid y del Dr. Juan José Garrido Jurado, en el Instituto Cajal (CSIC) y el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO) perteneciente al CSIC-UAM. Ha sido financiado desde Enero de 2008 a Septiembre de 2008 con una beca predoctoral de la Universidad Complutense de Madrid y desde Septiembre de 2008 a Diciembre de 2012 con una beca FPU del Ministerio de Educación.



Dr. Alberto Muñoz Céspedes
Centro de Tecnología Biomédica, Universidad Politécnica de Madrid

Dr. Juan José Garrido Jurado,
Instituto Cajal, CSIC

HACEN CONSTAR:

Que Doña Diana Sánchez Ponce ha realizado bajo su dirección el trabajo de su Tesis Doctoral titulado "COMPOSICIÓN Y MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN EL DESARROLLO DEL SEGMENTO INICIAL DEL AXÓN", que ha llevado a cabo con el mayor aprovechamiento. Revisado el presente trabajo, quedan conformes con su presentación para ser juzgado. Y para que conste y surta los efectos oportunos , lo firman en Madrid a 16 de julio de 2012.

Dr. Alberto Muñoz Céspedes

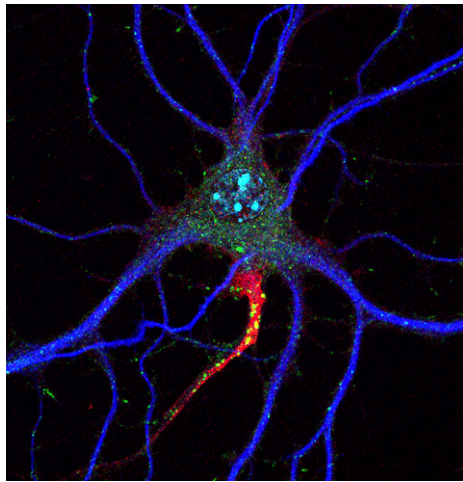
Dr. Juan José Garrido Jurado

A mi familia

A Julio

Lo esencial es invisible a los ojos

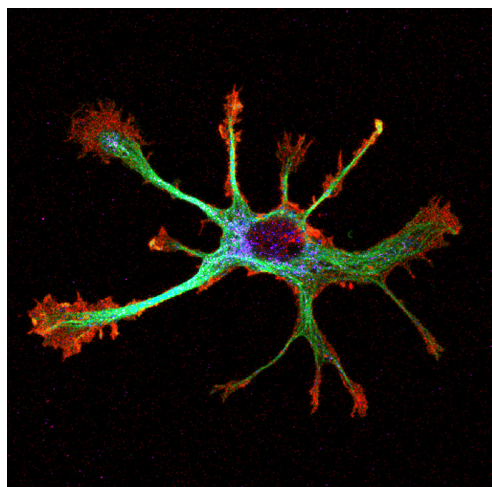
El Principito
Antoine de Saint-Exupéry



Índice

| | |
|---|----|
| INTRODUCCIÓN | 9 |
| 1. DESARROLLO DE LA NEOCORTEZA CEREBRAL Y EL HIPOCAMPO | 10 |
| 1.1. Corteza cerebral: organización y tipos neuronales | 10 |
| 1.2. Neurogénesis y migración neuronal | 11 |
| 1.3. Establecimiento de la polaridad neuronal <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> | 12 |
| 1.4. Las neuronas de hipocampo como modelo de estudio de la polaridad neuronal <i>in vitro</i> | 13 |
| 1.5. Vías de señalización celular implicadas en el establecimiento de la polaridad neuronal | 15 |
| 2. EL SEGMENTO INICIAL DEL AXÓN : CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES | 17 |
| 2.1. Barrera de difusión en la membrana plasmática | 17 |
| 2.2. Barrera de transporte citoplásmico | 18 |
| 2.3. Generación de potenciales de acción | 20 |
| 2.3.1. Control inhibitor: Inervación y modulación del segmento inicial del axón | 21 |
| 3. COMPOSICIÓN MOLECULAR DEL SEGMENTO INICIAL DEL AXÓN | 22 |
| 3.1. Citoesqueleto axonal y proteínas asociadas | 22 |
| 3.1.1. Microtúbulos | 22 |
| 3.1.2. Citoesqueleto de actina | 23 |
| 3.1.3. Papel del citoesqueleto en el establecimiento de la polaridad neuronal y del segmento inicial del axón | 24 |
| 3.2. Proteínas estructurales del segmento inicial del axón | 25 |
| 3.2.1. Ankirina G | 25 |
| 3.2.2. Espectrina β IV | 25 |
| 3.2.3. PSD93 | 25 |
| 3.3. Moléculas de adhesión celular | 25 |
| 3.4. Proteínas de la matriz extracelular | 26 |
| 3.5. Canales iónicos | 27 |
| 3.5.1. Canales de sodio dependientes de voltaje | 27 |
| 3.5.2. Canales de potasio dependientes de voltaje | 27 |
| 3.5.3. Canales de calcio dependientes de voltaje | 29 |
| 3.5.4. Variabilidad del segmento inicial del axón entre diferentes tipos neuronales | 29 |
| 3.6. Proteínas quinasas presentes en el segmento inicial del axón y vías de señalización relacionadas | 31 |
| 4. FORMACIÓN Y REGULACIÓN DEL SEGMENTO INICIAL DEL AXÓN | 32 |
| 4.1. Establecimiento y maduración del segmento inicial del axón | 32 |
| 4.2. Composición molecular y mecanismos de formación de los nodos de Ranvier: Diferencias con el segmento inicial del axón | 34 |
| 5. EL ORGÁNULO DE CISTERNAS | 36 |
| 6. PLASTICIDAD DEL SEGMENTO INICIAL DEL AXÓN | 37 |
| 7. PATOLOGÍAS RELACIONADAS CON ALTERACIONES EN EL SEGMENTO INICIAL DEL AXÓN | 38 |
| OBJETIVOS | 41 |

| | |
|--|----|
| RESULTADOS : ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN | 43 |
| 1. NEW ROLE OF IKK α/β PHOSPHORYLATED I κ B α IN AXON OUTGROWTH AND AXON INITIAL SEGMENT DEVELOPMENT <i>Nuevo papel de IκBα fosforilado en el crecimiento axonal y en el desarrollo del segmento inicial del axón</i> | 44 |
| 2. CASEIN KINASE 2 AND MICROTUBULES CONTROL AXON INITIAL SEGMENT FORMATION <i>La proteína caseína quinasa 2 y los microtúbulos controlan la formación del segmento inicial del axón</i> | 46 |
| 3. DEVELOPMENTAL EXPRESSION OF K v POTASSIUM CHANNELS AT THE AXON INITIAL SEGMENT OF CULTURED HIPPOCAMPAL NEURONS <i>Expresión durante el desarrollo de los canales de potasio dependientes de voltaje en el segmento inicial del axón de neuronas hipocámpales en cultivo</i> | 48 |
| 4. <i>IN VITRO</i> MATURATION OF THE CISTERNAL ORGANELLE IN THE HIPPOCAMPAL NEURON'S AXON INITIAL SEGMENT <i>Maduración in vitro del orgánulo de cisternas en el segmento inicial del axón de neuronas hipocámpales en cultivo</i> | 50 |
| 5. COLOCALIZATION OF α -ACTININ AND SYNAPOPODIN IN THE PYRAMIDAL CELL AXON INITIAL SEGMENT <i>Colocalización de α-actinina y sinaptopodina en el segmento inicial del axón de neuronas piramidales</i> | 52 |
| 6. <i>ACTIVITY-DEPENDENT CHANGES OF THE AXON INITIAL SEGMENT ARE RELATED TO CISTERNAL ORGANELLE DISAPPEARANCE</i> <i>Los cambios dependientes de actividad en el segmento inicial del axón están relacionados con la desaparición del orgánulo de cisternas</i> | 54 |
| DISCUSIÓN | 56 |
| 1. Adquisición de la polaridad neuronal y formación del axón | 57 |
| 2. Establecimiento del segmento inicial del axón | 58 |
| 3. Papel de los microtúbulos durante el desarrollo del segmento inicial del axón..... | 60 |
| 4. Maduración del segmento inicial del axón y establecimiento de microdominios internos | 62 |
| 5. Regulación de los niveles de calcio en el segmento inicial del axón | 64 |
| 6. Desarrollo, estabilización y localización del orgánulo de cisternas en el segmento inicial del axón | 66 |
| 7. Plasticidad en el segmento inicial del axón | 68 |
| CONCLUSIONES | 71 |
| BIBLIOGRAFÍA | 73 |
| ABREVIATURAS | 85 |
| AGRADECIMIENTOS | 88 |



Introducción

1. DESARROLLO DE LA NEOCORTEZA CEREBRAL Y EL HIPOCAMPO

1.1. Corteza cerebral: organización y tipos neuronales

La correcta fisiología del sistema nervioso central depende del establecimiento de conexiones neurales adecuadas. La formación de estas redes neuronales comprende una serie de eventos sucesivos y necesarios para su correcta funcionalidad, entre los que destacan la neurogénesis, la migración neuronal hacia territorios específicos, el establecimiento de polaridad neuronal, el crecimiento de dendritas y axones, los mecanismos de guía axonal, la maduración dendrítica y la sinaptogénesis. El desarrollo de esta secuencia de eventos en la corteza cerebral se denomina corticogénesis.

La corteza o cortex cerebral es una estructura laminada que envuelve externamente a los hemisferios cerebrales. Aunque evolutivamente está presente en reptiles y en aves, es en los mamíferos donde alcanza su máximo desarrollo y complejidad. En mamíferos la corteza cerebral incluye la neocorteza y la formación del hipocampo.

La neocorteza en general se puede dividir en distintas áreas en base a criterios citoarquitectónicos, de conectividad y en cuanto al tipo de información que procesan. Así, se pueden definir una importante diversidad de áreas sensoriales, áreas asociativas y áreas motoras. Sin embargo, desde el punto de vista histológico, todas ellas están formadas por los mismos elementos que incluyen distintos tipos de neuronas, células gliales, vasos sanguíneos y fibras nerviosas. Además de su organización vertical a modo de columnas, la neocorteza está estructurada de manera laminar en 6 capas celulares dispuestas en paralelo a la superficie pial. La formación del hipocampo es una estructura cortical con un importante papel en procesos de aprendizaje y consolidación de la memoria (Thompson and Kim, 1996). Se encuentra situada en la cara medial del lóbulo temporal y se divide en cuatro regiones principales: 1) la corteza entorrinal, 2) el complejo subícular, 3) el hipocampo propio o asta de Ammón, y 4) el giro dentado. El hipocampo propio o cuerno de Ammón (*cornu ammonis*, CA) se subdivide además en diferentes campos según la nomenclatura de Lorente de Nó (Lorente de Nó, 1938): CA1, CA2, CA3 y CA4. (**Figura I-1**). El giro dentado, el asta de Amón y el subículo son estructuras allocorticales compuestas por tres láminas: capa molecular, capa celular y capa polimórfica. El complejo subícular y la corteza entorrinal son áreas de perialocorteza que

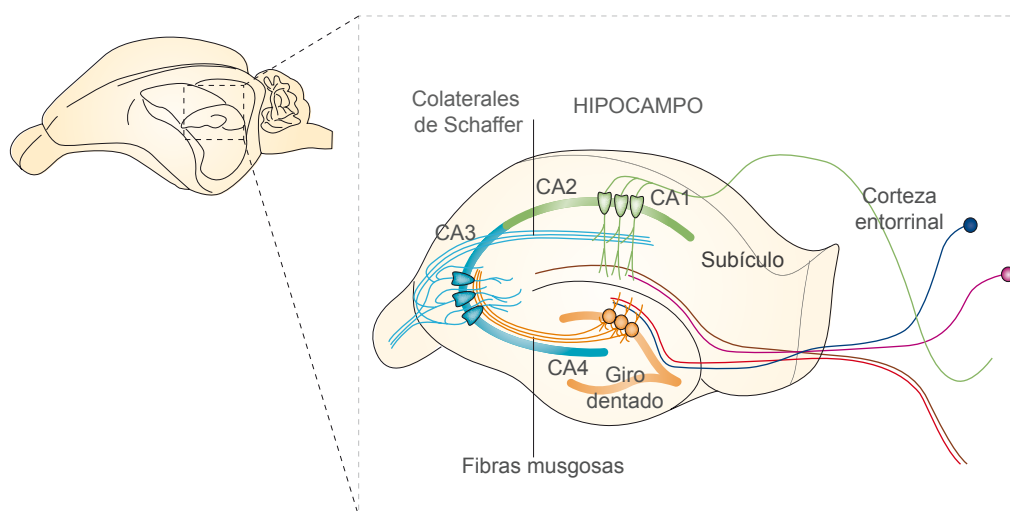


Figura I-1. Composición estructural de la formación hipocampal. Modificado de Neves et al., 2008.

presentan una laminación en seis capas más o menos diferenciadas y que suponen una transición a la neocorteza.

La corteza cerebral presenta una diversidad significativa de tipos celulares que incluyen diferentes estirpes de células gliales (astrocitos, oligodendrocitos y microglía) y neuronales, con diferencias morfológicas, neuroquímicas y funcionales. Aunque actualmente no existe consenso sobre el número de tipos neuronales de la corteza cerebral ni sobre la manera de clasificarlos, en general se pueden dividir en neuronas piramidales o de proyección y neuronas no piramidales o interneuronas (Rakic, 2009). Las neuronas piramidales representan entre el 70% y el 85% de la población neuronal total, son excitadoras y emplean glutamato como neurotransmisor. Estas neuronas tienen axones largos de proyección que establecen sinapsis excitadoras con neuronas situadas en regiones corticales distantes o con estructuras subcorticales. Por el contrario, las interneuronas representan el 15-30% de la población neuronal, son inhibitoras, utilizan mayoritariamente GABA como neurotransmisor y son células de axón corto que contactan con regiones concretas de la membrana de las neuronas piramidales adyacentes o con otras interneuronas (Fairén, 1984).

1.2. Neurogénesis y migración neuronal

Tras el cierre del tubo neural durante su diferenciación inicial, el sistema nervioso central presenta tres vesículas: el prosencéfalo, el mesencéfalo y el rombencéfalo. Después de una serie de pliegues, estas vesículas se subdividen generando la médula espinal, el mielencéfalo, el metencéfalo, el diencefalo y el telencéfalo, a partir del cual se formarán los hemisferios cerebrales. Las células que dan lugar a la corteza cerebral surgen a partir de la zona proliferativa del epitelio pseudoestratificado que tapiza a los ventrículos laterales denominado epitelio ventricular o zona ventricular (**Figura I-2A**). En el ratón, las neuronas de proyección se generan entre los días de desarrollo embrionario 11 y 17 (E11- E17) (Tarui et al., 2005). Al inicio de la neurogénesis, las células progenitoras se dividen simétricamente generando dos células hijas también progenitoras (Caviness and Takahashi, 1995). A medida que el desarrollo continua, los progenitores comienzan a dividirse asimétricamente, produciendo una neurona y una célula progenitora por cada ciclo de división. Así, la fracción de células que empieza a diferenciarse en neuronas aumenta mientras que la proporción de células que permanecen como progenitores se reduce. En las fases finales de la corticogénesis, la mayoría de los progenitores neurales dan lugar a dos células hijas que se diferencian en neuronas provocando la desaparición de los precursores neurales.

Una vez que las células salen del ciclo celular, empiezan a migrar fuera de la zona germinal ventricular hacia su posición final en la corteza (**Figura I-2A**). Hasta el momento se conocen dos modelos de migración diferentes: la migración radial y la migración tangencial (Marin and Rubenstein, 2003) (**Figura I-2B**). La migración radial, constituye el principal modo de migración de las neuronas piramidales durante el desarrollo de la corteza cerebral y es el fenómeno responsable de la laminación de la corteza cerebral. El desarrollo cortical va progresando con sucesivos frentes de migración que posicionan a las neuronas en las diferentes capas de la placa cortical, siguiendo un patrón de dentro hacia fuera, ya que las células generadas tempranamente permanecen en las capas más profundas, mientras que las generadas posteriormente migran a través de la primera hasta capas más superficiales de la corteza (Hatanaka and Murakami, 2002; Marin and Rubenstein, 2003). Durante el proceso de migración, las células van adquiriendo una morfología bipolar.

La migración tangencial la realizan la mayoría de las interneuronas corticales inhibitoras (Ayala

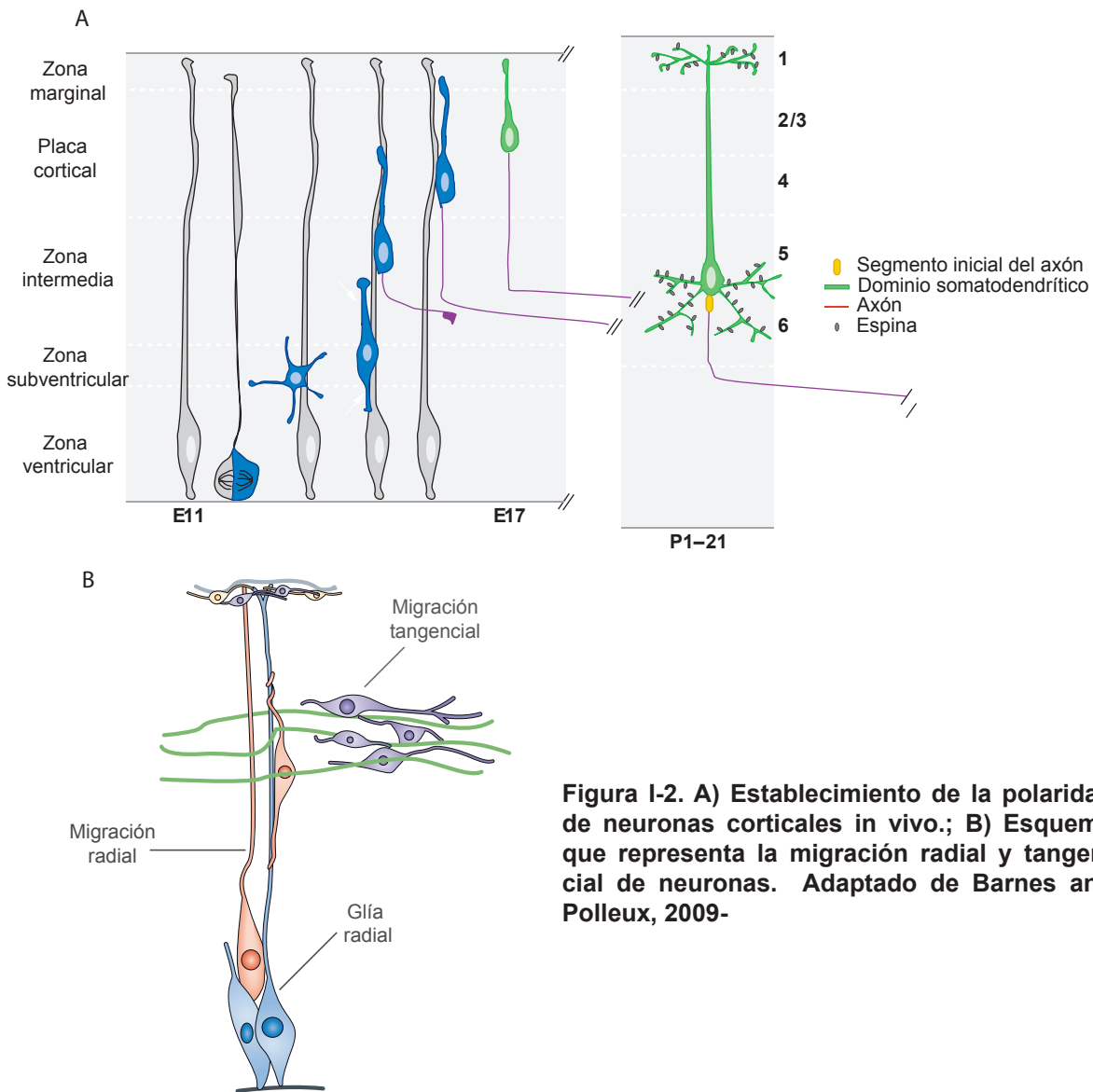


Figura I-2. A) Establecimiento de la polaridad de neuronas corticales in vivo.; B) Esquema que representa la migración radial y tangencial de neuronas. Adaptado de Barnes and Polleux, 2009-

et al., 2007). Estas células se generan en la zona subventricular de la eminencia ganglionar del telencéfalo dorsal y alcanzan la corteza cerebral en desarrollo desplazándose de forma paralela a la superficie ventricular y perpendicularmente a la glía radial. Posteriormente, las interneuronas adoptan un modo de migración radial para alcanzar su posición laminar final dentro de la corteza (Marin and Rubenstein, 2003; Nadarajah et al., 2003).

1.3. Establecimiento de la polaridad neuronal *in vivo* e *in vitro*

Las neuronas son células altamente especializadas con una compleja organización morfológica y funcional. Presentan dos dominios, axonal y somatodendrítico, que difieren en su morfología y en la composición proteica de su citoesqueleto y de su membrana plasmática. La polarización neuronal fue descrita por primera vez por Santiago Ramón y Cajal en 1891 en su Ley de Polarización Dinámica (Ramón y Cajal, 1891; Ramón y Cajal, 1897) en la cual se establece que cada neurona posee estructuras receptoras y emisoras que permiten la transmisión vectorial de la información entre neuronas. Estudios posteriores han confirmado que la información llega a la neurona principalmente a través de receptores de neurotransmisores, localizados fundamentalmente en la región somatodendrítica, desde donde es propagada en forma de potenciales postsinápticos hasta el segmento inicial del axón (SIA), dominio en el que se centra el presente trabajo. El SIA se

caracteriza por presentar una alta densidad de canales de sodio y potasio dependientes de voltaje necesarios para la generación inicial de los potenciales de acción que posteriormente se propagan anterogradamente a lo largo del axón y retrógradamente al dominio somatodendrítico. En los axones mielinizados, la propagación anterógrada de los potenciales de acción se realiza de forma rápida y saltatoria gracias a la presencia de múltiples subdominios localizados periódicamente a lo largo del axón en zonas donde la vaina de mielina se encuentra adelgazada. Estos dominios son comparables en muchos aspectos al SIA y se denominan nodos de Ranvier. La propagación de los potenciales de acción a lo largo del axón conduce finalmente a la liberación de neurotransmisores en los terminales presinápticos lo que posibilita la transmisión de la señal a otras neuronas. Por tanto, la polaridad funcional de las neuronas depende y a su vez es reflejo de su polarización morfológica y molecular (**Figura I- 3**).

La polaridad neuronal adquirida durante el desarrollo *in vivo* deriva de características que aparecen tras la última división celular a partir de los progenitores neurales. Durante la migración, las neuronas postmitóticas forman una prolongación anterior de avance y una prolongación posterior que darán lugar posteriormente a las dendritas y el axón (Barnes and Polleux, 2009; Polleux and Snider, 2008)

Las neuronas piramidales adquieren además otros rasgos característicos como el SIA y las espinas dendríticas durante las primeras semanas de su desarrollo, después de haber concluido la migración (**Figura I-2A**) (Hatanaka and Murakami, 2002). En cultivos neuronales se establecen en primer lugar neuritas que inicialmente son simétricas y que posteriormente rompen esta simetría. La polaridad morfológica comienza con el establecimiento y elongación de un axón a partir de una de esas neuritas, quedando el resto definidas como dendritas. La especificación del axón y su posterior elongación viene determinada por una combinación de señales externas del medio, receptores de membrana y vías de señalización internas (Barnes and Polleux, 2009; Stuessi and Bradke, 2011), que conllevan la reorganización del citoesqueleto (Yoshimura et al., 2006).

1.4 Las neuronas de hipocampo como modelo de estudio de la polaridad neuronal *in vitro*

El modelo de cocultivo de neuronas hipocámpales y astrocitos disociados a partir de embriones permite seguir *in vitro* un programa reproducible y bien caracterizado de maduración neuronal,

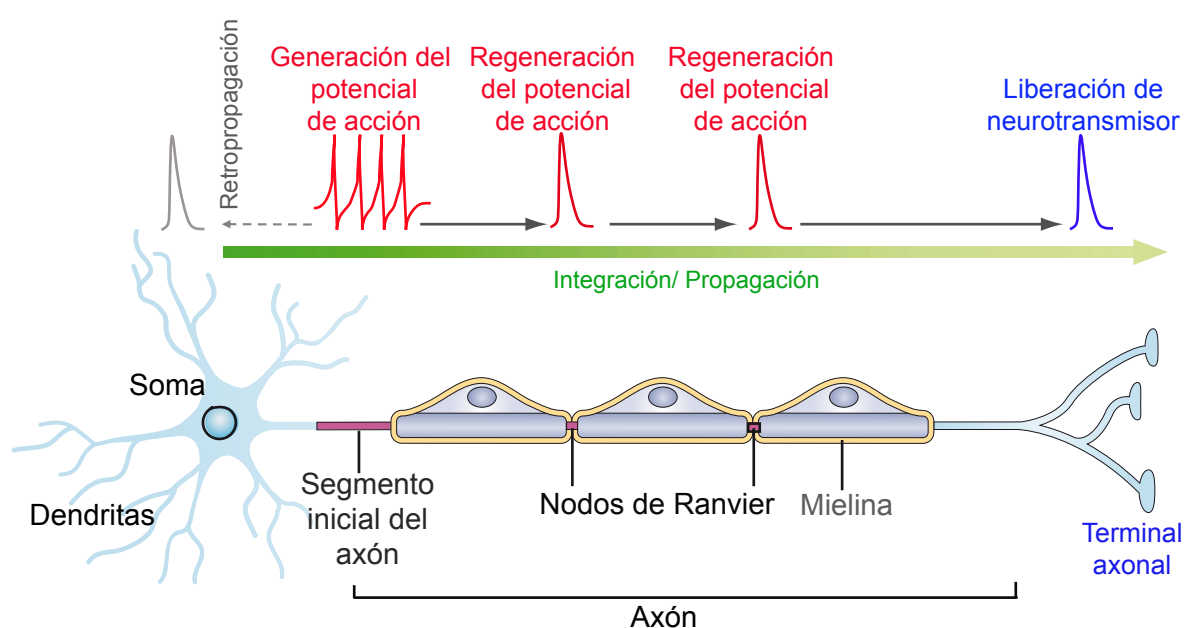


Figura I-3. Representación de la propagación del impulso nervioso en las neuronas.

adecuado para el estudio del desarrollo morfológico y molecular de las neuronas y del SIA (Craig and Banker, 1994). En este estudio hemos elegido este modelo ya que permite un acceso directo a las células y una fácil manipulación tanto mediante tratamientos farmacológicos como mediante modificaciones de la expresión génica por medio de nucleofección con plásmidos. Además, la baja densidad a la que se cultivan las células simplifica la complejidad, permitiendo estudios de localización subcelular o de transporte de proteínas a través del axón. En este modelo se tiene en cuenta el papel de los astrocitos en la modulación de numerosos procesos del desarrollo neuronal como la supervivencia, la diferenciación neural, la neuritogénesis y la sinaptogénesis (Araque and Navarrete, 2010; Pfrieger, 2009; Pfrieger and Barres, 1997), ya que se cocultivan, sin contacto físico, las neuronas hipocampales con una monocapa astroglial, la cual secreta los factores tróficos necesarios y crea un microambiente que favorece la supervivencia neuronal (**Figura I-4**). Hay que tener en cuenta que este programa de maduración se corresponde con una repolarización morfológica de las neuronas que estaban previamente diferenciadas, aunque de forma incipiente, *in vivo* (Barnes and Polleux, 2009).

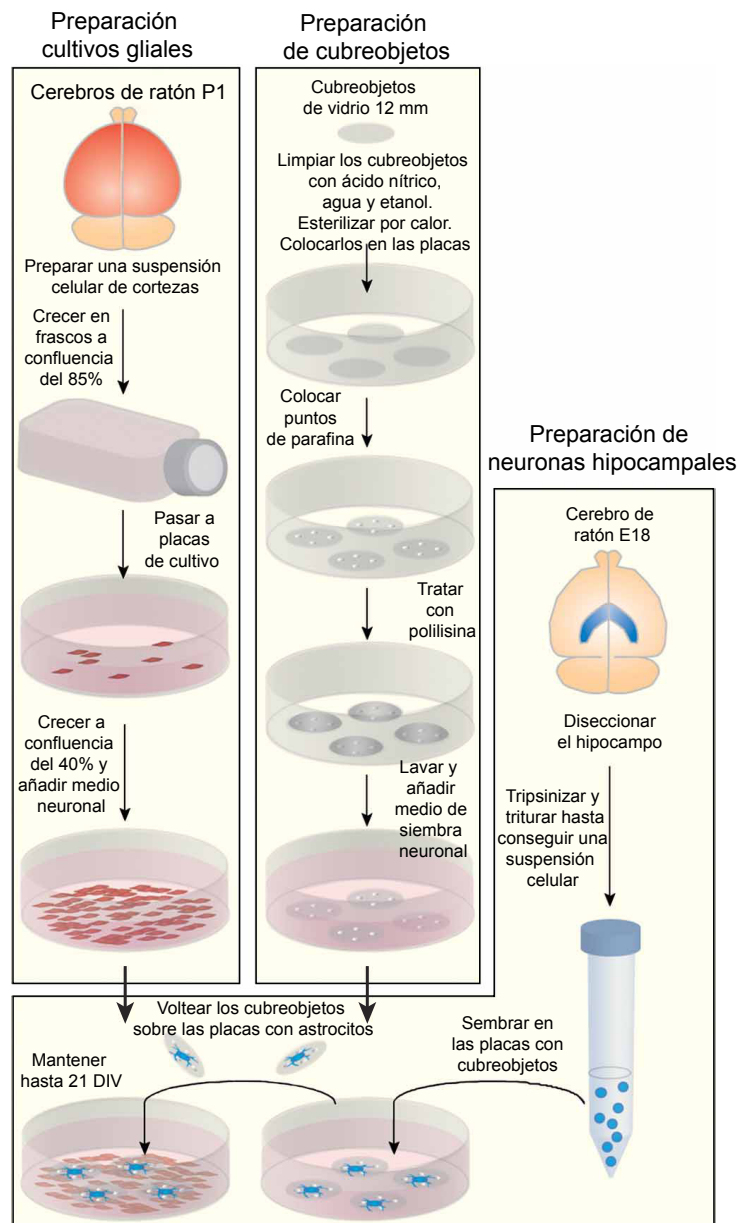


Figura I-4. Esquema que representa el método de obtención de cocultivos primarios de neuronas de hipocampo y astrocitos. Imagen adaptada de Kaech and Banker 2007.

Aunque en principio, se pueden generar cultivos de neuronas primarias desde cualquier región cerebral, son los cultivos de neuronas hipocampales, obtenidas a partir de rata/ratón en fases embrionarias finales, los más frecuentemente usados. Esto es debido a que la gran mayoría de células corresponden a neuronas principales, y por tanto, la composición en poblaciones neuronales es más homogénea en comparación a otras regiones.

La secuencia de diferenciación de neuronas disociadas a partir de hipocampo embrionario se divide en 5 estadios (Dotti et al., 1988; Kaech and Banker, 2007) (**Figura I-5**). En el estadio 1, después de adherirse al sustrato, las células presentan forma esférica y desarrollan lamelipodios que contienen una densa red de filamentos de actina. Posteriormente, en el segundo estadio, los lamelipodios se transforman en varias prolongaciones neuríticas, que se extienden hasta alcanzar de 10 a 15 μm de longitud. Estas neuritas sufren diversas retracciones y extensiones. Antes de las 36 horas se produce el principal cambio en la adquisición de la polaridad morfológica: una de las neuritas comienza a elongarse a mayor velocidad que el resto, convirtiéndose en el axón, mientras que el resto de prolongaciones apenas crece y quedarán especificadas como dendritas. Ya a las 36 horas, en el estadio 3, se observa un axón bien definido en las neuronas en cultivo. Durante el estadio 4, tras 4 días en cultivo, el resto de neuritas comienzan a elongarse, transformándose en dendritas y se observa el segmento inicial del axón. Finalmente, durante el estadio 5 la maduración de la neurona continúa, manteniendo su polaridad. Durante esta maduración se empiezan a formar ramificaciones dendríticas, a generar espinas dendríticas y comienzan a establecerse contactos sinápticos entre las neuronas (**Figura I-5**).

1.5 Vías de señalización celular implicadas en el establecimiento de la polaridad neuronal

Las vías de señalización traducen la información extracelular en respuestas biológicas intracelulares que generan señales en cascada o segundos mensajeros, los cuales actúan sobre la síntesis de proteínas, la expresión génica o la localización subcelular de proteínas. Esto produce modificaciones en el citoesqueleto, regulando de esta forma el establecimiento de la polaridad neuronal.

La principal ruta de señalización en el establecimiento de la polaridad neuronal es la vía que integra a PI3K-Akt-GSK3. PI3K (*Phosphatidyl Inositol-3-kinase*) regula múltiples funciones biológicas entre

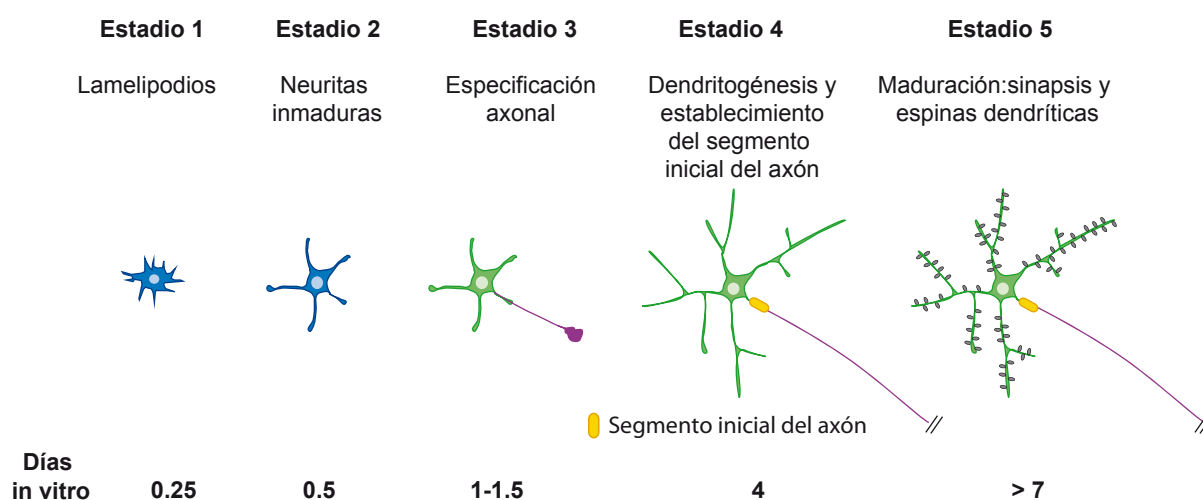


Figura I-5. Esquema representativo del desarrollo de neuronas hipocampales in vitro y su división siguiendo una secuencia estereotipada de 5 estadios diferenciables. Adaptado de Barnes and Polleux, 2009

las que se incluyen la supervivencia, la expresión génica, el establecimiento de la polaridad celular y la especificación axonal (Barnes and Polleux, 2009; Manning and Cantley, 2007; Shi et al., 2003). La proteína PTEN (*Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*) es una fosfatasa que actúa de forma antagónica a PI3K, inactivando la ruta de PI3K-Akt (Ramaswamy et al., 1999; Shi et al., 2003). PI3K regula la vía de señalización de Akt (o *PKB*; *protein kinase B*) la cual constituye uno de los principales nodos de señalización neuronal. La fosforilación de Akt en el residuo S473 por PI3K conduce a la fosforilación de GSK3 (*glycogen synthase kinase 3*). GSK3 se encuentra constitutivamente activa, un estado que se revierte tras la fosforilación por Akt, produciendo su inhibición (Etienne-Manneville and Hall, 2003). GSK3 es una serina/treonina quinasa que presenta dos isoformas (α y β) y que actúa regulando múltiples procesos neuronales (Jope and Johnson, 2004). La función de GSK3 en la especificación y elongación axonal ha sido objeto de diversos estudios. Algunos autores muestran que la inhibición de GSK3 genera una morfología multiaxonal en las neuronas (Jiang et al., 2005) mientras que otros describen que la actividad de GSK3 es necesaria para especificar una de las neuritas como axón, y su posterior inhibición permite su elongación (Garrido et al., 2007; Kim et al., 2006; Shi et al., 2004). Existen múltiples proteínas de señalización que actúan posteriormente a GSK3 en la cascada de señalización, muchas de ellas implicadas en la regulación del citoesqueleto como CRMP-2 (*Collapsin-response mediator protein-2*), que regula

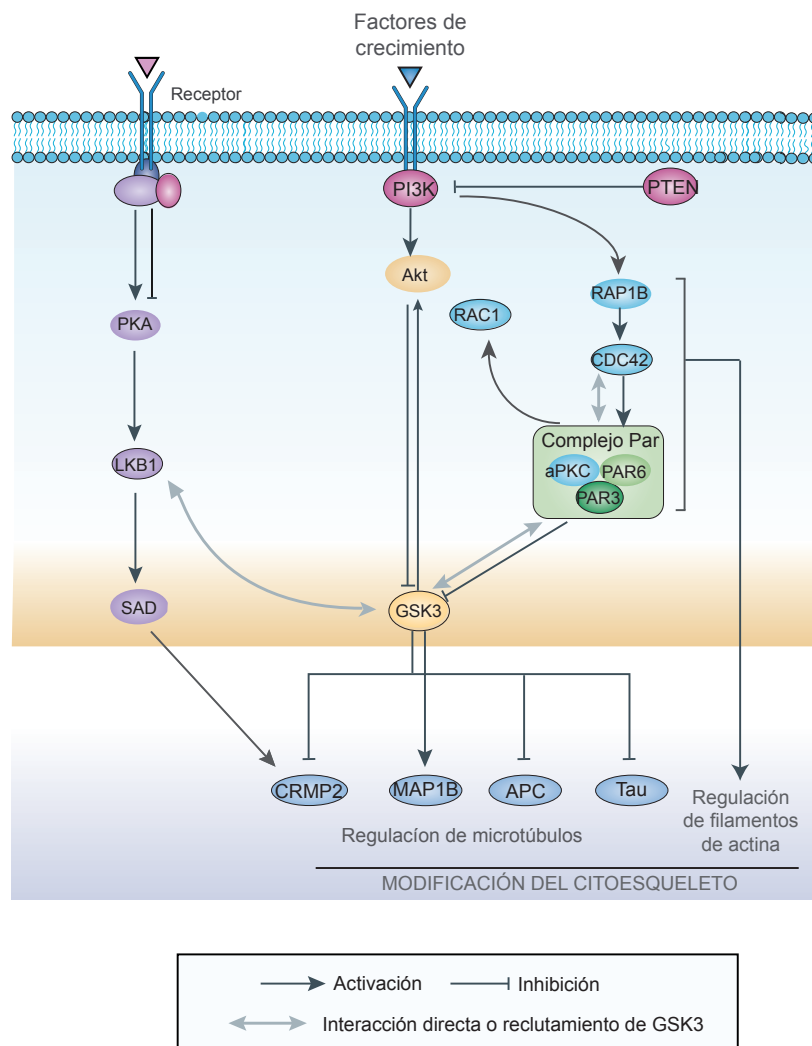


Figura I-6. Esquema descriptivo de algunas vías de señalización implicadas en la especificación y el crecimiento axonal. Modificado de Hur and Zhou, 2010.

el ensamblaje de tubulina y permite la polimerización de microtúbulos (Arimura et al., 2004; Inagaki et al., 2001), APC (*adenomatous polyposis coli*) implicada en la estabilización de microtúbulos en el axón (Shi et al., 2004) o MAP1B (*microtubule-associated protein 1B*) y Tau que regulan la estabilidad de los microtúbulos (Goold and Gordon-Weeks, 2004; Goold et al., 1999) (**Figura I-6**). Otras proteínas importantes en la especificación axonal y la adquisición de polaridad son las proteínas Par (*partitioning defective*): Par3, Par6, Par4 o LKB1. PI3K regula la especificación axonal a través de la localización específica de Par3/Par6 en la neurita que va a elongarse como axón. Estas proteínas forman un complejo con aPKC (*atypical protein kinase C*) y Cdc42 (Macara, 2004; Shi et al., 2003) que lo regulan. Este complejo de polaridad junto con otras vías de señalización actúan modificando el citoesqueleto de microfilamentos de actina y microtúbulos (Govek et al., 2005). La serina-treonina quinasa LKB1 (*Liver Kinase B1*, Par4) ha sido ampliamente estudiada durante la polarización neuronal en corteza cerebral (Asada et al., 2007). Una vez activada, LKB1 fosforila y activa a las quinasas SAD-A y SAD-B (*synapses of amphids defective*) que actúan sobre proteínas asociadas a microtúbulos regulando la polarización. La vía de LKB1 converge con la vía PI3K en la regulación del complejo Par (Barnes et al., 2007; Shelly et al., 2007; Shelly and Poo, 2011).

Aunque en los estudios *in vitro* las neuronas parecen seguir un programa de polarización interno (Craig and Banker, 1994) también pueden verse afectadas por factores externos. *In vitro*, el tipo de sustrato sobre el que crecen las células (laminina, polilisina ó NgCAM) (Esch et al., 1999); la presencia factores tróficos en el medio (NGF: *nerve growth factor* o BDNF: *brain derived neurotrophic factor*) (Shelly et al., 2007) o la presencia de moléculas de guía axonal (Sema3: *Semaphorin 3*) afectan a la polaridad y al crecimiento axonal (Polleux et al., 1998; Shelly and Poo, 2011).

2- EL SEGMENTO INICIAL DEL AXÓN: CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES

El segmento inicial del axón (SIA) es una estructura altamente especializada y localizada estratégicamente en la zona proximal del axón, ocupando aproximadamente sus 30 primeras micras de longitud. Morfológicamente, el SIA se caracteriza por la presencia de una densa estructura submembranosa, observable mediante microscopía electrónica, denominada *undercoating* (Palay et al., 1968) y por una organización fasciculada de microtúbulos (Palay et al., 1968). Presenta también características diferenciales en cuanto a las modificaciones postraduccionales de su tubulina (Tapia et al., 2010) (**Figura I-7**), implicadas en el reconocimiento de proteínas motoras y el transporte polarizado de proteínas hacia el axón (Konishi and Setou, 2009; Nakata and Hirokawa, 2003). Además, el SIA presenta una alta concentración de diferentes tipos de proteínas, entre las que cabe destacar a los canales de sodio y potasio dependientes de voltaje, necesarios para la generación de los potenciales de acción. Las características subcelulares especiales y la composición molecular del SIA están estrechamente relacionadas con las importantes funciones que desempeña este subdominio.

Aunque en apartados posteriores se describe en profundidad la composición molecular del SIA, es importante para entender esta complejidad resaltar en primer lugar las tres funciones principales que el SIA ejerce en la regulación y el mantenimiento de la fisiología neuronal y en la excitabilidad neuronal.

2.1. Barrera de difusión en la membrana plasmática

La polaridad se origina en los estadios tempranos del desarrollo axonal pero debe mantenerse posteriormente. Para ello, el SIA establece una “barrera” compuesta por una elevada concentración

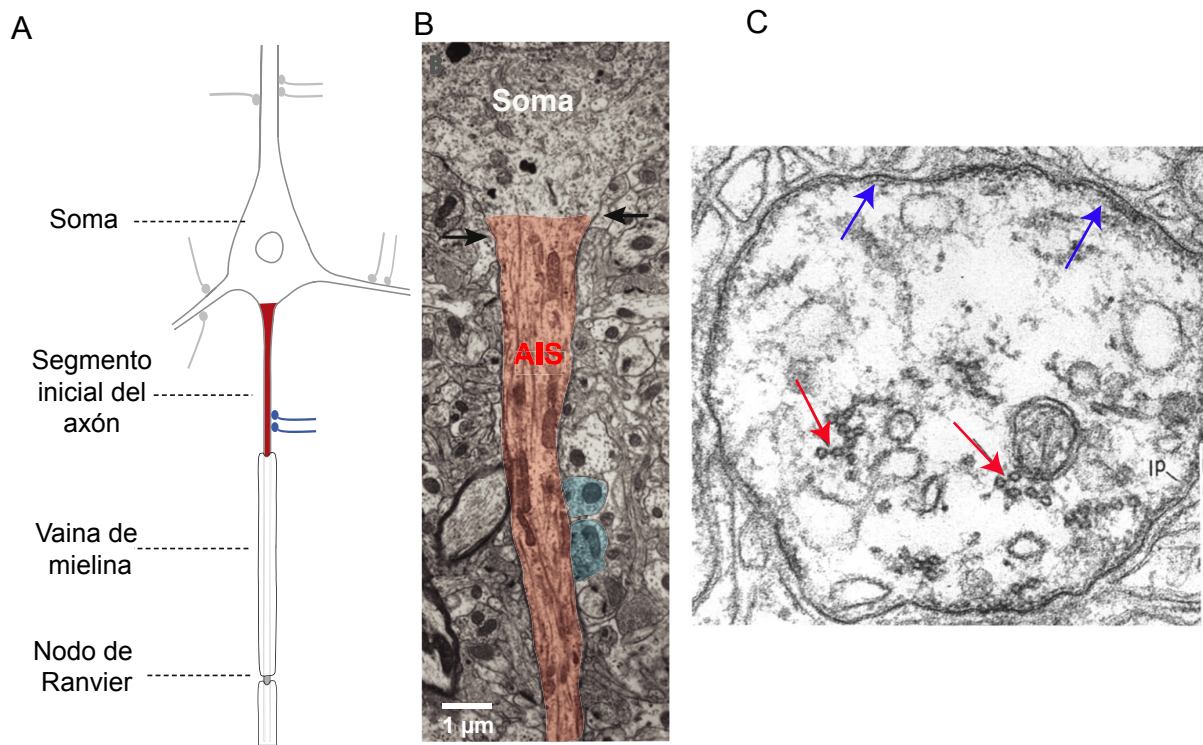


Figura I-7. Morfología del segmento inicial del axón. A) Esquema que ilustra la localización del segmento inicial del axón y los contactos sinápticos que recibe ;B) imagen de microscopía electrónica del segmento inicial del axón (rojo) y de sus contactos sinápticos (azul) Imágenes adaptadas de Kole and Stuart, 2012. C) Imagen de microscopía electrónica de una sección transversal del segmento inicial del axón. Las flechas rojas señalan fascículos de microtúbulos y las flechas azules indican la estructura submembranosa densa a los electrones denominada *undercoating*. Adaptado de Peters et al., 1968.

de proteínas que impide la difusión entre proteínas somatodendríticas y axonales (Kobayashi et al., 1992; Winckler and Mellman, 1999). Esta barrera ayuda al mantenimiento de la polaridad anatómica entre los dos dominios con un menor gasto energético, ya que probablemente disminuye los requerimientos de transporte de proteínas a cada dominio neuronal. Se ha sugerido que la naturaleza de esta barrera se establece gracias a diferentes mecanismos presentes en el SIA. Por un lado, las interacciones entre proteínas de membrana, componentes de la matriz extracelular y proteínas del citoesqueleto, participan en el establecimiento de la barrera. Un ejemplo son las interacciones que ocurren entre los canales de sodio y las proteínas neurofascina y NrCAM con las proteínas estructurales ankirina G y espectrina β IV, que generan complejos estables anclados a este dominio (Garrido et al., 2003; Zhou et al., 1998) (**Figura I-8**). Además, la estabilidad del citoesqueleto de actina resulta crucial para el mantenimiento de la barrera, como se demuestra en experimentos realizados con tratamientos farmacológicos que producen la despolimerización de actina, lo cual permite el paso de moléculas entre los diferentes dominios (Winckler and Mellman, 1999).

2.2. Barrera de transporte citoplásmico

El citoesqueleto microtubular desempeña un importante papel durante la polarización de las neuronas en desarrollo ya que está implicado en el tráfico que permite la localización específica de diferentes proteínas en el axón o las dendritas necesarias para llevar a cabo las funciones características de cada dominio. Las proteínas son dirigidas selectivamente a sus dominios mediante proteínas motoras como las de la superfamilia de kinesinas (KIF) implicadas en procesos de transporte anterógrado, y

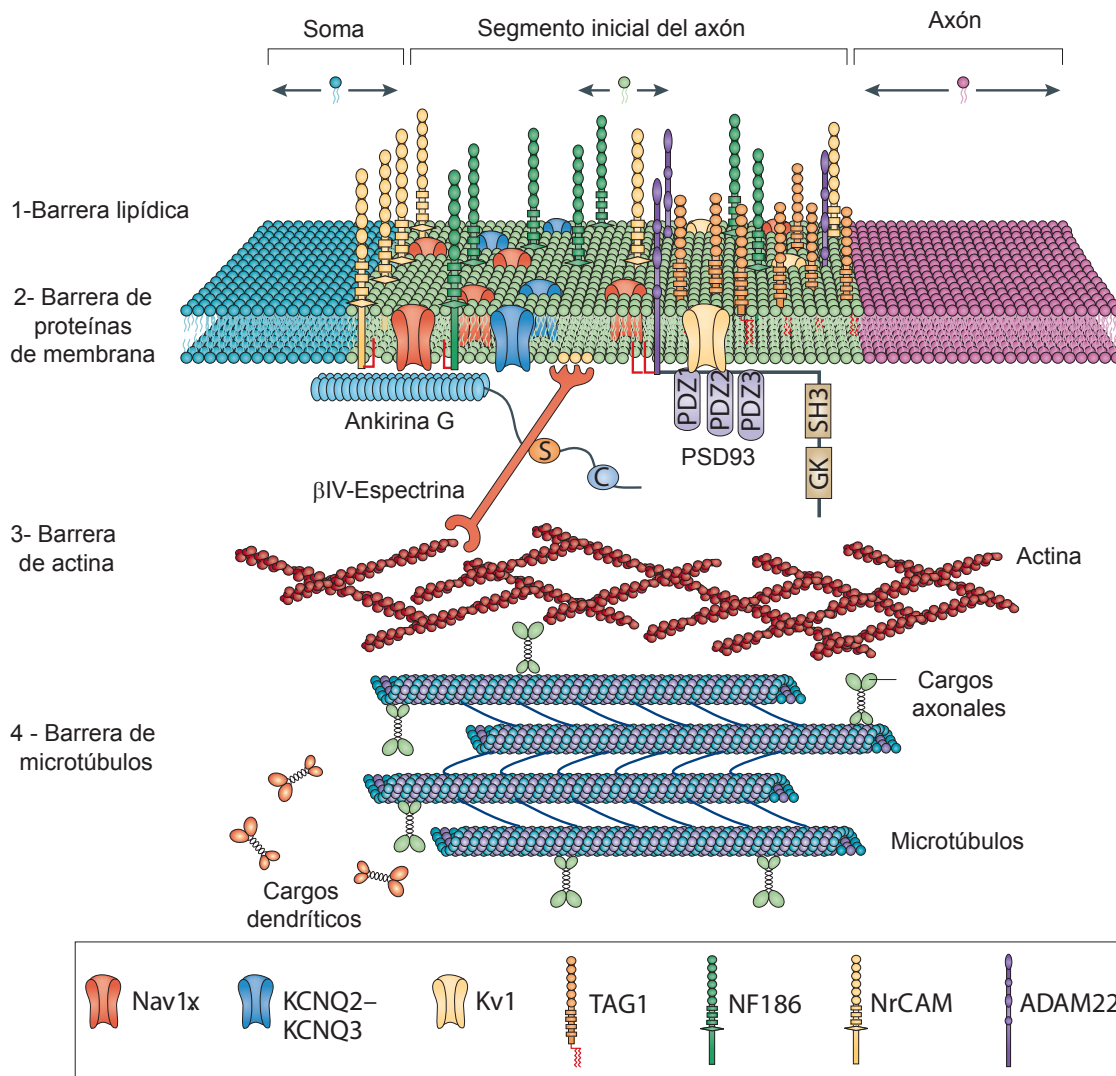


Figura I-8. Composición molecular del segmento inicial del axón. Imagen adaptada de Rasband, 2010.

las dineínas que participan en el transporte retrógrado. La superfamilia de kinesinas está compuesta por gran variedad de moléculas, que transportan cargas selectivamente hacia axones o dendritas (Hirokawa and Takemura, 2005; Nakata and Hirokawa, 2003). Las características diferenciales de los microtúbulos del SIA (Konishi and Setou, 2009; Tapia et al., 2010) permiten la unión de kinesinas que transportan cargas axonales (Nakata and Hirokawa, 2003) (**Figura I-8**). Así, el SIA actúa como un filtro selectivo de moléculas que permite el paso hacia el axón a proteínas transportadoras con carga axonal, pero no a proteínas con carga dendrítico. Además, el citoesqueleto de microtúbulos también participa en esta barrera de exclusión proteica, impidiendo el movimiento retrógrado hacia el soma de Tau, lo que promueve la segregación de proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) en ambos compartimientos (Li et al., 2011) (**Figura I-8**).

Los microtúbulos del SIA se encuentran polarizados, manteniendo el extremo de crecimiento (*plus-end*) con una orientación alejada del soma neuronal, al igual que el resto del axón, y a diferencia de los microtúbulos somatodendríticos que presentan orientación mixta (*plus-end* y *minus-end*). Esta orientación junto con modificaciones postraduccionales en los microtúbulos contribuyen al mecanismo de tráfico de kinesinas y de los cargos que lleven acoplados (Konishi and Setou, 2009; Nakata et al., 2011; Tapia et al., 2010). Los microtúbulos del SIA funcionan como el sitio de inicio

del tráfico mediado por kinesinas axonales, como por ejemplo KIF5. La construcción mutante de KIF5 que contiene el dominio de unión a microtúbulos fusionado con GFP transfectada a neuronas hipocampales se acumula en el SIA, indicando que la red de microtúbulos del SIA funciona como sitio preferente de anclaje inicial de KIF5 (Nakata and Hirokawa, 2003).

2.3. Generación de potenciales de acción

La principal característica distintiva de las neuronas, como células excitables, es su capacidad de generar potenciales de acción, fundamentales para la transmisión de la información nerviosa en vertebrados. Estos potenciales se generan gracias a la existencia de una diferencia de potencial de unos -60mV (mili-voltios) entre la cara externa (con carga positiva) y la cara interna de la membrana (con carga negativa). La llegada de un estímulo despolarizante que supere el valor umbral de canales de Na^+ provoca su apertura, lo que permite la entrada de grandes cantidades de este ión al interior y por tanto un flujo neto de carga positiva. Esto se traduce en una despolarización y la generación de un potencial de acción que se propaga hacia ambos lados de la membrana. Durante esta despolarización se produce la inactivación de los canales de Na^+ y la activación de los canales de K^+ los cuales producen una rápida repolarización de la membrana por debajo de los niveles iniciales entrando en un periodo refractario y la posterior recuperación del potencial de reposo (Kandel 2000) (Figura I-9).

En las neuronas de mamíferos, el lugar de iniciación de los potenciales de acción corresponde al SIA, donde se produce la integración de las señales provenientes de las sinapsis en el soma y de las dendritas para convertirlas en una respuesta todo-nada que genera un potencial que se transmitirá a lo largo del axón. La gran concentración de canales de sodio presentes en el SIA (alrededor de 50 veces mayor que la existente en soma) y sus propiedades eléctricas marcan una zona de bajo umbral necesaria para la fase de despolarización que inicia el potencial de acción (Kole et al., 2007) (Figura I-9).

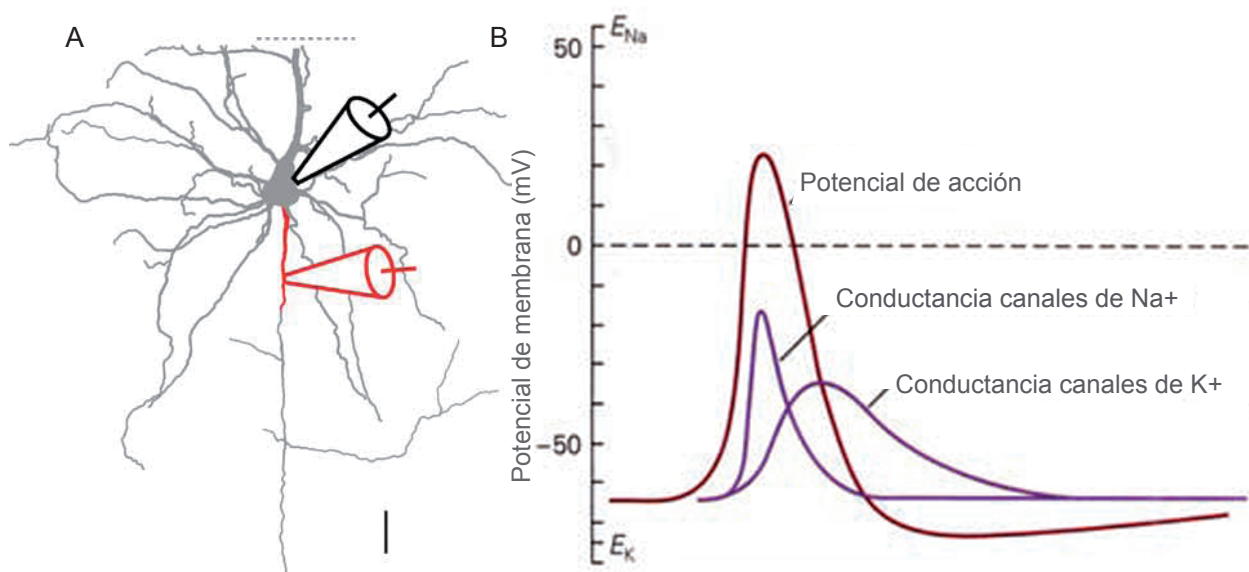


Figura I-9. A) Esquema que muestra la metodología empleada para medir diferencias en las características de los potenciales de acción entre el dominio somatodendrítico y el segmento inicial del axón (Kole and Stuart, 2012) . B) Gráfica que ilustra la apertura secuencial de los canales de Na^+ y K^+ sensibles a voltaje, necesaria para la generación del potencial de acción. Imagen adaptada de Kandel, 2000.

Dentro del SIA, la presencia de diferentes subtipos de canales iónicos y su distribución espacial determinan la forma de respuesta de cada tipo neuronal. En neuronas piramidales, la generación de potenciales de acción se produce preferentemente en la zona distal del SIA, aún cuando la concentración de canales de sodio es homogénea en todo el SIA debido a las diferencias entre subtipos de canales de sodio (ver apartado 3.5.4).

2.3.1 Control inhibitor: Inervación y modulación del segmento inicial del axón

En mamíferos existe una gran diversidad morfológica y neuroquímica de interneuronas GABAérgicas que inervan distintas regiones de las células piramidales (DeFelipe, 1993, 1997). Entre ellas destacan por su especificidad las células en candelabro, que inervan selectivamente el SIA (Somogyi et al., 1983) y representan su principal fuente de sinapsis (**Figura I-10**). Las terminaciones de las células en candelabro se concentran mayoritariamente en la región distal del SIA (Arellano et al., 2002; DeFelipe et al., 2001) coincidiendo con el lugar de localización de canales de potasio Kv1.2 (Inda et al., 2006). Sin embargo, la región proximal del SIA se caracteriza por la expresión de canales de Na⁺ dependientes de voltaje, aunque parece ser menos accesible al control GABAérgico de las células en candelabro (Inda et al., 2006). Las células en candelabro son consideradas elementos críticos en el control de las respuestas de las células piramidales de la corteza cerebral (Buhl et al., 1994; Colbert and Johnston, 1996; Stuart and Sakmann, 1994). De hecho, estudios recientes realizados en el hipocampo han demostrado como las células en candelabro no intervienen únicamente en la supresión de los potenciales de acción sino que participan en funciones complejas como la sincronización de los patrones de disparo de grandes poblaciones de neuronas en distintos estados de conciencia (Somogyi and Klausberger, 2005; Whittington and Traub, 2003). En cerebelo, las interneuronas en cesto presentan unas sinapsis exclusivas sobre el SIA de las células de Purkinje. La correcta inervación de estas neuronas depende de la integridad estructural del SIA controlada por ankirina G, ya que ratones *knock-out* para ankirina G en las células de Purkinje presentan reducción importante de la inervación en el SIA (Ango et al., 2004).

Además de las sinapsis GABAérgicas, el funcionamiento SIA está controlado por otros sistemas que

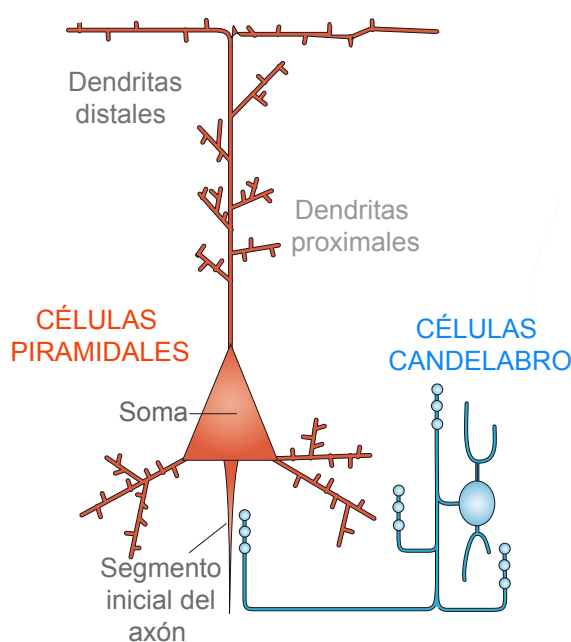


Figura I-10. Inervación GABAérgica del segmento inicial del axón.
Imagen adaptada de Huang et al., 2007.

regulan diversas corrientes de K^+ y Ca^{2+} . Estos mecanismos podrían modular el potencial de reposo, el umbral de apertura de canales sensibles a voltaje así como la frecuencia de generación de potenciales de acción en el SIA. La región proximal del SIA expresa receptores metabotrópicos de serotonina (5-HT_{1A}), cuya actividad podría inhibir a las células piramidales a través de la activación de corrientes salientes de K^+ (DeFelipe et al., 2001). Por otra lado, existen actualmente evidencias de la modulación de los canales de calcio tipo T del SIA a través de receptores de dopamina D₃ cuya activación reduce la generación de espigas de potencial en el SIA (Bender et al., 2012; Grubb et al., 2011).

3. COMPOSICION MOLECULAR DEL SEGMENTO INICIAL DEL AXÓN

Las funciones del SIA son reflejo de su composición molecular y de los macro-complejos estables que estas moléculas forman entre sí. Esta composición es característica de este subdominio axonal y se encuentra altamente conservada durante la evolución (Hill et al., 2008).

3.1. Citoesqueleto y proteínas asociadas

El citoesqueleto es un sistema de filamentos de proteínas interconectadas que desempeñan un importante papel en el SIA. Está compuesto por microtúbulos, proteínas de unión a microtúbulos y filamentos de actina.

3.1.1. Microtúbulos

En las neuronas, los microtúbulos (MTs) recorren longitudinalmente los axones y dendritas sirviendo de guía sobre la cual pueden ser transportadas diferentes macromoléculas. Están formados por heterodímeros de α/β tubulina que generan filamentos polares con un extremo de crecimiento rápido (+) y otro extremo de crecimiento lento (-) y más estable (Baas and Black, 1990; Baas et al., 1989; Baas et al., 1988). En los axones, su extremo (+) está orientado distalmente con respecto al soma mientras que en las dendritas la población de MTs presenta una orientación mixta (Baas et al., 1989; Baas et al., 1988). Esta polaridad es determinante para el transporte de moléculas a través de ellos. Los estudios de microscopía electrónica realizados por S. Palay (Palay et al., 1968) establecen que los MTs del SIA son distintos a los de otras regiones neuronales, ya que se encuentran fasciculados. Cada fascículo está compuesto por grupos de entre 6 y 12 MTs que se introducen en el SIA desde el cono axónico y lo recorren en toda su longitud. Dentro de cada fascículo, los MTs tienen trayectorias paralelas y se mantienen separados a una distancia regular de aproximadamente 120 Å que permanece estable gracias a la presencia de brazos o puentes entre ellos de material denso a los electrones. El número de fascículos es variable dependiendo del tipo neuronal (Palay et al., 1968; Peters et al., 1968; Peters A, 1991) **(Ver figura I-7)**.

Existen diferentes proteínas de unión a MTs, (*microtubule-associated proteins*; MAPs) las cuales controlan la dinámica y la estabilización del citoesqueleto de microtúbulos. Estas proteínas o sus formas fosforiladas presentan una localización selectiva en el dominio somatodendrítico (MAP2) o en el dominio axonal (Tau-1, MAP1B-P). Las proteínas de unión a microtúbulos EB1/EB3 (*End Binding proteins*) se unen al extremo + de los MTs. Forman parte de las proteínas +TIPs (*plus-end tracking proteins*) y actúan estabilizando y regulando la dinámica de MT así como permitiendo la interacción con otras proteínas y estructuras celulares (Akhmanova and Hoogenraad, 2005). EB1/EB3 se encuentran localizadas en el SIA de neuronas maduras donde interaccionan con la proteína de anclaje ankirina G. Además, EB1/EB3 participan en el mantenimiento del SIA y coordinan las interacciones de proteínas de anclaje con el citoesqueleto de microtúbulos (Leterrier et al., 2011; Nakata and Hirokawa, 2003).

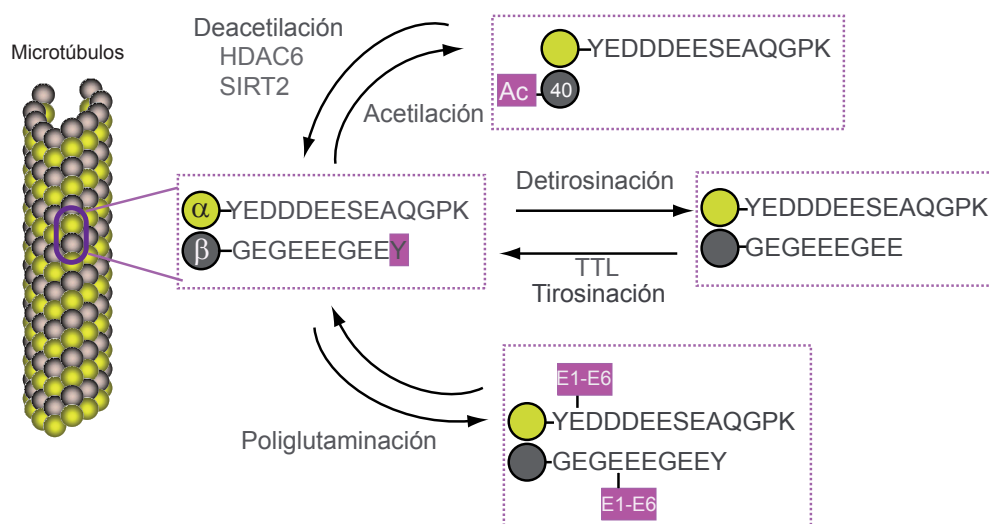


Figura I-11. Esquema que representa las diferentes modificaciones postraduccionales de la tubulina en neuronas (Adaptado de Fukushima et al., 2009)

La tubulina puede sufrir una serie de modificaciones postraduccionales (**Figura I-11**) entre las que destaca la acetilación (Ac-tubulina), aunque aún no se ha descrito cuál es la enzima responsable de ello. La acetilación es revertida por HDAC6 (*histone deacetylase 6* o *tubulina deacetylase 6*) y por SIRT2 (*human Sir2 ortologe*) (Hubbert et al., 2002; North et al., 2003) que se encuentran expresadas en neuronas y oligodendrocitos respectivamente (Southwood et al., 2007). En general, la acetilación de los MTs, junto con otras modificaciones postraduccionales, está asociada a un aumento de la estabilidad del citoesqueleto. Otra de las modificaciones de la tubulina es la tirosinación en su extremo C-terminal por la enzima TTL (tubulin-tyrosine-ligase). La tirosinación de la tubulina (Tyr-tubulina) está asociada a microtúbulos más dinámicos. Al igual que ocurre con la enzima que acetila la tubulina, no se conoce que enzima genera la detirosinación de la tubulina. El resultado de la detirosinación es la generación de Glu-tubulina (o tubulina detirosinada) que expone un grupo de ácido glutámico en su carboxilo terminal (Westermann and Weber, 2003). En neuronas en estadio 1 de desarrollo (no polarizadas) se observa la presencia de Tyr-tubulina en los conos de crecimiento, lo que refleja su estado dinámico. Posteriormente en el desarrollo, a partir de estadio 3 y en células ya polarizadas, se observa un aumento de la acetilación en el axón comparado con el resto de neuritas, aunque en el cono de crecimiento axonal permanece la tyr-tubulina. Esta distribución diferencial de los MTs con distintas modificaciones postraduccionales refleja las diferencias en estabilidad de los microtúbulos en axones y dendritas. Esta estabilidad es necesaria para iniciar la formación del axón (Witte et al., 2008). De hecho, experimentos con dosis bajas de taxol que estabiliza los microtúbulos sin impedir su crecimiento provocan la formación de múltiples axones en la neurona (Witte and Bradke, 2008; Witte et al., 2008).

3.1.2 Citoesqueleto de actina

Los microfilamentos de actina están formados por monómeros globulares de actina (actina-G) que a su vez se organiza en filamentos (actina-F) por polimerización. Estos filamentos están polarizados, presentando un extremo de crecimiento rápido (+) y un extremo de despolimerización (-). El SIA contiene una densa red de citoesqueleto de actina necesaria para el anclaje de proteínas y la formación de la barrera de difusión (Nakada et al., 2003). Aunque la disposición de los filamentos

de actina en el SIA no se conoce con detalle, su despolimerización afecta al mantenimiento de las proteínas en el SIA y a la integridad de la barrera de transporte selectivo entre el soma y el axón (Nakada et al., 2003; Winckler et al., 1999)

3.1.3. Papel del citoesqueleto en el establecimiento de la polaridad neuronal y del segmento inicial del axón

En el transcurso de la formación del axón, el citoesqueleto neuronal experimenta una gran reorganización. Los cambios en la dinámica del citoesqueleto afectan tanto a la actina como a los microtúbulos, antes de que se observen modificaciones en la morfología neuronal. El citoesqueleto de actina se desestabiliza y se vuelve más dinámico en el cono de crecimiento de la neurita que se va a convertir en axón, permitiendo la protrusión de los microtúbulos y el consecuente crecimiento neurítico (Bradke and Dotti, 1999; Da Silva et al., 2003). Por su parte, los microtúbulos aumentan su estabilidad en esa misma neurita antes de la formación del axón y esa estabilización es suficiente para generar la aparición de un axón (Witte et al., 2008) (**Figura I-12**). En referencia al SIA, los microtúbulos están altamente acetilados y presentan una gran estabilidad en relación a regiones más distales al axón (Tapia et al., 2010). De hecho, este gradiente es necesario para el anclaje y concentración de proteínas en el SIA, pues tratamientos con inhibidores de deacetilasas que incrementan la acetilación en otras regiones neuronales, provocan una pérdida de concentración de ankirina G y canales de sodio dependientes de voltaje en el SIA (Tapia et al., 2010).

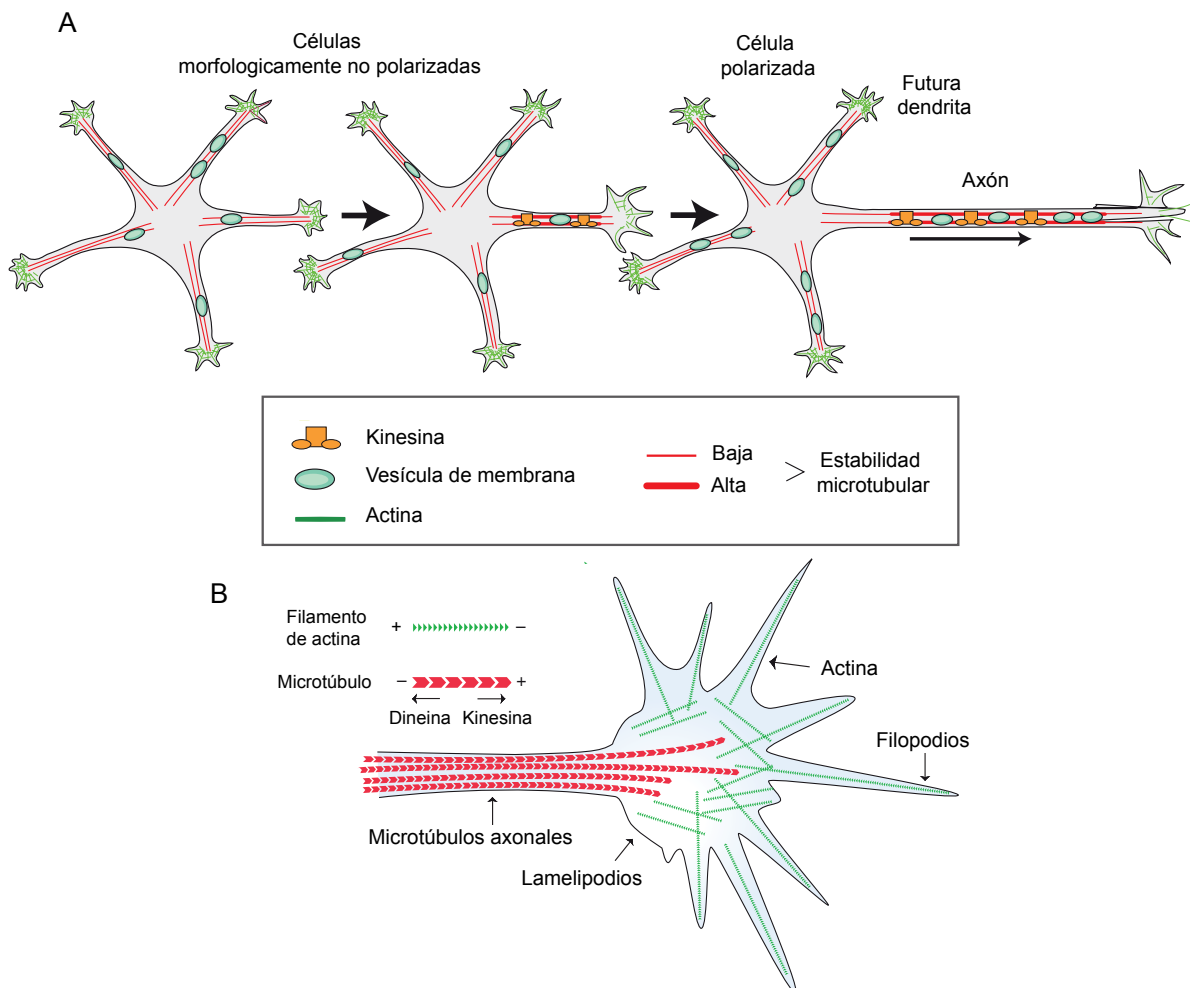


Figura I-12. A) Esquema que muestra mecanismo de polarización neuronal; B) Ilustración de la estructura del citoesqueleto del cono de crecimiento axonal y las proteínas transportadoras asociadas. Imágenes adaptadas de Tahirovic and Bradke, 2009.

3.2. Proteínas estructurales del segmento inicial del axón

El SIA está compuesto por una densa red de complejos proteicos heteromultiméricos estables que se anclan selectivamente en este subdominio y que están formados por diferentes proteínas:

3.2.1 Ankirina G

Dentro de la familia de las ankirinas existen 3 tipos: ankirina R, ankirina B y ankirina G, que están codificadas por genes diferentes (ANK1, ANK2, ANK3) y se expresan en distintos órganos (cerebro, corazón, hígado, etc.). Las ankirinas funcionan como proteínas adaptadoras que se unen al citoesqueleto y a proteínas de membrana. Mientras ankirina B se localiza en regiones distales del axón y está ausente del SIA (Galiano et al., 2012), la ankirina G (ANK3, *ankG*), con sus dos isoformas de 480 y 270 KDa (Kordeli et al., 1995)⁸, se concentra específicamente en el SIA y en los nodos de Ranvier desde etapas iniciales del desarrollo. Gracias a sus múltiples dominios (*ankyrin repeats, spectrin binding domain, etc...*) es capaz de concentrar en dominios concretos de la membrana proteínas que presenten dominios de unión a ankirina, lo cual incluye a canales de sodio y algunos tipos de canales de potasio dependientes de voltaje (Garrido et al., 2003; Pan et al., 2006), así como otras proteínas transmembrana o estructurales (**Figura I-13**). Los ratones deficientes en ankirina G en células de Purkinje de cerebelo, no son capaces de desarrollar un SIA y por tanto carecen de esa concentración de canales iónicos y otras proteínas específicas del SIA (Jenkins and Bennett, 2001).

3.2.2 Espectrina - β IV

Las espectrinas son una familia de proteínas resultado de la transcripción de distintos genes (SPTA1, SPTAN1, SPTB, SPTBN1, SPTBN2, SPTBN3, SPTBN4 y SPTBN5) que codifican para las dos subunidades α (α I y α II) y las cinco subunidades β (β I- β V). Estas subunidades forman heterotetrámeros que actúan como adaptadores moleculares que unen ankirina G al citoesqueleto de actina (Bennett and Baines, 2001). La subunidad β IV de espectrina se localiza específicamente en el SIA (Komada and Soriano, 2002). Los estudios *in vivo* en ratones deficientes para espectrina- β IV junto con estudios en neuronas hipocámpales en cultivo transfectadas con construcciones mutadas en el dominio de repetición 15 de espectrina- β IV muestran que esta no es vital para la formación del SIA pero sí podría tener un papel en el mantenimiento y la estabilidad a través de sus interacciones con el citoesqueleto (Komada and Soriano, 2002; Yang et al., 2004; Yang et al., 2007) y en la formación de la barrera que bloquea selectivamente la movilidad lateral de moléculas de adhesión de membrana (Nishimura et al., 2007) (**Figura I-13**).

3.2.3 PSD-93

PSD-93 o *chapsyn-110* (*postsynaptic density protein 93/channel-associated protein of synapse-110*) es una proteína de andamiaje de la familia MAGUK (*membrane-associated guanylate kinase*). Esta proteína forma estructuras de anclaje para canales iónicos, receptores o proteínas de señalización que se han estudiado principalmente en elementos postsinápticos. PSD-93 se concentra en el SIA, donde parece tener una función fundamental en el anclaje de canales de potasio dependientes de voltaje tipo Kv1 (Ogawa et al., 2008) (**Figura I-13**).

3.3. Moléculas de adhesión celular

Las moléculas de adhesión celular del tipo L1 se unen en el SIA a la proteína de andamiaje ankirina G, formando la principal conexión entre el citoesqueleto de actina-espectrina, la membrana plasmática y la matriz extracelular (Davis et al., 1993; Hortsch et al., 2009). En vertebrados se dividen en

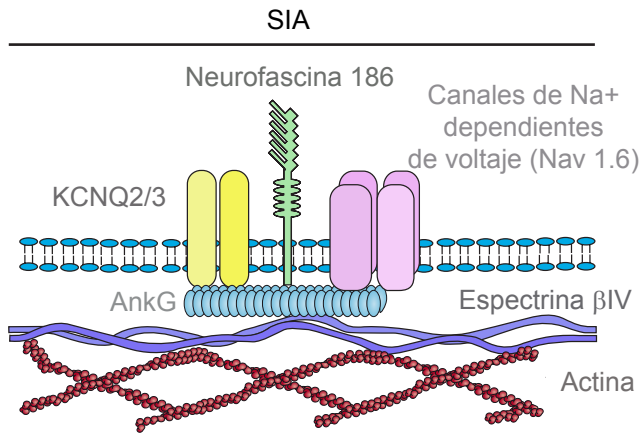


Figura I-13. Esquema que representa el papel estructural de diferentes proteínas en la composición molecular del segmento inicial del axón, destacando el papel de ankirina G como proteína de andamiaje fundamental.

cuatro tipos: L1-CAM (*Neural cell adhesion molecule L1*), CHL1 (*close homolog of L1*), neurofascina 186 y NrCAM (*Neuronal cell adhesion molecule*) que se expresan en células neuronales y glía. Están implicadas en promover crecimiento axonal y en la activación de diversas rutas bioquímicas (Hortsch et al., 2009).

Las moléculas de NrCAM y neurofascina 186 (NF-186) se localizan concentradas en el SIA tanto *in vivo* como *in vitro* (Hedstrom et al., 2007; Jenkins and Bennett, 2001). Esta localización se debe a la expresión de la secuencia altamente conservada de unión de ankirina G (Tuvia et al., 1997). La presencia de neurofascina 186 es necesaria para concentrar alrededor del SIA moléculas de la matriz extracelular como brevican (Hedstrom et al., 2007). La proteína neurofascina está también implicada directamente en la estabilización de la innervación GABAérgica del SIA por las células de Purkinje del cerebelo y por las células en candelabro de la corteza cerebral (Ango et al., 2004; Kriebel et al., 2011). Asimismo, neurofascina regula la localización de gefirina, una proteína postsináptica localizada específicamente en el SIA (Burkhardt et al., 2007). A su vez, la presencia de gefirina es necesaria para la localización de los receptores de GABA_A y por tanto para la formación de la sinapsis inhibitoras en el SIA (Kneussel et al., 1999).

Otras moléculas de adhesión presentes en la zona distal del SIA (y en zonas yuxtaparanodales) son Caspr2 (*Contactin associated protein like 2*), Tag-1 (ó *CNTN2; Contactin 2*) y ADAM22 (*Disintegrin and metalloproteinase domain containing protein 22*). Estas moléculas de adhesión celular se asocian junto con PSD-93 a los canales Kv1 formando un complejo macromolecular que participa en el anclaje de estos canales al SIA (Horresh et al., 2008; Ogawa et al., 2010).

3.4. Proteínas de la matriz extracelular

La red perineuronal (*perineuronal net; PNN*) forma una matriz extracelular compuesta por moléculas de proteoglicanos condroitin-sulfato (CSPGs). Entre las diferentes moléculas de CSPGs se encuentran el neurocan, el versican, el brevican, el agrecan y la tenascin-R. La acumulación de estos proteoglicanos genera un microambiente alrededor de las neuritas, el soma y el SIA que regula funciones neurales y sinápticas. Tanto agrecan como tenascin-R están asociadas al SIA en motoneuronas de colículo superior de ratón (Bruckner et al., 2006). Las neuronas hipocampales cultivadas al menos durante una semana presentan tanto brevican como neurocan, agrecan y versican en el SIA, aunque no se encuentran presentes en todas las células, distribuyéndose de manera heterogénea y dependiendo del ratio de astrocitos (John et al., 2006). La presencia de brevican está asociada a la presencia de neurofascina 186 en el SIA (Hedstrom et al., 2007). Se han descrito interacciones de canales de sodio dependientes de voltaje purificados con moléculas

de la matriz extracelular como tenascin-R y tenascin –C *in vitro* (Srinivasan et al., 1998). A pesar de la importancia que puede tener esta matriz extracelular en la función del SIA apenas hay todavía estudios sobre ello.

3.5. Canales iónicos

Los canales iónicos son proteínas de membrana que permiten el paso de iones. Se clasifican dependiendo del tipo de ión que fluya por el canal y del tipo de estímulo que permite su apertura. En el SIA, los canales iónicos regulan la excitabilidad neuronal y el inicio de la transmisión de los impulsos nerviosos (**Figura I-14**), siendo responsables de la generación y el control de los potenciales de acción.

3.5.1 Canales de sodio dependientes de voltaje (Nav)

En las neuronas, los canales de sodio dependientes de voltaje (*Voltage-gated Na (+) channel*, VGSC) son los principales responsables de la generación y la transmisión del potencial de acción. La localización precisa y la alta densidad de estos canales en el SIA y en los nodos de Ranvier es fundamental para esta función (Debanne et al., 2011; Kole et al., 2008). Los canales de sodio son proteínas transmembrana que están compuestas por una subunidad α que forma el poro del canal, y diferentes subunidades β asociadas que modulan sus propiedades biofísicas. La subunidad α posee 4 dominios repetidos compuestos de 6 segmentos transmembrana (S1-S6). Esta familia de canales está codificada por 9 genes (SCN) que producen 9 proteínas distintas (Nav1.1–Nav1.9). Los canales Nav1.1, Nav1.2 y Nav1.6 se encuentran concentrados en el SIA (Szu-Yu Ho and Rasband, 2010) junto con la subunidad β 1 que ha sido localizada también en el SIA de neuronas granulares de cerebelo (Brackenbury et al., 2010). La concentración de los canales de sodio en el SIA depende directamente de su anclaje a ankirina G a través de un motivo de unión específico localizado en el *loop* citoplásmico situado entre los dominios II y III (Garrido et al., 2003).

La distribución de los canales de sodio en el SIA difiere entre el zona proximal y distal del SIA, estableciéndose diferentes subdominios (denominados distal y proximal) dentro del SIA. Los canales de sodio Nav1.2 se localizan en la zona proximal, mientras los canales Nav1.6, que tienen un umbral más bajo de apertura, se localizan distalmente, contribuyendo a la propagación y a la iniciación del potencial de acción respectivamente (Hu et al., 2009). También la aparición temporal de distintos tipos de canales durante el desarrollo influye en la generación de diversos tipos de potenciales de acción en diferentes momentos del desarrollo, como ocurre con la aparición temprana de canales de Nav1.2 con respecto a la aparición tardía de canales Nav1.6 en células ganglionares de la retina (Van Wart and Matthews, 2006; Van Wart et al., 2007) (**Figura I-14**).

Además de su interacción con ankirina G, los canales de sodio pueden estar regulados por la interacción con otras proteínas. Por ejemplo, el canal Nav1.6 interaccionan con la proteína FGF14 (*Fibroblast growth factor 14 o FHF4*), la cual también se concentra de forma específica en el SIA (Laezza et al., 2007; Laezza et al., 2009). La familia de proteínas FHF/FGF se unen a la subunidad α del poro del canal y promueven cambios en las propiedades del canal (Laezza et al., 2007; Laezza et al., 2009), controlando así la excitabilidad a través de la regulación de los canales de sodio (Goldfarb, 2012; Goldfarb et al., 2007; Wittmack et al., 2004).

3.5.2 Canales de potasio dependientes de voltaje (Kv):

Mientras que los canales de sodio sensibles a voltaje actúan iniciando los potenciales de acción, dentro de la superfamilia de canales de K⁺, los canales de potasio dependientes de voltaje (Kv)

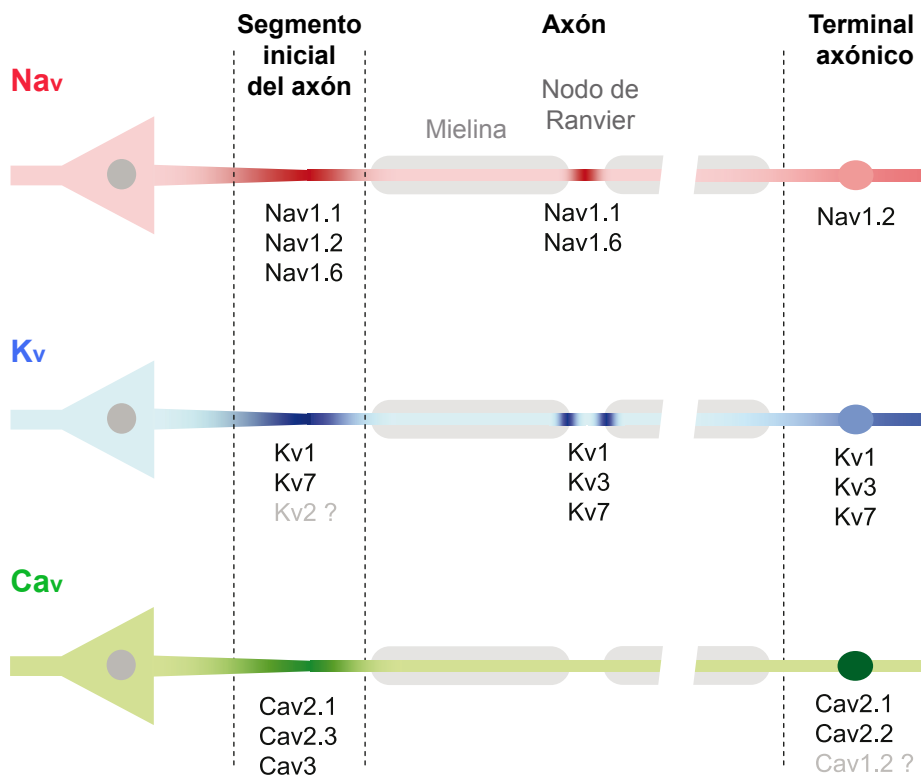


Figura I-14. Ilustración que muestra la distribución diferencial de distintos tipos de canales iónicos localizados en el segmento inicial del axón y en los nodos de Ranvier . (Debanne et al., 2011)

actúan regulando el potencial de membrana en reposo y diferentes propiedades de los potenciales de acción, incluyendo, forma, umbral, amplitud, duración y frecuencia de disparo (Debanne et al., 2011; Rasband, 2010). Estos canales se activan por despolarización y participan en la fase de repolarización del potencial de acción. Se clasifican como una amplia familia que se subdivide a su vez en cuatro subfamilias con diferentes subunidades: Kv1 (Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3 y Kv1.4), Kv2 (Kv2.1y Kv2.2), Kv3 (Kv3.1) y Kv7 (Kv7.2 y Kv7.3), también denominados KCNQ2 y KCNQ3. Su distribución precisa en la membrana neuronal y la restricción en dominios específicos es crucial para el control de la excitabilidad neuronal y la transmisión sináptica (Gu and Barry, 2011).

Los canales de la subfamilia Kv1 son canales de bajo umbral, con una cinética de activación rápida e inactivación lenta. Modulan el umbral, la iniciación, la forma, la tasa de generación de los potenciales de acción, la liberación de neurotransmisor y la eficacia sináptica. Se localizan tanto en las zonas yuxtaparanodales de los axones mielinizados, como en los terminales de las células en cesto del cerebelo, así como en la zona más distal del SIA de neuronas piramidales (Goldberg et al., 2008; Inda et al., 2006; Kole et al., 2007; Van Wart et al., 2007; Wang et al., 1993) **(Figura I-14)**.

La subfamilia Kv2 está formada por canales rectificadores tardíos que regulan la excitabilidad de la membrana. Dentro de esta subfamilia algunos tipos se han descrito localizados en el SIA como la subunidad Kv2.1, que ha sido descrito en neuronas hipocámpales y neocorticales *in vivo* (Sarmiere et al., 2008), mientras que el subunidad Kv2.2 ha sido localizada en el SIA de neuronas del núcleo medial del cuerpo trapezoide (Johnston et al., 2008). Actualmente se desconoce el mecanismo de anclaje a este dominio, ya que no depende directamente de una unión a ankirina G (Hedstrom et al., 2008). **(Figura I-14)**

Entre la subfamilia Kv3, la subunidad Kv3.1b se localiza tanto en sistema nervioso central como en periférico (**Figura I-14**). Contribuyen al disparo de alta frecuencia en multitud de neuronas debido su rápida repolarización (Rudy and McBain, 2001) e inmunoprecipitan con ankirina G pero no han sido localizados en el SIA aunque si en nodos de Ranvier (Rasband, 2010).

La subfamilia Kv7 (subunidades Kv7.2 y Kv7.3) se encuentra el SIA y nodos de Ranvier (Devaux et al., 2004; Pan et al., 2006). Son canales de bajo umbral que se activan lentamente con valores de potencial cercanos al potencial de reposo generando corrientes de tipo M (sensibles a Muscarina) las cuales son sensibles a diversos neurotransmisores que actúan a través de receptores metabotrópicos regulando la excitabilidad neuronal (Brown and Passmore, 2009; Schwarz et al., 2006; Shah et al., 2008). Al igual que los canales de sodio, los canales de potasio Kv7 se localizan y se anclan en el SIA gracias a la presencia de un dominio común de unión en C-terminal a ankirina G, el cual media la unión al citoesqueleto de actina-espectrina (Hill et al., 2008; Pan et al., 2006) (**Figura I-14**).

3.5.3 Canales de calcio dependientes de voltaje (Cav):

Los canales de calcio dependientes de voltaje (Cav) están implicados en la generación de ráfagas de alta frecuencia de potenciales de acción (Bender and Trussell, 2009). Se pueden clasificar en base a sus características biofísicas en canales de alto umbral que incluyen canales tipo L, N, P Q y R (en función de sus perfiles farmacológicos) y canales de calcio de bajo umbral o tipo T. En mamíferos existen 3 grandes familias. La familia Cav1 está formada por 4 miembros (Cav1.1, Cav1.2, Cav1.3, Cav1.4) de canales de calcio tipo L. La familia Cav2 incluye a Cav2.1, Cav2.2 y Cav2.3 los cuales son canales tipo P/Q, N y R respectivamente. La familia Cav3 o canales tipo T está formada por 3 miembros Cav3.1, Cav3.2 y Cav3.3 (Zamponi et al., 2010). En el SIA de neuronas del núcleo coclear dorsal se ha descrito la presencia de canales de calcio tipo R (Cav2.3) y T (Cav3) colocalizando con canales de sodio (Bender and Trussell, 2009; Bender et al., 2010), mientras que el SIA de neuronas piramidales de corteza prefrontal muestra una concentración de canales tipo P/Q (Cav2.1 y Cav2.2) (Yu et al., 2010). Estos canales en el SIA contribuyen a la despolarización de la membrana y por tanto influyen en la generación de los potenciales de acción (Bender et al., 2010). Actualmente, debido a la falta de anticuerpos específicos, se desconocen distribución precisa y los mecanismos de localización de estos canales en el SIA (**Figura I-14**).

3.5.4 Variabilidad del segmento inicial del axón entre diferentes tipos neuronales

Estudios electrofisiológicos del SIA han demostrado que el sitio exacto de generación de potenciales de acción es variable entre los distintos tipos neuronales, siendo proximal en el SIA de las neuronas granulares del giro dentado (Kole et al., 2008; Schmidt-Hieber et al., 2008) mientras que aparece distalmente tanto en el SIA de neuronas corticales de capa 5 (Palmer and Stuart, 2006; Shu et al., 2007) como en células piramidales de CA3 (Meeks and Mennerick, 2007). En las neuronas de Purkinje del cerebelo, los potenciales de acción parecen generarse en el primer nodo de Ranvier (Clark et al., 2005). De manera análoga, la forma y la frecuencia de los potenciales de acción generados varían también entre distintos tipos neuronales (Bean, 2007). Esta diversidad está relacionada con las diferencias en la organización estructural y molecular del SIA, es decir con el tipo de canales dependientes de voltaje y las diferencias en su distribución y en la densidad a lo largo del SIA en distintas poblaciones. En un detallado estudio, Lorincz y Nusser demuestran una gran heterogeneidad en la localización subcelular de canales de sodio Nav1.2 y Nav1.6 y de las subunidades de canales de potasio Kv1.1 y Kv1.2 a lo largo del SIA de diferentes tipos neuronales (Lorincz and Nusser, 2008) (**Figura I-15**). Por ejemplo en neuronas piramidales de la capa 2/3 y en

CA1, la densidad de Nav1.6 se incrementa hacia la zona distal del SIA mientras que las neuronas piramidales de capa 5 y CA3, presentan una alta densidad de canales Nav1.6 homogéneamente distribuida a lo largo del SIA. El canal Nav1.6 tiende a co-expresarse junto con Nav1.1 en las neuronas GABAérgicas y con Nav1.2 en las neuronas glutamatérgicas excitadoras. Sin embargo, en neuronas ganglionares de la retina el canal Nav1.1 y el canal Nav1.6 se expresan de forma segregada: el canal Nav1.1 aparece en la región proximal, mientras el canal Nav1.6 se expresa en la región distal (Van Wart et al., 2007). Por otro lado, las subunidades Kv1.1 y Kv1.2 van apareciendo ligeramente un poco más distales a los canales de sodio y van aumentando gradualmente su intensidad, presentando una distribución bastante uniforme e intensa a lo largo del resto del SIA (Lorincz and Nusser, 2008; Van Wart et al., 2007). La subunidad Kv1.2 también ha sido descrita distalmente en neuronas piramidales de capa III de neocorteza temporal humana (Inda et al., 2006). Estos resultados muestran variaciones en la expresión y localización próximo-distal de los diferentes canales de sodio y de subunidades de los canales de potasio en función del tipo celular. Esta variabilidad en la distribución aumenta la diversidad neuronal y contribuye a la diversidad de disparo de potenciales de acción entre neuronas (Nusser, 2009). Los mecanismos e interacciones moleculares que subyacen a estas variaciones en la distribución de canales iónicos en el SIA de distintas poblaciones neuronales son por el momento desconocidos y representan un interesante campo para futuros estudios.

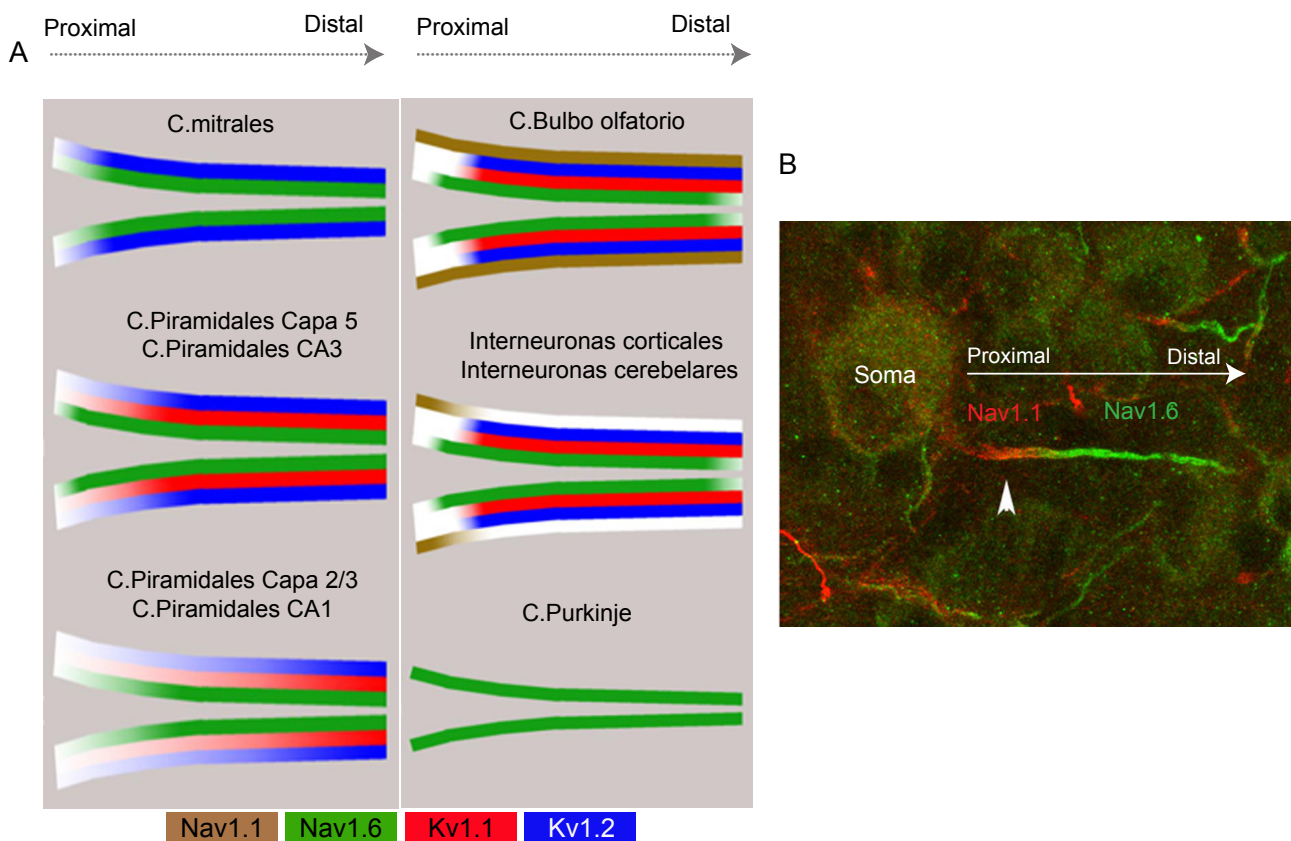


Figura I-15 . Variabilidad de la composición del segmento inicial del axón entre diferentes tipos neuronales (Adaptado de Lorincz and Nusser, 2008). La imagen muestra la distribución de diferentes canales en los microdominios proximal y distal del segmento inicial del axón (Van Wart et al., 2007)

3.6. Proteínas quinasas presentes en el segmento inicial del axón y vías de señalización celular relacionadas

En el SIA de las neuronas de hipocampo se ha descrito la presencia de diferentes proteínas-quinasas implicadas en la formación del axón y el establecimiento de la polaridad neuronal. Estas proteínas están implicadas en diversas vías de señalización neuronal.

La proteína CK2 (*Casein kinase 2*) es una serina/ treonina quinasa que controla gran variedad de funciones en la célula. Esta enzima presenta una estructura tetramérica, compuesta por dos subunidades catalíticas (CK2 α /CK2 α') y dos subunidades reguladoras (CK2 β). En mamíferos, el complejo CK2 puede ser homotetramérico (α 2- β 2 ó α 2'- β 2) o heterotetramérico ($\alpha\alpha'$ - β 2) (Gietz et al., 1995). CK2 se encuentra asociada a microtúbulos (Serrano et al., 1989) y promueve su polimerización (Moreno et al., 1999) siendo capaz de estabilizar microtúbulos *in vivo* (Lim et al., 2004). En neuronas de hipocampo en cultivo y en tejido de animales adultos CK2 α se encuentra concentrada en el SIA, pero no en zonas más distales del axón (Brechet et al., 2008). Se cree que esta acumulación en el SIA está implicada en la fosforilación de los residuos S1112, S1124 y S1126 del canal de sodio Nav1.2 en el *loop* citoplásmico II-III, lo que favorece la interacción del canal de sodio Nav1.2 con ankirina G en el SIA (Brechet et al., 2008; Rasband, 2008).

Otra de las quinasas localizadas en el SIA es Cdk5 (*Cyclin-dependent kinase 5*), esencial desarrollo cerebral y la migración neuronal. En vertebrados Cdk5 se regula por las subunidades activadoras p35 o p39. Los ratones deficientes en Cdk5 muestran alteraciones severas en la migración y la laminación de neocorteza, hipocampo y cerebelo (Ko et al., 2001). En adultos, Cdk5 está implicada también en la neurogénesis hipocampal (Lagace et al., 2008). Cdk5 (y también Cdk2) están presentes en el SIA de neuronas hipocampales donde colocalizan con proteínas del SIA, aunque no son específicas de esta zona en concreto, apareciendo también en el dominio somatodendrítico y en zonas distales del axón. Se ha propuesto que Cdk5 actúa fosforilando la subunidad Kv β 2 del canal de potasio Kv1 en los residuos de serina 9 y 31, regulando así su interacción con la proteína microtubular EB1 (Vacher et al., 2011). En *Drosophila*, se ha observado que el complejo Cdk5/p35 es capaz de regular la formación y el tamaño de la región axonal equivalente al SIA (Trunova et al., 2011).

Los miembros de la familia de proteínas quinasas calcio/calmodulina dependientes tipo 2 (CAMKII) –CAMKII α , CAMKII β , CAMKII δ y CAMKII γ – son quinasas serina-treonina con un papel fundamental en el control de la excitabilidad neuronal, regulando entre otras funciones la biofísica de los canales, el transporte de orgánulos, el metabolismo, la transcripción y la plasticidad sináptica (Hund et al., 2010). Recientemente se ha localizado CAMKII concentrada en el SIA de neuronas de Purkinje de cerebelo y asociada a espectrina- β IV y se ha propuesto que desempeña un importante papel regulador en la localización de canales de sodio (Hund et al., 2010).

El sistema NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) es un complejo de proteínas que regula la transcripción del DNA implicada en múltiples procesos como la respuesta inmune, la supervivencia celular y la apoptosis (Karin and Lin, 2002). En neuronas de sistema nervioso central de mamífero existe una activación constitutiva de la ruta del factor transcripcional NF- κ B que promueve supervivencia celular y protege a las neuronas de la apoptosis (Bhakar et al., 2002; Kaltschmidt et al., 1999). En general, el complejo citoplásmico inactivo NF κ B consiste en un dímero p65 (RelA/p50) que se encuentra retenido en el citosol por unión a la subunidad inhibitoria I κ B α , la cual enmascara la secuencia de localización nuclear. La ruta NF κ B (**Figura I-16**) se activa

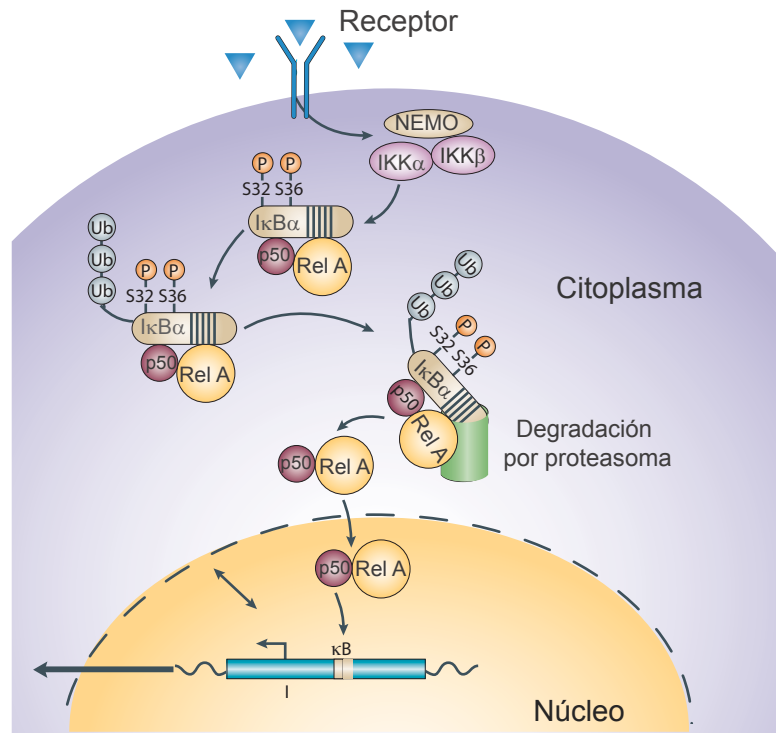


Figura I-16. Ruta de activación de NFκB. (Adaptado de (Chen and Greene, 2004))

por señales específicas (activación de receptores, presencia de citoquinas o por moléculas de adhesión) produciendo la activación de la quinasa de IκB (IKK), la cual presenta dos subunidades catalíticas (IKKα e IKKβ) y una subunidad reguladora (IKKγ o NEMO). La fosforilación de IκBα en las serinas 32 y 36 por IKK genera IκBα en su forma fosforilada (pIκBα) que se desliga del complejo IκBα- NFκB (p50-p65). Entonces, NFκB se trasloca hacia el núcleo donde actúa como factor de transcripción. Se considera que pIκBα se ubiquitina y degrada en el proteasoma.

En neuronas hipocampales tanto *in vivo* como *in vitro*, pIκBα (Ser 32-36), junto con otras proteínas activadoras de la ruta NFκB como la quinasa pIKKα/β y p65 se encuentran concentradas en el SIA y en los nodos de Ranvier (Politi et al., 2008; Schultz et al., 2006). Hasta el momento no se conoce la posible interacción entre las diferentes quinasas y vías de señalización, y el papel que algunas de ellas desempeñan en SIA. En el presente trabajo nos proponemos profundizar en el conocimiento de alguno de estos aspectos utilizando el modelo de neuronas hipocampales en cultivo.

4. FORMACIÓN Y REGULACIÓN DEL SEGMENTO INICIAL DEL AXÓN

4.1. Establecimiento y maduración del segmento inicial del axón

El ensamblaje del SIA es una propiedad intrínseca de las neuronas que, a diferencia de los nodos de Ranvier no depende de factores extracelulares o de señales de origen glial (Susuki and Rasband, 2008). La principal proteína implicada en el establecimiento del SIA es ankirina G. En neuronas, ankirina G se localiza concentrada en el SIA desde las primeras etapas del desarrollo, antes de la aparición del resto de proteínas en el SIA y su interferencia, mediante plásmidos shRNA, impide la localización de otras proteínas del SIA como las moléculas de adhesión neurofascina-186 y NrCAM (Hedstrom et al., 2007), espectrina- βIV (Jenkins and Bennett, 2001) o canales iónicos de sodio y de potasio Kv7.2 y Kv7.3, los cuales presentan un dominio de unión directo y común a ankirina G necesario para su localización al SIA (Garrido et al., 2003; Pan et al., 2006) (Figura I-17). Recientemente se ha descrito la posible implicación del citoesqueleto axonal distal en la formación

del SIA (Galiano et al., 2012)

Durante la diferenciación del SIA la proteína estructural espectrina β IV funciona como una proteína adaptadora a través de la cual se une ankirina G a la red de actina estableciendo el anclaje al citoesqueleto neuronal y contribuyendo al mantenimiento del SIA (Lacas-Gervais et al., 2004; Yang et al., 2007). Por último, las moléculas de adhesión como neurofascina-186 (NF-186) también participan en el establecimiento del SIA (**Figura I-17**). NF-186 es esencial para la localización del proteoglicano brevican y el ensamblaje de la matriz extracelular (Hedstrom et al., 2007) así como para la localización de gefirina en el SIA de neuronas de hipocampo y el establecimiento de la sinaptogénesis GABAérgica inhibitoria (Burkarth et al., 2007)

Otra de las proteínas necesarias para el establecimiento del SIA es PSD-93, la cual está implicada en la localización de los canales de potasio Kv1.1, Kv1.2 y Kv1.4. Estos canales se unen por interacción de su dominio PDZ en el C-terminal con el dominio PDZ de PSD-93 (Ogawa et al., 2008) y forman un complejo macromolecular junto con Caspr2, Tag1 y ADAM22 (Rasband, 2010) (**Figura I-17**).

Actualmente se desconocen los mecanismos por los cuales ankirina G se localiza concentrada inicialmente en el SIA de manera específica y el papel de otras proteínas en el establecimiento del SIA.

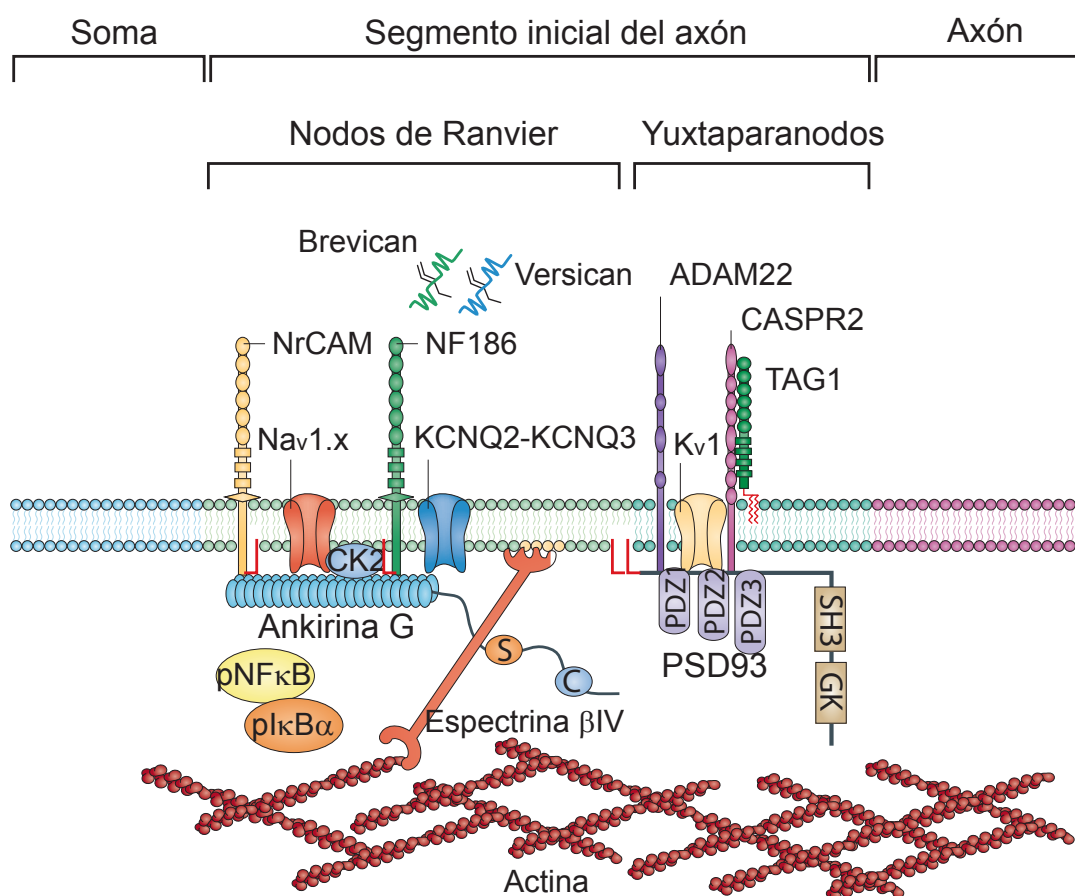


Figura I-17. Esquema que muestra las diferentes interacciones moleculares necesarias para la formación y la estructuración del SIA. Adaptado de Rasband, 2010

4.2. Composición molecular y mecanismos de formación de los nodos de Ranvier: diferencias con el segmento inicial del axón

Una vez generados los potenciales de acción en el SIA, la propagación debe de llevarse a cabo de manera rápida y efectiva a lo largo del axón. En los axones mielinizados de mamíferos esta transmisión eficiente se realiza gracias a la presencia de nodos de Ranvier (NR) localizados a lo largo de los axones, en puntos de adelgazamiento de la vaina de mielina. Los NR presentan varios subdominios: el nodo y el paranodo y el yuxtaparanodo. La zona mielinizada entre un NR y el siguiente se denomina internodo (**Figura I-18**).

Dado que llevan a cabo funciones análogas en el axón, la composición molecular el SIA y los NR presenta muchas similitudes, aunque también importantes diferencias. La zona del nodo está compuesta de canales de sodio (Nav1.6) (Letierrier et al., 2011), canales de potasio dependientes de voltaje (KCNQ2/3) (Devaux et al., 2004; Schwarz et al., 2006), moléculas de adhesión (neurofascina-186 y NrCAM) (Davis et al., 1993) y una matriz extracelular especializada compuesta por brevicana y versican (Bekku et al., 2009; Dours-Zimmermann et al., 2009). Además, los nodos de manera similar al SIA, presentan una alta concentración de proteínas de anclaje relacionadas con el citoesqueleto como ankirina G, espectrina β IV o proteína 4.1, proteínas con dominios PDZ y proteínas de la familia de los FGFs que interaccionan modulando los canales de sodio Nav1.6 (Wittmack et al., 2004) (**Figura I-18**). La zona del paranodo, que flanquea a ambos lados al nodo carece de canales iónicos, y está compuesta por la proteína asociada a contactina (Caspr), contactina y la forma glial neurofascina-155 formando un complejo implicado en la unión de mielina al axón. Estructuralmente los paranodos presentan altas concentraciones de ankirina B, espectrina β II y de la proteína 4.1B. La zona yuxtaparanodal, es el dominio de contacto entre axón y glía y presenta una alta densidad de canales de potasio dependientes de voltaje, moléculas de adhesión (Caspr2 y Tag1) y metaloproteasas (ADAM22) (Rasband, 2011) (**Figura I-18**). Los yuxtaparanodos expresan PDS95 (que no se encuentra en SIA), PSD93 y en la proteína asociada al citoesqueleto 4.1B que se une a moléculas de adhesión (CAMs) para anclarse al citoesqueleto de actina (Rasband, 2011; Susuki and Rasband, 2008). En la región yuxtaparanodal, la localización de canales de K^+ depende críticamente de sus interacciones heterofílicas, a través de Caspr2, con la proteína glial Tag1 de la mielina compacta que rodea a la región yuxtaparanodal (Denisenko-Nehrbass et al., 2003; Girault et al., 2003; Poliak and Peles, 2003; Poliak et al., 2003; Traka et al., 2002; Traka et al., 2003). Otras proteínas presentes en SIA como plkB α , pIKK, CK2, Cdk5 y Cdk2 también han sido descritas en los NR aunque se desconoce su función (Brechet et al., 2008; Politi et al., 2008; Vacher et al., 2011).

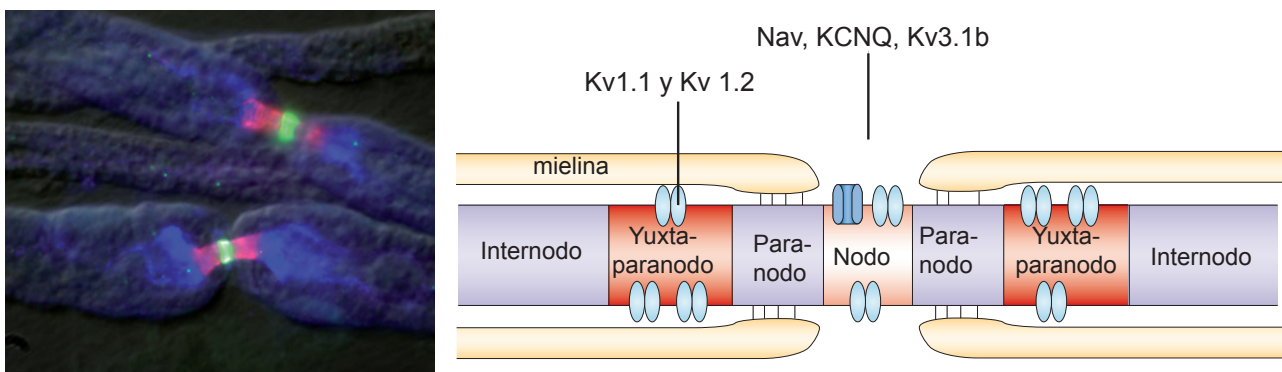


Figura I-18. Imagen y esquema que representan los diferentes dominios presentes en los nodos de Ranvier y los canales iónicos localizados en cada uno de ellos (adaptado de Lai and Jan, 2006)

Estas similitudes sugieren que el mecanismo de desarrollo de ambos dominios se encuentra evolutivamente conservado (Hedstrom et al., 2007). Sin embargo existen una serie de diferencias importantes. Al contrario del SIA, que presenta un programa interno de establecimiento y se organiza de dentro hacia fuera basándose en la presencia de proteínas estructurales como ankirina G, los NR se organizan de fuera hacia dentro y necesitan de señales externas procedentes de la glía e interacciones neurona-glía para iniciar su formación. Estas interacciones promueven la acumulación de neurofascina-186 (NF-186), que actúa como proteína principal en el establecimiento de los NR (Rasband, 2011; Susuki and Rasband, 2008) (Dzhashiashvili et al., 2007). La NF-186 se localiza en membrana, en la zona adyacente a la vaina de mielina durante las fases iniciales del desarrollo (Zhang et al., 2012) y posteriormente inicia en el reclutamiento de ankirina G. Una vez que ankirina G se ha localizado en el nodo, se anclan el resto de proteínas como espectrina- β IV y canales iónicos Nav y KCNQ2/3, de modo similar al SIA (Rasband, 2011) (**Figura I-19**). Otra de las diferencias con el SIA se establece en cuanto a la segregación de canales iónicos. Mientras que en los NR, los canales Nav y el subtipo de canal de potasio Kv1.2 están distribuidos simétricamente y segregados espacialmente a las zonas nodal y yuxtaparanodal respectivamente y separados por la zona paranodal, en el SIA se establece un solapamiento parcial entre ambos tipos de canales en la zona más distal (Inda et al., 2006).

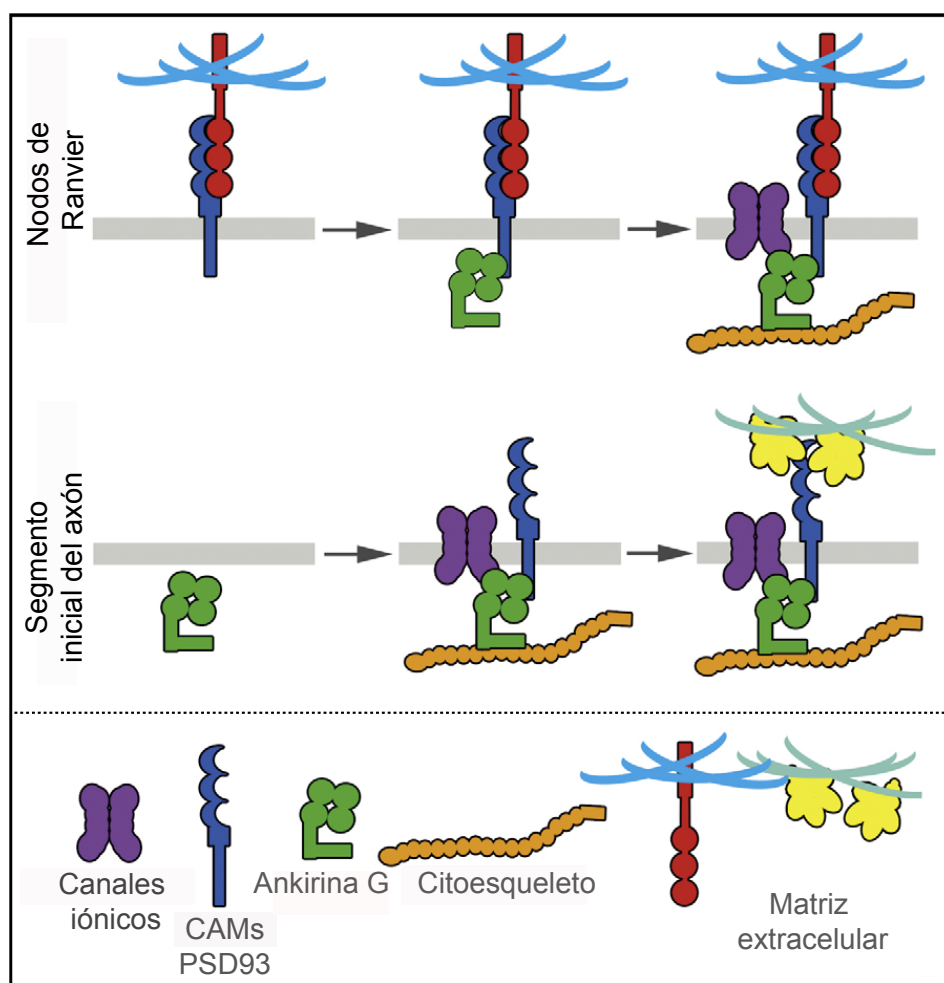


Figura I-19. Esquema que compara la formación del segmento inicial del axón y los nodos de Ranvier. Adaptado de Susuki and Rasband, 2008.

5. EL ORGÁNULO DE CISTERNAS

El retículo endoplásmico (RE) consiste en una red de estructuras membranosas interconectadas que se distribuyen por todo el citoplasma y que incluye elementos tubulares y sacos aplanados o cisternas. Entre sus funciones se incluye su implicación en el almacenamiento de iones Ca^{2+} los cuales desempeñan un papel esencial en la regulación de múltiples funciones celulares. Los iones de Ca^{2+} son bombeados al interior del RE por bombas de Ca^{2+} dependientes de ATP denominadas

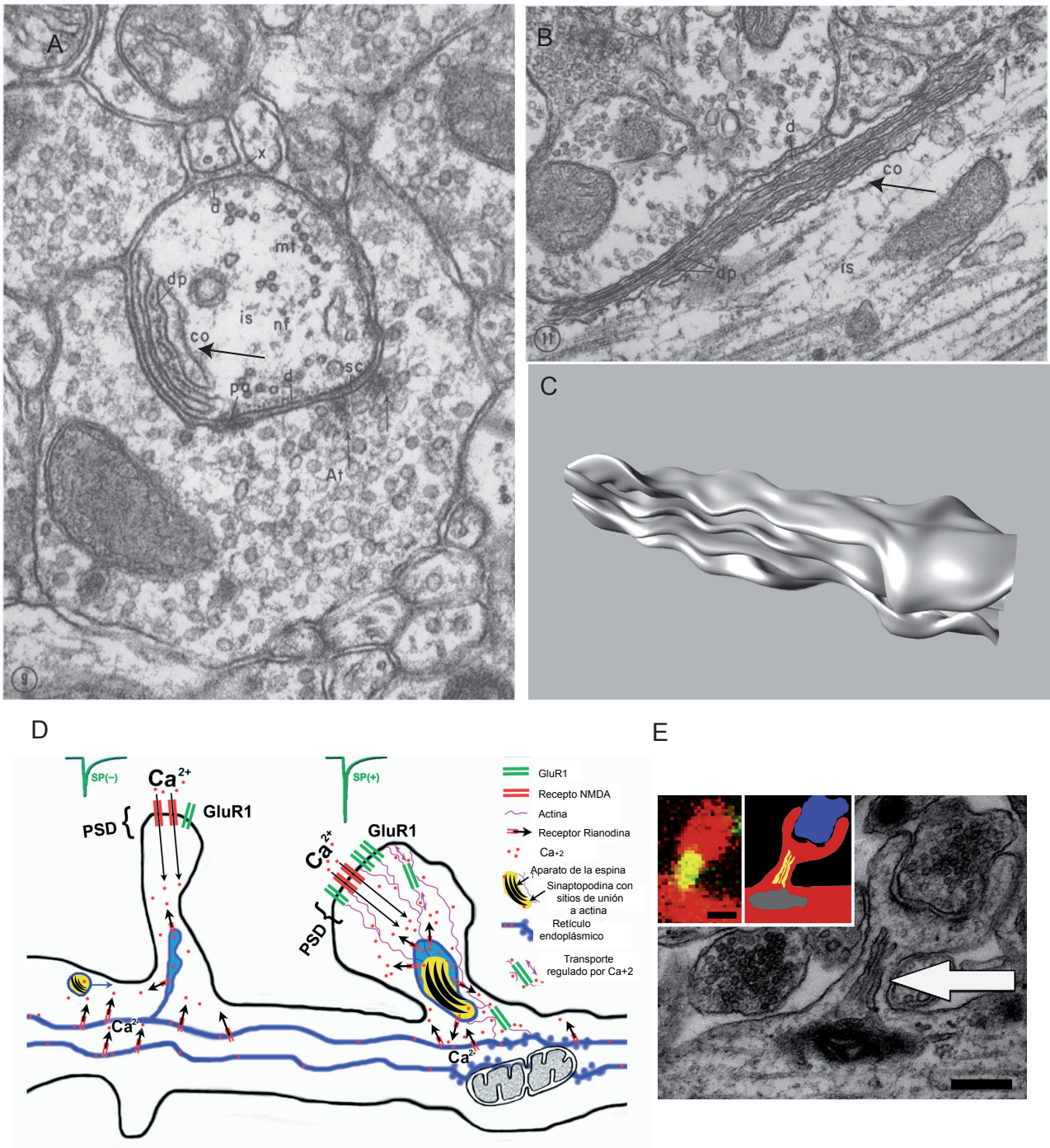


Figura I-20. Imágenes de secciones transversal (A) y longitudinal (B) de microscopía electrónica que muestran la localización de orgánulo de cisternas (co) en el segmento inicial del axón (flechas). Tomado de (Peters et al., 1968) y de (Benedeczky et al., 1994). ; C) Reconstrucción tridimensional del orgánulo de cisternas. Tomado de Atlas of Ultrastructural Neurocytology. ;D) Imagen de microscopía electrónica del aparato de la espina (flecha) presente en el cuello de una espina dendrítica (Vlachos, 2011) ;E) Esquema que representa la regulación de calcio en la espina dendrítica por el aparato de la espina (adaptado de (Vlachos et al., 2009)

SERCA (*sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase*,) y son liberados en respuesta a señales extracelulares a través de los receptores de IP₃R1 y de rianodina.

El orgánulo de cisternas es una estructura localizada en el SIA de las neuronas principales de la corteza cerebral que fue descrita mediante microscopía electrónica en 1968 por S. Palay (Palay et al., 1968). Está formado por una serie de membranas apiladas derivadas del retículo endoplásmico liso de las cuales, la más externa está en aposición con la cara interna de la membrana plasmática (Palay et al., 1968; Peters et al., 1968; Peters A, 1991) (**Figura I-20 A-C**). El orgánulo de cisternas presenta similitudes estructurales con el aparato de la espina, un orgánulo localizado en una subpoblación de espinas dendríticas (Spacek, 1985) e implicado en la regulación de los niveles de Ca⁺² y en procesos de plasticidad en las espinas (**Figura I-20 D y E**). La formación tanto del orgánulo de cisternas como del aparato de la espina, depende de la presencia de sinaptopodina, una proteína de unión a actina y a α -actinina (Asanuma et al., 2005; Deller et al., 2003). Los ratones deficientes en sinaptopodina no son capaces de desarrollar ni el aparato de espina ni el orgánulo de cisternas del SIA, aunque esto no afecta a la generación de potenciales de acción (Bas Orth et al., 2007).

Actualmente se desconoce el momento del desarrollo en el que el orgánulo de cisternas aparece en el SIA así como los mecanismos implicados en su estabilización. Aunque se conoce poco de su función, el orgánulo de cisternas ha sido implicado en el control de los niveles intracelulares de calcio (Ca⁺²), debido a la presencia en su membrana de la bomba de calcio SERCA-ATPasa (Benedeczy et al., 1994). La regulación de los niveles de Ca⁺² en el SIA es esencial para mantener su estructura y funcionalidad. Las concentraciones elevadas de este ion producidas por un daño cerebral o situaciones de isquemia, inducen la activación de calpaína y la proteólisis de proteínas estructurales del SIA como ankirina G y espectrina- β IV lo cual deriva en la pérdida de canales de sodio y moléculas de adhesión asociadas (Schafer et al., 2009).

6. PLASTICIDAD DEL SEGMENTO INICIAL DEL AXON

Aunque el SIA es una estructura compleja que se encuentra estabilizada a través de numerosas interacciones moleculares que permiten el anclaje y la localización precisa de los canales iónicos necesarios para la generación de potenciales de acción, algunos autores han demostrado recientemente que el SIA no es una estructura estática, si no puede sufrir procesos de plasticidad morfológica y funcional en respuesta a cambios en la actividad neuronal. Esta plasticidad se ve reflejada en diferentes cambios de localización y extensión del SIA promovidos por variaciones en la actividad eléctrica (Grubb and Burrone, 2010; Grubb et al., 2011; Kuba et al., 2010). La despolarización crónica de neuronas hipocámpales en cultivo generada por una alta concentración de iones potasio en el medio extracelular, o mediante la expresión de una construcción de canalorodopsina unida a ankirina G en el SIA y su posterior fotoestimulación, produce el movimiento una media de 17 μ m desde el soma hacia zonas distales del axón de múltiples componentes del SIA (incluyendo ankirina G, espectrina y canales de potasio) (Grubb and Burrone, 2010; Grubb et al., 2011) (**Figura I-21**). Estos cambios en la posición se correlacionan con una disminución de la excitabilidad neuronal y alteraciones en la capacidad de generar potenciales de acción. Este movimiento distal del SIA, es reversible, recuperando su posición cuando la neurona vuelve a condiciones no despolarizantes y es dependiente de la entrada de Ca⁺² a través de la activación de canales de calcio tipo L y /o T dependientes de voltaje (Grubb and Burrone, 2010; Grubb et al., 2011). Asimismo, la privación

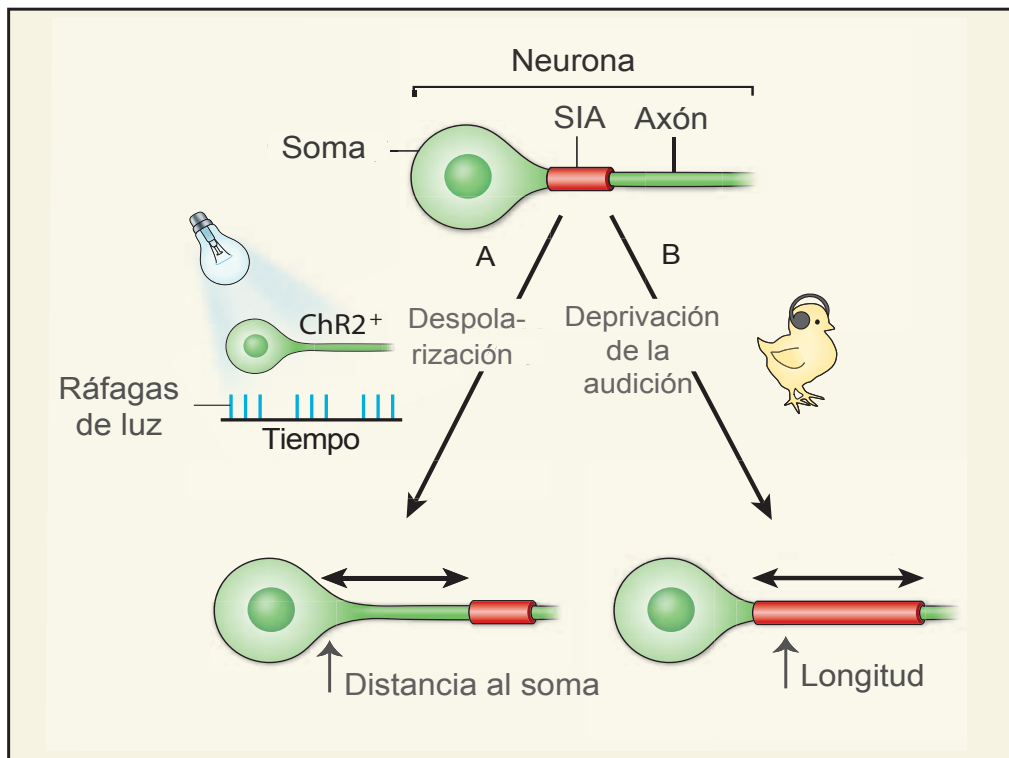


Figura I-21. Esquema que representa la plasticidad en el segmento inicial según Grubb and Burrone (2010) (A) y Kuba et al 2010 (B) . Adaptado de Grundemann and Hausser, 2010

de impulsos aferentes en circuitos neuronales produce cambios plásticos en elementos pre y postsinápticos para tratar de restaurar la actividad neuronal. Este es también el caso del SIA. Se ha demostrado que la deprivación de estimulación sensorial auditiva de neuronas del núcleo del cuerpo trapezoide del tronco del encéfalo de aves produce un incremento en la longitud del SIA, definida por la distribución de canales de sodio y ankirina G, lo cual aumenta la excitabilidad de la neurona (Grubb and Burrone, 2010; Grubb et al., 2011; Kuba et al., 2010) (**Figura I-21**). Este cambio viene acompañado por un aumento en la corriente total de sodio, cambios en la excitabilidad de membrana y disparos espontáneos de potenciales de acción, sugiriendo una compensación para restaurar la actividad del circuito. Es por tanto evidente que el SIA es una estructura dinámica, y los cambios en su distribución son capaces de regular la actividad neuronal, aunque no se conoce el mecanismo ni el significado que dicha plasticidad podría tener. Debido a que algunos de estos cambios plásticos dependientes de actividad están mediados por la entrada de Ca^{+2} en el AIS, en este trabajo nos proponemos estudiar la posible implicación del orgánulo de cisternas en la plasticidad del AIS.

7. PATOLOGÍAS RELACIONADAS CON ALTERACIONES EN EL SEGMENTO INICIAL DEL AXÓN

La importancia del SIA y de los nodos de Ranvier como estructuras responsables de la generación y propagación de estímulos nerviosos, se ve reflejada en el hecho de que sus alteraciones producen cambios severos en las funciones del sistema nervioso, relacionadas con la aparición de diversas patologías neurológicas. Se denominan canalopatías a las modificaciones en las proteínas que conforman las subunidades de diferentes canales iónicos y las alteraciones que presentan en el tráfico, la localización, y la expresión. Estas alteraciones se asocian a la aparición de distintas formas de ataxia y epilepsia (Wimmer et al., 2010). En el caso de los canales de sodio dependientes de voltaje (Nav), las mutaciones tanto en la subunidades α como en β producen hiperexcitabilidad y

convulsiones. Las mutaciones en el gen *Scn1a*, que codifica para la subunidad α Nav1.1 del canal de sodio se relacionan con una forma de epilepsia infantil conocida como síndrome de Dravet o epilepsia mioclónica grave. Esta subunidad se localiza concentrada en el SIA de interneuronas GABAérgicas (Yu et al., 2006). Además, se han identificado otras mutaciones relacionadas con este síndrome en el gen *Scn2a*, que codifica para la subunidad Nav1.2. Una de estas mutaciones se produce en el dominio sensible a voltaje del canal Nav1.2 (Shi et al., 2009).

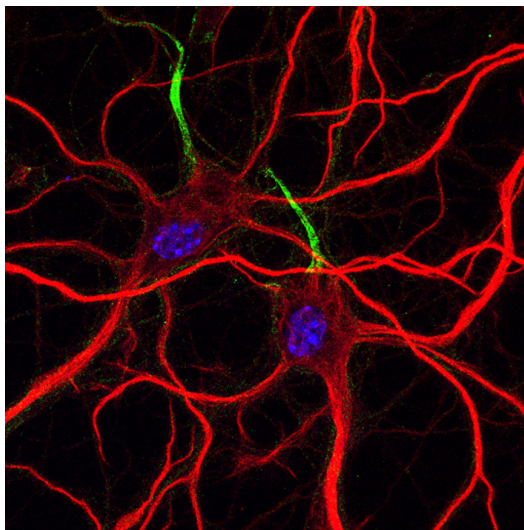
Los cambios en la expresión de los canales Nav1.6 están relacionados con la hiper-excitabilidad y la aparición de actividad epileptogénica (Martin et al., 2007). Estos cambios de expresión en canales de sodio también se han detectado en un modelo murino del síndrome de Angelman, un trastorno neuro-psiquiátrico que se genera por la delección de partes de la copia del cromosoma 15 que elimina, entre otros, al gen *UBE3A* que codifica para la proteína E3A de la ubiquitina ligasa, necesaria para la ubiquitinación de proteínas y su posterior degradación en proteasoma. En estos ratones mutantes para *UBE3A* aumenta la expresión de la subunidad $\alpha 1$ de la ATPasa Na/K, así como de Nav1.6 y ankirina G en el SIA (Kaphzan et al., 2011) produciendo alteraciones en el potencial de membrana, el umbral y la generación de potenciales de acción. Por otro lado, la mutación autosómica dominante de la proteína *FGF14*, la cual interacciona directamente con la subunidad α de canales de sodio, está implicada en el desarrollo de ataxias espinocerebelosas o deficiencias cognitivas en humanos (Dalski et al., 2005; van Swieten et al., 2003).

En el caso de los canales de potasio, las alteraciones en la actividad producen variaciones en la forma de los potenciales de acción y las propiedades de la membrana como en el caso de las mutaciones en los canales *Kv7.2* y *Kv7.3* que han sido identificadas como factores de riesgo para la epilepsia neonatal benigna (Buffington and Rasband, 2011; Singh et al., 1998).

Además de las canalopatías, diversos estudios han relacionado alteraciones en la inhibición GABAérgica del SIA con distintas alteraciones neurológicas y psiquiátricas. Por ejemplo, diversos estudios han propuesto que en pacientes con epilepsia del lóbulo temporal, alteraciones en el número, la distribución o las características neuroquímicas de los terminales axonales de las neuronas en candelabro de la neocorteza temporal y el hipocampo podrían estar relacionadas con la aparición de actividad epileptiforme (Arellano et al., 2004; Defelipe et al., 1999; Wittner et al., 2001). Asimismo, en la corteza prefrontal de pacientes con esquizofrenia se han descrito alteraciones que conducen a la disminución de la liberación de GABA por los terminales en candelabro y una sobreexpresión de receptores GABA_A en el SIA de las neuronas piramidales (Lewis, 2011). Además, la esquizofrenia y el trastorno bipolar comparten como factor de riesgo genético el gen *ANK3* que codifica para ankirina G (Ferreira et al., 2008; Schulze et al., 2009), estando disminuida su expresión en el análisis *post-mortem* de pacientes diagnosticados de esquizofrenia (Cruz et al., 2009). En el autismo, un trastorno cognitivo asociado a alteraciones en el desarrollo cortical, han sido implicados multitud de genes como factores de riesgo, la mayoría relacionados con proteínas sinápticas y proteínas relacionadas con la plasticidad sináptica (Boda et al., 2010; Bourgeron, 2009). Sin embargo, se han identificado alteraciones en el gen *CNTNAP2* que codifica para la proteína *Caspr2* (Alarcon et al., 2008; Arking et al., 2008; Bakkaloglu et al., 2008) como otro factor de riesgo en el autismo. Este gen también es un factor de riesgo en la esquizofrenia y las mutaciones también se relacionan con epilepsia (Burbach and van der Zwaag, 2009; Friedman et al., 2008; Strauss et al., 2006). La proteína *Caspr2* está concentrada en el SIA distal y en la zona yuxtaparanodal, y es necesaria para la localización selectiva de los canales de potasio, así como la regulación de las interacciones axo-gliales (Poliak et al., 2001; Poliak et al., 2003).

Además de estas patologías, el reconocimiento inmunológico de proteínas del SIA y de los nodos de Ranvier es un mecanismo potencialmente patogénico. Recientemente se ha descubierto en suero de en pacientes con esclerosis múltiple la presencia de altas concentraciones de auto-anticuerpos contra neurofascina 186 (Mathey et al., 2007). En ciertas canalopatías autoinmunes como el síndrome de Morvan, la presencia de anticuerpos contra canales de potasio pueden afectar a la excitabilidad neuronal (Misawa and Mizusawa, 2010).

A pesar de la importancia para la fisiología neuronal del SIA todavía se desconocen aspectos importantes sobre los mecanismos que gobiernan la adquisición de su elaborada arquitectura molecular durante la diferenciación neuronal y como se modifican en los procesos de plasticidad estructural.

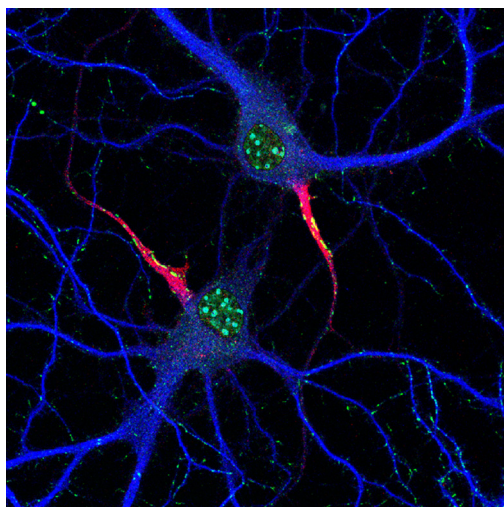


Objetivos

El segmento inicial del axón (SIA) es un subdominio axonal de gran importancia para la funcionalidad neuronal y el control de la excitabilidad neuronal. El objetivo principal de la presente tesis doctoral ha consistido en el estudio de los mecanismos moleculares implicados en la formación del SIA y los cambios en su composición molecular a lo largo del desarrollo.

Para ello se plantearon los siguientes objetivos concretos:

1. A partir de la descripción previa de la presencia de la quinasa IKK y proteínas de la ruta de NFκB en el SIA, nos planteamos estudiar su implicación en el establecimiento de la polaridad neuronal y la formación del SIA.
2. Estudiar el papel de la quinasa CK2 en la formación y mantenimiento del SIA, y en particular, en la estabilidad del citoesqueleto de microtúbulos.
3. Debido a su implicación en el control de los potenciales de acción, nos planteamos describir los patrones de expresión de canales de sodio y de potasio (subunidades Kv1.2, Kv2.2 y Kv7.2) dependientes de voltaje en los distintos subdominios del SIA a lo largo del desarrollo *in vitro* del SIA. Asimismo, estudiamos su resistencia a tratamientos con detergentes, a la interferencia de la expresión de ankirina G y a la desorganización del citoesqueleto de actina.
4. Estudiar el desarrollo *in vitro* del orgánulo de cisternas del SIA en neuronas hipocampales, los mecanismos que intervienen en su localización, y la expresión de diversas moléculas implicadas en la regulación de los niveles de calcio en el SIA.
5. Analizar la expresión de α-actinina y sinaptopodina en el SIA de neuronas piramidales de la neocorteza y el hipocampo y su relación con el orgánulo de cisternas.
6. Estudiar la implicación del orgánulo de cisternas en los procesos de plasticidad del SIA tras la despolarización crónica *in vitro* de neuronas hipocampales.



*Resultados:
Artículos de investigación*

*New role of IKK α / β phosphorylated I κ B α in axon
outgrowth and axon initial segment development*

Molecular and Cellular Neuroscience
Vol .37(2008) 832-844

New role of IKK α / β phosphorylated I κ B α in axon outgrowth and axon initial segment development

Diana Sanchez-Ponce,^{a,b} Mónica Tapia,^a Alberto Muñoz,^{b,*} and Juan José Garrido^{a,*}

^aDepartment of Cellular, Molecular and Developmental Neurobiology, Instituto Cajal, CSIC, Av. Doctor Arce 37, Madrid 28002, Spain

^bDepartment of Cell Biology, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

Received 15 October 2007; revised 12 December 2007; accepted 7 January 2008

Available online 26 January 2008

Neuronal polarity development begins by the outgrowth of the axon and the formation of the axon initial segment which acts as a diffusion barrier and it is the place of action potential generation. The mechanisms controlling this development are largely unknown. We describe a role for I κ B α , the NF κ B inhibitor, in the initial stages of axon outgrowth and the development of the axon initial segment. In cultured hippocampal neurons, inhibition of I κ B α phosphorylation by I κ B kinases (IKKs) impedes axon outgrowth. Moreover, the absence of I κ B α phosphorylation, in the next stages of axon development, impairs the localization of structural and functional proteins at the axon initial segment, such as ankyrin G and voltage gated sodium channels. These results demonstrate a new role for proteins of the NF κ B pathway in the acquisition of neuronal polarity and its involvement in the development of the axon initial segment.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: I κ B α ; I κ B kinases; Axon outgrowth; Axon initial segment; Cultured hippocampal neurons; Voltage gated sodium channels; Ankyrin G

Introduction

The correct functioning of neurons relies on having first established morphological and functional neuronal polarity. Cultured dissociated hippocampal neurons represent a widely used model to study the development of neuronal polarity and its underlying mechanisms (Banker and Goslin, 1988). The development of neuronal polarity depends on the differentiation of functional domains,

Abbreviations: AIS, axon initial segment; APC, adenomatous polyposis coli; GSK3, glycogen synthase kinase-3; IGFR-I, Insulin like growth factor receptor-I; I κ B α , inhibitor of NF κ B; IKK, inhibitor of NF κ B kinase; JNK, Jun N-terminal kinase; MAP1B, microtubule associated protein 1B; MTOC, microtubule organizing centre; NF κ B, nuclear factor κ B; PI3-kinase, phosphatidylinositol 3-kinase.

* Corresponding authors. J.J. Garrido is to be contacted at fax: +34 915854754.

E-mail addresses: amunozc@bio.ucm.es (A. Muñoz),
jjgarrido@cajal.csic.es (J.J. Garrido).

Available online on ScienceDirect (www.sciencedirect.com).

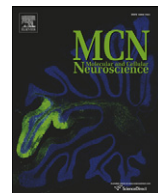
1044-7431/\$ - see front matter © 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.mcn.2008.01.010

axon and dendrites. These domains are characterized by a different protein composition in specialized membrane domains, which perform the specific functions of each domain, contributing to the vectorial propagation of information. This differentiation starts by the formation of the axon and the development of the axon initial segment (AIS). The signals and transduction pathways implicated in axon specification and outgrowth remain largely unknown. Axon formation is controlled by PI3-kinase activity, which pharmacological inhibition impairs axon formation in cultured hippocampal neurons (Shi et al., 2003). PI3-kinase activity control the function of other signalling proteins, such as Akt, GSK3, Rap1b, JNK, ζ PKC, CRMP-2, small GTPases and the vertebrate orthologs of *C. elegans* Par1, Par3, Par4 (LKB1) and Par6, that have been also implicated in neuronal polarization (Garrido et al., 2007; Kim et al., 2006; Oliva et al., 2006; Schwamborn and Puschel, 2004; Shelly et al., 2007; Shi et al., 2004, 2003). The signalling cascades associated with these proteins regulate microtubule and microfilament dynamics, which facilitates axon growth (Dotti and Poo, 2003).

In addition, axon growth requires the synthesis and transport of membrane components, and the localization of proteins to specific functional domains, such as the axon initial segment. This domain is characterized by a high density of membrane proteins (voltage gated sodium channels, potassium channels and cell adhesion molecules) and cytoskeleton proteins (such as ankyrin G or β IV-spectrin). This association of proteins allows the generation of action potentials and controls the traffic of proteins towards the axon acting as a diffusion barrier (Nakada et al., 2003; Nakata and Hirokawa, 2003; Stuart et al., 1997; Winckler et al., 1999; Zhang and Bennett, 1998). Despite the functional significance of this domain, the signal transduction pathways implicated in its establishment remain unclear. It has been shown that ankyrin G is responsible for the localization of other structural and functional proteins in the AIS, such as sodium channels, potassium channels and cell adhesion proteins of the L1 family (Boiko et al., 2007; Garrido et al., 2003; Jenkins and Bennett, 2001; Pan et al., 2006). Indeed, the amino acid motifs in ankyrin G that determine its localization to the AIS have been characterized (Zhang and Bennett, 1998), although it is not clear which signalling mecha-

*Casein kinase 2 and microtubules
control axon initial segment formation*

Molecular and Cellular Neuroscience
Vol 46 (2011) 222-234



Casein kinase 2 and microtubules control axon initial segment formation

Diana Sanchez-Ponce^{a,b,c}, Alberto Muñoz^{c,e}, Juan José Garrido^{a,b,d,*}

^a Department of Cellular, Molecular and Developmental Neurobiology, Instituto Cajal, CSIC, 28002 Madrid, Spain

^b Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", CSIC-UAM, Nicolás Cabrera 1, 28049 Madrid, Spain

^c Department of Cell Biology, Complutense University, 28040 Madrid, Spain

^d CIBERNED, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas, Spain

^e Laboratorio de Circuitos Corticales (CTB), Universidad Politécnica de Madrid, Pozuelo de Alarcón, 28223 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 June 2010

Revised 16 August 2010

Accepted 8 September 2010

Available online 17 September 2010

Keywords:

Casein kinase 2

Axon initial segment

Microtubules

AnkyrinG

IκBα

Axon

Voltage gated sodium channels

ABSTRACT

The axon initial segment (AIS) is a unique axonal subdomain responsible for the generation of the neuronal action potential and the maintenance of the axon-dendritic functional polarity. Despite its importance, the mechanisms controlling AIS development and maintenance remain largely unknown. Here we show that the AIS microtubule cytoskeleton is composed of a pool of more stable, detergent resistant, microtubules. This AIS specific characteristic is conferred by the presence of CK2, an important regulator of microtubule stability, in the AIS during its development and maturation. We show that CK2 α and CK2 α' subunits concentrate at the AIS from its initial development, at the same time as pIκB α and ankyrinG. CK2 pharmacological inhibition or suppression of CK2 α expression with nucleofected interference RNAs modifies microtubule characteristics throughout the neuron, changes KIF5C distribution, and impairs its own concentration at the AIS, as well as that of ankyrinG, ankyrinG-GFP, pIκB α and voltage gated sodium channels. Moreover, CK2 α concentration at the AIS depends on IκB α phosphorylation by IKK and ankyrinG. In conclusion, our results demonstrate a mutual dependence of CK2, ankyrinG and pIκB α for their concentration at the axon initial segment, which is related to the specific characteristics of microtubules at the AIS.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

The development of morphological and functional polarity in neurons is necessary to allow the vectorial transmission of information from dendrites to axon. The morphological and functional development of neurons starts by establishing an axon and the development of the axon initial segment (AIS). The AIS constitutes a barrier to membrane diffusion and cytoplasmic trafficking toward the axon (Song et al., 2009; Winckler et al., 1999). The AIS is also the place where the neuronal action potential is generated and it is characterized by a high density of membrane proteins, including ionic channels (voltage gated sodium channels and potassium channels) and cell adhesion proteins such as neurofascin (Ogawa and Rasband, 2008). This high density of proteins is achieved through their interaction with intracellular proteins, such as ankyrinG and β IV-spectrin, through specific amino acid motifs (Boiko et al., 2007; Garrido et al., 2003; Hedstrom et al., 2008; Jenkins and Bennett, 2001; Pan et al., 2006; Sobotzik et al., 2009).

Despite the functional significance of this domain, the mechanisms responsible for its initial development are not well understood. Several studies have shown that the localization of other structural and functional proteins in the AIS depends on ankyrinG, which is also necessary to maintain the characteristics of the axon (Hedstrom et al., 2008). The amino acid motifs that determine ankyrinG localization to the AIS have been characterized (Zhang and Bennett, 1998), although it remains unclear which signaling molecules and mechanisms regulate the transport and tethering of ankyrinG to the AIS. One possible mechanism involves pIκB α and IKKs, in which inhibition impairs the concentration of ankyrinG and sodium channels in the AIS, excluding both proteins from the axon (Sanchez-Ponce et al., 2008). The mechanism by which this phosphorylation affects the concentration of ankyrinG at the AIS is not known, although pIκB α associates with microtubules at the AIS (Schultz et al., 2006), and may be an important regulator of cytoskeleton properties at the AIS. Conversely, the microtubule cytoskeleton structure of the AIS is disrupted in ankyrinG knock-out mice neurons and in cultured hippocampal neurons that express ankyrinG interference RNAs (Hedstrom et al., 2008; Sobotzik et al., 2009). Thus, regulatory mechanisms and proteins that modify microtubule properties at the AIS are good candidates to regulate AIS development and polarized axonal trafficking. In fact, differences in microtubule properties between dendrites and proximal axon do drive kinesin-1 motors

* Corresponding author. Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", CSIC-UAM, Universidad Autónoma de Madrid, Nicolás Cabrera 1, Madrid 28049, Spain. Fax: + 34 91 1964420.

E-mail addresses: jgarrido@cbm.uam.es, jgarrido@cajal.csic.es (J.J. Garrido).

Developmental expression of Kv potassium channels at the axon initial segment of cultured hippocampal neurons

Plos One

Developmental Expression of Kv Potassium Channels at the Axon Initial Segment of Cultured Hippocampal Neurons

Diana Sánchez-Ponce^{1,2,3,4}, Javier DeFelipe^{1,3,5}, Juan José Garrido^{2,5*}, Alberto Muñoz^{1,3,4*}

1 Department of Functional and Systems Neurobiology, Instituto Cajal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain, **2** Department of Molecular, Cellular and Developmental Neurobiology, Instituto Cajal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain, **3** Laboratorio Cajal de Circuitos Corticales, Centro de Tecnología Biomédica, Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, Spain, **4** Department of Cell Biology, Complutense University, Madrid, Spain, **5** Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain

Abstract

Axonal outgrowth and the formation of the axon initial segment (AIS) are early events in the acquisition of neuronal polarity. The AIS is characterized by a high concentration of voltage-dependent sodium and potassium channels. However, the specific ion channel subunits present and their precise localization in this axonal subdomain vary both during development and among the types of neurons, probably determining their firing characteristics in response to stimulation. Here, we characterize the developmental expression of different subfamilies of voltage-gated potassium channels in the AISs of cultured mouse hippocampal neurons, including subunits Kv1.2, Kv2.2 and Kv7.2. In contrast to the early appearance of voltage-gated sodium channels and the Kv7.2 subunit at the AIS, Kv1.2 and Kv2.2 subunits were tethered at the AIS only after 10 days *in vitro*. Interestingly, we observed different patterns of Kv1.2 and Kv2.2 subunit expression, with each confined to distinct neuronal populations. The accumulation of Kv1.2 and Kv2.2 subunits at the AIS was dependent on ankyrin G tethering, it was not affected by disruption of the actin cytoskeleton and it was resistant to detergent extraction, as described previously for other AIS proteins. This distribution of potassium channels in the AIS further emphasizes the heterogeneity of this structure in different neuronal populations, as proposed previously, and suggests corresponding differences in action potential regulation.

Citation: Sánchez-Ponce D, DeFelipe J, Garrido JJ, Muñoz A (2012) Developmental Expression of Kv Potassium Channels at the Axon Initial Segment of Cultured Hippocampal Neurons. PLoS ONE 7(10): e48557. doi:10.1371/journal.pone.0048557

Editor: Stuart E. Dryer, University of Houston, United States of America

Received: July 3, 2012; **Accepted:** September 27, 2012; **Published:** October 31, 2012

Copyright: © 2012 Sánchez-Ponce et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from the Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF 2010-18218 to A.M., SAF 2009-12249-C02-02 to J.J.G. and SAF 2009-09394 to J.D.), the Cajal Blue Brain Project and the Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED). D.S. is supported by an FPU fellowship from the Ministerio de Educación (Spain). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: amunozc@bio.ucm.es (AM); jgarrido@cajal.csic.es (JJG)

Introduction

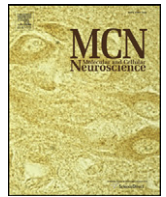
The non-uniform distribution of specific voltage-gated K⁺ (Kv) channels and their restriction to discrete neuronal domains is thought to contribute to the control of neuronal excitability. Indeed, these channels are believed to influence different properties of neurons, including resting membrane potential, waveform shape, action potential (AP) firing pattern, transmitter release and synaptic strength. The importance of Kv channels in neuronal function is reflected by the neurological alterations induced by mutations or diseases that disrupt K⁺ channel expression, including episodic ataxia and epilepsies [1,2,3,4,5,6]. In the plasma membrane, Kv channels are actually complexes made up of four voltage-sensing and pore-forming subunits, each generated from a family of over 35 subunits divided into 12 subfamilies (Kv1–12) [7,8]. These complexes may assemble with auxiliary β subunits that may influence the expression, localization and biophysical properties of Kv channels [9,10,11]. The axon initial segment (AIS) is a neuronal domain that is densely populated by voltage-gated ion channels, and it is a structure that is critical for input integration and action

potential generation [12,13,14,15]. In addition to voltage-gated Na⁺ (VGSC) [16,17,18,19,20] and Ca²⁺ (Ca_v) channels [12,21,22], the AIS of neocortical and hippocampal principal cells is characterized by the expression of Kv1, Kv2 and Kv7 channels [17,18,19,20,23,24,25,26]. The distinct subunit composition of these channels confers distinct biophysical properties to the ion currents mediated by each of them. Together with heterogeneous expression and localization of such channels in the AIS, they are likely to contribute to the electrophysiological variability between neuronal populations, and the corresponding differences in AP initiation and/or propagation [17,18,19,20,27,28,29,30,31].

Kv1 channels are characterized by low thresholds, as well as rapid activation and slow inactivation kinetics, and they are known to modulate the threshold, initiation, shape and propagation rate of APs, as well as neurotransmitter release and synaptic efficacy [25,32,33,34,35,36]. Kv2 or delayed rectifier Kv channels regulate somatodendritic excitability and Ca²⁺ influx in hippocampal and cortical neurons during periods of repetitive high frequency firing [37,38,39,40,41,42,43]. These channels are also localized at the AISs of different neuronal populations, where they contribute to

*In vitro maturation of the cisternal organelle in
the hippocampal neuron's axon initial segment*

Molecular and Cellular Neuroscience
Vol 48 (2011)



In vitro maturation of the cisternal organelle in the hippocampal neuron's axon initial segment

Diana Sánchez-Ponce^{a,b,c}, Javier DeFelipe^{a,b}, Juan José Garrido^{a,d}, Alberto Muñoz^{a,b,c,*}

^a Instituto Cajal, CSIC, 28002 Madrid, Spain

^b Laboratorio Cajal de Circuitos Corticales (CTB), Universidad Politécnica de Madrid, Pozuelo de Alarcón, 28223 Madrid, Spain

^c Department of Cell Biology, Complutense University, 28040 Madrid, Spain

^d CIBERNED, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 January 2011

Revised 7 June 2011

Accepted 9 June 2011

Available online 25 June 2011

Keywords:

Calcium

Synaptopodin

Annexin 6

IP₃R

Cultured hippocampal neurons

Ankyrin G

ABSTRACT

Regulation of Ca²⁺ concentrations is essential to maintain the structure and function of the axon initial segment (AIS). The so-called cisternal organelle of the AIS is a structure involved in this regulation, although little is known as to how this organelle matures and is stabilized. Here we describe how the cisternal organelle develops in cultured hippocampal neurons and the interactions that facilitate its stabilization in the AIS. We also characterize the developmental expression of molecules involved in Ca²⁺ regulation in the AIS. Our results indicate that synaptopodin (synpo) positive elements considered to be associated to the cisternal organelle are present in the AIS after six days in vitro. There are largely overlapping microdomains containing the inositol 1,4,5-triphosphate receptor 1 (IP₃R1) and the Ca²⁺ binding protein annexin 6, suggesting that the regulation of Ca²⁺ concentrations in the AIS is sensitive to IP₃ and subject to regulation by annexin 6. The expression of synpo, IP₃R1 and annexin 6 in the AIS is independent of the neuron activity, as it was unaffected by tetrodotoxin blockage of action potentials and it was resistant to detergent extraction, indicating that these proteins interact with scaffolding and/or cytoskeleton proteins. The presence of ankyrin G seems to be required for the acquisition and maintenance of the cisternal organelle, while the integrity of the actin cytoskeleton must be maintained for the expression IP₃R1 and annexin 6 to persist in the AIS.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

The axon initial segment (AIS) is a short region of the axon that is critical to integrate inputs and to generate action potentials (Stuart et al., 1997; Kole et al., 2008; Yu et al., 2008). However, the detailed structural organization and functioning of the AIS is still not fully understood. The localized expression of certain proteins in the AIS facilitates the initiation of action potentials and controls axonal diffusion and transport mechanisms. These proteins include kinases, motor proteins and heteromultimeric protein complexes, including different types of voltage-gated ion channels, cell adhesion molecules, and scaffolding and adaptor proteins that crosslink the plasma membrane to the peripheral cytoskeleton (Stuart et al., 1997; Zhang and Bennett, 1998; Winckler et al., 1999; Garrido et al., 2003; Nakata and Hirokawa, 2003; Nakada et al., 2003; Inda et al., 2006; Schultz et al., 2006; Bréchet et al., 2008; Hedstrom et al., 2008; Ogawa and Rasband, 2008; Clark et al., 2009; Hund et al., 2010; Tapia et al., 2010; Sánchez-Ponce et al., 2011).

During the generation of action potentials, in addition to Na⁺ and K⁺ currents, activity-dependent transient elevations of AIS Ca²⁺ levels, consequence of transmembrane Ca²⁺ entry, have been described in different types of neurons. These Ca²⁺ transients modulate the generation and timing of action potentials in the AIS (Yu et al., 2008, 2010; Bender and Trussell, 2009) but must be tightly controlled, both temporally and spatially, in order to avoid possible deleterious effects. In fact, increased Ca²⁺ at the AIS as a result of neuronal injury induces Ca²⁺-dependent calpain-mediated proteolysis of the ankyrin G and βIV-spectrin, resulting in the failure to retain ion channels and cell adhesion molecules in the AIS (Schafer et al., 2009). Among other possible systems regulating Ca²⁺ concentrations, the AIS of cortical principal cells contains the cisternal organelle. This organelle consists of stacks of flat and aligned membranous cisternae that are derived from the smooth endoplasmic reticulum (SER) and the outermost of which is connected to the plasma membrane (Palay et al., 1968; Peters et al., 1968; Sloper and Powell, 1979; Kosaka, 1980; Somogyi et al., 1983; Benedeczy et al., 1994; Jedlicka et al., 2008). The cisternal apparatus of the AIS resembles the plasmareticulosomes, that contain many receptors, channels and proteins necessary for Ca²⁺ signaling and homeostasis. Accordingly, they define a restricted cytosolic space in which Ca²⁺ may accumulate without getting off into the bulk cytosol and where complex and specific Ca²⁺ signals can

* Corresponding author at: Laboratorio Cajal de Circuitos Corticales, Centro de Tecnología Biomédica, Universidad Politécnica Madrid, Pozuelo de Alarcón, Madrid 28223, Spain.

E-mail address: amunozc@bio.ucm.es (A. Muñoz).

*Colocalization of α -actinin and Synaptopodin in
the Pyramidal Cell Axon Initial Segment*

Cerebral Cortex
2012 Jul;22(7):1648-61.

Colocalization of α -actinin and Synaptopodin in the Pyramidal Cell Axon Initial SegmentDiana Sánchez-Ponce^{1,2,3}, Lidia Blázquez-Llorca^{1,2}, Javier DeFelipe^{1,2,4}, Juan José Garrido^{1,4} and Alberto Muñoz^{1,2,3}¹Department of Functional and Systems Neurobiology, Instituto Cajal, CSIC, 28002 Madrid, Spain, ²Laboratorio Cajal de Circuitos Corticales, Centro de Tecnología Biomédica, Universidad Politécnica de Madrid, Pozuelo de Alarcón, 28223 Madrid, Spain,³Department of Cell Biology, Complutense University, 28040 Madrid, Spain and ⁴CIBERNED, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas, Spain

Address correspondence to Alberto Muñoz, Laboratorio Cajal de Circuitos Corticales Centro de Tecnología Biomédica, Universidad Politécnica Madrid, Pozuelo de Alarcón, Madrid 28223, Spain. Email: amunozc@bio.ucm.es.

The cisternal organelle that resides in the axon initial segment (AIS) of neocortical and hippocampal pyramidal cells is thought to be involved in regulating the Ca^{2+} available to maintain AIS scaffolding proteins, thereby preserving normal AIS structure and function. Through immunocytochemistry and correlative light and electron microscopy, we show here that the actin-binding protein α -actinin is present in the typical cisternal organelle of rodent pyramidal neurons as well as in a large structure in the AIS of a subpopulation of layer V pyramidal cells that we have called the "giant saccular organelle." Indeed, this localization of α -actinin in the AIS is dependent on the integrity of the actin cytoskeleton. Moreover, in the cisternal organelle of cultured hippocampal neurons, α -actinin colocalizes extensively with synaptopodin, a protein that interacts with both actin and α -actinin, and they appear concomitantly during the development of these neurons. Together, these results indicate that α -actinin and the actin cytoskeleton are important components of the cisternal organelle that are probably required to stabilize the AIS.

Keywords: actin cytoskeleton, axon initial segment, calcium, cisternal organelle, synaptopodin

Introduction

The axon initial segment (AIS) is considered to be the site where action potentials are generated, particularly due to the local concentration of voltage-gated ion channels in this region (Stuart et al. 1997; Garrido et al. 2003; Inda et al. 2006; Kole et al. 2008; Yu et al. 2008; Rasband 2010). The integrity of the actin and microtubule cytoskeleton in the AIS is necessary to preserve its normal structure and function (Winckler et al. 1999; Tapia et al. 2010), and this is at least partially reflected by the ability to regulate local Ca^{2+} levels. Indeed, Ca^{2+} -mediated proteolysis of the AIS cytoskeleton produces a dispersion of Na^+ channels (Schafer et al. 2009), and Ca^{2+} -mediated activity-dependent plasticity leads to the topographic redistribution of Na^+ channels within the AIS (Kuba et al. 2010; Grubb and Burrone 2010a). The cisternal organelle consists of stacks of membranous cisternae derived from the smooth endoplasmic reticulum, the outermost of which are attached to the axonal plasma membrane (Palay et al. 1968; Peters et al. 1968; Jones and Powell 1969; Sloper and Powell 1979; Kosaka 1980; Somogyi et al. 1983; Benedeczký et al. 1994; Jedlicka et al. 2008). In neocortical and hippocampal cells, the cisternal organelle is thought to provide the AIS with the ability to regulate changes in cytosolic Ca^{2+} concentrations (Bas Orth et al. 2007; Sánchez-Ponce et al. 2011b), likely including the transient elevations of AIS Ca^{2+} concomitant with action

potential generation (Yu et al. 2008, 2010; Bender and Trussell 2009). The expression of the SERCA-type Ca^{2+} pump (Benedeczký et al. 1994), the inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3) receptor Ca^{2+} channel (IP_3R), and the calcium-binding protein annexin 6 (Yamatani et al. 2010; Sánchez-Ponce et al., 2011b) in this structure provides further evidence that the cisternal organelle is involved in regulating Ca^{2+} .

Ankyrin G and the actin cytoskeleton are important elements that maintain the integrity of the cisternal organelle in cultured hippocampal cells, as actin-depolymerizing agents affect its stability in the AIS. In addition, the protein synaptopodin is required to recruit the cisternal organelle to the AIS of neocortical and hippocampal cells (Bas Orth et al. 2007). Synaptopodin is an actin interacting regulatory protein with multiple binding sites for the ubiquitously expressed protein α -actinin (Mundel et al. 1997; Asanuma et al. 2005; Kremerskothen et al. 2005; Faul et al. 2007; Okubo-Suzuki et al. 2008). α -actinin belongs to a family of actin-binding proteins that cross-link and bundle actin filaments (Otey and Carpen 2004), which includes spectrins, dystrophin, and utrophin (Blanchard et al. 1989; Pascual et al. 1997; Asanuma et al. 2005). Accordingly, α -actinin is involved in the organization of the submembranous cortical cytoskeleton where it induces the formation of isotropic networks of short-branched bundles of actin filaments (Wachsstock et al. 1993; Pelletier et al. 2003). However, synaptopodin may regulate the actin-bundling activity of α -actinin by altering its affinity for actin, inducing the formation of long-unbranched parallel bundles of filaments (Asanuma et al. 2005).

Synaptopodin and α -actinin generally colocalize in the hippocampus (Asanuma et al. 2005), and both α -actinin (Capani et al. 2001) and synaptopodin are found in dendritic spines including the spine apparatus. In these structures, synaptopodin is required for the formation and dynamic reorganization of the actin cytoskeleton, and it serves a role in shaping spines and/or linking the actin cytoskeleton with synaptic membrane proteins (Vlachos et al. 2009). In the AIS, synaptopodin has been found in the cisternal organelle (Bas Orth et al. 2007; Sánchez-Ponce et al. 2011b), and while it remains unclear whether α -actinin is associated to the cisternal organelle in the AIS, it is present in the axon hillock at the base of pyramidal cells (Wyszynski et al. 1997; Di Biase et al. 2008). Here, we used immunocytochemistry and confocal and electron microscopy to define the distribution α -actinin in the AIS of different populations of mouse and rat neocortical and hippocampal pyramidal neurons. In addition, we analyzed the appearance of α -actinin immunoreactivity during the development of the AIS, and its colocalization with synaptopodin and actin filaments in cultured hippocampal cells. Finally, we studied the

*Activity-dependent changes of the axon initial segment
are related to cisternal organelle disappearance*

The Journal of Neuroscience
En revisión

Activity-dependent changes of the axon initial segment are related to cisternal organelle disappearance

Diana Sánchez-Ponce^{1,2,3}, Javier DeFelipe^{1,2,4}, Juan José Garrido^{1,4*}, and Alberto Muñoz^{1,2,3,4,*}

¹ Instituto Cajal, CSIC, 28002 Madrid, Spain.

² Laboratorio Cajal de Circuitos Corticales (CTB), Universidad Politécnica de Madrid, Pozuelo de Alarcón, 28223 Madrid, Spain.

³ Department of Cell Biology, Complutense University, 28040 Madrid, Spain.

⁴ CIBERNED, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas, Spain.

*Corresponding author: Alberto Muñoz, Ph.D., Laboratorio Cajal de Circuitos Corticales, Centro de Tecnología Biomédica, Universidad Politécnica Madrid, Pozuelo de Alarcón, Madrid 28223, SPAIN. Tel: +34 91 3364656 (ext 29008); amunozc@bio.ucm.es or Juan José Garrido, Ph.D., Instituto Cajal, CSIC, Av. Dr. Arce, 37, Madrid 28002, SPAIN. jjgarrido@cajal.csic.es

ABSTRACT

Chronic depolarization of hippocampal neurons induces an axon initial segment (AIS) morpho-functional reorganization driven by voltage-dependent Ca²⁺ entry. Here, by Western blotting and immunocytochemistry in mouse cultured hippocampal neurons, we show that this plastic change is related to the downregulation of synaptopodin expression and disappearance of α -actinin and synaptopodin immunoreactivity in the cisternal organelle at the AIS whereas no apparent changes in the AIS cytoskeleton occur. These alterations most likely considerably disrupt the ability of the AIS to regulate Ca²⁺ levels.

INTRODUCTION

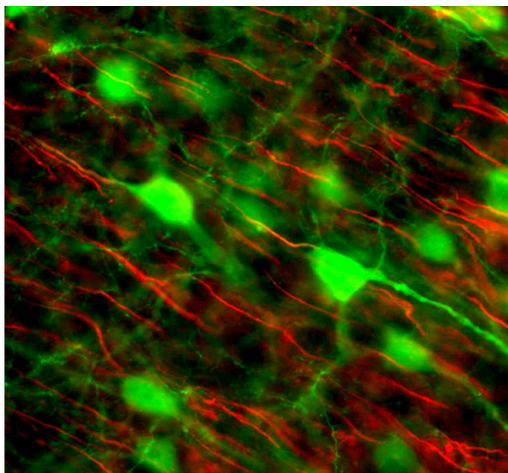
The excitability of a neuron can be regulated by activity-dependent plastic changes in the length and location of the axon initial segment (AIS) (Grubb et al., 2011), a complex axonal domain enriched in voltage-gated ion channels and involved in the initiation of action potentials. For example, 15 mM KCl chronic long-term depolarization of cultured rat hippocampal neurons produces a distal shift in many components of the AIS, through a chronic increase in Ca²⁺ levels, which involves voltage-gated Ca²⁺ channels (Grubb and Burrone, 2010). The tight regulation of Ca²⁺ levels seems to be fundamental for AIS preservation as ischemia-induced neuronal injury produces a dispersion of Na⁺ channels and adhesion molecules in the AIS due to the calpain- and Ca²⁺-mediated proteolysis of the AIS cytoskeleton (Schafer et al., 2009). Ca²⁺ level regulation in the AIS of neocortical and hippocampal principal cells is thought to involve the cisternal organelle (Benedeczy et al., 1994; Bas Orth et al., 2007; Sanchez-Ponce et al., 2011a). The recruitment and maintenance of the cisternal organelle at the AIS

is dependent on the integrity of the actin cytoskeleton (Sanchez-Ponce et al., 2011a) and the actin and α -actinin interacting protein synaptopodin (Bas Orth et al., 2007). The cisternal organelle is in many regards reminiscent of the spine apparatus of dendritic spines (Sanchez-Ponce et al., 2011a) for which recruitment, synaptopodin is also an essential component, involved in the spine calcium kinetics and required for the formation and dynamic reorganization of the actin cytoskeleton in spine plasticity (Deller et al., 2000; Deller et al., 2003; Vlachos et al., 2009). Since the cisternal organelle may regulate the Ca²⁺ available to maintain AIS structure and function, we tested the hypothesis of whether the cisternal organelle is affected by chronic depolarization and contributes to AIS plasticity.

MATERIAL AND METHODS

Neuronal cultures

Hippocampal neurons were obtained from E17 mouse embryos. Briefly, after dissection of the hippocampus, the tissue was washed 3 times in Ca²⁺/Mg²⁺-free Hank's balanced salt solution (HBSS) and digested for 15 min in the same solution containing 0.25% trypsin. The tissue was again washed 3 times in Ca²⁺/Mg²⁺-free HBSS, and it was then dissociated with a fire-polished Pasteur pipette. The cells were recovered, counted and resuspended in plating medium (Minimum essential medium + 10% Horse Serum and 0.6% glucose) and seeded at a density of 5000/cm² on polylysine-coated coverslips (1 mg/mL). After 2 h, the medium was replaced with neuronal culture medium (Neurobasal medium + B-27 supplement and glutamax I). To maintain the neurons for 16 days in vitro (DIV), the cells were transferred to 60 mm plates containing astrocyte monolayers cultured in neuronal culture medium that was added 24 h previously. 1- β -D-arabinofuranosylcytosine



Discusión

En la presente tesis hemos abordado el estudio de algunos aspectos de la composición y los mecanismos de formación del segmento inicial del axón (SIA), una estructura indispensable para la generación de los potenciales de acción durante la transmisión nerviosa y el control de tráfico de proteínas hacia el axón. Para ello, utilizando neuronas hipocampales de ratón en cultivo hemos estudiado el posible papel que IKK y CK2, dos quinasas recientemente localizadas en el SIA, llevan a cabo durante la formación axonal y el establecimiento del SIA. También, debido a su importante papel durante la generación de los potenciales de acción, se ha descrito el patrón de aparición temporal y la distribución espacial de canales de sodio y diferentes subunidades de canales de potasio dependientes de voltaje en el SIA. Además se ha establecido el patrón de aparición y la relación con el citoesqueleto del orgánulo de cisternas, una estructura derivada del retículo endoplásmico liso que se caracteriza por la expresión de sinaptopodina y α -actinina. Finalmente se han estudiado las implicaciones que dicho orgánulo podría tener en los procesos de plasticidad estructural del SIA.

1. Adquisición de la polaridad neuronal y formación de axón

El establecimiento de la polaridad neuronal es el primer evento para la formación del axón. Esta comienza con la transformación de una de las neuritas iniciales en el axón, que empieza a crecer con una velocidad mayor que el resto de prolongaciones. Este cambio viene regulado y controlado por vías de señalización que conllevan modificaciones en el citoesqueleto de microtúbulos y microfilamentos. Existen numerosos estudios que muestran el papel de diferentes rutas de señalización celular (dependientes o independientes de la ruta de señalización de PI3K) en la regulación del citoesqueleto y el control del crecimiento axonal.

En el presente trabajo hemos estudiado el posible papel de la ruta de NF κ B y la quinasa IKK en el desarrollo neuronal en cultivos primarios de neuronas hipocampales. Los estudios iniciales sugieren una posible relación entre estas proteínas y el crecimiento y la supervivencia neuronal (Azoitei et al., 2005; Bhakar et al., 2002; Gutierrez et al., 2005). La quinasa IKK actúa fosforilando a I κ B α , inhibidor de NF κ B, y también a su homólogo I κ B β (Ghosh and Hayden, 2008; Karin and Ben-Neriah, 2000). En el sistema inmune se ha descrito que pI κ B α se ubiquitina y se degrada en proteasoma. Sin embargo, en 2006, Schultz y colaboradores (Schultz et al., 2006) describieron la localización de pI κ B α , pIKK, p65 en el SIA de distintas poblaciones neuronales. Estos datos permitieron establecer la hipótesis de una posible función para estas proteínas durante la elongación y la maduración neuronal. Nuestros resultados señalan que en neuronas hipocampales, pI κ B α se localiza en el axón desde el inicio de su elongación y va concentrándose en el SIA durante el desarrollo, mientras que la forma no fosforilada, se encuentra distribuida de manera homogénea por toda la célula (Sanchez-Ponce et al., 2008). La inmunoreactividad para pI κ B α se encuentra además asociada a microtúbulos del SIA. La desestabilización de dichos microtúbulos con el tratamiento con un agente despolimerizante (Colchicina) reduce el marcaje de pI κ B α en el SIA. Este efecto se abole por tratamientos con inhibidores de proteasoma (MG132), lo que indica que la reducción del marcaje de pI κ B α tras la desestabilización del citoesqueleto está relacionada con la degradación por proteasoma de pI κ B α una vez liberado de los microtúbulos (Schultz et al., 2006).

La inhibición farmacológica de la fosforilación de I κ B (inhibiendo las quinasas IKK α / β mediante tratamiento de las células con el inhibidor selectivo BMS-345541) impide la formación del axón sin afectar al crecimiento del resto de neuritas. Estos datos indican que los eventos tempranos en la

formación del axón en neuronas hipocampales requieren la actividad de IKK α/β , en concordancia con estudios previos que señalan que el crecimiento de neuritas en células PC12 viene acompañado de la activación del complejo IKK (Azoitei et al., 2005). Aunque el inhibidor farmacológico de quinasas IKK (BMS-345541) es selectivo, podría no ser completamente específico y estar afectando a otras quinasas implicadas en la regulación del crecimiento neuronal (Bain et al., 2007). Por ello se comprobaron los resultados obtenidos mediante la nucleofección de las células con el plásmido que permite la expresión de un mutante de I κ B α en el que se han sustituido las serinas fosforilables por alaninas (I κ B α S32/36A). Los resultados demuestran que la sobre-expresión de I κ B α no fosforilable produce también una disminución de la concentración de pl κ B α y de otras proteínas específicas en el SIA (Sanchez-Ponce et al., 2008; Schultz et al., 2006). La expresión del mutante de I κ B α S32/36A también produce una reducción del tamaño y la complejidad del árbol dendrítico en neuronas postnatales corticales y en neuronas sensoriales del sistema nervioso periférico (Gutierrez et al., 2005).

2. Establecimiento del segmento inicial del axón

Tras la polarización neuronal y la formación de un dominio axonal y otro somatodendrítico diferenciados, las neuronas establecen diferentes subdominios especializados necesarios para su funcionalidad. El SIA es un subdominio que requiere para su establecimiento y formación el transporte de proteínas y la precisa localización espacio-temporal de estas en la parte proximal del axón.

La proteína de anclaje ankirina G (ankG) es esencial para la organización de SIA, e interacciona con el citoesqueleto de actina a través de la proteína espectrina- β IV (Bennett and Baines, 2001). Estudios previos demuestran que la interferencia en la expresión de ankirina G mediante la infección de las neuronas ya polarizadas en cultivo con adenovirus interferentes de ARN (shRNA ;*short hairpin*) para ankirina G, promueven la desorganización del SIA, y la pérdida de expresión de proteínas específicas de este dominio, junto con la adquisición de proteínas somatodendríticas y el desarrollo de espinas dendríticas en el SIA (Hedstrom et al., 2008; Rasband, 2010a) como resultado de la pérdida de las características axonales. Estos datos coinciden con los resultados en ratones deficientes para ankirina G en cerebelo, cuyas neuronas de Purkinje desarrollan espinas y marcadores somatodendríticos en el SIA (Jenkins and Bennett, 2001; Sobotzik et al., 2009; Zhou et al., 1998). Nuestros resultados muestran que la ausencia de ankirina G desde los estadios iniciales del desarrollo en neuronas de hipocampo en cultivo, mediante nucleofección de ARNs de interferencia para ankirina G, no altera la adquisición de polaridad en la célula en cuanto a la distribución polarizada de Tau-1 en el axón y el marcaje de MAP2 en el soma y dendritas. Esto indica que la presencia de proteínas del SIA no es necesaria para el establecimiento de la polaridad axonal a este nivel. Sin embargo, esas células si muestran alteraciones en la acumulación de proteínas específicas del SIA (ankirina G, canales de sodio y pl κ B α). Por lo tanto, la pérdida de ankirina G no parece influir en la distribución inicial de proteínas asociadas a microtúbulos. Esto no excluye que la ausencia de ankirina G puede afectar a la distribución polarizada de otras proteínas.

La localización de ankirina G en el SIA es necesaria para la concentración de otras proteínas en este subdominio (Boiko et al., 2007; Garrido et al., 2003; Jenkins and Bennett, 2001). Nuestros estudios muestran que la aparición de ankirina G polarizada a lo largo del axón en crecimiento (36 horas en cultivo) coincide con la aparición de pl κ B α . En los estadios posteriores (48-72 horas en cultivo) ambas proteínas se concentran en el SIA, antes de que sea detectable la aparición de los canales de

sodio dependientes de voltaje. Del mismo modo CK2 α y CK2 α' se encuentran localizadas a lo largo de todo el axón en estadios iniciales, colocalizando con plkB α , y se concentran posteriormente en el SIA. Esta concentración se mantiene en el SIA de neuronas maduras (21 días *in vitro*). Dichos datos indicaban que las proteínas plkB α y CK2 podrían estar implicadas, además de en la regulación y coordinación del crecimiento del axón, en el desarrollo de su segmento inicial. Nuestros resultados indican que la actividad IKK α/β es necesaria para conseguir la concentración de ankirina G y canales de sodio en el SIA. Es posible que plkB α y la actividad quinasa de IKK regulen el tráfico de ankirina G al SIA, siendo la ankirina G la proteína responsable de la concentración de otras proteínas en el SIA. De hecho, la concentración de estas proteínas en el soma, en la proximidad del lugar de protrusión del axón tras la inhibición de la quinasa IKK, sugiere que IKK α/β podría estar involucrada en el tráfico polarizado de proteínas hacia el SIA. Por otro lado, la inhibición de CK2 mediante el tratamiento farmacológico o la nucleofección de RNAs interferentes, impiden la localización de proteínas del SIA (plkB α y ankirina G) y de la propia CK2, lo que indica que la concentración del CK2 en el SIA también es necesaria para el desarrollo del SIA.

Un estudio reciente, que utiliza el ratón *knockout* para la proteína I κ B α (Nfkbai $^{-/-}$), ha señalado que los anticuerpos comerciales frente a plkB α podrían estar reconociendo a otra proteína desconocida del SIA (Buffington et al., 2012). El ratón defectivo para I κ B α sobrevive hasta 10 días postnatales y aparentemente no presenta alteraciones en el desarrollo del SIA. Los cortes de cerebro de dichos ratones presentan marcaje de ankirina G y otras proteínas específicas del SIA como canales de sodio concentradas en el segmento inicial. Sorprendentemente, los ratones Nfkbai $^{-/-}$ presentan también marcaje en SIA para diferentes anticuerpos comerciales fosfo-específicos contra plkB α -S32-36. Las neuronas en cultivo de estos animales transgénicos también tienen inmunoreactividad para plkB α en el SIA. Según Buffington et al., los anticuerpos frente a antígenos fosforilados no serían específicos y podrían reconocer alguna otra proteína fosforilada del SIA que se encuentra asociada a microtúbulos (Buffington et al., 2012). El bloqueo específico con el péptido inmunógeno fosforilado impide el marcaje de plkB α , así como el tratamiento con fosfatasa alcalina (Buffington and Rasband, 2011; Schultz et al., 2006). Sin embargo, en el ratón deficiente para I κ B α se ha descrito que podrían existir compensaciones con otras proteínas, como la proteína I κ B β , con la que muestra gran similitud en su actividad bioquímica, gran homología de secuencia y que también es fosforilada por IKK α/β en las serinas 19 y 23. En ratones deficientes para I κ B α , la adición de I κ B β es capaz de compensar la falta de I κ B α , generando un ratón sin alteraciones, fértil y que sobrevive hasta etapas maduras (Cheng et al., 1998). Por tanto, esta aparente discrepancia podría también ser explicada por la inhibición de la fosforilación de I κ B α/β en neuronas de hipocampo en cultivo, y una posible reacción cruzada del anticuerpo dirigido contra plkB α que podría reconocer plkB β en el SIA de neuronas de ratones Nfkbai $^{-/-}$. Mientras que el marcaje de plkB α se encuentra localizado exclusivamente en el SIA, la proteína total I κ B α se distribuye homogéneamente por toda la neurona (Sanchez-Ponce et al., 2008; Schultz et al., 2006). Además junto con plkB α , se han descrito también otras proteínas de la ruta NF κ B localizadas en SIA, como p65 y pIKK α/β (Schultz et al., 2006), así como la subunidad reguladora IKK γ /NEMO que, a diferencia de las otras, no se presenta en su forma fosforilada sino total (Konig et al., 2011). Esta proteína interacciona con FHF1/FGF12 pudiendo regular la presencia de canales de sodio en el SIA. Por otro lado, a diferencia del patrón de marcaje de plkB α , el cual se localiza asociado a microtúbulos, la forma activa de la quinasa IKK α/β (pIKK α/β Ser 180 –181) ha sido localizada en SIA asociada a microdominios insolubles de la membrana plasmática denominados balsas lipídicas, presentando por tanto un patrón de marcaje complementario a plkB α (Schultz et al., 2006). Estas proteínas de la ruta NF κ B localizadas en SIA, se encuentran también en nodos

de Ranvier (Politi et al., 2008). Todos estos datos indican que, a pesar de las posibles uniones inespecíficas de los anticuerpos frente a proteínas fosforiladas de la ruta de NF κ B a otra proteína desconocida que se encuentra fosforilada y unida a microtúbulos (Buffington et al., 2012), existen numerosas evidencias que sugieren la presencia de IKK y plkB α en el SIA y su implicación en los procesos de formación y maduración del SIA.

3. Papel de los microtúbulos durante el desarrollo del segmento inicial del axón.

El control de la dinámica de los microtúbulos tiene una importancia fundamental durante el desarrollo axonal. La tubulina puede ser modificada postraduccionalmente lo que produce un aumento o una disminución de su estabilidad. El citoesqueleto del SIA contiene microtúbulos que presentan una serie de modificaciones postraduccionales que los hacen más estables (tubulina acetilada y tubulina detirosinada), mientras que las zonas de crecimiento axonal más distales los microtúbulos son más dinámicos para facilitar la elongación axonal, por lo que están compuestos por tubulina tirosinada (Rochlin et al., 1996; Tapia et al., 2010). Ankirina G, plkB α y CK2 se localizan en SIA desde el inicio de su diferenciación, pero no en zonas de crecimiento y se encuentran asociadas al citoesqueleto. En nuestros experimentos de extracción con detergentes se demuestra que el SIA contiene una mayor expresión de tubulina acetilada y detirosinada que el resto de la neurona, lo cual indica que el SIA presenta una composición de microtúbulos con características diferentes al resto del axón. Además de su composición, estudios previos de microscopía electrónica describieron que la fasciculación de los microtúbulos en el SIA es también diferente a la del resto del axón (Palay et al., 1968). Nuestros datos indican que tras la inhibición de CK2 con tratamientos farmacológicos, se incrementan los niveles de acetilación y detirosinación de tubulina; y la distribución de microtúbulos con tubulina acetilada y detirosinada se extienden a toda la célula, incluyendo las regiones distales del axón (**Figura D-1**). Al mismo tiempo, el tratamiento farmacológico o la inhibición de la expresión de CK2, impiden la localización de CK2 en el SIA, lo cual viene asociado a una pérdida en la concentración de ankirina G, plkB α y canales de sodio. De hecho, la unión de la holoenzima CK2

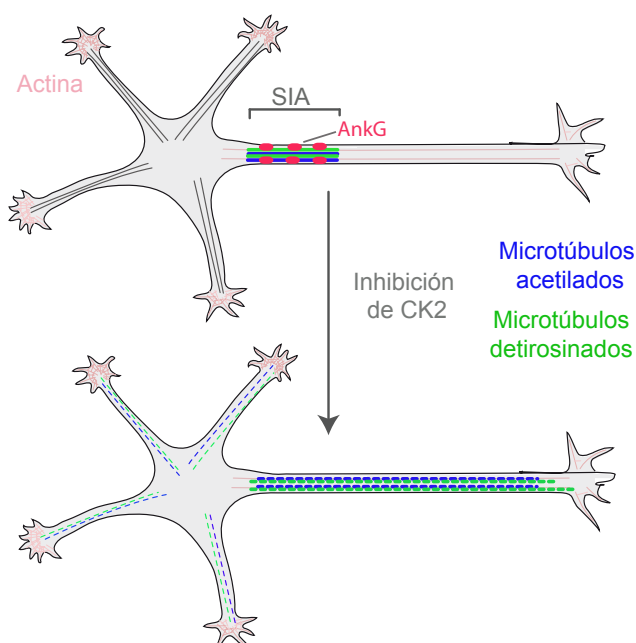


Figura D1. La estabilidad del SIA depende de la actividad de CK2. Esquema que refleja el cambio en la distribución de los niveles de acetilación y detirosinación de los microtúbulos tras la inhibición de CK2 y la consiguiente alteración del SIA.

a microtúbulos es necesaria para conferirles estabilidad (Lim et al., 2004). Estos datos demuestran que la ausencia de CK2 impide la formación del SIA probablemente a través de modificaciones en el tráfico de proteínas relevantes para su desarrollo (ankirina G y plkB α) debido a alteraciones en los microtúbulos. En relación con esto, se ha descrito que, en neuronas hipocampales en cultivo, el bloqueo de la actividad deacetilasa por inhibición de la enzima HDAC6, que mantiene deacetilados los microtúbulos en regiones distales del axón, impide la localización específica de proteínas en el SIA (Tapia et al., 2010).

En estudios previos se ha descrito que CK2 es capaz de fosforilar canales de sodio dependientes de voltaje, aumentando su capacidad de interacción con ankirina G y contribuyendo a su localización en el SIA (Brechet et al., 2008). Sin embargo, nuestros datos sugieren que la pérdida de canales de sodio en el SIA tras la inhibición farmacológica de CK2, o el bloqueo de la expresión de CK2 α mediante RNA interferente, puede deberse a la falta de concentración de ankirina G en el SIA (Brechet et al., 2008; Sanchez-Ponce et al., 2011). Como se mencionaba previamente, la inhibición de CK2 previene su propia acumulación en el SIA, alterando las características de los microtúbulos en neuronas e impidiendo la localización y anclaje de plkB α y ankirina G en el SIA. De hecho, nuestros datos sugieren que la concentración de CK2 α , plkB α y ankirina G en el SIA es mutuamente dependiente, lo que indica que la regulación de los microtúbulos y el anclaje al SIA puede deberse a una acción combinada de estas proteínas, dado que tanto CK2, como plkB α y ankirina G, se encuentran asociadas con los microtúbulos (Brechet et al., 2008; Buffington et al., 2012; Davis and Bennett, 1984; Schultz et al., 2006). De hecho, la supresión de ankirina G desorganiza los microtúbulos del SIA y elimina la polarización neuronal (Hedstrom et al., 2008; Sobotzik et al., 2009). Por lo tanto, las proteínas adaptadoras, junto con CK2 pueden regular la dinámica de microtúbulos y la concentración de proteínas en el SIA. **(Figura D1)**

Una de las funciones fundamentales de los microtúbulos es la de servir como guía para proteínas transportadoras a lo largo del axón. Uno de los miembros de la familia de proteínas motoras kinesinas, KIF5, interacciona con los microtúbulos del SIA y es responsable del tráfico polarizado de cargos hacia el axón en las neuronas hipocampales (Nakata and Hirokawa, 2003). Los microtúbulos proporcionan las señales para el transporte axonal polarizado a través de la interacción con kinesinas (Nakata and Hirokawa, 2003), el cual es dirigido hacia el axón debido al ratio de detirosinación de microtúbulos presente en la parte inicial del axón (Konishi and Setou, 2009). Se ha localizado en el SIA una proteína quimera basada en el dominio motor de KIF5 (Nakata and Hirokawa, 2003) la cual interactúa con microtúbulos acetilados y/o detirosinados, para llevar su cargo hacia el axón (Konishi and Setou, 2009). Los cambios en las características de los microtúbulos que producen la pérdida de CK2 en el SIA, podrían afectar la entrada de kinesinas hacia el axón y el transporte de proteínas al SIA y a regiones más distales. De hecho nuestros resultados muestran que la inhibición de CK2 altera la distribución de KIF5 a lo largo del axón, la cual pierde el gradiente de concentración en regiones distales del axón. Se han descrito cambios similares en experimentos en los que se aumenta la estabilidad de los microtúbulos tras tratamientos con taxol, el cual potencia la acetilación y la detirosinación (Nakata and Hirokawa, 2003). Igualmente, la inhibición de la actividad deacetilasa, localizada en regiones distales de los axones, produce modificaciones en los microtúbulos que alteran el enriquecimiento distal de KIF5C (Tapia et al., 2010). Por otra parte, CK2 es capaz de fosforilar KIF5C (Schafer et al., 2009a; Schafer et al., 2008) y es posible que esta fosforilación sea necesaria para la liberación de su cargo (Pigino et al., 2009).

4. Maduración del segmento inicial del axón y establecimiento de microdominios internos

La localización precisa de los canales de Na⁺ y K⁺ dependientes de potencial en dominios discretos de la membrana axonal es esencial para la generación y propagación de potenciales de acción, y depende de la expresión diferencial de proteínas de adhesión y de interacción con el citoesqueleto. Dentro del SIA se ha descrito la existencia de subdominios proximal y distal en base a la segregación espacial de distintos tipos de canales de Na⁺ y K⁺ (Hu et al., 2009; Inda et al., 2006; Kole et al., 2007; Van Wart et al., 2007). Sin embargo, la organización de subdominios en el SIA y la expresión diferencial de canales iónicos es variable entre distintas poblaciones neuronales (Lorincz and Nusser, 2008) y a lo largo del desarrollo (Van Wart and Matthews, 2006; Van Wart et al., 2007).

La expresión de proteínas en el SIA varía a lo largo de la maduración neuronal. Durante los primeros estadios del desarrollo (tres días *in vitro*), ankirina G, plkB α y CK2 se expresan a lo largo del axón en crecimiento y van gradualmente concentrándose en el SIA. Ligeramente después se produce el anclaje de los canales de sodio a través de sus dominios de unión a ankirina G.

En nuestro trabajo hemos estudiado la expresión de diferentes subtipos de canales de potasio dependientes de voltaje a lo largo de los estadios de maduración neuronal. Los estudios previos muestran que la localización y acumulación de canales de potasio tipo Kv7 en el SIA depende directamente de su interacción con ankirina G (Pan et al., 2006). Esto coincide con nuestros datos que señalan que la localización de Kv7.2 se produce en los primeros días de desarrollo prácticamente en paralelo a la localización de canales de sodio. Por el contrario, la expresión en SIA de los canales de potasio Kv1 y Kv2 comienza durante la segunda semana *in vitro*. Estas diferencias en el momento de aparición de los canales probablemente estén relacionadas con cambios en la capacidad de generación de potenciales de acción durante la maduración.

Además de las diferencias en el patrón de maduración, existe una gran diversidad en cuanto a la organización estructural interna de subdominios dentro del SIA (Lorincz and Nusser, 2008). Nuestros datos muestran que los canales de potasio presentan un patrón de distribución específico dentro de cada subdominio del SIA (**Figura D-2**). Durante las primeras 3 semanas de desarrollo *in vitro*, los canales Kv7.2 se distribuyen de forma homogénea a lo largo del SIA, coincidiendo con el patrón de ankirina G. Por el contrario, la subunidad Kv1.2 se restringe a la región más distal del SIA, donde presenta un marcaje homogéneo. Esta segregación entre dominios proximal y distal también se observa entre los canales Nav1.2 y Nav1.6 de sodio, y ha sido relacionada con la especialización de estas regiones en la generación y retropropagación de potenciales de acción, respectivamente (Hu et al., 2009; Kole et al., 2007). Probablemente en relación con las diferencias en las características electrofisiológicas de los potenciales de acción que existen entre poblaciones neuronales, la concentración de la subunidad Kv1.2 en la zona distal es más evidente en algunos tipos neuronales, como las neuronas piramidales de capa 2/3 de neocorteza, las neuronales piramidales e interneuronas de CA1 y neuronas ganglionares de la retina, a diferencia de otras poblaciones como las neuronas piramidales de CA3 (Inda et al., 2006; Lorincz and Nusser, 2008; Van Wart et al., 2007). En nuestros cultivos hipocampales después de 21 DIV *in vitro* hemos observado que alrededor del 30% de las neuronas expresan Kv1.2 en el SIA. Este porcentaje podría reflejar la subpoblación de neuronas piramidales de CA1 presentes en el cultivo.

Los canales de potasio Kv2.2 se distribuyen formando pequeños microdominios o *clusters* en regiones somatodendríticas y en la zona proximal del SIA. Esto sugiere que en neuronas hipocampales la subunidad Kv2.2 podría contribuir a la regulación del potencial de reposo y a la frecuencia de potenciales de acción, como es el caso en neuronas del núcleo medial del cuerpo trapezoide

(Johnston et al., 2008). La distribución en *clusters* de Kv2.2 coincide con la distribución descrita para la subunidad Kv2.1 en neuronas hipocampales *in vitro* y en neuronas neocorticales *in vivo* (Sarmiere et al., 2008) aunque se desconoce si existe colocalización entre ambas. El marcaje de Kv2.2 en SIA aparece aproximadamente en el 60% de las neuronas en cultivo a 21 días *in vitro*. Nuestros resultados también muestran que la expresión de Kv1.2 y Kv2.2 son mutuamente excluyentes, ya que las células que expresan Kv2.2 somatodendrítico y en SIA no presentan inmunoreactividad para Kv1.2 en el SIA y viceversa. Esta falta de colocalización refleja la existencia en nuestros cultivos de neuronas hipocampales de diferentes tipos neuronales con distinto patrón de expresión de canales iónicos (**Figura D-2**).

Como hemos descrito anteriormente, la presencia de ankirina G en el SIA y su interacción con el citoesqueleto de actina a través de espectrina β IV, es crítica para la concentración de proteínas esenciales como los canales de sodio dependientes de voltaje. Este es también el caso para las proteínas de adhesión neurofascina 186 y NrCAM y algunos tipos de canales de potasio dependientes de voltaje, (Boiko et al., 2007; Chung et al., 2006; Davis et al., 1996; Garrido et al., 2003; Hedstrom et al., 2008; Hedstrom et al., 2007; Jenkins and Bennett, 2001; Lemaillet et al., 2003; Pan et al., 2006; Rasmussen et al., 2007; Zhou et al., 1998). En el caso de las subunidades Kv7.2 y 7.3 de los canales de potasio Kv7, su anclaje al SIA es consecuencia directa de su unión a ankirina G a través de un dominio similar al presente en los canales de sodio (Pan et al., 2006; Rasmussen et al., 2007; Hill et al., 2008). A diferencia de los canales Kv7, las subunidades de los canales Kv1 (Kv1.1, Kv1.2 and Kv1.4) forman complejos que incluyen Caspr2, TAG-1, ADAM22 y la proteína estructural PSD93. Su localización en el SIA es dependiente de la presencia de PSD93/Chapsyn-110 y de interacciones con dominios PDZ (Ogawa et al., 2008; Ogawa et al., 2010). Sin embargo, se cree que este mecanismo podría no ser suficiente para su concentración específica en este subdominio (Jensen et al., 2011; Triller and Choquet, 2008). En nuestro trabajo se muestra que la acumulación de subunidades Kv1.2 en el SIA no se ve afectada por la desestabilización del citoesqueleto de actina, pero si depende de la presencia de ankirina G, como se observa tras la nucleofección de las células con los plásmidos interferentes para ankirina G. Aunque no existen evidencias de una interacción directa entre ankirina G y Kv1.2 (Rasband, 2010b), nuestros datos

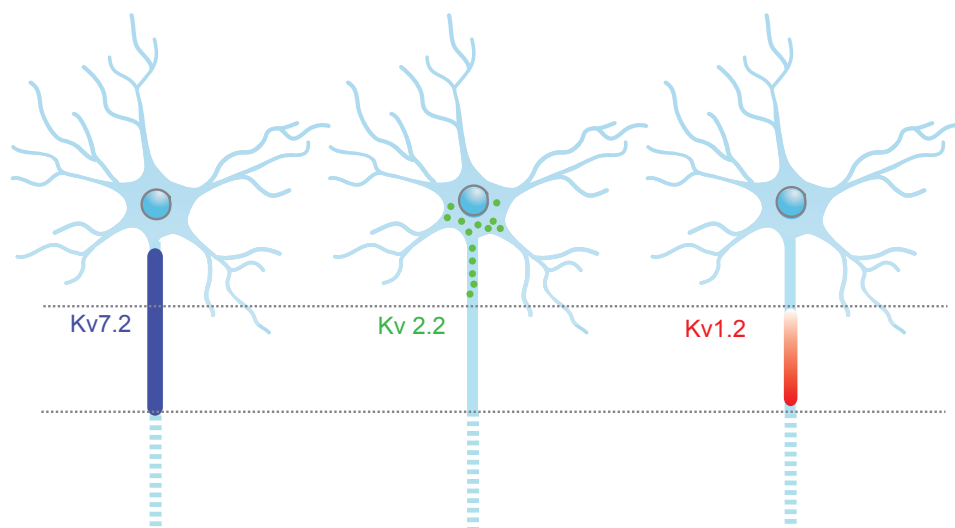


Figura D2. Expresión de canales de potasio en SIA y patrones de distribución. Esquema que representa la localización de las subunidades Kv7.2, Kv2.2 y Kv1.2 en distintos subdominios y con diferente patrón de expresión en el SIA.

indican que la presencia de ankirina G es necesaria para la adquisición y el mantenimiento de los canales Kv1.2 y de Kv2.2 en el SIA.

El mecanismo implicado en la localización de los canales Kv2.2, incluyendo los *clusters* o microdominios del SIA es desconocido en la actualidad (Antonucci et al., 2001; Rasband, 2010b). Los microdominios de la subunidad Kv2.1 son estructuras dinámicas cuyo mantenimiento y localización se ha propuesto que dependen de la presencia de un motivo de anclaje (Lim et al., 2000), o de la interacción con proteínas adaptadoras (Surmeier and Foehring, 2004). Estos microdominios y la activación dependiente de voltaje de los canales Kv2.1 son regulados por fosforilación tras el flujo de Ca^{2+} inducido por la actividad neuronal y la liberación de Ca^{2+} de almacenes internos (Misonou et al., 2004; Misonou et al., 2005; Mohapatra and Trimmer, 2006; Tamkun et al., 2007). Los microdominios de la subunidad Kv2.1 localizados en el SIA son más estables que los localizados en el soma (Sarmiere et al., 2008). Nuestros datos muestran que los microdominios de Kv2.2 no se ven afectados por alteraciones en el citoesqueleto de actina tras el tratamiento con agentes despolimerizantes, los cuales si afectan a la movilidad de proteínas y la distribución asimétrica de otros lípidos y proteínas del SIA (Nakada et al., 2003; Song et al., 2009; Winckler et al., 1999; Winckler and Mellman, 1999). Además, la nucleofección de las células con el plásmido interferente para ankirina G impide la localización de estas subunidades en el SIA. Todos estos datos sugieren la existencia de interacciones moleculares no caracterizadas hasta el momento que pueden ayudar a la estabilización de los microdominios de los canales de Kv2 en el SIA.

5. Regulación de los niveles de calcio en el segmento inicial del axón

Durante la generación de los potenciales de acción en el SIA, además de las corrientes de Na^+ y K^+ , se ha descrito la entrada de Ca^{+2} a través de distintos tipos de canales de Ca^{+2} dependientes de voltaje (Cav2.1, Cav2.2, Cav2.3, Cav3). Esta entrada de Ca^{+2} es transitoria y participa en la generación y el establecimiento de la frecuencia de potenciales de acción pudiendo además regular diferentes tipos de canales de potasio (Bender and Trussell, 2009; Bender et al., 2010; Grubb and Burrone, 2010; Yu et al., 2010; Yu et al., 2008). En las neuronas, el Ca^{+2} actúa como segundo mensajero pudiendo afectar diversos procesos en los cuales el SIA está involucrado, como la maduración y el transporte o la activación de quinasas sensibles a Ca^{+2} en el SIA, entre las que podrían estar IKK (Schultz et al., 2006) o Ca^{+2} /calmodulina quinasa 2 (CaMKII) (Hund et al., 2010). Además, la elevación de los niveles de Ca^{+2} producidos tras un daño celular inducen la activación de calpaina lo que produce el desensamblaje del citoesqueleto del SIA (Schafer et al., 2009b). Por lo tanto, en condiciones normales los niveles de Ca^{+2} deben permanecer regulados de manera precisa para mantener la integridad del SIA. Esta regulación de los niveles de Ca^{+2} intracelular probablemente dependa de la coordinación de mecanismos que permiten la entrada de Ca^{+2} a través de la membrana plasmática, la liberación de Ca^{+2} desde el retículo endoplásmico y la recaptación de Ca^{+2} por el retículo endoplásmico, como se ha descrito anteriormente en otros dominios y tipos celulares (Blaustein and Golovina, 2001; Bootman et al., 2001). **(Figura D-3)**

Uno de los posibles sistemas de regulación de la concentración de Ca^{+2} en el SIA es el orgánulo de cisternas, que consiste en una serie de cisternas apiladas y derivadas del retículo endoplásmico liso, la más externa de las cuales está en aposición con la cara interna de la membrana plasmática (Benedeczky et al., 1994; Jedlicka et al., 2008; Kosaka, 1980). En estudios previos se ha demostrado que el orgánulo de cisternas comparte características con el del aparato de la espina de las espinas dendríticas y que puede ser marcado mediante tinciones inmunocitoquímicas para la proteína

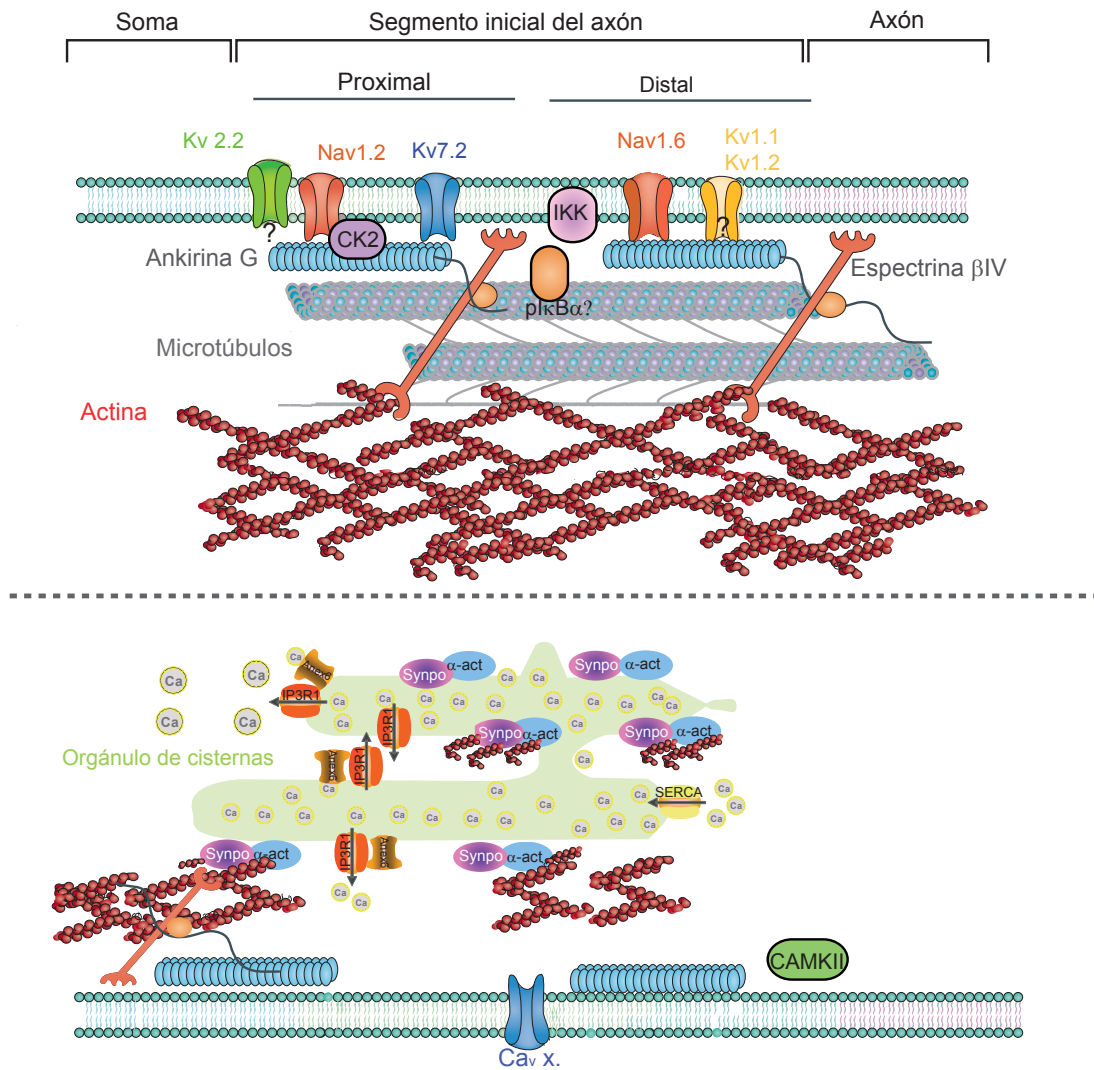


Figura D3. Composición del segmento inicial del axón. Esquema resumen que representa algunos de los principales componentes moleculares del SIA. En la parte superior se resume la distribución de los principales tipos y subunidades de canales de Na⁺ y K⁺ dependientes de potencial así como algunas de las interacciones con proteínas de andamiaje y de citoesqueleto que intervienen en su estabilización en el SIA. Asimismo se representa la distribución de las quinazas CK2 e IKK y de plkBα?. En la parte inferior se representa el orgánulo de cisternas junto a las moléculas que intervienen en su estabilización y las que participan en la regulación de los niveles de Ca²⁺ del SIA.

sinaptopodina (Bas Orth et al., 2007).

La implicación del orgánulo de cisternas en la regulación de los niveles de Ca²⁺ del SIA se propuso en base a la presencia de la ATPasa de calcio SERCA (*sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase*) en la membrana de sus cisternas (Benedeczky et al., 1994). Nuestros resultados describen la presencia de microdominios de membrana en el SIA que expresan IP₃R1 (Receptor IP₃ tipo 1), a través de los cuales pueda llevarse a cabo la movilización de Ca²⁺. Aunque algunos de los microdominios inmunoreactivos para IP₃R1 pueden corresponder a la membrana plasmática del SIA, la colocalización de IP₃R1 con sinaptopodina en algunos microdominios indica que el orgánulo de cisternas es un centro de almacenamiento de Ca²⁺ sensible a IP₃. (**Figura D-3**). Además, la co-distribución de anexina 6 e IP₃R1 en los microdominios del SIA, indica una potencial relación funcional y/o estructural entre ambas proteínas. La proteína anexina 6 ha sido previamente localizada en membrana plasmática y en orgánulos secuestradores de Ca²⁺ (Hazarika et al., 1991) y se ha propuesto que podría actuar como un canal del Ca²⁺ dependiente de voltaje (Benz et al.,

1996; Gerke and Moss, 2002; Hofmann et al., 1997) o como un regulador de la liberación de Ca^{+2} desde almacenes internos (Diaz-Munoz et al., 1990; Monastyrskaya et al., 2009). Aunque los procesos mediados por anexina 6 en el SIA y su posible dependencia de cambios en el potencial de membrana son aún desconocidos, es posible que la liberación de Ca^{2+} inducida por IP_3 afecte a los mecanismos mediados por anexina 6 en las zonas vecinas de la membrana plasmática. Los lugares de contacto entre el orgánulo de cisternas y la membrana plasmática del SIA recuerdan a los plasmareticulosomas descritos en varios tipos celulares, incluidas neuronas. IP_3 se une a su receptor en estas regiones y la consecuente liberación de Ca^{2+} desde zonas de almacenamiento es necesaria para precipitar la entrada de Ca^{2+} extracelular a través de canales TRPC de la membrana plasmática (*Transient receptor potential channels*) (Blaustein and Golovina, 2001; Delmas and Brown, 2002; Lencesova et al., 2004). Actualmente se desconoce si este tipo de canales u otras bombas o transportadores de Ca^{2+} están presentes en los microdominios que expresan $\text{IP}_3\text{R1}$ o en otras regiones del SIA y participan en la regulación de los niveles de Ca^{2+} de este complicado dominio axonal.

6 Desarrollo, estabilización y localización del orgánulo de cisternas en el segmento inicial del axón

A diferencia de la naturaleza dinámica de otras regiones del retículo endoplásmico, nuestros datos muestran que la organización del orgánulo de cisternas del SIA depende de la presencia de proteínas estructurales resistentes a la extracción con detergentes y de la integridad del citoesqueleto, como se describió previamente en los plasmareticulosomas (Blaustein and Golovina, 2001; Voeltz et al., 2002). La eliminación de ankirina G por silenciamiento génico, mediante la nucleofección de ARNs de interferencia produce la desaparición de microdominios inmunoreactivos para sinaptopodina, $\text{IP}_3\text{R1}$ y anexina 6 en el SIA. Esto indica que la formación del orgánulo de cisternas depende de la presencia ankirina G y del correcto desarrollo estructural del SIA.

Además, la estructura y función del SIA también dependen de la integridad del citoesqueleto de actina. El papel del SIA como barrera que impide la libre difusión de moléculas se altera tras el tratamiento con agentes despolimerizantes de actina (Nakada et al., 2003; Winckler et al., 1999). En el SIA, la formación del orgánulo de cisternas depende de la presencia de sinaptopodina entre las membranas de las cisternas (Bas Orth et al., 2007). La sinaptopodina interactúa con filamentos de F-actina y con la proteína α -actinina lo que promueve la formación de haces y la elongación de filamentos de actina (Kremerskothen et al., 2005). En nuestros experimentos, el tratamiento de las células con un agente despolimerizante de filamentos de actina (Citocalasina D) reduce el número de estructuras inmunoreactivas para sinaptopodina y para α -actinina en el SIA además de modificar su morfología. Asimismo, el tratamiento impide la expresión de $\text{IP}_3\text{R1}$ y anexina 6. Estos efectos sugieren que el citoesqueleto de actina está implicado en el mantenimiento de la posición y las características neuroquímicas del orgánulo de cisternas (**Figura D-3**). Además de la presencia de ankirina G y de filamentos de actina, la localización de $\text{IP}_3\text{R1}$ en el SIA podría un papel estructural, ayudando a mantener el apilamiento de las cisternas (Takei et al., 1994). Asimismo, $\text{IP}_3\text{R1}$ también podría participar en el anclaje de las cisternas a la membrana plasmática por interacción con la ankirina G, como ha sido propuesto en los plasmareticulosomas (Davis et al., 1992). La pérdida de $\text{IP}_3\text{R1}$ en las neuritas de neuronas interferidas para ankirina G o tratadas con citocalasina D indica que podría existir esta interacción entre $\text{IP}_3\text{R1}$, ankirina G y el citoesqueleto de actina. Estas interacciones de $\text{IP}_3\text{R1}$ con proteínas de anclaje o del citoesqueleto pueden participar

en el reclutamiento de IP₃R1 en el SIA, ya que se ha demostrado que intervienen en su distribución heterogénea dentro del retículo endoplásmico (Vermassen et al., 2004). De hecho, los receptores de IP₃ son capaces de interactuar con filamentos de actina (Fujimoto et al., 1995) y la polimerización de actina modula la liberación de Ca²⁺ desde reservorios intracelulares (Wang et al., 2002).

La colocalización de anexina 6 e IP₃R1 en el SIA mostrada en nuestros resultados, también sugiere que la anexina 6 puede jugar un papel estructural en la asociación de la membrana plasmática y el orgánulo de cisternas y/o en la estabilización de microdominios inmunoreactivos para IP₃R1 en el SIA. Estudios previos han demostrado que la anexina 6 es capaz de interactuar de manera Ca²⁺ dependiente con dos membranas diferentes, agregándolas (Buzhynskyy et al., 2009; Gerke et al., 2005; Hayes et al., 2004a; Hayes et al., 2004b). Además, las anexinas han sido propuestas como proteínas mediadoras en la integración de estímulos de señalización mediados por Ca²⁺ con la arquitectura del citoesqueleto y la dinámica de actina en zonas de contacto con la membrana (Gerke et al., 2005; Hayes et al., 2004a; Hayes et al., 2004b). En particular, la anexina 6 interactúa de manera dependiente de Ca²⁺, con la forma de espectrina de cerebro, inhibiendo la F-actina (Watanabe et al., 1994). La anexina 6 podría crear en el citoesqueleto asociado a microdominios del SIA las condiciones necesarias para permitir la asociación de membranas, o la localización de IP₃R1 y otras moléculas implicadas en la señalización del Ca²⁺. Nuestro trabajo demuestra que la presencia de ankirina G y la integridad del citoesqueleto de actina son necesarias para la acumulación de IP₃R1 y anexina 6 en el SIA. Esto indica que las interacciones del citoesqueleto con anexina 6 e IP₃R1 son importantes para la regulación espacio-temporal de las concentraciones de Ca²⁺ en el SIA de neuronas hipocampales.

Nuestros experimentos describen como durante el desarrollo de las neuronas hipocampales en cultivo, sinaptopodina se expresa en el SIA y colocaliza con α -actinina tras la aparición y organización de otras moléculas relevantes para el desarrollo y la actividad del SIA (plkB α , CK2, ankirina G, canales de sodio) (**Figura D-3**). La aparición tardía de α -actinina coincide con estudios previos que muestran que su expresión comienza a los 10 días *in vitro* (Rao et al., 1998). De hecho, estudios realizados en el hipocampo y la neocorteza de la rata, indican que aunque α -actinina se expresa desde el primer día de desarrollo postnatal, su expresión aumenta progresivamente y su distribución madura durante las primeras semanas postnatales (Ratzliff and Soltesz, 2001; Wyszynski et al., 1998). El comienzo de la expresión de α -actinina y sinaptopodina en el SIA durante la segunda semana *in vitro* podría estar relacionado con el momento de aparición del orgánulo de cisternas y por tanto con la capacidad de regular Ca²⁺ del SIA. La distribución de α -actinina en el SIA también se ve afectada por el tratamiento con citocalasina D de acuerdo con datos anteriores que muestran que F-actina es responsable del anclaje y de la localización sináptica de α -actinina en espinas dendríticas (Allison et al., 2000).

Aunque no conocemos la función precisa de la α -actinina en el SIA es posible que participe en el anclaje de canales iónicos y de receptores. De hecho, la correcta localización de los canales de potasio activados por calcio (SK2 o KCa2.2) en la membrana plasmática de cardiomiocitos es dependiente de su interacción con α -actinina (Lu et al., 2009). En neuronas, α -actinina participa en la unión de subunidades del receptor NMDA al citoesqueleto, lo que posiblemente module la función del dicho receptor y su localización en espinas dendríticas (Wyszynski et al., 1998; Wyszynski et al., 1997). α -actinina también se une a CAMKII (Walikonis et al., 2001) y su asociación en espinas dendríticas depende de la presencia de F-actina (Allison et al., 2000; Allison et al., 1998). En el SIA, α -actinina podría modular indirectamente la actividad de cualquier proteína asociada al citoesqueleto de actina como espectrina β IV, canales de sodio (Rasband, 2010a), y CAMKII (Hund et al., 2010).

Las actininas son proteínas que se acumulan en diferentes tipos de uniones celulares, mayoritariamente en las adhesiones focales. Estas proteínas están asociadas al citoesqueleto submembranoso, donde crean una red isotrópica de filamentos de actina ramificados (Otey and Carpen, 2004; Pelletier et al., 2003). Además, estas proteínas pueden interactuar con diversas proteínas del citoesqueleto y proteínas asociadas a membrana (Blanchard et al., 1989). Entre las diferentes isoformas, la α -actinina 2 (forma sarcomérica) se expresa en cerebro (Walikonis et al., 2000; Walikonis et al., 2001; Wyszynski et al., 1997), donde aparece en la densidad postsináptica y el aparato de la espina de las espinas dendríticas (Wyszynski et al., 1998). Nuestros resultados indican que además de las espinas dendríticas, α -actinina es un componente del SIA en diferentes poblaciones neuronales, donde podría actuar entrecruzando filamentos de actina y potenciando la estabilidad del orgánulo de cisternas. La colocalización de α -actinina, sinaptopodina y los filamentos de actina indica una asociación funcional entre estas proteínas.

A nivel ultraestructural, α -actinina se distribuye en el orgánulo de cisternas del SIA de las neuronas piramidales de CA1, donde se encuentra asociado al material denso a los electrones localizado entre las membranas de las cisternas. Esta distribución es semejante a la descrita previamente para sinaptopodina (Bas Orth et al., 2007), lo cual sugiere que ambas proteínas pueden contribuir al mantenimiento de la estructura del orgánulo de cisternas.

En este estudio hemos descrito la existencia de un *orgánulo sacular gigante* que supone una especialización del SIA en una subpoblación de neuronas piramidales en la capa V de la neocorteza. Está formado por estructuras membranosas saculares y tubulares orientadas paralelamente al eje longitudinal del SIA. Aunque presenta puntos de contacto ocasionales con la membrana plasmática del SIA, este orgánulo parece corresponder a una diferenciación del componente central del retículo endoplásmico liso (Peters et al., 1991; Peters et al., 1968) ya que se localiza principalmente en una posición central en el SIA, y se extiende a lo largo de toda su longitud. Estas características contrastan con la presencia del orgánulo de cisternas, presente en las neuronas principales, en gran variedad de áreas y capas neocorticales y regiones del hipocampo, y que corresponde al componente periférico del retículo endoplásmico liso (Peters et al., 1991; Peters et al., 1968). Se desconoce la posible función del *orgánulo sacular gigante* y su posible implicación en el almacenamiento y la regulación de la liberación de Ca^{+2} , como se propone para el orgánulo de cisternas. El orgánulo sacular expresa sinaptopodina y α -actinina. A nivel ultraestructural, está asociado a microfilamentos que contactan con microtúbulos adyacentes o con la cara citoplásmica de la membrana plasmática, lo cual podría participar en el soporte estructural de este orgánulo. Esta organización es semejante a la que la α -actinina presenta en células musculares, donde forma un complejo con otras proteínas, incluida la miopodina (el equivalente a sinaptopodina células musculares) en el disco Z. En estas células, α -actinina participa en el ensamblaje del disco Z, en el entrecruzamiento antiparalelo de los filamentos de actina de los sarcómeros adyacentes, y en la asociación y estabilización de las miofibrillas al sarcolema (Faul et al., 2007; Linnemann et al., 2010; Weins et al., 2001).

7. Plasticidad en el segmento inicial del axón

Estudios recientes han demostrado que el SIA, pese a su alto contenido en complejos multiproteicos estabilizados a través de interacciones con el citoesqueleto, está sometido a procesos de plasticidad estructural en respuesta a alteraciones en la actividad neuronal, en los que intervienen mecanismos dependientes de Ca^{2+} y que producen alteraciones en la excitabilidad neuronal (Grubb and Burrone, 2010; Grubb et al., 2011; Kuba et al., 2010). Nuestros estudios relacionan la plasticidad del SIA

inducida por despolarización crónica mediante tratamientos con concentraciones elevadas con KCl, con alteraciones en el orgánulo de cisternas. Estudios previos demostraron que estos procesos de plasticidad del SIA dependen de la entrada de Ca^{2+} a través de canales dependientes de voltaje (Grubb and Burrone, 2010; Grubb et al., 2011). Las alteraciones en el orgánulo de cisternas consisten en una disminución en la expresión de sinaptopodina y la pérdida de inmunoreactividad para sinaptopodina y α -actinina en el SIA, que corresponden al orgánulo de cisternas el cual está implicado en la regulación de los niveles de Ca^{2+} . Sin embargo, el número y la forma de los elementos marcados para sinaptopodina no se ven afectados por el tratamiento con TTX, que inhibe la generación de potenciales de acción.

En podocitos, la sinaptopodina tiene una vida media de alrededor de 17 horas, y no presenta degradación por proteasoma sino por proteólisis mediada por calcineurina/catepsina (Faul et al., 2008). De hecho, sinaptopodina es fosforilada por PKA y CAMKII y desfosforilada por calcineurina, y esta desfosforilación permite la degradación mediada por catepsina (Faul et al., 2008). La pérdida de expresión de sinaptopodina en el SIA, inducida por despolarización, podría ser causada por degradación debido a un cambio en la actividad de CAMKII, cuya presencia se ha descrito en el SIA (Hund et al., 2010).

Estudios previos muestran que la pérdida de sinaptopodina produce la desaparición del orgánulo de cisternas en el SIA de neuronas hipocampales (Bas Orth et al., 2007) por lo que la despolarización crónica probablemente produce una desaparición del orgánulo de cisternas. Esto sugiere que además de la entrada de Ca^{2+} a través de canales de calcio tipo L (Grubb and Burrone, 2010) las modificaciones inducidas en el SIA debido al tratamiento con KCl alteran la regulación de los niveles de Ca^{2+} como resultado de la desaparición del orgánulo de cisternas.

Nuestros datos en neuronas hipocampales de ratón demuestran que el tratamiento con KCl produce un acortamiento del SIA, al desplazar distalmente el punto inicial y el punto de máxima inmunoreactividad para canales de sodio y ankirina G del SIA, y no afecta al límite distal del SIA (**Figura D-4**). Esto sugiere que la despolarización inducida por KCl reduce la expresión de ankirina G y canales de sodio en la región proximal. Estos datos discrepan parcialmente con los estudios de Grubb y Burrone (Grubb and Burrone, 2010) realizados en neuronas de hipocampo de rata, que

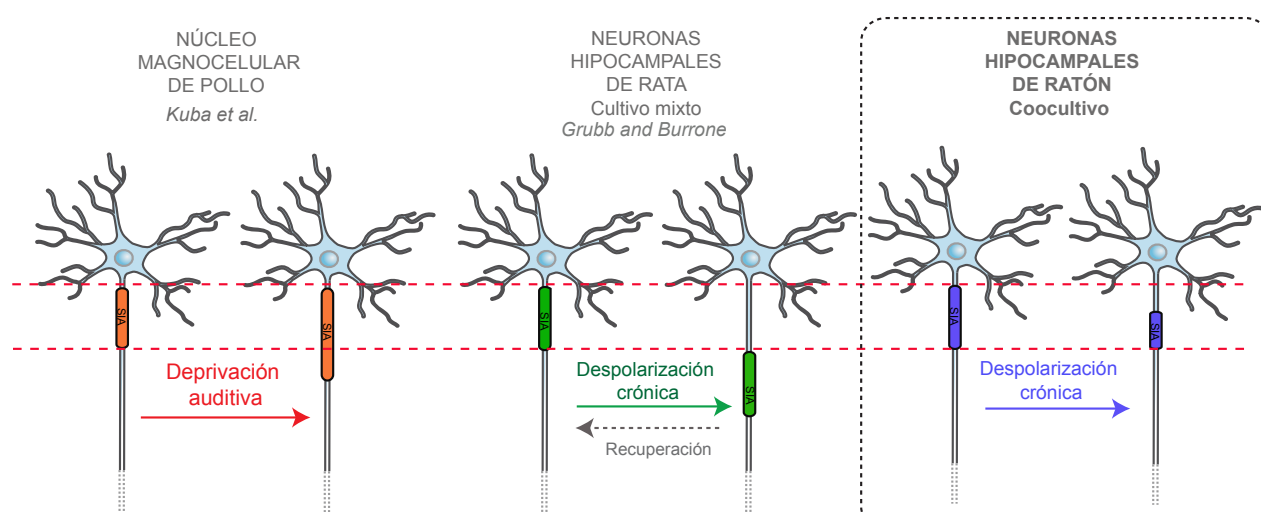
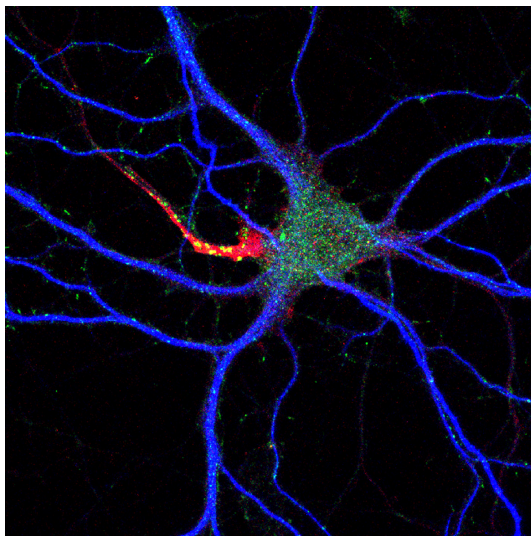


Figura D4. Plasticidad del SIA. Representación de los diferentes cambios plásticos en la longitud y la posición del SIA tras la deprivación de estímulos en neuronas del núcleo del cuerpo trapezoide del pollo (izquierda; (Kuba et al., 2010) o la despolarización crónica de cultivos mixtos de neuronas hipocampales de rata (centro; (Grubb and Burrone, 2010) y en los coocultivos de neuronas hipocampales de ratón (derecha; Presente trabajo).

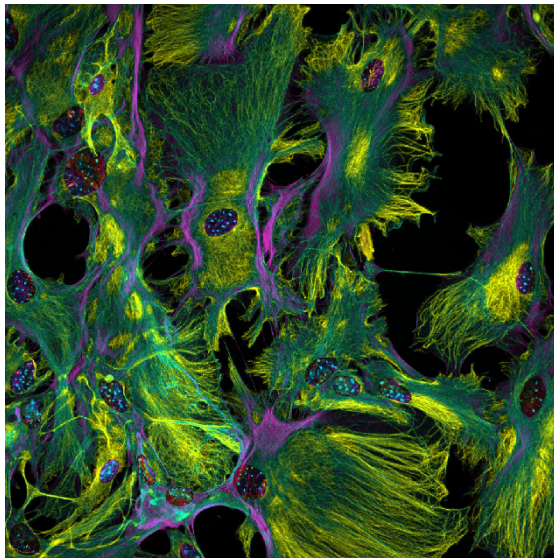
muestran un desplazamiento distal de todo el SIA a lo largo del axón, tanto del punto inicial como el máximo de fluorescencia y el límite distal. Estas diferencias pueden deberse a variabilidad entre especies, o a las diferencias entre el modelo y las condiciones de cultivo. Nuestros datos también muestran una reducción en la intensidad máxima de inmunofluorescencia para ankirina G pero no para canales de sodio de las células tratadas. Esto sugiere que la mayor expresión de ankirina G en neuronas control podría estar localizada en la región proximal del SIA, mientras que la expresión de los canales de sodio es o bien homogénea a lo largo de todo el SIA o mayor en la región distal. La desaparición del orgánulo de cisternas podría modificar la regulación de los niveles de Ca^{2+} del SIA y afectar a la distribución de ankirina G y canales de sodio en el SIA, como es el caso en las elevaciones de Ca^{2+} secundarias a condiciones isquémicas o lesiones axonales distales (Schafer et al., 2009b). El tratamiento de las neuronas con un agente despolimerizante (citocalasina D) que interfiere con la integridad del citoesqueleto de actina produce alteraciones similares en el patrón de distribución de ankirina G y canales de sodio en el SIA. Asimismo, el tratamiento con citocalasina D probablemente altere la estructura del orgánulo de cisternas ya que desestabiliza y produce un alargamiento de los elementos inmunoreactivos para sinaptopodina del SIA. Aunque no se ha demostrado experimentalmente, es probable que estas alteraciones afecten a la regulación de los niveles de Ca^{2+} del SIA. La similitud entre los cambios plásticos en la distribución de ankirina G y canales de sodio en el SIA producidos por tratamientos con KCl y citocalasina D indican que ambos podrían compartir algunos mecanismos. El hecho de que en ambos casos se altere la expresión de sinaptopodina en el SIA y como consecuencia la estabilidad del orgánulo de cisternas, sugieren que en ellos podría intervenir la desregulación de los niveles de Ca^{2+} en el SIA. Sin embargo, todas estas cuestiones requieren el respaldo experimental de futuros estudios.

En resumen, en este trabajo se ha contribuido al estudio de diversos aspectos relacionados con la composición y los mecanismos de formación del SIA, un subdominio axonal de gran importancia para la fisiología neuronal. Nuestros resultados evidencian el papel de las quinasas IKK y CK2 durante la adquisición de la polaridad neuronal y en la formación y mantenimiento del axón y el SIA. Ambas quinasas participan en la regulación de mecanismos implicados en la concentración de proteínas en el SIA, en los cuales, los microtúbulos parecen desempeñar un papel fundamental. Tras la localización de proteínas estructurales, se concentran en el SIA, gracias a distintas interacciones moleculares, canales de Na^+ y K^+ dependientes de voltaje indispensables para la generación de potenciales de acción. Estos se distribuyen en subdominios dentro del SIA, que difieren entre poblaciones neuronales lo que probablemente contribuye a la variabilidad de sus respuestas electrofisiológicas. Por último, la regulación de los niveles de calcio en el SIA, en los que probablemente interviene el orgánulo de cisternas, es un elemento importante para el mantenimiento estructural del SIA y participa en los mecanismos de plasticidad dependiente de actividad en el SIA



Conclusiones

1. El segmento inicial del axón (SIA) se forma en paralelo con el inicio de la elongación axonal y progresivamente se restringe a la región inicial del axón.
2. En cultivos de neuronas de hipocampo, la inhibición de la quinasa IKK α/β antes de la especificación del axón impide la formación del mismo. La inhibición posterior a la especificación axonal, o la expresión de un mutante no fosforilable de I κ B α impide la llegada al SIA de proteínas como ankirina G y canales de sodio dependientes de voltaje, esenciales para el mantenimiento de la estructura y la función del SIA.
3. La formación y mantenimiento del SIA depende de la actividad de caseína quinasa 2 (CK2), y su regulación sobre las modificaciones postraduccionales de la tubulina que afectan a la estabilidad de los microtúbulos. La ausencia de actividad de CK2 altera la distribución axonal de KIF5C e impide la concentración de CK2, pI κ B α , ankirina G y canales de sodio en el SIA.
4. Además de los canales de sodio sensibles a voltaje, el SIA de neuronas hipocampales expresa canales de potasio dependientes de voltaje de los tipos Kv1, Kv2 y Kv7, con patrones de distribución y aparición temporal específicos y cuya localización no depende de la integridad del citoesqueleto de actina, pero sí de la expresión de ankirina G.
5. El orgánulo de cisternas del SIA, implicado en la regulación de los niveles de Ca²⁺, se desarrolla durante la segunda semana *in vitro* en cultivos de neuronas hipocampales. Su estabilidad estructural y la expresión IP₃R1 y anexina 6 en el SIA son independientes del bloqueo de la generación de potenciales de acción. Sin embargo, dependen de la presencia de ankirina G durante el desarrollo del SIA y de la integridad del citoesqueleto de actina.
6. La existencia de microdominios que expresan IP₃R1 y anexina 6 en el SIA sugiere que el orgánulo de cisternas es un reservorio de Ca²⁺ sensible a IP₃ que podría regular los niveles intracelulares de Ca²⁺ y el mantenimiento estructural del SIA.
7. La proteína α -actinina 2 es un componente estructural que colocaliza con sinaptopodina y filamentos de F-actina en el orgánulo de cisternas del SIA de neuronas piramidales de la neocorteza y el hipocampo.
8. El SIA de una subpoblación de neuronas piramidales de capa V presenta una estructura de función desconocida que hemos denominado orgánulo sacular, formada por un conjunto de sacos y túbulos membranosos asociados a microfilamentos de F-actina e inmunoreactividad para sinaptopodina y α -actinina.
9. La despolarización crónica de neuronas hipocampales de ratón o la desorganización de los filamentos de actina produce una disminución de la inmunoreactividad para ankirina G y canales de sodio en la región proximal del SIA y un acortamiento del SIA. Esta despolarización va acompañada por la desaparición de sinaptopodina y α -actinina del orgánulo de cisternas lo que probablemente altere la capacidad de regulación de los niveles de Ca²⁺ en el SIA.



Bibliografia

- Akhmanova, A., Hoogenraad, C.C., 2005, Microtubule plus-end-tracking proteins: mechanisms and functions. *Curr Opin Cell Biol* 17, 47-54.
- Alarcon, M., Abrahams, B.S., Stone, J.L., Duvall, J.A., Perederiy, J.V., Bomar, J.M., Sebat, J., Wigler, M., Martin, C.L., Ledbetter, D.H., Nelson, S.F., Cantor, R.M., Geschwind, D.H., 2008, Linkage, association, and gene-expression analyses identify CNTNAP2 as an autism-susceptibility gene. *Am J Hum Genet* 82, 150-159.
- Allison, D.W., Chervin, A.S., Gelfand, V.I., Craig, A.M., 2000, Postsynaptic scaffolds of excitatory and inhibitory synapses in hippocampal neurons: maintenance of core components independent of actin filaments and microtubules. *J Neurosci* 20, 4545-4554.
- Allison, D.W., Gelfand, V.I., Spector, I., Craig, A.M., 1998, Role of actin in anchoring postsynaptic receptors in cultured hippocampal neurons: differential attachment of NMDA versus AMPA receptors. *J Neurosci* 18, 2423-2436.
- Ango, F., di Cristo, G., Higashiyama, H., Bennett, V., Wu, P., Huang, Z.J., 2004, Ankyrin-based subcellular gradient of neurofascin, an immunoglobulin family protein, directs GABAergic innervation at purkinje axon initial segment. *Cell* 119, 257-272.
- Antonucci, D.E., Lim, S.T., Vassanelli, S., Trimmer, J.S., 2001, Dynamic localization and clustering of dendritic Kv2.1 voltage-dependent potassium channels in developing hippocampal neurons. *Neuroscience* 108, 69-81.
- Araque, A., Navarrete, M., 2010, Glial cells in neuronal network function. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 365, 2375-2381.
- Arellano, J.I., DeFelipe, J., Munoz, A., 2002, PSA-NCAM immunoreactivity in chandelier cell axon terminals of the human temporal cortex. *Cereb Cortex* 12, 617-624.
- Arellano, J.I., Munoz, A., Ballesteros-Yanez, I., Sola, R.G., DeFelipe, J., 2004, Histopathology and reorganization of chandelier cells in the human epileptic sclerotic hippocampus. *Brain* 127, 45-64.
- Arimura, N., Menager, C., Fukata, Y., Kaibuchi, K., 2004, Role of CRMP-2 in neuronal polarity. *J Neurobiol* 58, 34-47.
- Arking, D.E., Cutler, D.J., Brune, C.W., Teslovich, T.M., West, K., Ikeda, M., Rea, A., Guy, M., Lin, S., Cook, E.H., Chakravarti, A., 2008, A common genetic variant in the neurexin superfamily member CNTNAP2 increases familial risk of autism. *Am J Hum Genet* 82, 160-164.
- Asada, N., Sanada, K., Fukada, Y., 2007, LKB1 regulates neuronal migration and neuronal differentiation in the developing neocortex through centrosomal positioning. *J Neurosci* 27, 11769-11775.
- Asanuma, K., Kim, K., Oh, J., Giardino, L., Chabanis, S., Faul, C., Reiser, J., Mundel, P., 2005, Synaptopodin regulates the actin-bundling activity of alpha-actinin in an isoform-specific manner. *J Clin Invest* 115, 1188-1198.
- Ayala, R., Shu, T., Tsai, L.H., 2007, Trekking across the brain: the journey of neuronal migration. *Cell* 128, 29-43.
- Azoitei, N., Wirth, T., Baumann, B., 2005, Activation of the IkkappaB kinase complex is sufficient for neuronal differentiation of PC12 cells. *J Neurochem* 93, 1487-1501.
- Baas, P.W., Black, M.M., 1990, Individual microtubules in the axon consist of domains that differ in both composition and stability. *J Cell Biol* 111, 495-509.
- Baas, P.W., Black, M.M., Banker, G.A., 1989, Changes in microtubule polarity orientation during the development of hippocampal neurons in culture. *J Cell Biol* 109, 3085-3094.
- Baas, P.W., Deitch, J.S., Black, M.M., Banker, G.A., 1988, Polarity orientation of microtubules in hippocampal neurons: uniformity in the axon and nonuniformity in the dendrite. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 8335-8339.
- Bain, J., Plater, L., Elliott, M., Shpiro, N., Hastie, C.J., McLauchlan, H., Klevernic, I., Arthur, J.S., Alessi, D.R., Cohen, P., 2007, The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J* 408, 297-315.
- Bakkaloglu, B., O'Roak, B.J., Louvi, A., Gupta, A.R., Abelson, J.F., Morgan, T.M., Chawarska, K., Klin, A., Ercan-Sencicek, A.G., Stillman, A.A., Tanriver, G., Abrahams, B.S., Duvall, J.A., Robbins, E.M., Geschwind, D.H., Biederer, T., Gunel, M., Lifton, R.P., State, M.W., 2008, Molecular cytogenetic analysis and resequencing of contactin associated protein-like 2 in autism spectrum disorders. *Am J Hum Genet* 82, 165-173.
- Barnes, A.P., Lilley, B.N., Pan, Y.A., Plummer, L.J., Powell, A.W., Raines, A.N., Sanes, J.R., Polleux, F., 2007, LKB1 and SAD kinases define a pathway required for the polarization of cortical neurons. *Cell* 129, 549-563.
- Barnes, A.P., Polleux, F., 2009, Establishment of axon-dendrite polarity in developing neurons. *Annu Rev Neurosci* 32, 347-381.
- Bas Orth, C., Schultz, C., Muller, C.M., Frotscher, M., Deller, T., 2007, Loss of the cisternal organelle in the axon initial segment of cortical neurons in synaptopodin-deficient mice. *J Comp Neurol* 504, 441-449.
- Bean, B.P., 2007, The action potential in mammalian central neurons. *Nat Rev Neurosci* 8, 451-465.
- Bekku, Y., Rauch, U., Ninomiya, Y., Oohashi, T., 2009, Brevican distinctively assembles extracellular components at the large diameter nodes of Ranvier in the CNS. *J Neurochem* 108, 1266-1276.

- Bender, K.J., Trussell, L.O., 2009, Axon initial segment Ca²⁺ channels influence action potential generation and timing. *Neuron* 61, 259-271.
- Bender, K.J., Uebele, V.N., Renger, J.J., Trussell, L.O., 2010, Control of firing patterns through modulation of axon initial segment T-type calcium channels. *J Physiol* 590, 109-118.
- Bender, K.J., Uebele, V.N., Renger, J.J., Trussell, L.O., 2012, Control of firing patterns through modulation of axon initial segment T-type calcium channels. *J Physiol* 590, 109-118.
- Benedeczky, I., Molnar, E., Somogyi, P., 1994, The cisternal organelle as a Ca(2+)-storing compartment associated with GABAergic synapses in the axon initial segment of hippocampal pyramidal neurones. *Exp Brain Res* 101, 216-230.
- Bennett, V., Baines, A.J., 2001, Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues. *Physiol Rev* 81, 1353-1392.
- Benz, J., Bergner, A., Hofmann, A., Demange, P., Gottig, P., Liemann, S., Huber, R., Voges, D., 1996, The structure of recombinant human annexin VI in crystals and membrane-bound. *J Mol Biol* 260, 638-643.
- Bhakar, A.L., Tannis, L.L., Zeindler, C., Russo, M.P., Jobin, C., Park, D.S., MacPherson, S., Barker, P.A., 2002, Constitutive nuclear factor-kappa B activity is required for central neuron survival. *J Neurosci* 22, 8466-8475.
- Blanchard, A., Ohanian, V., Critchley, D., 1989, The structure and function of alpha-actinin. *J Muscle Res Cell Motil* 10, 280-289.
- Blaustein, M.P., Golovina, V.A., 2001, Structural complexity and functional diversity of endoplasmic reticulum Ca(2+) stores. *Trends Neurosci* 24, 602-608.
- Boda, B., Dubos, A., Muller, D., 2010, Signaling mechanisms regulating synapse formation and function in mental retardation. *Curr Opin Neurobiol* 20, 519-527.
- Boiko, T., Vakulenko, M., Ewers, H., Yap, C.C., Norden, C., Winckler, B., 2007, Ankyrin-dependent and -independent mechanisms orchestrate axonal compartmentalization of L1 family members neurofascin and L1/neuron-glia cell adhesion molecule. *J Neurosci* 27, 590-603.
- Bootman, M.D., Collins, T.J., Peppiatt, C.M., Prothero, L.S., MacKenzie, L., De Smet, P., Travers, M., Tovey, S.C., Seo, J.T., Berridge, M.J., Ciccolini, F., Lipp, P., 2001, Calcium signalling--an overview. *Semin Cell Dev Biol* 12, 3-10.
- Bourgeron, T., 2009, A synaptic trek to autism. *Curr Opin Neurobiol* 19, 231-234.
- Brackenbury, W.J., Calhoun, J.D., Chen, C., Miyazaki, H., Nukina, N., Oyama, F., Ranscht, B., Isom, L.L., 2010, Functional reciprocity between Na⁺ channel Nav1.6 and beta1 subunits in the coordinated regulation of excitability and neurite outgrowth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 2283-2288.
- Bradke, F., Dotti, C.G., 1999, The role of local actin instability in axon formation. *Science* 283, 1931-1934.
- Brechet, A., Fache, M.P., Brachet, A., Ferracci, G., Baude, A., Irondelle, M., Pereira, S., Letierrier, C., Dargent, B., 2008, Protein kinase CK2 contributes to the organization of sodium channels in axonal membranes by regulating their interactions with ankyrin G. *J Cell Biol* 183, 1101-1114.
- Brown, D.A., Passmore, G.M., 2009, Neural KCNQ (Kv7) channels. *Br J Pharmacol* 156, 1185-1195.
- Bruckner, G., Szeoke, S., Pavlica, S., Grosche, J., Kacza, J., 2006, Axon initial segment ensheathed by extracellular matrix in perineuronal nets. *Neuroscience* 138, 365-375.
- Buffington, S.A., Rasband, M.N., 2011, The axon initial segment in nervous system disease and injury. *Eur J Neurosci* 34, 1609-1619.
- Buffington, S.A., Sobotzik, J.M., Schultz, C., Rasband, M.N., 2012, IkappaBalpha is not required for axon initial segment assembly. *Mol Cell Neurosci*.
- Buhl, E.H., Han, Z.S., Lorinczi, Z., Stezhka, V.V., Karnup, S.V., Somogyi, P., 1994, Physiological properties of anatomically identified axo-axonic cells in the rat hippocampus. *J Neurophysiol* 71, 1289-1307.
- Burbach, J.P., van der Zwaag, B., 2009, Contact in the genetics of autism and schizophrenia. *Trends Neurosci* 32, 69-72.
- Burkhardt, N., Kriebel, M., Kranz, E.U., Volkmer, H., 2007, Neurofascin regulates the formation of gephyrin clusters and their subsequent translocation to the axon hillock of hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci* 36, 59-70.
- Buzhynskyy, N., Golczak, M., Lai-Kee-Him, J., Lambert, O., Tessier, B., Gounou, C., Berat, R., Simon, A., Granier, T., Chevalier, J.M., Mazeris, S., Bandorowicz-Pikula, J., Pikula, S., Brisson, A.R., 2009, Annexin-A6 presents two modes of association with phospholipid membranes. A combined QCM-D, AFM and cryo-TEM study. *J Struct Biol* 168, 107-116.
- Caviness, V.S., Jr., Takahashi, T., 1995, Proliferative events in the cerebral ventricular zone. *Brain Dev* 17, 159-163.
- Clark, B.A., Monsivais, P., Branco, T., London, M., Hausser, M., 2005, The site of action potential initiation in cerebellar Purkinje neurons. *Nat Neurosci* 8, 137-139.
- Colbert, C.M., Johnston, D., 1996, Axonal action-potential initiation and Na⁺ channel densities in the soma and axon initial segment of subicular pyramidal neurons. *J Neurosci* 16, 6676-6686.
- Craig, A.M., Banker, G., 1994, Neuronal polarity. *Annu Rev Neurosci* 17, 267-310.
- Cruz, D.A., Weaver, C.L., Lovallo, E.M., Melchitzky, D.S., Lewis, D.A., 2009, Selective alterations in postsynaptic

markers of chandelier cell inputs to cortical pyramidal neurons in subjects with schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 34, 2112-2124.

- Chen, L.F., Greene, W.C., 2004, Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 392-401.
- Cheng, J.D., Ryseck, R.P., Attar, R.M., Dambach, D., Bravo, R., 1998, Functional redundancy of the nuclear factor kappa B inhibitors I kappa B alpha and I kappa B beta. *J Exp Med* 188, 1055-1062.
- Chung, H.J., Jan, Y.N., Jan, L.Y., 2006, Polarized axonal surface expression of neuronal KCNQ channels is mediated by multiple signals in the KCNQ2 and KCNQ3 C-terminal domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 8870-8875.
- Da Silva, J.S., Medina, M., Zuliani, C., Di Nardo, A., Witke, W., Dotti, C.G., 2003, RhoA/ROCK regulation of neuritegenesis via profilin Ila-mediated control of actin stability. *J Cell Biol* 162, 1267-1279.
- Dalski, A., Atici, J., Kreuz, F.R., Hellenbroich, Y., Schwinger, E., Zuhlke, C., 2005, Mutation analysis in the fibroblast growth factor 14 gene: frameshift mutation and polymorphisms in patients with inherited ataxias. *Eur J Hum Genet* 13, 118-120.
- Davis, J.Q., Bennett, V., 1984, Brain ankyrin. A membrane-associated protein with binding sites for spectrin, tubulin, and the cytoplasmic domain of the erythrocyte anion channel. *J Biol Chem* 259, 13550-13559.
- Davis, J.Q., Lambert, S., Bennett, V., 1996, Molecular composition of the node of Ranvier: identification of ankyrin-binding cell adhesion molecules neurofascin (mucin+/third FNIII domain-) and NrCAM at nodal axon segments. *J Cell Biol* 135, 1355-1367.
- Davis, J.Q., McLaughlin, T., Bennett, V., 1993, Ankyrin-binding proteins related to nervous system cell adhesion molecules: candidates to provide transmembrane and intercellular connections in adult brain. *J Cell Biol* 121, 121-133.
- Davis, L.H., Davis, J.Q., Bennett, V., 1992, Ankyrin regulation: an alternatively spliced segment of the regulatory domain functions as an intramolecular modulator. *J Biol Chem* 267, 18966-18972.
- Debanne, D., Campanac, E., Bialowas, A., Carlier, E., Alcaraz, G., 2011, Axon physiology. *Physiol Rev* 91, 555-602.
- DeFelipe, J., 1993, Neocortical neuronal diversity: chemical heterogeneity revealed by colocalization studies of classic neurotransmitters, neuropeptides, calcium-binding proteins, and cell surface molecules. *Cereb Cortex* 3, 273-289.
- DeFelipe, J., 1997, Types of neurons, synaptic connections and chemical characteristics of cells immunoreactive for calbindin-D28K, parvalbumin and calretinin in the neocortex. *J Chem Neuroanat* 14, 1-19.
- DeFelipe, J., Arellano, J.I., Gomez, A., Azmitia, E.C., Munoz, A., 2001, Pyramidal cell axons show a local specialization for GABA and 5-HT inputs in monkey and human cerebral cortex. *J Comp Neurol* 433, 148-155.
- Defelipe, J., Gonzalez-Albo, M.C., Del Rio, M.R., Elston, G.N., 1999, Distribution and patterns of connectivity of interneurons containing calbindin, calretinin, and parvalbumin in visual areas of the occipital and temporal lobes of the macaque monkey. *J Comp Neurol* 412, 515-526.
- Delmas, P., Brown, D.A., 2002, Junctional signaling microdomains: bridging the gap between the neuronal cell surface and Ca²⁺ stores. *Neuron* 36, 787-790.
- Deller, T., Korte, M., Chabanis, S., Drakew, A., Schwegler, H., Stefani, G.G., Zuniga, A., Schwarz, K., Bonhoeffer, T., Zeller, R., Frotscher, M., Mundel, P., 2003, Synaptopodin-deficient mice lack a spine apparatus and show deficits in synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10494-10499.
- Denisenko-Nehrbass, N., Goutebroze, L., Galvez, T., Bonnon, C., Stankoff, B., Ezan, P., Giovannini, M., Faivre-Sarrailh, C., Girault, J.A., 2003, Association of Caspr/paranodin with tumour suppressor schwannomin/merlin and beta1 integrin in the central nervous system. *J Neurochem* 84, 209-221.
- Devaux, J.J., Kleopa, K.A., Cooper, E.C., Scherer, S.S., 2004, KCNQ2 is a nodal K⁺ channel. *J Neurosci* 24, 1236-1244.
- Diaz-Munoz, M., Hamilton, S.L., Kaetzel, M.A., Hazarika, P., Dedman, J.R., 1990, Modulation of Ca²⁺ release channel activity from sarcoplasmic reticulum by annexin VI (67-kDa calcimedlin). *J Biol Chem* 265, 15894-15899.
- Dotti, C.G., Sullivan, C.A., Banker, G.A., 1988, The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 8, 1454-1468.
- Dours-Zimmermann, M.T., Maurer, K., Rauch, U., Stoffel, W., Fassler, R., Zimmermann, D.R., 2009, Versican V2 assembles the extracellular matrix surrounding the nodes of ranvier in the CNS. *J Neurosci* 29, 7731-7742.
- Dzhashiashvili, Y., Zhang, Y., Galinska, J., Lam, I., Grumet, M., Salzer, J.L., 2007, Nodes of Ranvier and axon initial segments are ankyrin G-dependent domains that assemble by distinct mechanisms. *J Cell Biol* 177, 857-870.
- Esch, T., Lemmon, V., Banker, G., 1999, Local presentation of substrate molecules directs axon specification by cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 19, 6417-6426.
- Etienne-Manneville, S., Hall, A., 2003, Cell polarity: Par6, aPKC and cytoskeletal crosstalk. *Curr Opin Cell Biol* 15, 67-72.
- Fairén A, D.J.a.R.J., 1984, Non piramidal neurons . General account. *Cerebral Cortex . Cellular components*

of the Cerebral Cortex Vol.1, pp. 201 -253.

- Faul, C., Dhume, A., Schecter, A.D., Mundel, P., 2007, Protein kinase A, Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II, and calcineurin regulate the intracellular trafficking of myopodin between the Z-disc and the nucleus of cardiac myocytes. *Mol Cell Biol* 27, 8215-8227.
- Faul, C., Donnelly, M., Merscher-Gomez, S., Chang, Y.H., Franz, S., Delfgaauw, J., Chang, J.M., Choi, H.Y., Campbell, K.N., Kim, K., Reiser, J., Mundel, P., 2008, The actin cytoskeleton of kidney podocytes is a direct target of the antiproteinuric effect of cyclosporine A. *Nat Med* 14, 931-938.
- Ferreira, M.A., O'Donovan, M.C., Meng, Y.A., Jones, I.R., Ruderfer, D.M., Jones, L., Fan, J., Kirov, G., Perlis, R.H., Green, E.K., Smoller, J.W., Grozeva, D., Stone, J., Nikolov, I., Chambert, K., Hamshere, M.L., Nimgaonkar, V.L., Moskvina, V., Thase, M.E., Caesar, S., Sachs, G.S., Franklin, J., Gordon-Smith, K., Ardlie, K.G., Gabriel, S.B., Fraser, C., Blumenstiel, B., Defelice, M., Breen, G., Gill, M., Morris, D.W., Elkin, A., Muir, W.J., McGhee, K.A., Williamson, R., MacIntyre, D.J., MacLean, A.W., St, C.D., Robinson, M., Van Beck, M., Pereira, A.C., Kandaswamy, R., McQuillin, A., Collier, D.A., Bass, N.J., Young, A.H., Lawrence, J., Ferrier, I.N., Anjorin, A., Farmer, A., Curtis, D., Scolnick, E.M., McGuffin, P., Daly, M.J., Corvin, A.P., Holmans, P.A., Blackwood, D.H., Gurling, H.M., Owen, M.J., Purcell, S.M., Sklar, P., Craddock, N., 2008, Collaborative genome-wide association analysis supports a role for ANK3 and CACNA1C in bipolar disorder. *Nat Genet* 40, 1056-1058.
- Friedman, J.I., Vrijenhoek, T., Markx, S., Janssen, I.M., van der Vliet, W.A., Faas, B.H., Knoers, N.V., Cahn, W., Kahn, R.S., Edelmann, L., Davis, K.L., Silverman, J.M., Brunner, H.G., van Kessel, A.G., Wijmenga, C., Ophoff, R.A., Veltman, J.A., 2008, CNTNAP2 gene dosage variation is associated with schizophrenia and epilepsy. *Mol Psychiatry* 13, 261-266.
- Fujimoto, T., Miyawaki, A., Mikoshiba, K., 1995, Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-like protein in plasmalemmal caveolae is linked to actin filaments. *J Cell Sci* 108 (Pt 1), 7-15.
- Fukushima, N., Furuta, D., Hidaka, Y., Moriyama, R., Tsujiuchi, T., 2009, Post-translational modifications of tubulin in the nervous system. *J Neurochem* 109, 683-693.
- Galiano, M.R., Jha, S., Ho, T.S., Zhang, C., Ogawa, Y., Chang, K.J., Stankewich, M.C., Mohler, P.J., Rasband, M.N., 2012, A Distal Axonal Cytoskeleton Forms an Intra-Axonal Boundary that Controls Axon Initial Segment Assembly. *Cell* 149, 1125-1139.
- Garrido, J.J., Giraud, P., Carlier, E., Fernandes, F., Moussif, A., Fache, M.P., Debanne, D., Dargent, B., 2003, A targeting motif involved in sodium channel clustering at the axonal initial segment. *Science* 300, 2091-2094.
- Garrido, J.J., Simon, D., Varea, O., Wandosell, F., 2007, GSK3 alpha and GSK3 beta are necessary for axon formation. *FEBS Lett* 581, 1579-1586.
- Gerke, V., Creutz, C.E., Moss, S.E., 2005, Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 449-461.
- Gerke, V., Moss, S.E., 2002, Annexins: from structure to function. *Physiol Rev* 82, 331-371.
- Ghosh, S., Hayden, M.S., 2008, New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nat Rev Immunol* 8, 837-848.
- Gietz, R.D., Graham, K.C., Litchfield, D.W., 1995, Interactions between the subunits of casein kinase II. *J Biol Chem* 270, 13017-13021.
- Girault, J.A., Oguievetskaia, K., Carnaud, M., Denisenko-Nehrbass, N., Goutebroze, L., 2003, Transmembrane scaffolding proteins in the formation and stability of nodes of Ranvier. *Biol Cell* 95, 447-452.
- Goldberg, E.M., Clark, B.D., Zaghera, E., Nahmani, M., Erisir, A., Rudy, B., 2008, K⁺ channels at the axon initial segment dampen near-threshold excitability of neocortical fast-spiking GABAergic interneurons. *Neuron* 58, 387-400.
- Goldfarb, M., 2012, Voltage-gated sodium channel-associated proteins and alternative mechanisms of inactivation and block. *Cell Mol Life Sci* 69, 1067-1076.
- Goldfarb, M., Schoorlemmer, J., Williams, A., Diwakar, S., Wang, Q., Huang, X., Giza, J., Tchetchik, D., Kelley, K., Vega, A., Matthews, G., Rossi, P., Ornitz, D.M., D'Angelo, E., 2007, Fibroblast growth factor homologous factors control neuronal excitability through modulation of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 55, 449-463.
- Goold, R.G., Gordon-Weeks, P.R., 2004, Glycogen synthase kinase 3beta and the regulation of axon growth. *Biochem Soc Trans* 32, 809-811.
- Goold, R.G., Owen, R., Gordon-Weeks, P.R., 1999, Glycogen synthase kinase 3beta phosphorylation of microtubule-associated protein 1B regulates the stability of microtubules in growth cones. *J Cell Sci* 112 (Pt 19), 3373-3384.
- Govek, E.E., Newey, S.E., Van Aelst, L., 2005, The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes Dev* 19, 1-49.
- Grubb, M.S., Burrone, J., 2010, Activity-dependent relocation of the axon initial segment fine-tunes neuronal excitability. *Nature* 465, 1070-1074.
- Grubb, M.S., Shu, Y., Kuba, H., Rasband, M.N., Wimmer, V.C., Bender, K.J., 2011, Short- and long-term plasticity at the axon initial segment. *J Neurosci* 31, 16049-16055.
- Grundemann, J., Hausser, M., 2010, Neuroscience: A plastic axonal hotspot. *Nature* 465, 1022-1023.

- Gu, C., Barry, J., 2011, Function and mechanism of axonal targeting of voltage-sensitive potassium channels. *Prog Neurobiol* 94, 115-132.
- Gutierrez, H., Hale, V.A., Dolcet, X., Davies, A., 2005, NF-kappaB signalling regulates the growth of neural processes in the developing PNS and CNS. *Development* 132, 1713-1726.
- Hatanaka, Y., Murakami, F., 2002, In vitro analysis of the origin, migratory behavior, and maturation of cortical pyramidal cells. *J Comp Neurol* 454, 1-14.
- Hayes, M.J., Merrifield, C.J., Shao, D., Ayala-Sanmartin, J., Schorey, C.D., Levine, T.P., Proust, J., Curran, J., Bailly, M., Moss, S.E., 2004a, Annexin 2 binding to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate on endocytic vesicles is regulated by the stress response pathway. *J Biol Chem* 279, 14157-14164.
- Hayes, M.J., Rescher, U., Gerke, V., Moss, S.E., 2004b, Annexin-actin interactions. *Traffic* 5, 571-576.
- Hazarika, P., Kaetzel, M.A., Sheldon, A., Karin, N.J., Fleischer, S., Nelson, T.E., Dedman, J.R., 1991, Annexin VI is associated with calcium-sequestering organelles. *J Cell Biochem* 46, 78-85.
- Hedstrom, K.L., Ogawa, Y., Rasband, M.N., 2008, AnkyrinG is required for maintenance of the axon initial segment and neuronal polarity. *J Cell Biol* 183, 635-640.
- Hedstrom, K.L., Xu, X., Ogawa, Y., Frischknecht, R., Seidenbecher, C.I., Shrager, P., Rasband, M.N., 2007, Neurofascin assembles a specialized extracellular matrix at the axon initial segment. *J Cell Biol* 178, 875-886.
- Hill, A.S., Nishino, A., Nakajo, K., Zhang, G., Fineman, J.R., Selzer, M.E., Okamura, Y., Cooper, E.C., 2008, Ion channel clustering at the axon initial segment and node of Ranvier evolved sequentially in early chordates. *PLoS Genet* 4, e1000317.
- Hirokawa, N., Takemura, R., 2005, Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. *Nat Rev Neurosci* 6, 201-214.
- Hofmann, A., Benz, J., Liemann, S., Huber, R., 1997, Voltage dependent binding of annexin V, annexin VI and annexin VII-core to acidic phospholipid membranes. *Biochim Biophys Acta* 1330, 254-264.
- Horresh, I., Poliak, S., Grant, S., Bredt, D., Rasband, M.N., Peles, E., 2008, Multiple molecular interactions determine the clustering of Caspr2 and Kv1 channels in myelinated axons. *J Neurosci* 28, 14213-14222.
- Hortsch, M., Nagaraj, K., Godenschwege, T.A., 2009, The interaction between L1-type proteins and ankyrins-a master switch for L1-type CAM function. *Cell Mol Biol Lett* 14, 57-69.
- Hu, W., Tian, C., Li, T., Yang, M., Hou, H., Shu, Y., 2009, Distinct contributions of Na(v)1.6 and Na(v)1.2 in action potential initiation and backpropagation. *Nat Neurosci* 12, 996-1002.
- Huang, Z.J., Di Cristo, G., Ango, F., 2007, Development of GABA innervation in the cerebral and cerebellar cortices. *Nat Rev Neurosci* 8, 673-686.
- Hubbert, C., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., Yoshida, M., Wang, X.F., Yao, T.P., 2002, HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* 417, 455-458.
- Hund, T.J., Koval, O.M., Li, J., Wright, P.J., Qian, L., Snyder, J.S., Gudmundsson, H., Kline, C.F., Davidson, N.P., Cardona, N., Rasband, M.N., Anderson, M.E., Mohler, P.J., 2010, A beta(IV)-spectrin/CaMKII signaling complex is essential for membrane excitability in mice. *J Clin Invest* 120, 3508-3519.
- Hur, E.M., Zhou, F.Q., 2010, GSK3 signalling in neural development. *Nat Rev Neurosci* 11, 539-551.
- Inagaki, N., Chihara, K., Arimura, N., Menager, C., Kawano, Y., Matsuo, N., Nishimura, T., Amano, M., Kaibuchi, K., 2001, CRMP-2 induces axons in cultured hippocampal neurons. *Nat Neurosci* 4, 781-782.
- Inda, M.C., DeFelipe, J., Munoz, A., 2006, Voltage-gated ion channels in the axon initial segment of human cortical pyramidal cells and their relationship with chandelier cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 2920-2925.
- Jedlicka, P., Vlachos, A., Schwarzacher, S.W., Deller, T., 2008, A role for the spine apparatus in LTP and spatial learning. *Behav Brain Res* 192, 12-19.
- Jenkins, S.M., Bennett, V., 2001, Ankyrin-G coordinates assembly of the spectrin-based membrane skeleton, voltage-gated sodium channels, and L1 CAMs at Purkinje neuron initial segments. *J Cell Biol* 155, 739-746.
- Jensen, C.S., Rasmussen, H.B., Misonou, H., 2011, Neuronal trafficking of voltage-gated potassium channels. *Mol Cell Neurosci* 48, 288-297.
- Jiang, H., Guo, W., Liang, X., Rao, Y., 2005, Both the establishment and the maintenance of neuronal polarity require active mechanisms: critical roles of GSK-3beta and its upstream regulators. *Cell* 120, 123-135.
- John, N., Krugel, H., Frischknecht, R., Smalla, K.H., Schultz, C., Kreutz, M.R., Gundelfinger, E.D., Seidenbecher, C.I., 2006, Brevican-containing perineuronal nets of extracellular matrix in dissociated hippocampal primary cultures. *Mol Cell Neurosci* 31, 774-784.
- Johnston, J., Griffin, S.J., Baker, C., Skrzypiec, A., Chernova, T., Forsythe, I.D., 2008, Initial segment Kv2.2 channels mediate a slow delayed rectifier and maintain high frequency action potential firing in medial nucleus of the trapezoid body neurons. *J Physiol* 586, 3493-3509.
- Jope, R.S., Johnson, G.V., 2004, The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci* 29, 95-102.
- Kaech, S., Banker, G., 2007, Culturing hippocampal neurons. *Nat Protoc* 1, 2406-2415.

- Kaltschmidt, B., Uherek, M., Wellmann, H., Volk, B., Kaltschmidt, C., 1999, Inhibition of NF-kappaB potentiates amyloid beta-mediated neuronal apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9409-9414.
- Kandel, S.T., Jessel TM, 2000, *Principles of Neural Science*, Vol 4th Edition. McGraw-Hill., New York: .
- Kaphzan, H., Buffington, S.A., Jung, J.I., Rasband, M.N., Klann, E., 2011, Alterations in intrinsic membrane properties and the axon initial segment in a mouse model of Angelman syndrome. *J Neurosci* 31, 17637-17648.
- Karin, M., Ben-Neriah, Y., 2000, Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* 18, 621-663.
- Karin, M., Lin, A., 2002, NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 3, 221-227.
- Kim, W.Y., Zhou, F.Q., Zhou, J., Yokota, Y., Wang, Y.M., Yoshimura, T., Kaibuchi, K., Woodgett, J.R., Anton, E.S., Snider, W.D., 2006, Essential roles for GSK-3s and GSK-3-primed substrates in neurotrophin-induced and hippocampal axon growth. *Neuron* 52, 981-996.
- Kneussel, M., Brandstatter, J.H., Laube, B., Stahl, S., Muller, U., Betz, H., 1999, Loss of postsynaptic GABA(A) receptor clustering in gephyrin-deficient mice. *J Neurosci* 19, 9289-9297.
- Ko, J., Humbert, S., Bronson, R.T., Takahashi, S., Kulkarni, A.B., Li, E., Tsai, L.H., 2001, p35 and p39 are essential for cyclin-dependent kinase 5 function during neurodevelopment. *J Neurosci* 21, 6758-6771.
- Kobayashi, T., Storrie, B., Simons, K., Dotti, C.G., 1992, A functional barrier to movement of lipids in polarized neurons. *Nature* 359, 647-650.
- Kole, M.H., IIschner, S.U., Kampa, B.M., Williams, S.R., Ruben, P.C., Stuart, G.J., 2008, Action potential generation requires a high sodium channel density in the axon initial segment. *Nat Neurosci* 11, 178-186.
- Kole, M.H., Letzkus, J.J., Stuart, G.J., 2007, Axon initial segment Kv1 channels control axonal action potential waveform and synaptic efficacy. *Neuron* 55, 633-647.
- Kole, M.H., Stuart, G.J., 2012, Signal processing in the axon initial segment. *Neuron* 73, 235-247.
- Komada, M., Soriano, P., 2002, [Beta]IV-spectrin regulates sodium channel clustering through ankyrin-G at axon initial segments and nodes of Ranvier. *J Cell Biol* 156, 337-348.
- Konig, H.-G., Fenner, B.J., Schwamborn, R.F., Bernas, T., Prehn, J.H., 2011, Fibroblast growth factor homologous factor 1 (FHF1/FGF12) regulates neuronal morphology by interaction with NEMO/IKKy in the axon-initial segment of adult neurons and negative modulation of constitutive NF-kB signaling. *IBRO 8th World Congress of Neuroscience*. 2011
- Konishi, Y., Setou, M., 2009, Tubulin tyrosination navigates the kinesin-1 motor domain to axons. *Nat Neurosci* 12, 559-567.
- Kordeli, E., Lambert, S., Bennett, V., 1995, AnkyrinG. A new ankyrin gene with neural-specific isoforms localized at the axonal initial segment and node of Ranvier. *J Biol Chem* 270, 2352-2359.
- Kosaka, T., 1980, The axon initial segment as a synaptic site: ultrastructure and synaptology of the initial segment of the pyramidal cell in the rat hippocampus (CA3 region). *J Neurocytol* 9, 861-882.
- Kremerskothen, J., Plaas, C., Kindler, S., Frotscher, M., Barnekow, A., 2005, Synaptopodin, a molecule involved in the formation of the dendritic spine apparatus, is a dual actin/alpha-actinin binding protein. *J Neurochem* 92, 597-606.
- Kriebel, M., Metzger, J., Trinks, S., Chugh, D., Harvey, R.J., Harvey, K., Volkmer, H., 2011, The cell adhesion molecule neurofascin stabilizes axo-axonic GABAergic terminals at the axon initial segment. *J Biol Chem* 286, 24385-24393.
- Kuba, H., Oichi, Y., Ohmori, H., 2010, Presynaptic activity regulates Na(+) channel distribution at the axon initial segment. *Nature* 465, 1075-1078.
- Lacas-Gervais, S., Guo, J., Strenzke, N., Scarfone, E., Kolpe, M., Jahkel, M., De Camilli, P., Moser, T., Rasband, M.N., Solimena, M., 2004, BetaIVSigma1 spectrin stabilizes the nodes of Ranvier and axon initial segments. *J Cell Biol* 166, 983-990.
- Laezza, F., Gerber, B.R., Lou, J.Y., Kozel, M.A., Hartman, H., Craig, A.M., Ornitz, D.M., Nerbonne, J.M., 2007, The FGF14(F145S) mutation disrupts the interaction of FGF14 with voltage-gated Na+ channels and impairs neuronal excitability. *J Neurosci* 27, 12033-12044.
- Laezza, F., Lampert, A., Kozel, M.A., Gerber, B.R., Rush, A.M., Nerbonne, J.M., Waxman, S.G., Dib-Hajj, S.D., Ornitz, D.M., 2009, FGF14 N-terminal splice variants differentially modulate Nav1.2 and Nav1.6-encoded sodium channels. *Mol Cell Neurosci* 42, 90-101.
- Lagace, D.C., Benavides, D.R., Kansy, J.W., Mapelli, M., Greengard, P., Bibb, J.A., Eisch, A.J., 2008, Cdk5 is essential for adult hippocampal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 18567-18571.
- Lai, H.C., Jan, L.Y., 2006, The distribution and targeting of neuronal voltage-gated ion channels. *Nat Rev Neurosci* 7, 548-562.
- Lemaillet, G., Walker, B., Lambert, S., 2003, Identification of a conserved ankyrin-binding motif in the family of sodium channel alpha subunits. *J Biol Chem* 278, 27333-27339.
- Lencsova, L., O'Neill, A., Resneck, W.G., Bloch, R.J., Blaustein, M.P., 2004, Plasma membrane-cytoskeleton-endoplasmic reticulum complexes in neurons and astrocytes. *J Biol Chem* 279, 2885-2893.
- Leterrier, C., Vacher, H., Fache, M.P., d'Ortoli, S.A., Castets, F., Autillio-Touati, A., Dargent, B., 2011, End-

binding proteins EB3 and EB1 link microtubules to ankyrin G in the axon initial segment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 8826-8831.

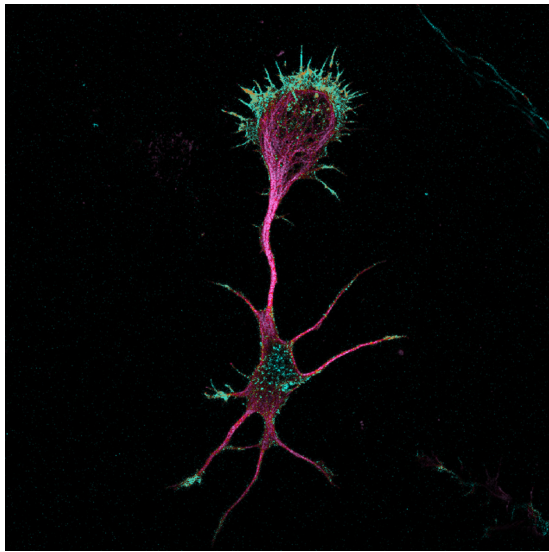
- Lewis, D.A., 2011, The chandelier neuron in schizophrenia. *Dev Neurobiol* 71, 118-127.
- Li, X., Kumar, Y., Zempel, H., Mandelkow, E.M., Biernat, J., Mandelkow, E., 2011, Novel diffusion barrier for axonal retention of Tau in neurons and its failure in neurodegeneration. *Embo J* 30, 4825-4837.
- Lim, A.C., Tiu, S.Y., Li, Q., Qi, R.Z., 2004, Direct regulation of microtubule dynamics by protein kinase CK2. *J Biol Chem* 279, 4433-4439.
- Lim, S.T., Antonucci, D.E., Scannevin, R.H., Trimmer, J.S., 2000, A novel targeting signal for proximal clustering of the Kv2.1 K⁺ channel in hippocampal neurons. *Neuron* 25, 385-397.
- Linnemann, A., van der Ven, P.F., Vakeel, P., Albinus, B., Simonis, D., Bendas, G., Schenk, J.A., Micheel, B., Kley, R.A., Furst, D.O., 2010, The sarcomeric Z-disc component myopodin is a multiadapter protein that interacts with filamin and alpha-actinin. *Eur J Cell Biol* 89, 681-692.
- Lorente de N6, P., 1938, *Architectonics and structure of the cerebral cortex*. Oxford University Press, New York, 291-330 pp.
- Lorincz, A., Nusser, Z., 2008, Cell-type-dependent molecular composition of the axon initial segment. *J Neurosci* 28, 14329-14340.
- Lu, L., Timofeyev, V., Li, N., Rafizadeh, S., Singapuri, A., Harris, T.R., Chiamvimonvat, N., 2009, Alpha-actinin2 cytoskeletal protein is required for the functional membrane localization of a Ca²⁺-activated K⁺ channel (SK2 channel). *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 18402-18407.
- Macara, I.G., 2004, Par proteins: partners in polarization. *Curr Biol* 14, R160-162.
- Manning, B.D., Cantley, L.C., 2007, AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129, 1261-1274.
- Marin, O., Rubenstein, J.L., 2003, Cell migration in the forebrain. *Annu Rev Neurosci* 26, 441-483.
- Martin, M.S., Tang, B., Papale, L.A., Yu, F.H., Catterall, W.A., Escayg, A., 2007, The voltage-gated sodium channel *Scn8a* is a genetic modifier of severe myoclonic epilepsy of infancy. *Hum Mol Genet* 16, 2892-2899.
- Mathey, E.K., Derfuss, T., Storch, M.K., Williams, K.R., Hales, K., Woolley, D.R., Al-Hayani, A., Davies, S.N., Rasband, M.N., Olsson, T., Moldenhauer, A., Velhin, S., Hohlfeld, R., Meinl, E., Lington, C., 2007, Neurofascin as a novel target for autoantibody-mediated axonal injury. *J Exp Med* 204, 2363-2372.
- Meeks, J.P., Mennerick, S., 2007, Action potential initiation and propagation in CA3 pyramidal axons. *J Neurophysiol* 97, 3460-3472.
- Misawa, T., Mizusawa, H., 2010, [Anti-VGKC antibody-associated limbic encephalitis/Morvan syndrome]. *Brain Nerve* 62, 339-345.
- Misonou, H., Mohapatra, D.P., Park, E.W., Leung, V., Zhen, D., Misonou, K., Anderson, A.E., Trimmer, J.S., 2004, Regulation of ion channel localization and phosphorylation by neuronal activity. *Nat Neurosci* 7, 711-718.
- Misonou, H., Mohapatra, D.P., Trimmer, J.S., 2005, Kv2.1: a voltage-gated k⁺ channel critical to dynamic control of neuronal excitability. *Neurotoxicology* 26, 743-752.
- Mohapatra, D.P., Trimmer, J.S., 2006, The Kv2.1 C terminus can autonomously transfer Kv2.1-like phosphorylation-dependent localization, voltage-dependent gating, and muscarinic modulation to diverse Kv channels. *J Neurosci* 26, 685-695.
- Monastyrskaya, K., Babiychuk, E.B., Hostettler, A., Wood, P., Grewal, T., Draeger, A., 2009, Plasma membrane-associated annexin A6 reduces Ca²⁺ entry by stabilizing the cortical actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 284, 17227-17242.
- Moreno, F.J., Diaz-Nido, J., Jimenez, J.S., Avila, J., 1999, Distribution of CK2, its substrate MAP1B and phosphatases in neuronal cells. *Mol Cell Biochem* 191, 201-205.
- Nadarajah, B., Alifragis, P., Wong, R.O., Parnavelas, J.G., 2003, Neuronal migration in the developing cerebral cortex: observations based on real-time imaging. *Cereb Cortex* 13, 607-611.
- Nakada, C., Ritchie, K., Oba, Y., Nakamura, M., Hotta, Y., Iino, R., Kasai, R.S., Yamaguchi, K., Fujiwara, T., Kusumi, A., 2003, Accumulation of anchored proteins forms membrane diffusion barriers during neuronal polarization. *Nat Cell Biol* 5, 626-632.
- Nakata, T., Hirokawa, N., 2003, Microtubules provide directional cues for polarized axonal transport through interaction with kinesin motor head. *J Cell Biol* 162, 1045-1055.
- Nakata, T., Niwa, S., Okada, Y., Perez, F., Hirokawa, N., 2011, Preferential binding of a kinesin-1 motor to GTP-tubulin-rich microtubules underlies polarized vesicle transport. *J Cell Biol* 194, 245-255.
- Neves, G., Cooke, S.F., Bliss, T.V., 2008, Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat Rev Neurosci* 9, 65-75.
- Nishimura, K., Akiyama, H., Komada, M., Kamiguchi, H., 2007, betaIV-spectrin forms a diffusion barrier against L1CAM at the axon initial segment. *Mol Cell Neurosci* 34, 422-430.
- North, B.J., Marshall, B.L., Borra, M.T., Denu, J.M., Verdin, E., 2003, The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase. *Mol Cell* 11, 437-444.
- Nusser, Z., 2009, Differential subcellular distribution of ion channels and the diversity of neuronal function. *Curr Opin Neurobiol*.

- Ogawa, Y., Horresh, I., Trimmer, J.S., Bredt, D.S., Peles, E., Rasband, M.N., 2008, Postsynaptic density-93 clusters Kv1 channels at axon initial segments independently of Caspr2. *J Neurosci* 28, 5731-5739.
- Ogawa, Y., Oses-Prieto, J., Kim, M.Y., Horresh, I., Peles, E., Burlingame, A.L., Trimmer, J.S., Meijer, D., Rasband, M.N., 2010, ADAM22, a Kv1 channel-interacting protein, recruits membrane-associated guanylate kinases to juxtaparanodes of myelinated axons. *J Neurosci* 30, 1038-1048.
- Otey, C.A., Carpen, O., 2004, Alpha-actinin revisited: a fresh look at an old player. *Cell Motil Cytoskeleton* 58, 104-111.
- Palay, S.L., Sotelo, C., Peters, A., Orkand, P.M., 1968, The axon hillock and the initial segment. *J Cell Biol* 38, 193-201.
- Palmer, L.M., Stuart, G.J., 2006, Site of action potential initiation in layer 5 pyramidal neurons. *J Neurosci* 26, 1854-1863.
- Pan, Z., Kao, T., Horvath, Z., Lemos, J., Sul, J.Y., Cranstoun, S.D., Bennett, V., Scherer, S.S., Cooper, E.C., 2006, A common ankyrin-G-based mechanism retains KCNQ and NaV channels at electrically active domains of the axon. *J Neurosci* 26, 2599-2613.
- Pelletier, O., Pokidysheva, E., Hirst, L.S., Bouxsein, N., Li, Y., Safinya, C.R., 2003, Structure of actin cross-linked with alpha-actinin: a network of bundles. *Phys Rev Lett* 91, 148102.
- Peters, A., Proskauer, C.C., Kaiserman-Abramof, I.R., 1968, The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The axon hillock and initial segment. *J Cell Biol* 39, 604-619.
- Peters A, P.S., Webster H, editors., 1991, *The fine structure of the nervous system*, Vol 3rd ed. New York.
- Pfrieger, F.W., 2009, Role of glial cells in the formation and maintenance of synapses. *Brain Res Rev* 63, 39-46.
- Pfrieger, F.W., Barres, B.A., 1997, Synaptic efficacy enhanced by glial cells in vitro. *Science* 277, 1684-1687.
- Pigino, G., Morfini, G., Atagi, Y., Deshpande, A., Yu, C., Jungbauer, L., LaDu, M., Busciglio, J., Brady, S., 2009, Disruption of fast axonal transport is a pathogenic mechanism for intraneuronal amyloid beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 5907-5912.
- Poliak, S., Gollan, L., Salomon, D., Berglund, E.O., Ohara, R., Ranscht, B., Peles, E., 2001, Localization of Caspr2 in myelinated nerves depends on axon-glia interactions and the generation of barriers along the axon. *J Neurosci* 21, 7568-7575.
- Poliak, S., Peles, E., 2003, The local differentiation of myelinated axons at nodes of Ranvier. *Nat Rev Neurosci* 4, 968-980.
- Poliak, S., Salomon, D., Elhanany, H., Sabanay, H., Kiernan, B., Pevny, L., Stewart, C.L., Xu, X., Chiu, S.Y., Shrager, P., Furley, A.J., Peles, E., 2003, Juxtaparanodal clustering of Shaker-like K⁺ channels in myelinated axons depends on Caspr2 and TAG-1. *J Cell Biol* 162, 1149-1160.
- Politi, C., Del Turco, D., Sie, J.M., Golinski, P.A., Tegeder, I., Deller, T., Schultz, C., 2008, Accumulation of phosphorylated I kappaB alpha and activated IKK in nodes of Ranvier. *Neuropathol Appl Neurobiol* 34, 357-365.
- Polleux, F., Giger, R.J., Ginty, D.D., Kolodkin, A.L., Ghosh, A., 1998, Patterning of cortical efferent projections by semaphorin-neuropilin interactions. *Science* 282, 1904-1906.
- Polleux, F., Snider, W., 2008, Initiating and growing an axon. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a001925.
- Rakic, P., 2009, Evolution of the neocortex: a perspective from developmental biology. *Nat Rev Neurosci* 10, 724-735.
- Ramaswamy, S., Nakamura, N., Vazquez, F., Batt, D.B., Perera, S., Roberts, T.M., Sellers, W.R., 1999, Regulation of G1 progression by the PTEN tumor suppressor protein is linked to inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2110-2115.
- Ramón y Cajal, S., 1891, Comunicación acerca de la significación fisiológica de las expansiones protoplásmicas y nerviosas de la sustancia gris. Primer Congreso Médico-Farmacéutico regional. Valencia. *Revista de Ciencias Médicas de Barcelona*. 17: 671-679, 715-723.
- Ramón y Cajal, S., 1897, Leyes de la morfología y el dinamismo de las células nerviosas. *Revista Trimestral Micrográfica*. 2: 1-28.
- Rao, A., Kim, E., Sheng, M., Craig, A.M., 1998, Heterogeneity in the molecular composition of excitatory postsynaptic sites during development of hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 18, 1217-1229.
- Rasband, M.N., 2008, Na⁺ channels get anchored...with a little help. *J Cell Biol* 183, 975-977.
- Rasband, M.N., 2010a, The axon initial segment and the maintenance of neuronal polarity. *Nat Rev Neurosci* 11, 552-562.
- Rasband, M.N., 2010b, Clustered K⁺ channel complexes in axons. *Neurosci Lett* 486, 101-106.
- Rasband, M.N., 2011, Composition, assembly, and maintenance of excitable membrane domains in myelinated axons. *Semin Cell Dev Biol* 22, 178-184.
- Rasmussen, H.B., Frokjaer-Jensen, C., Jensen, C.S., Jensen, H.S., Jorgensen, N.K., Misonou, H., Trimmer, J.S., Olesen, S.P., Schmitt, N., 2007, Requirement of subunit co-assembly and ankyrin-G for M-channel localization at the axon initial segment. *J Cell Sci* 120, 953-963.
- Ratzliff, A.D., Soltesz, I., 2001, Differential immunoreactivity for alpha-actinin-2, an N-methyl-D-aspartate-receptor/actin binding protein, in hippocampal interneurons. *Neuroscience* 103, 337-349.

- Rochlin, M.W., Wickline, K.M., Bridgman, P.C., 1996, Microtubule stability decreases axon elongation but not axoplasm production. *J Neurosci* 16, 3236-3246.
- Rudy, B., McBain, C.J., 2001, Kv3 channels: voltage-gated K⁺ channels designed for high-frequency repetitive firing. *Trends Neurosci* 24, 517-526.
- Sanchez-Ponce, D., Munoz, A., Garrido, J.J., 2011, Casein kinase 2 and microtubules control axon initial segment formation. *Mol Cell Neurosci* 46, 222-234.
- Sanchez-Ponce, D., Tapia, M., Munoz, A., Garrido, J.J., 2008, New role of IKK alpha/beta phosphorylated I kappa B alpha in axon outgrowth and axon initial segment development. *Mol Cell Neurosci* 37, 832-844.
- Sarmiere, P.D., Weigle, C.M., Tamkun, M.M., 2008, The Kv2.1 K⁺ channel targets to the axon initial segment of hippocampal and cortical neurons in culture and in situ. *BMC Neurosci* 9, 112.
- Schafer, B., Gotz, C., Dudek, J., Hessenauer, A., Matti, U., Montenarh, M., 2009a, KIF5C: a new binding partner for protein kinase CK2 with a preference for the CK2alpha' subunit. *Cell Mol Life Sci* 66, 339-349.
- Schafer, B., Gotz, C., Montenarh, M., 2008, The kinesin I family member KIF5C is a novel substrate for protein kinase CK2. *Biochem Biophys Res Commun* 375, 179-183.
- Schafer, D.P., Jha, S., Liu, F., Akella, T., McCullough, L.D., Rasband, M.N., 2009b, Disruption of the axon initial segment cytoskeleton is a new mechanism for neuronal injury. *J Neurosci* 29, 13242-13254.
- Schmidt-Hieber, C., Jonas, P., Bischofberger, J., 2008, Action potential initiation and propagation in hippocampal mossy fibre axons. *J Physiol* 586, 1849-1857.
- Schultz, C., Konig, H.G., Del Turco, D., Politi, C., Eckert, G.P., Ghebremedhin, E., Prehn, J.H., Kogel, D., Deller, T., 2006, Coincident enrichment of phosphorylated I kappa B alpha, activated IKK, and phosphorylated p65 in the axon initial segment of neurons. *Mol Cell Neurosci* 33, 68-80.
- Schulze, T.G., Detera-Wadleigh, S.D., Akula, N., Gupta, A., Kassem, L., Steele, J., Pearl, J., Strohmaier, J., Breuer, R., Schwarz, M., Propping, P., Nothen, M.M., Cichon, S., Schumacher, J., Rietschel, M., McMahon, F.J., 2009, Two variants in Ankyrin 3 (ANK3) are independent genetic risk factors for bipolar disorder. *Mol Psychiatry* 14, 487-491.
- Schwarz, J.R., Glassmeier, G., Cooper, E.C., Kao, T.C., Nodera, H., Tabuena, D., Kaji, R., Bostock, H., 2006, KCNQ channels mediate IKs, a slow K⁺ current regulating excitability in the rat node of Ranvier. *J Physiol* 573, 17-34.
- Serrano, L., Hernandez, M.A., Diaz-Nido, J., Avila, J., 1989, Association of casein kinase II with microtubules. *Exp Cell Res* 181, 263-272.
- Shah, M.M., Migliore, M., Valencia, I., Cooper, E.C., Brown, D.A., 2008, Functional significance of axonal Kv7 channels in hippocampal pyramidal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 7869-7874.
- Shelly, M., Cancedda, L., Heilshorn, S., Sumbre, G., Poo, M.M., 2007, LKB1/STRAD promotes axon initiation during neuronal polarization. *Cell* 129, 565-577.
- Shelly, M., Poo, M.M., 2011, Role of LKB1-SAD/MARK pathway in neuronal polarization. *Dev Neurobiol* 71, 508-527.
- Shi, S.H., Cheng, T., Jan, L.Y., Jan, Y.N., 2004, APC and GSK-3beta are involved in mPar3 targeting to the nascent axon and establishment of neuronal polarity. *Curr Biol* 14, 2025-2032.
- Shi, S.H., Jan, L.Y., Jan, Y.N., 2003, Hippocampal neuronal polarity specified by spatially localized mPar3/mPar6 and PI 3-kinase activity. *Cell* 112, 63-75.
- Shi, X., Yasumoto, S., Nakagawa, E., Fukasawa, T., Uchiya, S., Hirose, S., 2009, Missense mutation of the sodium channel gene SCN2A causes Dravet syndrome. *Brain Dev* 31, 758-762.
- Shu, Y., Yu, Y., Yang, J., McCormick, D.A., 2007, Selective control of cortical axonal spikes by a slowly inactivating K⁺ current. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 11453-11458.
- Singh, N.A., Charlier, C., Stauffer, D., DuPont, B.R., Leach, R.J., Melis, R., Ronen, G.M., Bjerre, I., Quattlebaum, T., Murphy, J.V., McHarg, M.L., Gagnon, D., Rosales, T.O., Peiffer, A., Anderson, V.E., Leppert, M., 1998, A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. *Nat Genet* 18, 25-29.
- Sobotzik, J.M., Sie, J.M., Politi, C., Del Turco, D., Bennett, V., Deller, T., Schultz, C., 2009, AnkyrinG is required to maintain axo-dendritic polarity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 17564-17569.
- Somogyi, P., Klausberger, T., 2005, Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *J Physiol* 562, 9-26.
- Somogyi, P., Nunzi, M.G., Gorio, A., Smith, A.D., 1983, A new type of specific interneuron in the monkey hippocampus forming synapses exclusively with the axon initial segments of pyramidal cells. *Brain Res* 259, 137-142.
- Song, A.H., Wang, D., Chen, G., Li, Y., Luo, J., Duan, S., Poo, M.M., 2009, A selective filter for cytoplasmic transport at the axon initial segment. *Cell* 136, 1148-1160.
- Southwood, C.M., Peppi, M., Dryden, S., Tainsky, M.A., Gow, A., 2007, Microtubule deacetylases, SirT2 and HDAC6, in the nervous system. *Neurochem Res* 32, 187-195.
- Spacek, J., 1985, Three-dimensional analysis of dendritic spines. II. Spine apparatus and other cytoplasmic

- components. *Anat Embryol (Berl)* 171, 235-243.
- Srinivasan, J., Schachner, M., Catterall, W.A., 1998, Interaction of voltage-gated sodium channels with the extracellular matrix molecules tenascin-C and tenascin-R. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15753-15757.
- Stiess, M., Bradke, F., 2011, Neuronal polarization: the cytoskeleton leads the way. *Dev Neurobiol* 71, 430-444.
- Strauss, K.A., Puffenberger, E.G., Huentelman, M.J., Gottlieb, S., Dobrin, S.E., Parod, J.M., Stephan, D.A., Morton, D.H., 2006, Recessive symptomatic focal epilepsy and mutant contactin-associated protein-like 2. *N Engl J Med* 354, 1370-1377.
- Stuart, G.J., Sakmann, B., 1994, Active propagation of somatic action potentials into neocortical pyramidal cell dendrites. *Nature* 367, 69-72.
- Surmeier, D.J., Foehring, R., 2004, A mechanism for homeostatic plasticity. *Nat Neurosci* 7, 691-692.
- Susuki, K., Rasband, M.N., 2008, Molecular mechanisms of node of Ranvier formation. *Curr Opin Cell Biol* 20, 616-623.
- Szu-Yu Ho, T., Rasband, M.N., 2010, Maintenance of neuronal polarity. *Dev Neurobiol* 71, 474-482.
- Tahirovic, S., Bradke, F., 2009, Neuronal polarity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1, a001644.
- Takei, K., Mignery, G.A., Mugnaini, E., Sudhof, T.C., De Camilli, P., 1994, Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor causes formation of ER cisternal stacks in transfected fibroblasts and in cerebellar Purkinje cells. *Neuron* 12, 327-342.
- Tamkun, M.M., O'Connell K, M., Rolig, A.S., 2007, A cytoskeletal-based perimeter fence selectively corrals a sub-population of cell surface Kv2.1 channels. *J Cell Sci* 120, 2413-2423.
- Tapia, M., Wandosell, F., Garrido, J.J., 2010, Impaired function of HDAC6 slows down axonal growth and interferes with axon initial segment development. *PLoS One* 5, e12908.
- Tarui, T., Takahashi, T., Nowakowski, R.S., Hayes, N.L., Bhide, P.G., Caviness, V.S., 2005, Overexpression of p27 Kip 1, probability of cell cycle exit, and laminar destination of neocortical neurons. *Cereb Cortex* 15, 1343-1355.
- Thompson, R.F., Kim, J.J., 1996, Memory systems in the brain and localization of a memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13438-13444.
- Tian, D., Jacobo, S.M., Billing, D., Rozkalne, A., Gage, S.D., Anagnostou, T., Pavenstadt, H., Hsu, H.H., Schlondorff, J., Ramos, A., Greka, A., 2011, Antagonistic regulation of actin dynamics and cell motility by TRPC5 and TRPC6 channels. *Sci Signal* 3, ra77.
- Traka, M., Dupree, J.L., Popko, B., Karagogeos, D., 2002, The neuronal adhesion protein TAG-1 is expressed by Schwann cells and oligodendrocytes and is localized to the juxtaparanodal region of myelinated fibers. *J Neurosci* 22, 3016-3024.
- Traka, M., Goutebroze, L., Denisenko, N., Bessa, M., Nifli, A., Havaki, S., Iwakura, Y., Fukamauchi, F., Watanabe, K., Soliven, B., Girault, J.A., Karagogeos, D., 2003, Association of TAG-1 with Caspr2 is essential for the molecular organization of juxtaparanodal regions of myelinated fibers. *J Cell Biol* 162, 1161-1172.
- Triller, A., Choquet, D., 2008, New concepts in synaptic biology derived from single-molecule imaging. *Neuron* 59, 359-374.
- Trunova, S., Baek, B., Giniger, E., 2011, Cdk5 regulates the size of an axon initial segment-like compartment in mushroom body neurons of the *Drosophila* central brain. *J Neurosci* 31, 10451-10462.
- Tuvia, S., Garver, T.D., Bennett, V., 1997, The phosphorylation state of the FIGQY tyrosine of neurofascin determines ankyrin-binding activity and patterns of cell segregation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12957-12962.
- Vacher, H., Yang, J.W., Cerda, O., Autillo-Touati, A., Dargent, B., Trimmer, J.S., 2011, Cdk-mediated phosphorylation of the Kvbeta2 auxiliary subunit regulates Kv1 channel axonal targeting. *J Cell Biol* 192, 813-824.
- van Swieten, J.C., Brusse, E., de Graaf, B.M., Krieger, E., van de Graaf, R., de Koning, I., Maat-Kievit, A., Leegwater, P., Dooijes, D., Oostra, B.A., Heutink, P., 2003, A mutation in the fibroblast growth factor 14 gene is associated with autosomal dominant cerebellar ataxia [corrected]. *Am J Hum Genet* 72, 191-199.
- Van Wart, A., Matthews, G., 2006, Expression of sodium channels Nav1.2 and Nav1.6 during postnatal development of the retina. *Neurosci Lett* 403, 315-317.
- Van Wart, A., Trimmer, J.S., Matthews, G., 2007, Polarized distribution of ion channels within microdomains of the axon initial segment. *J Comp Neurol* 500, 339-352.
- Vermassen, E., Parys, J.B., Mauger, J.P., 2004, Subcellular distribution of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptors: functional relevance and molecular determinants. *Biol Cell* 96, 3-17.
- Vlachos, A., 2011, Synaptopodin and the spine apparatus organelle-Regulators of different forms of synaptic plasticity? *Ann Anat*.
- Vlachos, A., Korkotian, E., Schonfeld, E., Copanaki, E., Deller, T., Segal, M., 2009, Synaptopodin regulates plasticity of dendritic spines in hippocampal neurons. *J Neurosci* 29, 1017-1033.
- Voeltz, G.K., Rolls, M.M., Rapoport, T.A., 2002, Structural organization of the endoplasmic reticulum. *EMBO Rep* 3, 944-950.

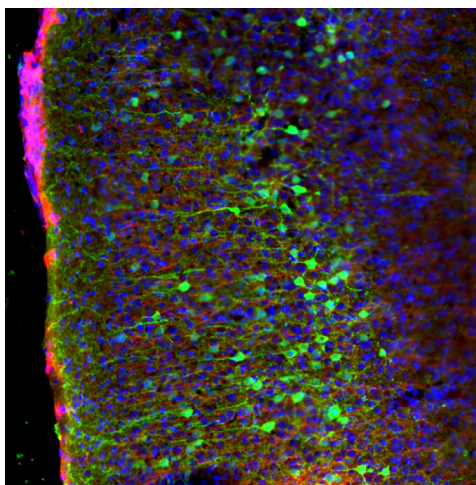
- Walikonis, R.S., Jensen, O.N., Mann, M., Provance, D.W., Jr., Mercer, J.A., Kennedy, M.B., 2000, Identification of proteins in the postsynaptic density fraction by mass spectrometry. *J Neurosci* 20, 4069-4080.
- Walikonis, R.S., Oguni, A., Khorosheva, E.M., Jeng, C.J., Asuncion, F.J., Kennedy, M.B., 2001, Densin-180 forms a ternary complex with the (alpha)-subunit of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II and (alpha)-actinin. *J Neurosci* 21, 423-433.
- Wang, H., Kunkel, D.D., Martin, T.M., Schwartzkroin, P.A., Tempel, B.L., 1993, Heteromultimeric K⁺ channels in terminal and juxtaparanodal regions of neurons. *Nature* 365, 75-79.
- Wang, Y., Mattson, M.P., Furukawa, K., 2002, Endoplasmic reticulum calcium release is modulated by actin polymerization. *J Neurochem* 82, 945-952.
- Watanabe, T., Inui, M., Chen, B.Y., Iga, M., Sobue, K., 1994, Annexin VI-binding proteins in brain. Interaction of annexin VI with a membrane skeletal protein, calspectin (brain spectrin or fodrin). *J Biol Chem* 269, 17656-17662.
- Weins, A., Schwarz, K., Faul, C., Barisoni, L., Linke, W.A., Mundel, P., 2001, Differentiation- and stress-dependent nuclear cytoplasmic redistribution of myopodin, a novel actin-bundling protein. *J Cell Biol* 155, 393-404.
- Westermann, S., Weber, K., 2003, Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 938-947.
- Whittington, M.A., Traub, R.D., 2003, Interneuron diversity series: inhibitory interneurons and network oscillations in vitro. *Trends Neurosci* 26, 676-682.
- Wimmer, V.C., Reid, C.A., So, E.Y., Berkovic, S.F., Petrou, S., 2010, Axon initial segment dysfunction in epilepsy. *J Physiol* 588, 1829-1840.
- Winckler, B., Forscher, P., Mellman, I., 1999, A diffusion barrier maintains distribution of membrane proteins in polarized neurons. *Nature* 397, 698-701.
- Winckler, B., Mellman, I., 1999, Neuronal polarity: controlling the sorting and diffusion of membrane components. *Neuron* 23, 637-640.
- Witte, H., Bradke, F., 2008, The role of the cytoskeleton during neuronal polarization. *Curr Opin Neurobiol* 18, 479-487.
- Witte, H., Neukirchen, D., Bradke, F., 2008, Microtubule stabilization specifies initial neuronal polarization. *J Cell Biol* 180, 619-632.
- Wittmack, E.K., Rush, A.M., Craner, M.J., Goldfarb, M., Waxman, S.G., Dib-Hajj, S.D., 2004, Fibroblast growth factor homologous factor 2B: association with Nav1.6 and selective colocalization at nodes of Ranvier of dorsal root axons. *J Neurosci* 24, 6765-6775.
- Wittner, L., Magloczky, Z., Borhegyi, Z., Halasz, P., Toth, S., Eross, L., Szabo, Z., Freund, T.F., 2001, Preservation of perisomatic inhibitory input of granule cells in the epileptic human dentate gyrus. *Neuroscience* 108, 587-600.
- Wyszynski, M., Kharazia, V., Shanghvi, R., Rao, A., Beggs, A.H., Craig, A.M., Weinberg, R., Sheng, M., 1998, Differential regional expression and ultrastructural localization of alpha-actinin-2, a putative NMDA receptor-anchoring protein, in rat brain. *J Neurosci* 18, 1383-1392.
- Wyszynski, M., Lin, J., Rao, A., Nigh, E., Beggs, A.H., Craig, A.M., Sheng, M., 1997, Competitive binding of alpha-actinin and calmodulin to the NMDA receptor. *Nature* 385, 439-442.
- Yang, Y., Lacas-Gervais, S., Morest, D.K., Solimena, M., Rasband, M.N., 2004, BetaIV spectrins are essential for membrane stability and the molecular organization of nodes of Ranvier. *J Neurosci* 24, 7230-7240.
- Yang, Y., Ogawa, Y., Hedstrom, K.L., Rasband, M.N., 2007, betaIV spectrin is recruited to axon initial segments and nodes of Ranvier by ankyrinG. *J Cell Biol* 176, 509-519.
- Yoshimura, T., Arimura, N., Kaibuchi, K., 2006, Signaling networks in neuronal polarization. *J Neurosci* 26, 10626-10630.
- Yu, F.H., Mantegazza, M., Westenbroek, R.E., Robbins, C.A., Kalume, F., Burton, K.A., Spain, W.J., McKnight, G.S., Scheuer, T., Catterall, W.A., 2006, Reduced sodium current in GABAergic interneurons in a mouse model of severe myoclonic epilepsy in infancy. *Nat Neurosci* 9, 1142-1149.
- Yu, Y., Maureira, C., Liu, X., McCormick, D., 2010, P/Q and N channels control baseline and spike-triggered calcium levels in neocortical axons and synaptic boutons. *J Neurosci* 30, 11858-11869.
- Yu, Y., Shu, Y., McCormick, D.A., 2008, Cortical action potential backpropagation explains spike threshold variability and rapid-onset kinetics. *J Neurosci* 28, 7260-7272.
- Zamponi, G.W., Lory, P., Perez-Reyes, E., 2010, Role of voltage-gated calcium channels in epilepsy. *Pflugers Arch* 460, 395-403.
- Zhang, Y., Bekku, Y., Dzhashiashvili, Y., Armenti, S., Meng, X., Sasaki, Y., Milbrandt, J., Salzer, J.L., 2012, Assembly and maintenance of nodes of ranvier rely on distinct sources of proteins and targeting mechanisms. *Neuron* 73, 92-107.
- Zhou, D., Lambert, S., Malen, P.L., Carpenter, S., Boland, L.M., Bennett, V., 1998, AnkyrinG is required for clustering of voltage-gated Na channels at axon initial segments and for normal action potential firing. *J Cell Biol* 143, 1295-1304.



Abreviaturas

5-HT1A: *5-hydroxytryptamine receptor 1A*
 actina-F: filamentos de actina
 actina-G: monómeros globulares de actina
 Ac-tubulina : Tubulina acetilada
 ADAM22 : *Disintegrin and metalloproteinase domain containing protein 22*
 ADN: Ácido DesoxirriboNucleico
 Akt: homólogo del proto-oncogén del virus murino AKT8
 ANK3: gen que codifica para ankirina G
ankG: ankirina G
 AP: potencial de acción (*action potencial*)
 APC: *adenomatous polyposis coli*
 aPKC: *atypical protein kinase C*
 ARN: Ácido RiboNucleico
 ATPasa Na/K: Bomba sodio/potasio dependiente de ATP
 BDNF: *brain derived neurotrophic factor*
 CA: *cornu ammonis*
 Ca+: ión calcio
 CAMKII: Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases II
 Caspr2: *Contactin associated protein like 2*
 Cav: *Voltage-gated Ca (+) channel*, canal de calcio dependiente de voltaje
 Cdc42: *Cell division cycle 42*
 CdK : *Cyclin-dependent kinase*
 CK2 : *Casein kinase 2*
 CNTN2: *Gen que codifica para Contactin 2*
 CNTNAP2 : *Gen que codifica para Caspr2*
 CRMP-2 : *Collapsin- response mediator protein-2*
 CSPGs: proteoglicanos condroitin-sulfato
 chapsyn-110 : *channel-associated protein of synapse-110*
 CHL1: *close homolog of L1*
 DIV: Días *in vitro*
 EB1/EB3 : *End Binding proteins*
 EM : esclerosis múltiple
 FHF / FGF: *Fibroblast Growth Factor Homologous factor / Fibroblast Growth Factor*
 GABA: ácido gamma-aminobutírico
 GFP: *Green Fluorescent Protein*
 Glu-tubulina : tubulina detirosinada
 GSK3: *glycogen synthase kinase 3*
 GTPasas: guanosina trifosfatasa o trifosfatasa de guanosina
 HDAC6: *histone deacetylase 6*
 IKK: *IκB kinase*
 IκB: *inhibitor κB*
 K+: ión potasio
 KIF: *Kinesin superfamily proteins*
 Kv: *Voltage-gated K (+) channel*; canal de potasio dependiente de voltaje
 L1-CAM: *Neural cell adhesion molecule L1*

LKB1: *Liver Kinase B1*
 MAGUK: *membrane-associated guanylate kinase*
 MAP: *Microtubule Associated Protein*
 MAP1B :*microtubule - associated protein 1B*
 MTs : microtubulos
 Na+: ión sodio
 Nav : *Voltage-gated Na (+) channel*, canal de sodio dependiente de voltaje
 NEMO: *nuclear factor kappa-B kinase subunit gamma (IKK-γ)*
 NF186: neurofascina 186
 NF-κB *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*
 NgCAM: *neuron-glia cell adhesion molecule*
 NGF: *nerve growth factor*
 NR:nodos de Ranvier
 NrCAM :*Neuronal cell adhesion molecule*
 OC :orgánulo de cisternas
 Par: *partitioning defective*
 PI3K: *Phosphatidyl Inositol-3-kinase*
 pIκBα: *phosphorylated IκB kinase fosforilada*
 PKA; *protein kinase A*
 PKB; *protein kinase B*
 PNN: *perineuronal net; red perineuronal*
 PSD-93: *postsynaptic density protein 93*
 PTEN :*Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*
 PV :parvoalbúmina
 Rac1 :*related C3 botulinum toxin substrate 1*
 RE: Retículo endoplásmico
 RelA : *Transcription factor p65*
 RhoA: *Ras homolog gene family, member A*
 S1-S6 : segmentos transmembrana 1-6
 SAD: *synapses of amphids defective*
 Sema3 :*Semaphorin 3*
 SERCA :*sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase,*
 shRNA: *small hairpin RNA (ARN de interferencia)*
 SIA: segmento inicial del axón
 SIRT2 : *human Sir2 ortologe*
 SPTA: gen que codifica para Espectrina
 Tag-1: *transient axonal glycoprotein 1*
 TIPs: *plus-end tracking proteins*
 TRPC: *Transient receptor potential channel*
 TTC: tubulin-tyrosin-ligase
 TTCP : *tubulin-tyrosin-carboxipeptidase*
 Tyr – tubulina: tubulina tirosinada
 UBE3A:gen que codifica para la proteína E3A de la ubiquitina ligasa



Agradecimientos

Esta ha sido una tesis muy viajera. Comenzó en el Departamento de Biología Celular de la Universidad Complutense y en el Instituto Cajal. Se mudó al Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, ha estado de estancia a Houston y, últimamente, ha repartido su tiempo entre el Centro de Tecnología Biomédica y su nuevo lugar en el Instituto Cajal. Mi caja de muestras para el microscopio ha visto mucho mundo... (y tengo una amplia colección de tarjetas de personal y cuentas de correo variadas). En cada uno de estos sitios se ha realizado una parte importante de este trabajo, y en todos ellos he encontrado la ayuda de gente magnífica sin la que hubiera sido imposible lógralo.

En primer lugar quiero agradecer a mis directores de tesis, Alberto y Juanjo, la gran oportunidad que me dieron de trabajar en sus laboratorios. Durante este tiempo he aprendido de ellos científica y personalmente y me han transmitido su entusiasmo y emoción por la ciencia. Aunque tener dos directores a veces tiene desventajas, han pesado más las cosas buenas y me ha permitido enriquecerme con las ideas y los conocimientos de ambos. Esta tesis se lleva lo mejor de las dos partes.

A mis chicas: Mónica, Ana y Noe. Hemos compartido desayunos, viajes, cabina, congresos, ratones, anticuerpos, mudanzas, ordenadores... Hemos pasado miles de horas juntas en el laboratorio. Nos hemos llamado C18, 206, MB02... pero vosotras habéis estado ahí siempre, apoyando y haciendo las cosas mucho más fáciles. Esta tesis es también vuestra.

Gracias al laboratorio 206, del centro de Biología Molecular Severo Ochoa, donde se han realizado una gran parte de los experimentos de esta tesis y que es nuestro segundo hogar. A Paco, por toda la ayuda prestada, sus ideas y su generosidad al acogernos. A Maribel, Nuria e Irene, por esa alegría contagiosa y esos buenos ratos juntas. A Jorge, por sus charlas, sus ideas y su ánimo incondicional. A MariJose B., por esa paciencia infinita. A Lara O. y Marta, por su ayuda sin reservas y su buen humor. A MariJose P., por su energía y su interés. A Ricardo, por esas lecciones magistrales en su pizarra-ventana y esos momentos compartiendo poyata. A los que ya no están por ahí: Héctor, Olga, Ana F., Lara R., Jonay... también hay un trocito vuestro en esta tesis. Y a Pablo, para mí eres uno más del laboratorio.

Al laboratorio de Circuitos Corticales, en el Centro de Tecnología Biomédica de la Universidad Politécnica. Gracias a todos por la ayuda que me habéis ofrecido y por estar siempre disponibles para cualquier cosa que surgiera. Y gracias por dejar que me apoderara de vuestro microscopio confocal todo este tiempo: las mejores fotos de esta tesis han salido de ese laboratorio. Especialmente, quiero agradecer a Lidia Blázquez su trabajo de microscopía electrónica y a Javier DeFelipe por sus ideas, su apoyo y sus comentarios siempre enriquecedores

Al Departamento de Biología Celular de la Universidad Complutense, el origen de esta tesis. A las chicas VIP: Mar, Selene, Rebeca, Irene, Yasmina y Rosa, por cuidarme cada vez que me dejo caer por su laboratorio. Y al resto del Departamento: Teresa, Mar, Isabel, David, Javi, Laura, Ruth, Nerea, Íñigo, Agustín, Jesús, Keti, Benjamín... por hacer que me sienta como en casa aunque pase meses sin ir por allí.

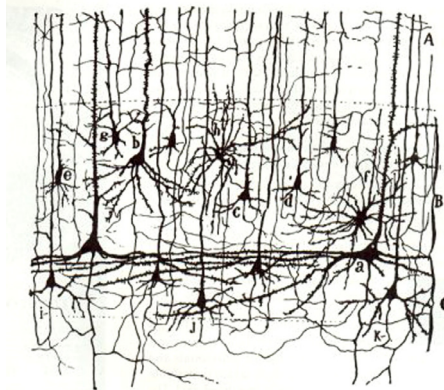
A Matthew Rasband, del Departamento de Neurociencia del *Baylor College of Medicine* en Houston, por acogerme y compartir conmigo todas sus ideas y experimentos durante mi estancia en su laboratorio. A Mauricio, Kei, Shelly, Kae, Kelli, Smita, Yan, Zhang y especialmente a Tammy, por su generosidad y su paciencia enseñándome y los buenos momentos que hemos pasado juntas dentro y fuera del laboratorio.

Gracias a todos aquellos amigos que no trabajáis en un laboratorio y os esforzáis por entender en qué consiste mi trabajo y a qué dedico mis días. Creo que la idea que tenéis sigue sin parecerse en nada a la realidad... pero sois siempre un soplo de aire fresco en mi vida.

A mi familia, que me ha apoyado y animado durante todo este tiempo y ha conseguido que llegue sana y salva hasta el final. A mi madre, a la que le encantan “esas fotos tan bonitas llenas de colores” y siempre se interesa por mis experimentos. A mi padre por animarme a conseguir lo que me propusiera.

A Julio, por quererme como soy. Por haber estado a mi lado durante todo este tiempo. Sin ti no habría podido lograrlo. Ahora nos toca empezar juntos la siguiente aventura.

Gracias a todos.



P.D : Parece increíble que 30 micras puedan dar para tanto...

