



Fundación Romanillos



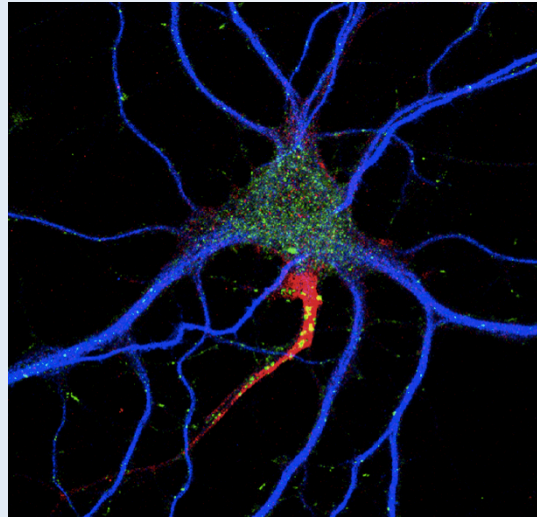
Premio Alberto Rábano 2012

Madrid, 28 Noviembre 2013

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

Tesis Doctoral

Diana Sánchez Ponce

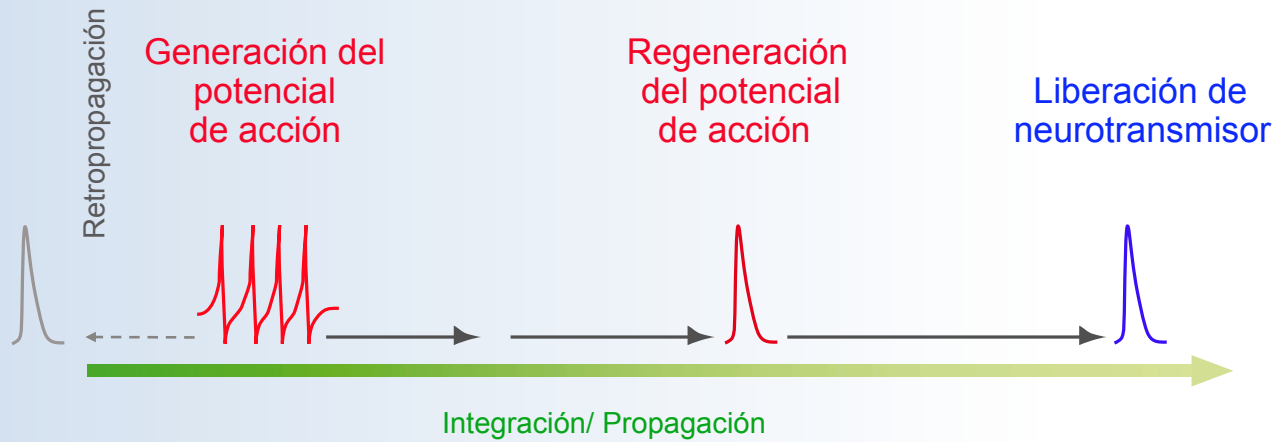
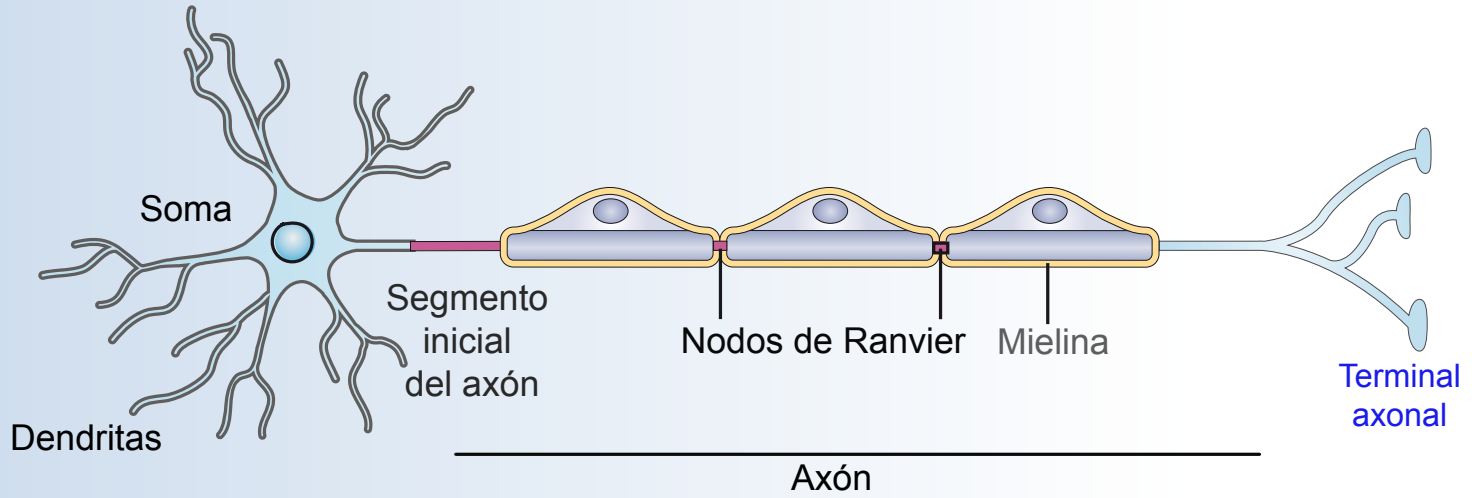


Directores : Alberto Muñoz

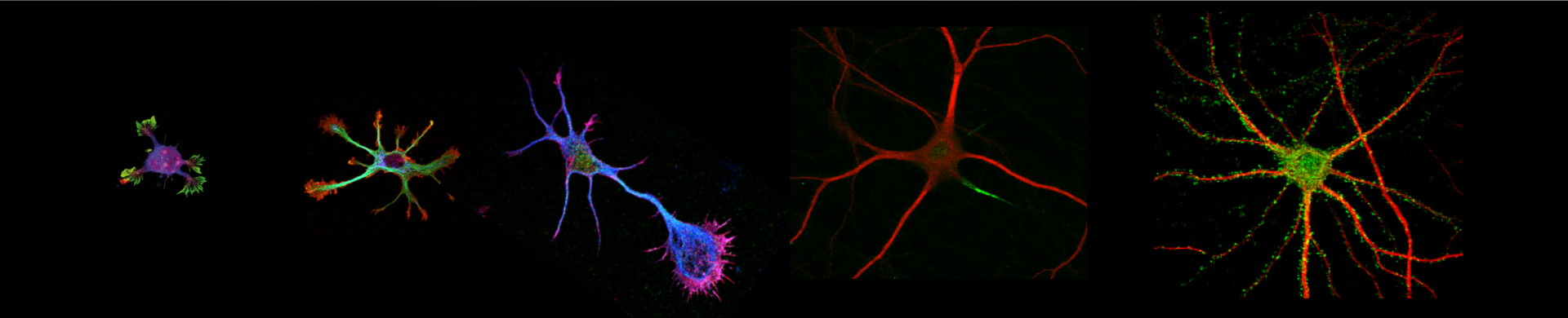
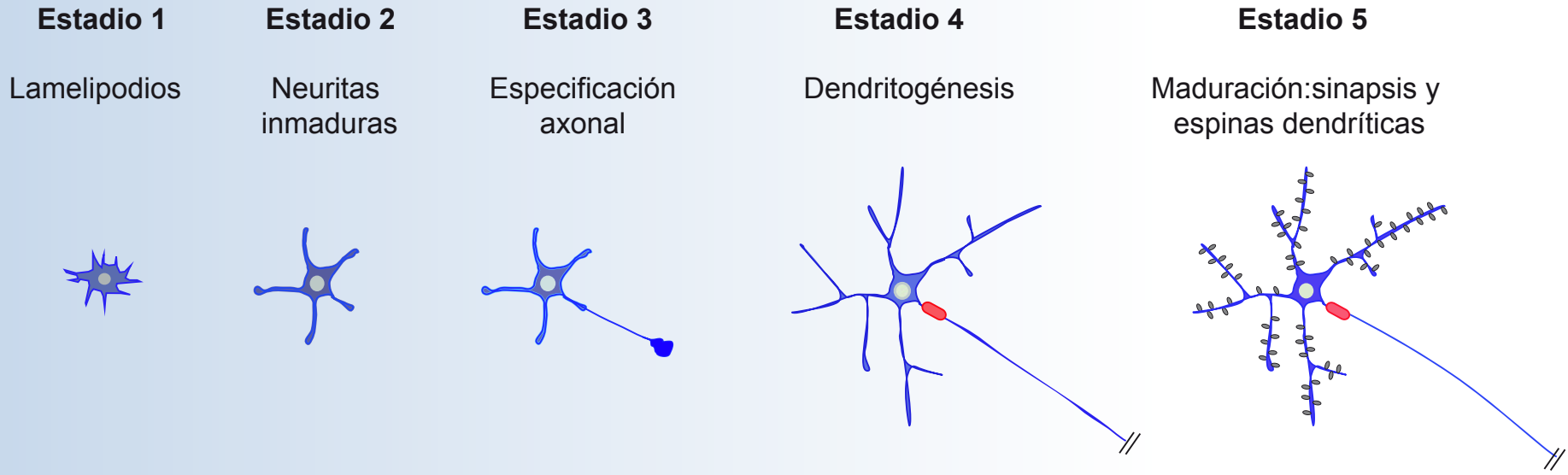
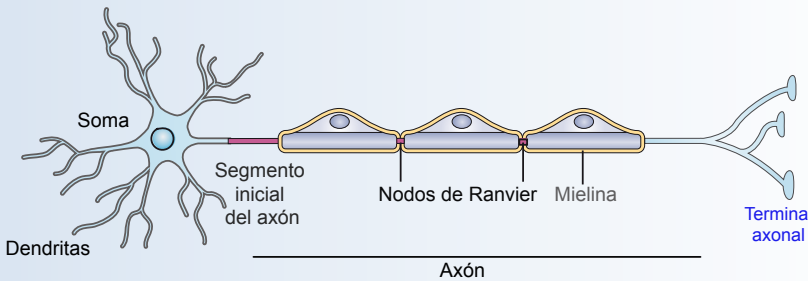
Juan José Garrido

Introducción

Polaridad neuronal

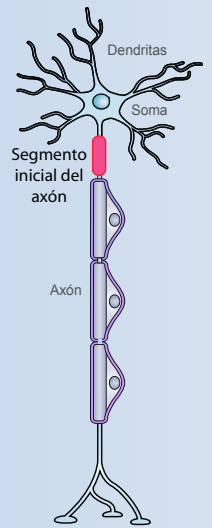


Polaridad neuronal : Desarrollo neuronal

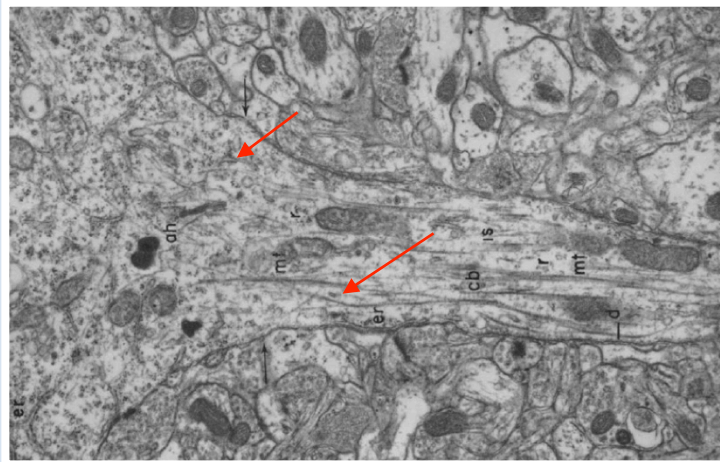


El segmento inicial del axón

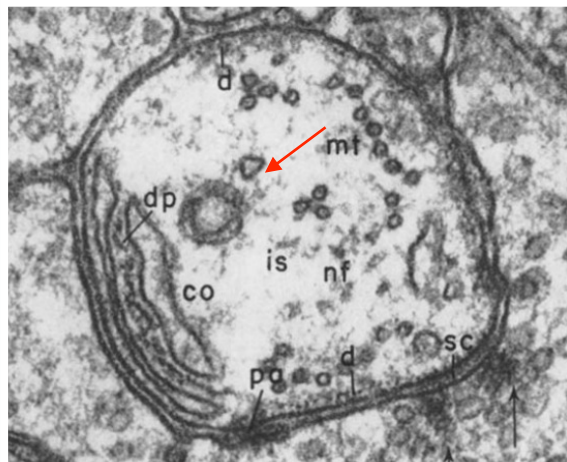
• Característica estructurales



Estructura submembranosa electrondensa



Organización fasciculada de microtúbulos



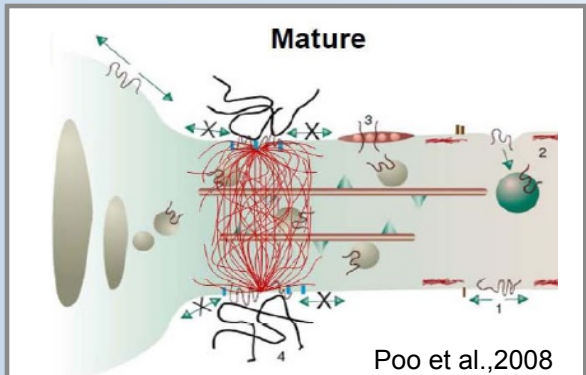
Palay , 1968, *JCB*

• Funciones principales

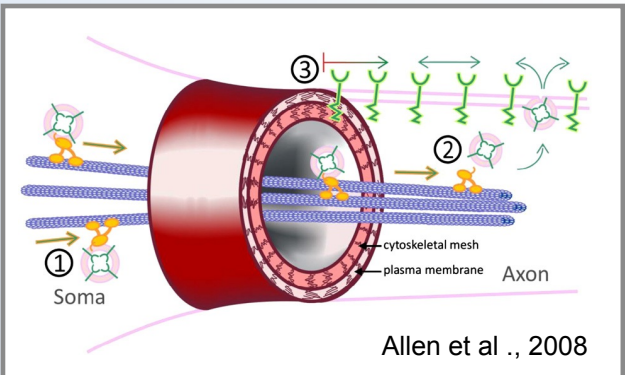
1. Barrera de difusión

2. Filtro de transporte citoplásmico

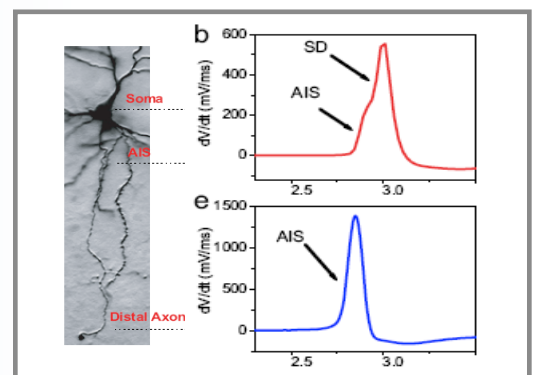
3. Generación de potencial de acción



Poo et al., 2008

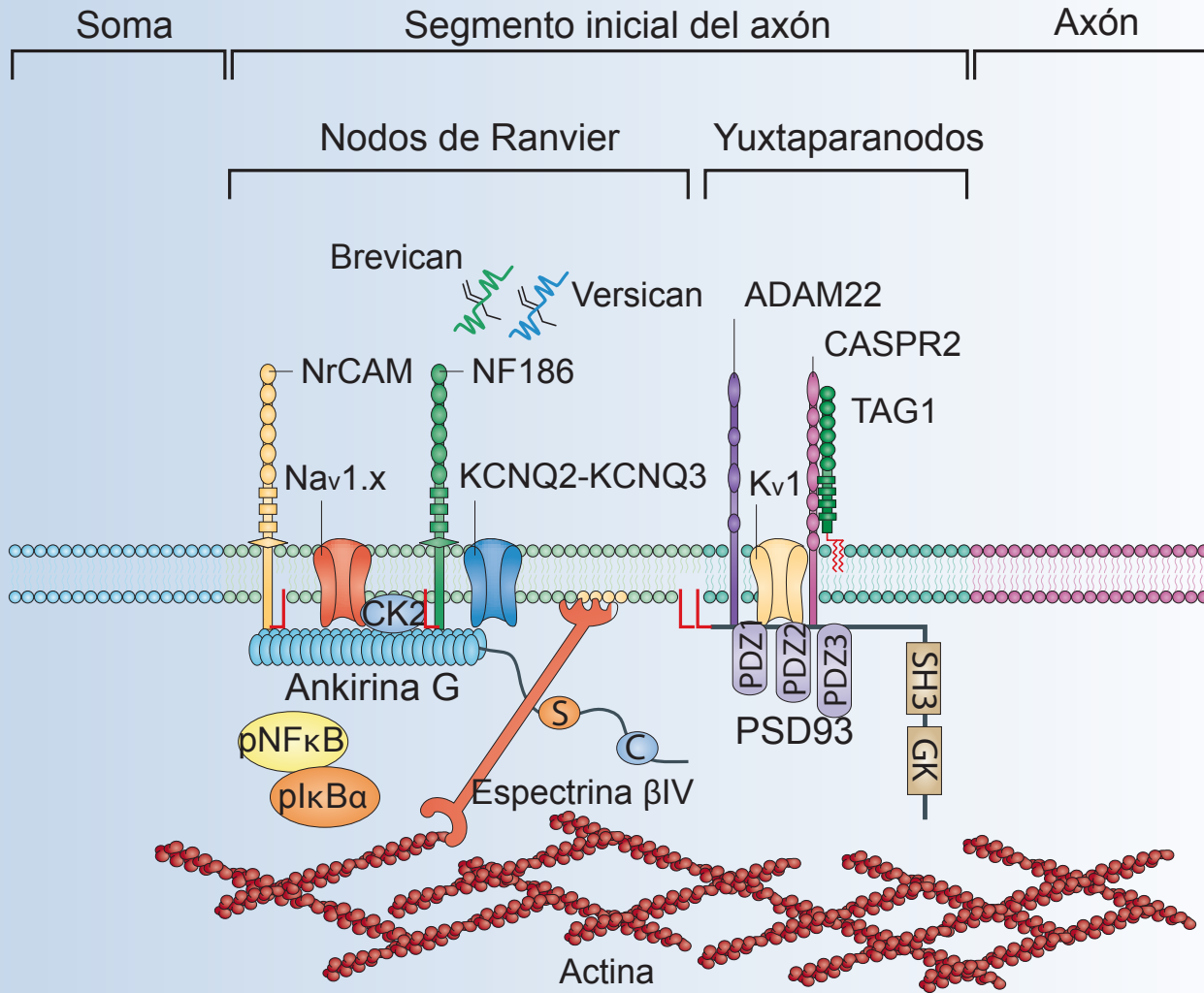


Allen et al ., 2008



Kole and Stuart , 2012 , *Neuron*

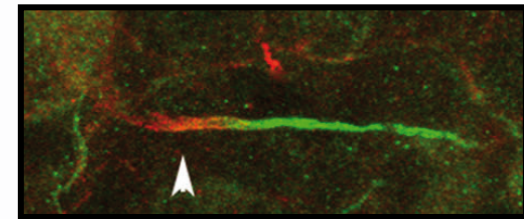
Composición molecular del SIA



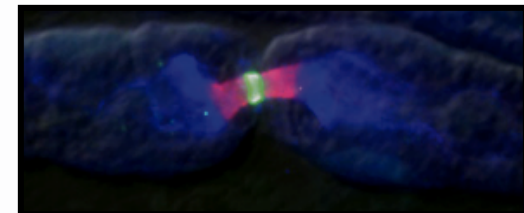
COMPOSICIÓN:

1. Citoesqueleto y proteínas asociadas
2. Proteínas adaptadoras
3. Moléculas de adhesión
4. Proteínas de la matriz
5. Proteínas quinasas
6. Canales iónicos

SIA

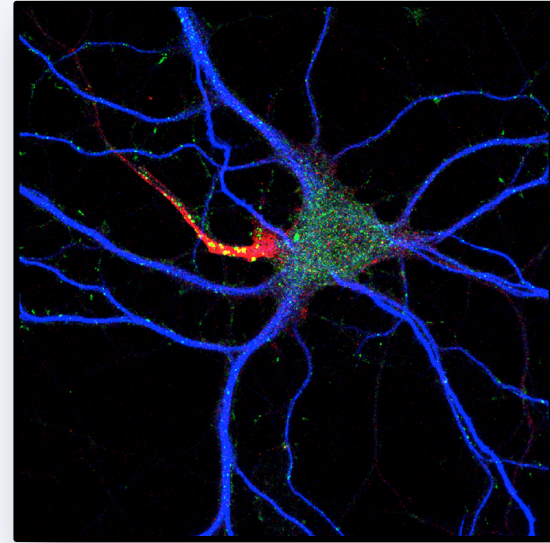
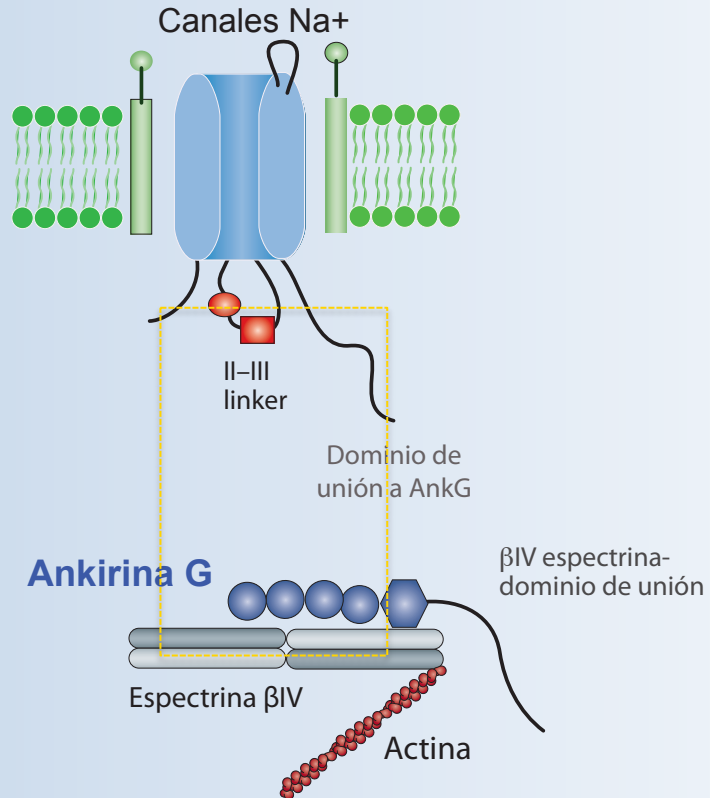


Nodos de Ranvier

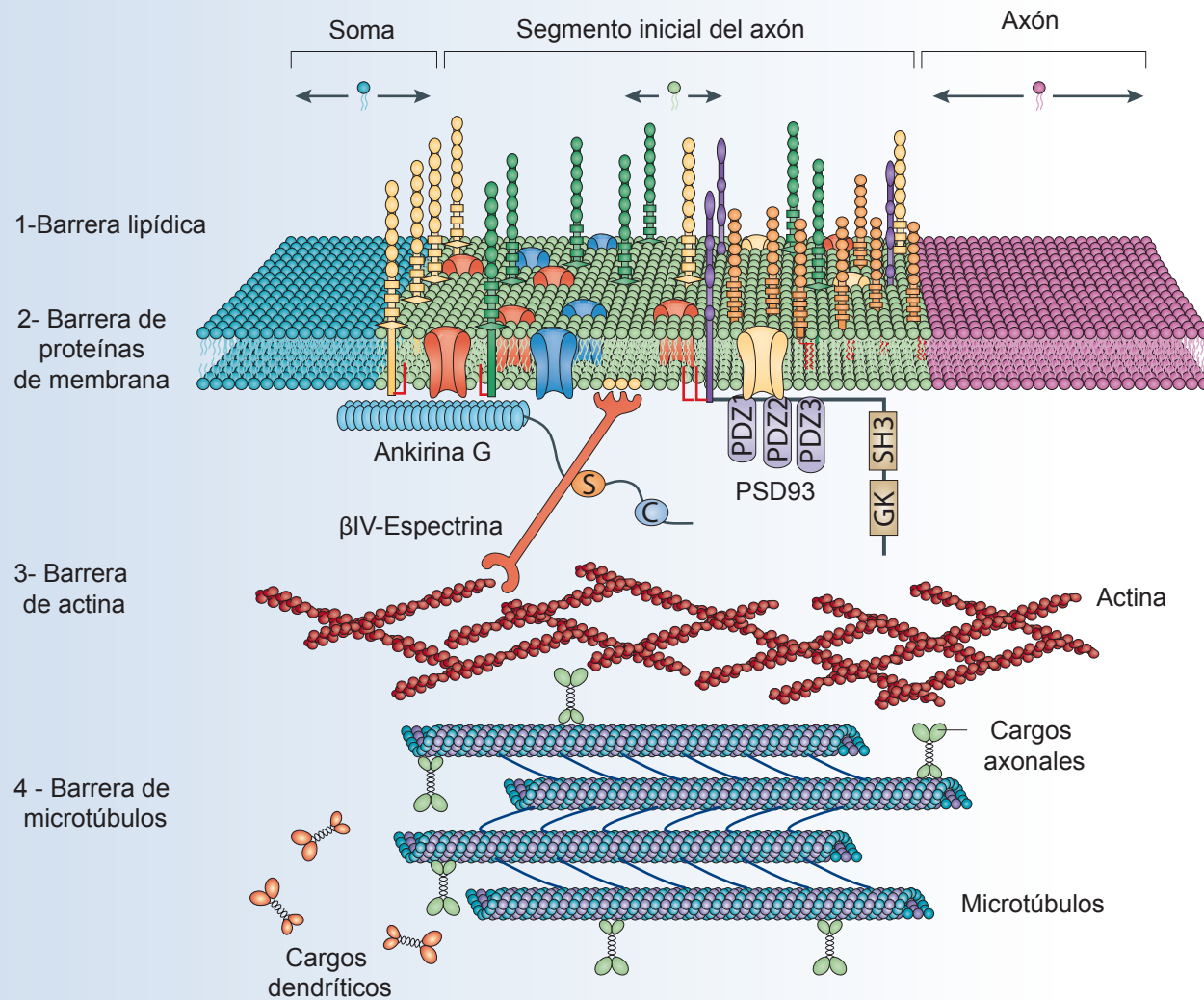


Composición molecular del SIA

- Ankirina G (proteína adaptadora)
- Esencial para la localización de canales de sodio



Objetivo general



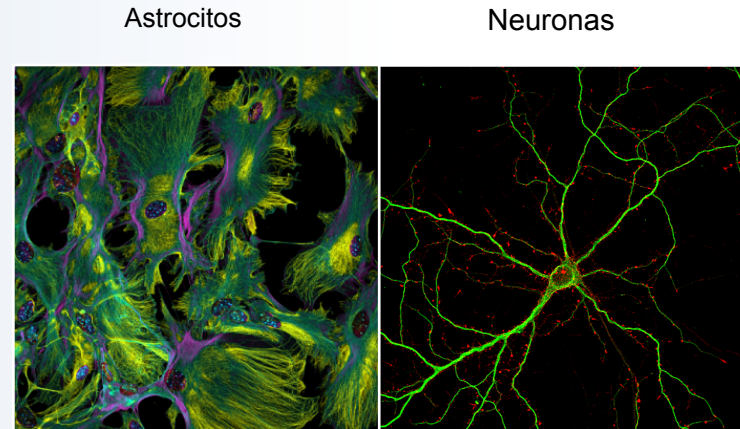
Mecanismos implicados en la formación y el desarrollo del SIA

Material y métodos

- Cultivo de astrocitos
- Cultivo de neuronas

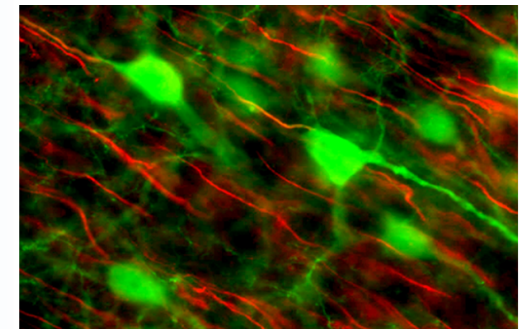
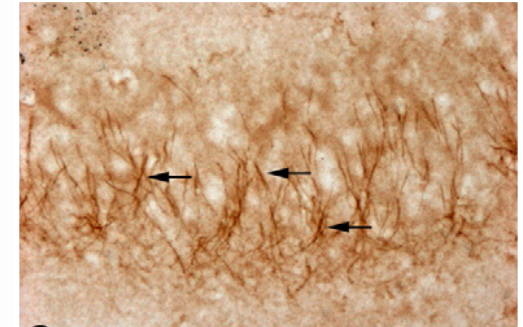
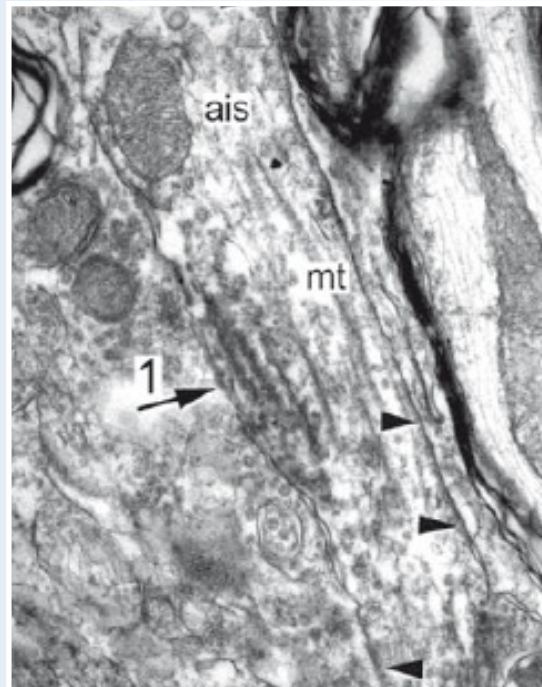
- Tratamientos farmacológicos
- Nucleofección con plásmidos
- Extracción con detergente
- Western Blot
- Inmunocitoquímica de fluorescencia
- Análisis: microscopía confocal

Cocultivo



- Muestras de tejido cerebral de ratón

- Inmunohistoquímica
- Microscopía confocal
- Microscopía electrónica

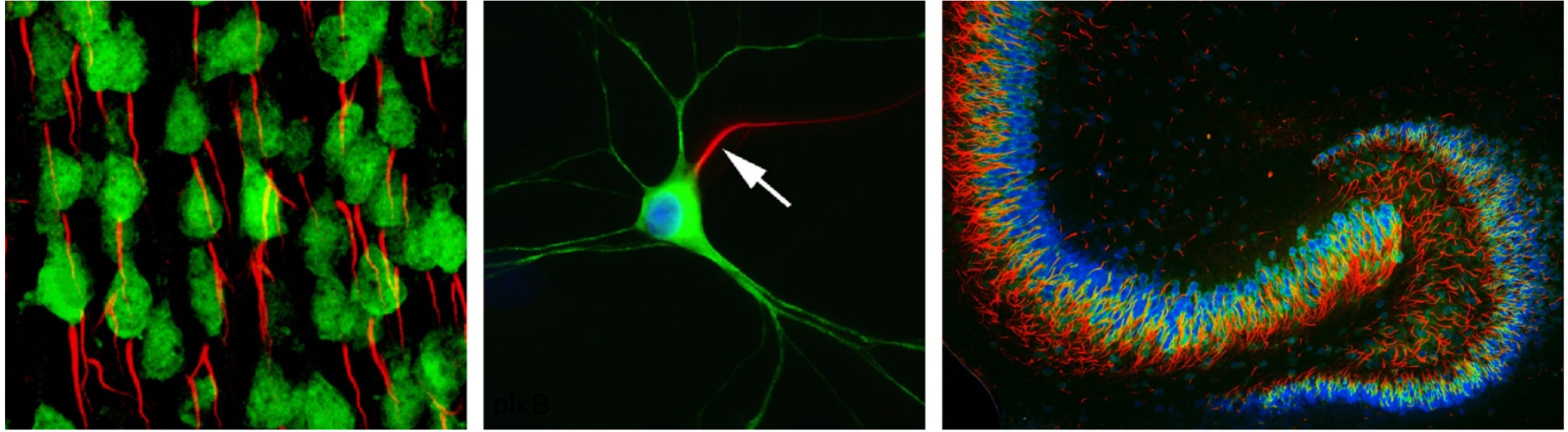


Objetivos

- Estructura, composición y maduración del segmento inicial del axón:
 1. Implicación de las quinasas IKK y CK2 en el establecimiento de la polaridad neuronal y la formación del SIA.
 2. Patrones de expresión de canales de potasio dependientes de voltaje en los distintos subdominios a lo largo del desarrollo *in vitro* del SIA.
 3. Estudio del desarrollo *in vitro* del orgánulo de cisternas del SIA en neuronas hipocampales, los mecanismos de localización, y la expresión de diversas moléculas implicadas en la regulación de los niveles de calcio en el SIA.
 4. Analizar la implicación del orgánulo de cisternas en los procesos de plasticidad del SIA

Proteínas de la ruta NFκB: plkB ,pIKK y p65 (RelA)

Segmento inicial del axón

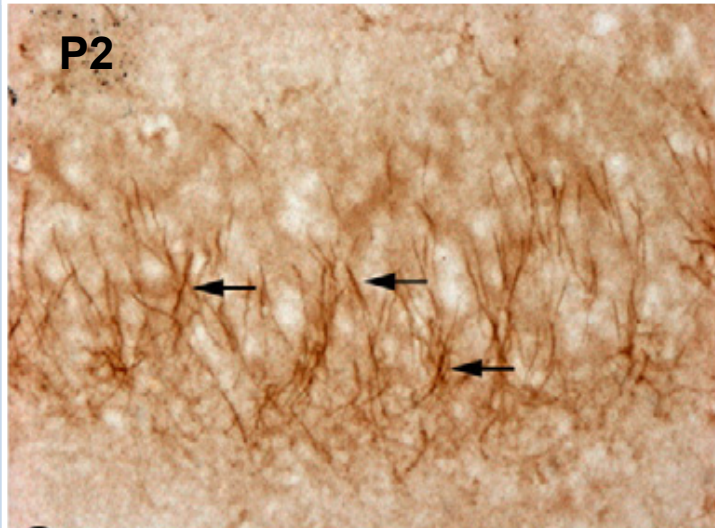
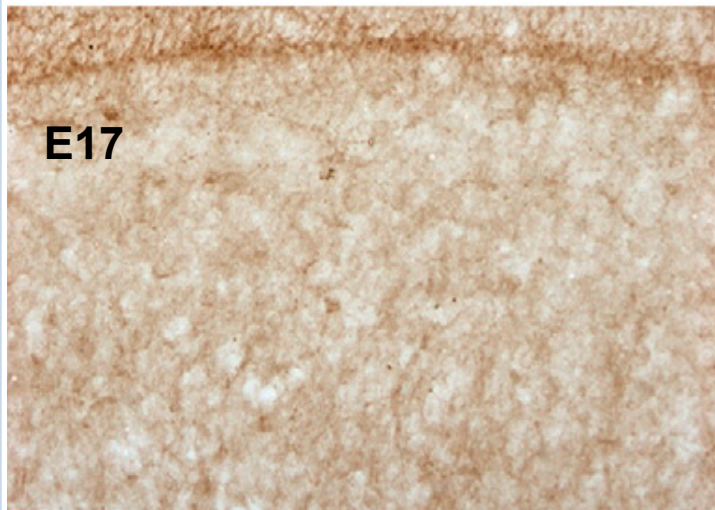


Nodos de Ranvier

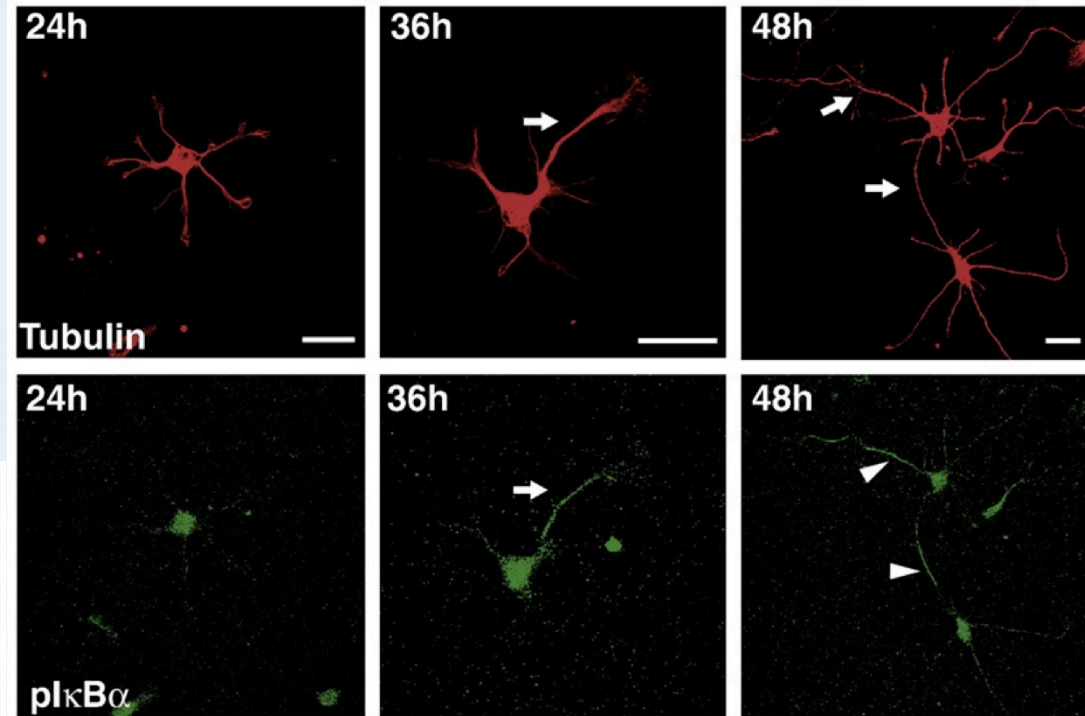


pI κ B α : Expresión temprana en el SIA

Tejido (hipocampo)



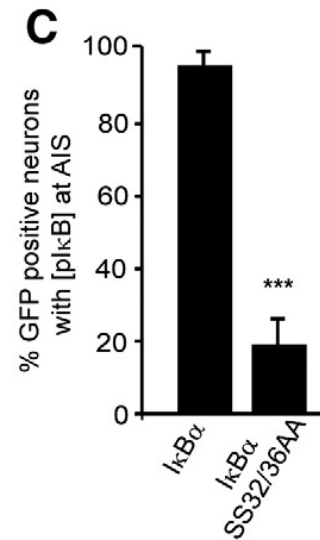
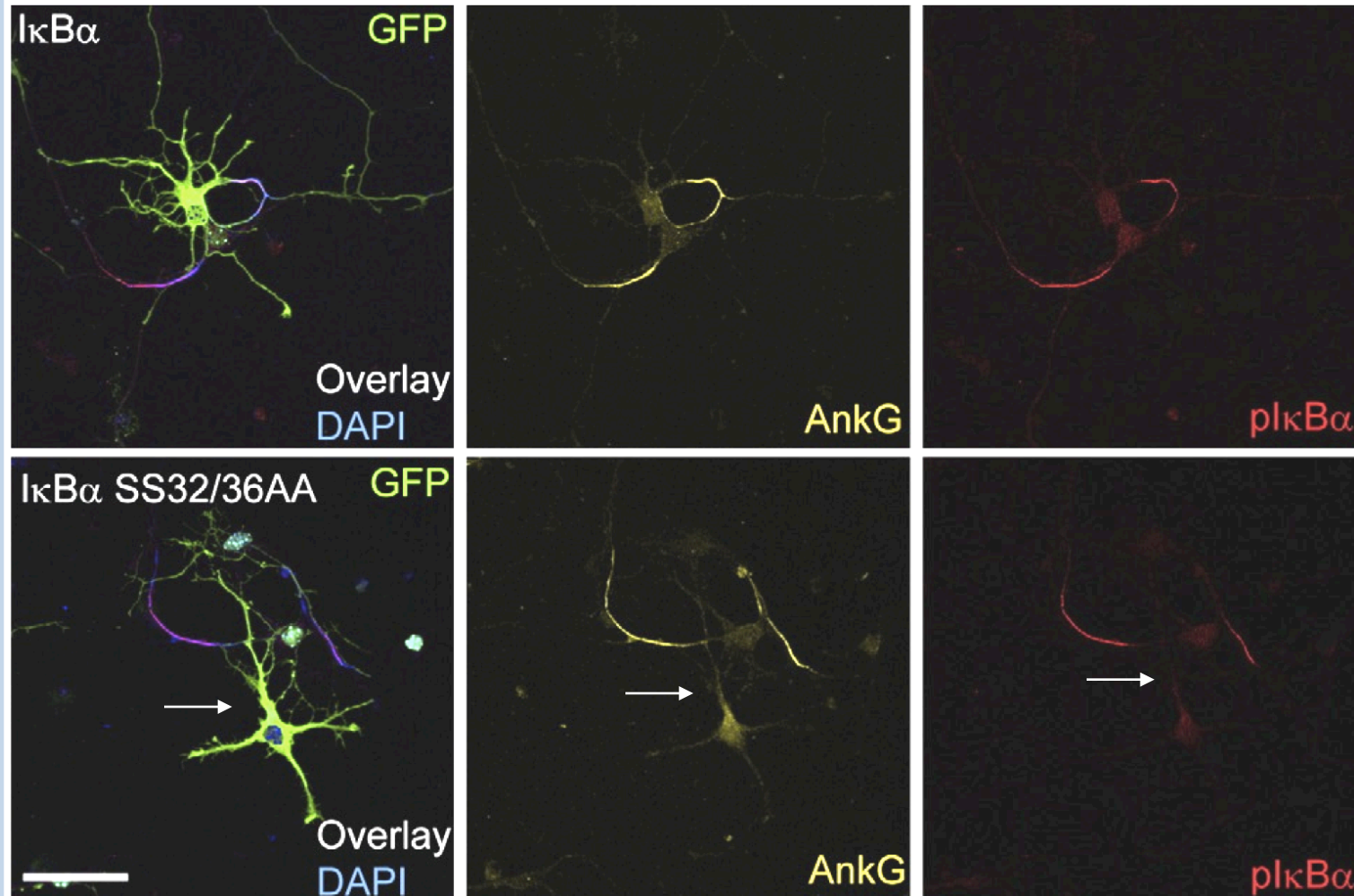
Cultivo neuronas hipocampo



¿Papel de pI κ B?

Papel de IKK en la formación del SIA

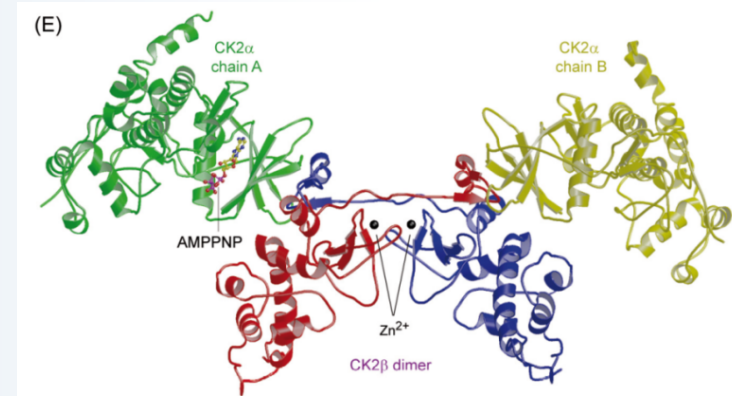
- Tratamiento inhibitor farmacológico IKK
- Nucleofección con el plásmido mutante de I κ B



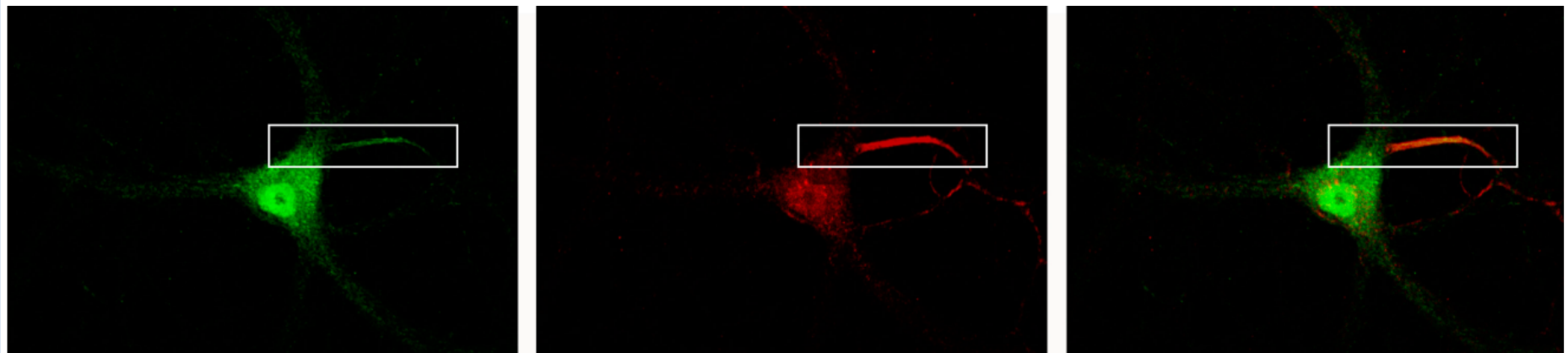
La quinasa IKK es esencial para la formación del axón y el establecimiento del SIA

Caseína quinasa 2

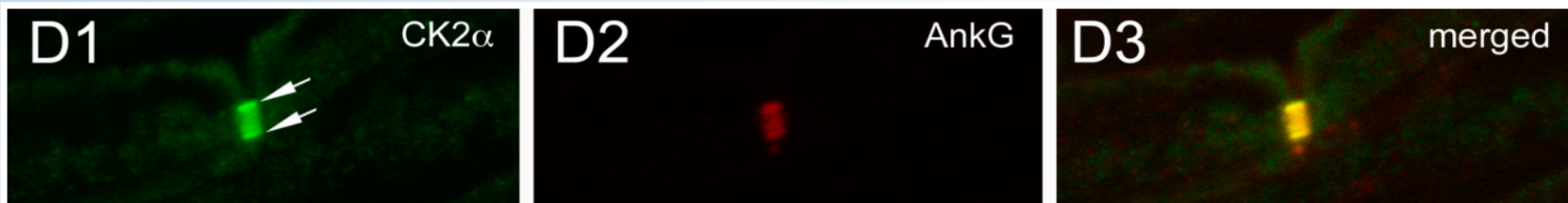
- Ser –Thr quinasa
- Tetrámero : 2 subunidades α y α' (dominio catalítico) y 2 subunidades β (reguladoras)



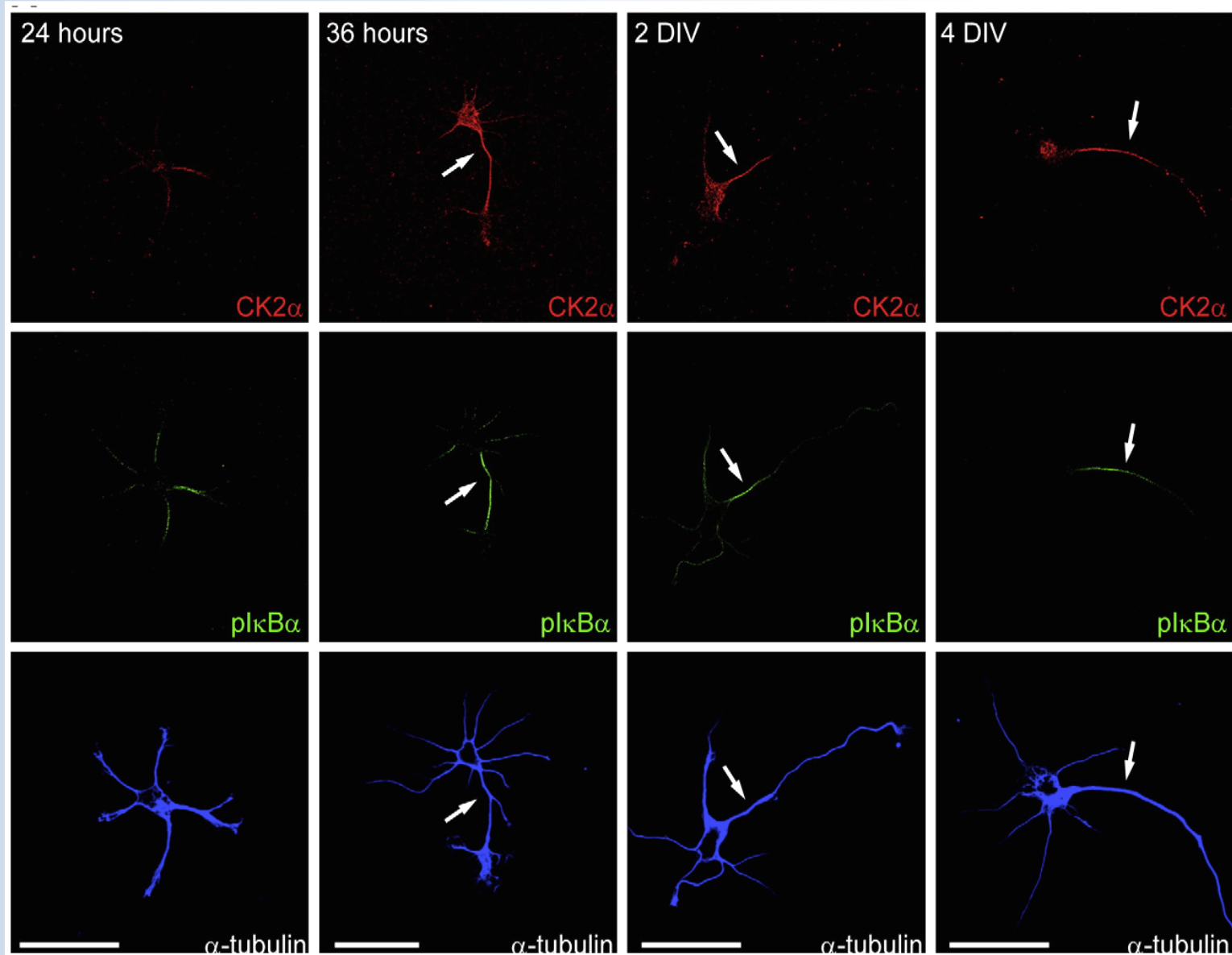
SIA



Nodos de Ranvier

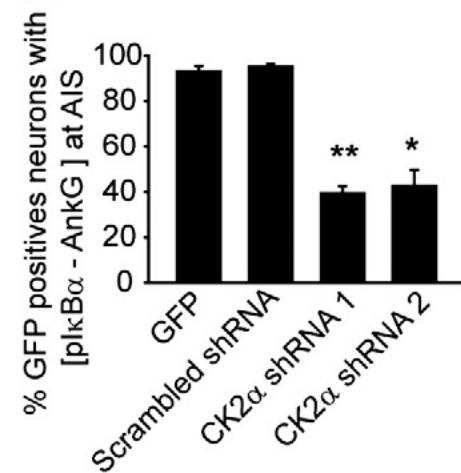
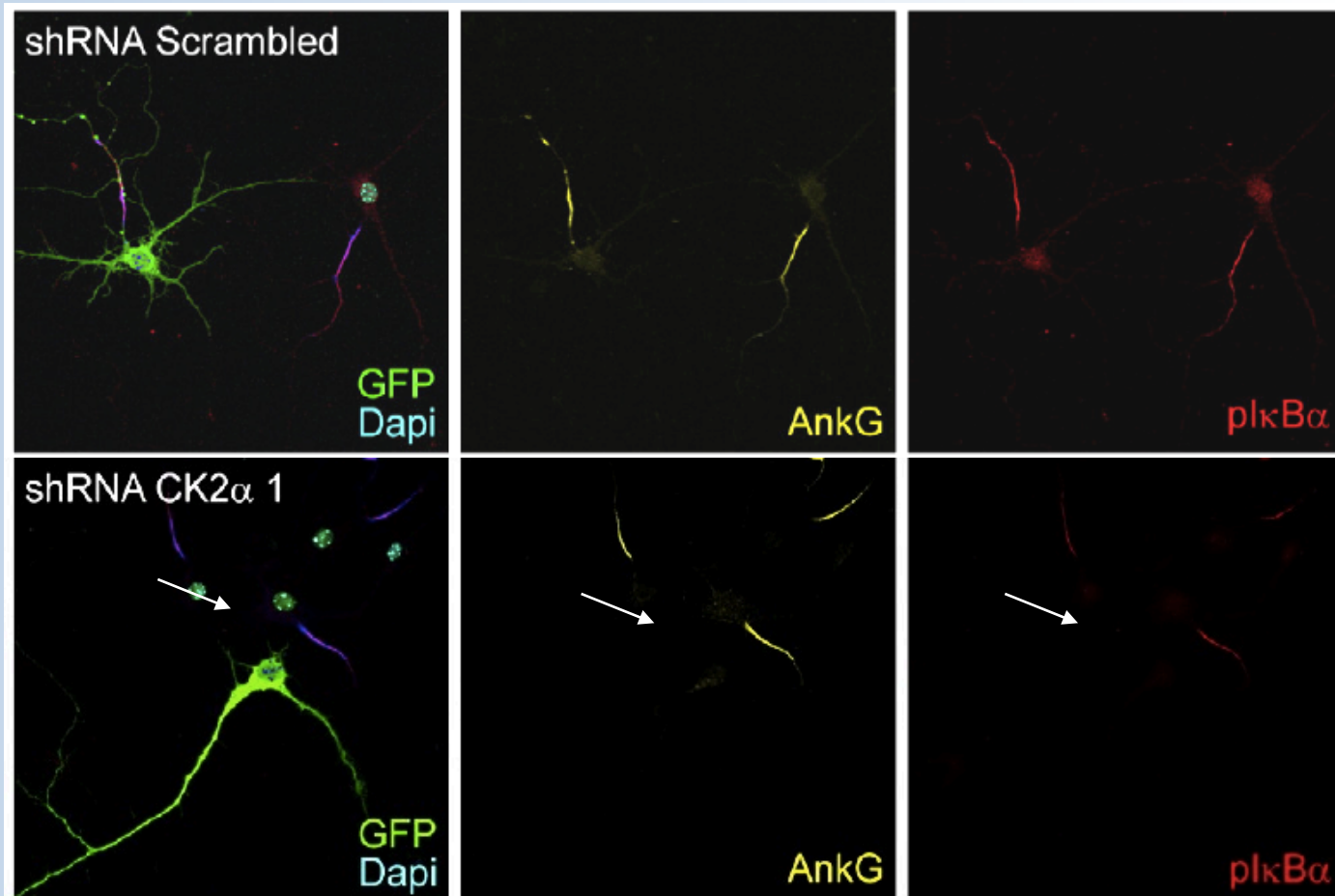


Localización de CK2 durante el desarrollo



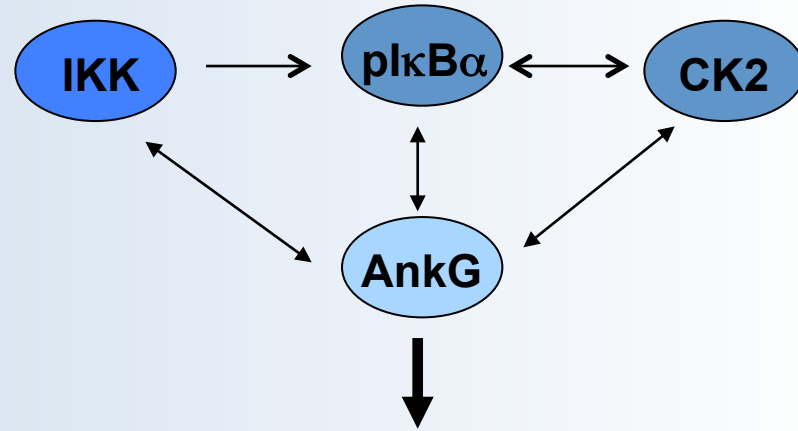
¿Papel del CK2 en el SIA?

- Tratamiento inhibidor farmacológico CK2
- Nucleofección con el plásmido interferente para CK2

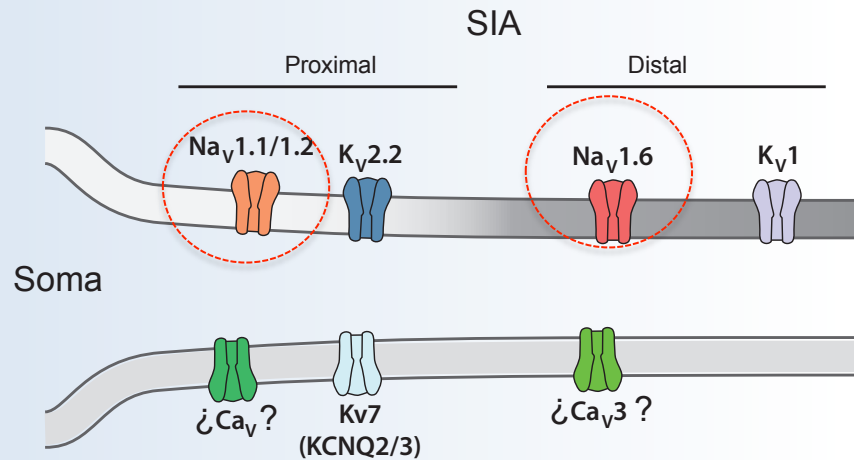


CK2 controla la formación del SIA

Papel de IKK y CK2 en la formación del SIA



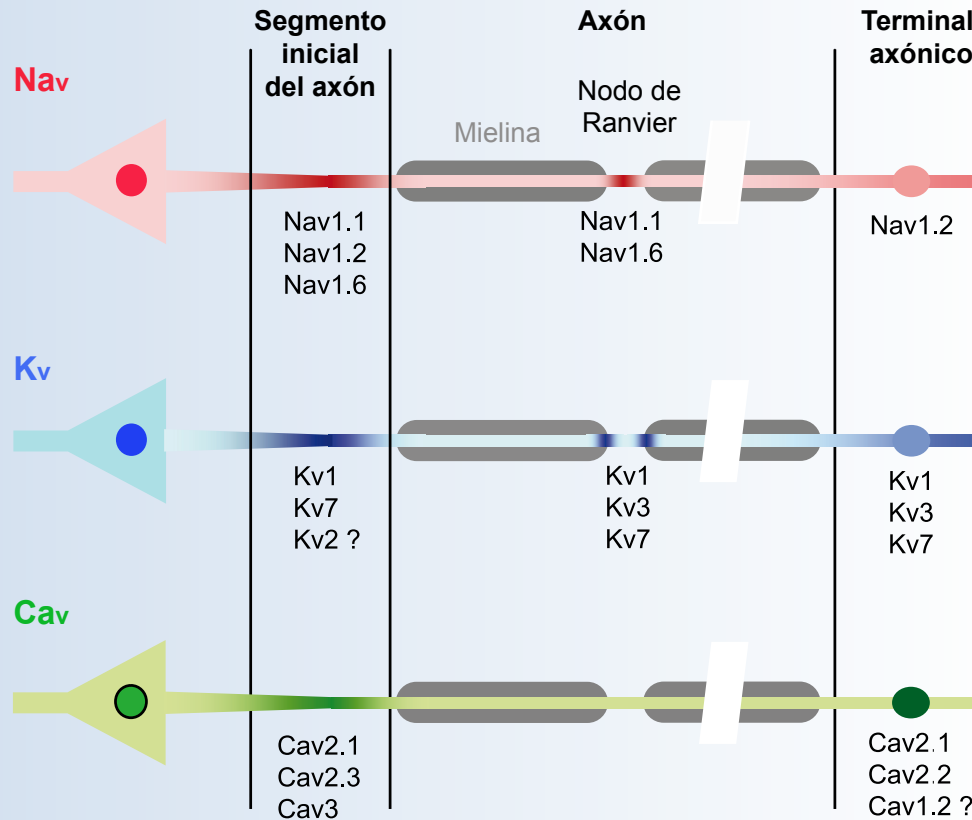
Concentración de canales de Na⁺ dependientes de voltaje en el SIA



Composición molecular del SIA: canales iónicos

1. Patrones de distribución específicos

2. Gran heterogeneidad entre diferentes poblaciones



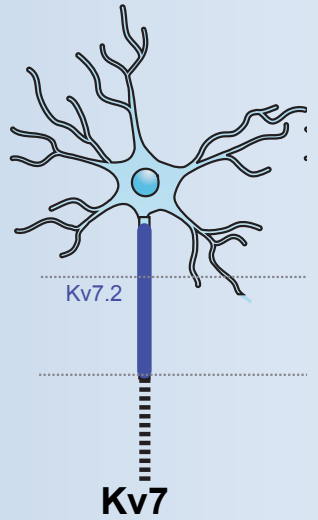
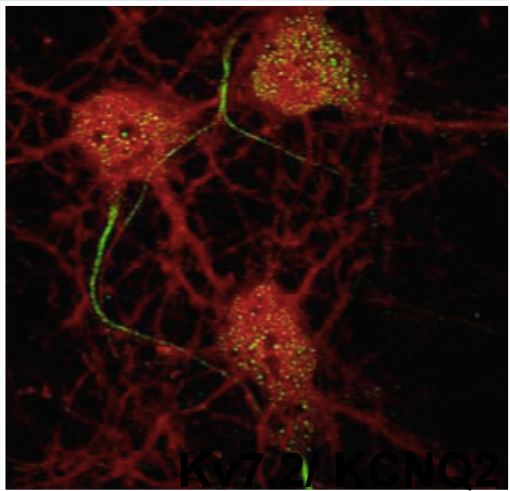
Debanne et al 2011, *Physiol Rev*

↑ Variabilidad y complejidad

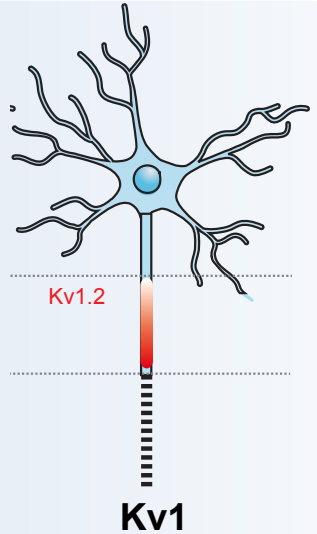
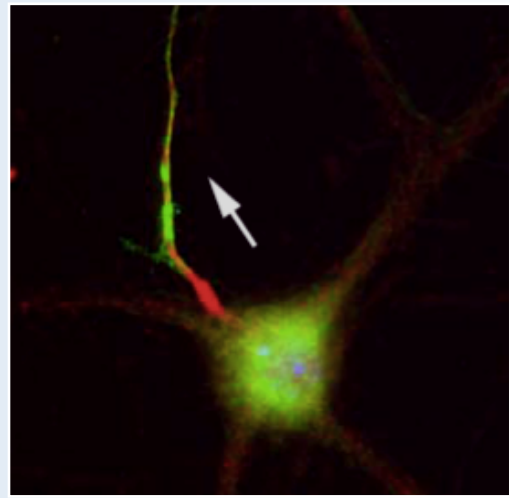
Objetivos

- Estructura y composición y maduración del segmento inicial del axón :
 1. Implicación de las quinasas IKK y CK2 en el establecimiento de la polaridad neuronal y la formación del SIA.
 2. Patrones de expresión de canales de potasio dependientes de voltaje en los distintos subdominios a lo largo del desarrollo *in vitro* del SIA.
 3. Estudio del desarrollo *in vitro* del orgánulo de cisternas del SIA en neuronas hipocampales, los mecanismos de localización, y la expresión de diversas moléculas implicadas en la regulación de los niveles de calcio en el SIA.
 4. Analizar la implicación del orgánulo de cisternas en los procesos de plasticidad del SIA

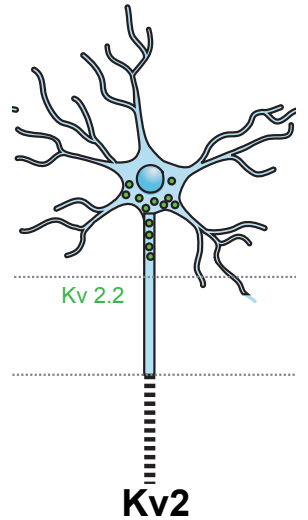
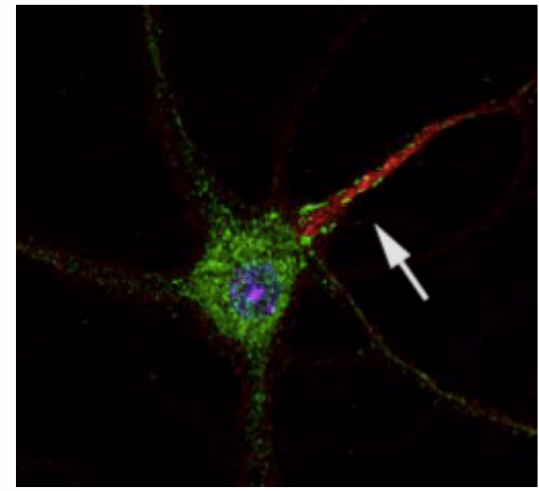
Expresión de canales de potasio en el SIA durante el desarrollo neuronal



- Expresión temprana en el SIA
- Presente en el 80-90% de las células
- Se distribuye a lo largo del SIA

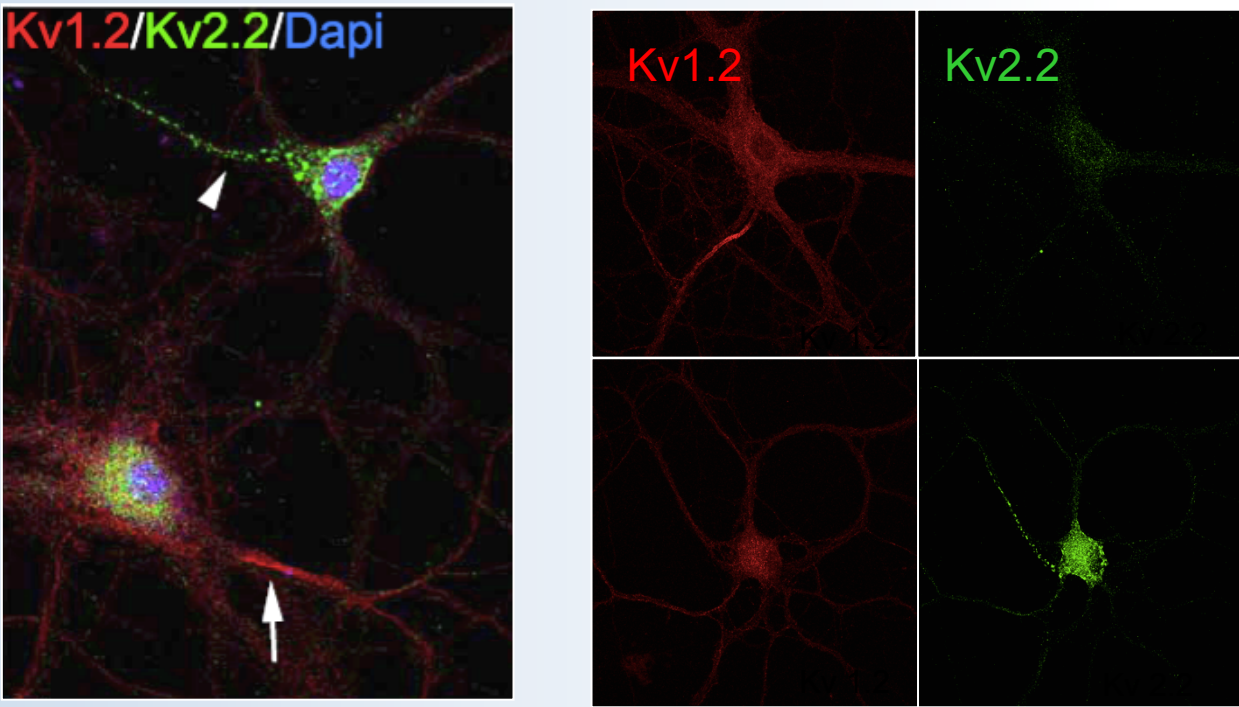


- Expresión tardía en el SIA
- 30% de las neuronas
- Distribución distal en el SIA

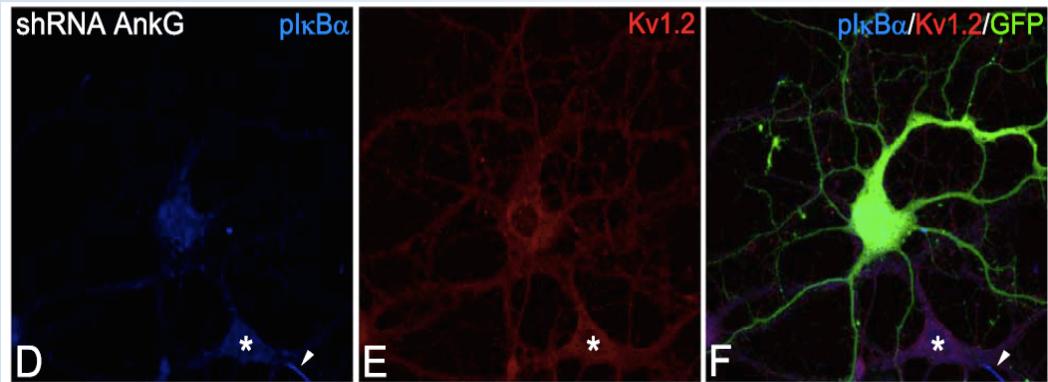


- Expresión tardía en el SIA
- 70% de las neuronas
- Distribución proximal en el SIA
- forma pequeños "clusters"

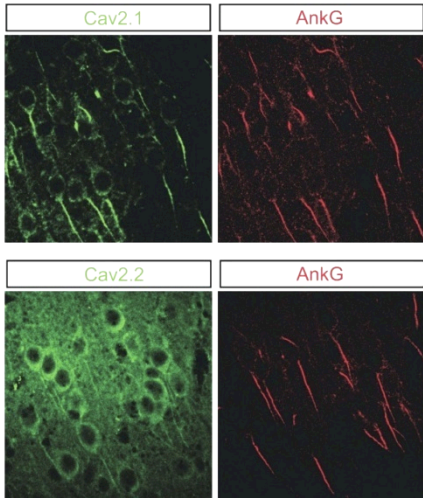
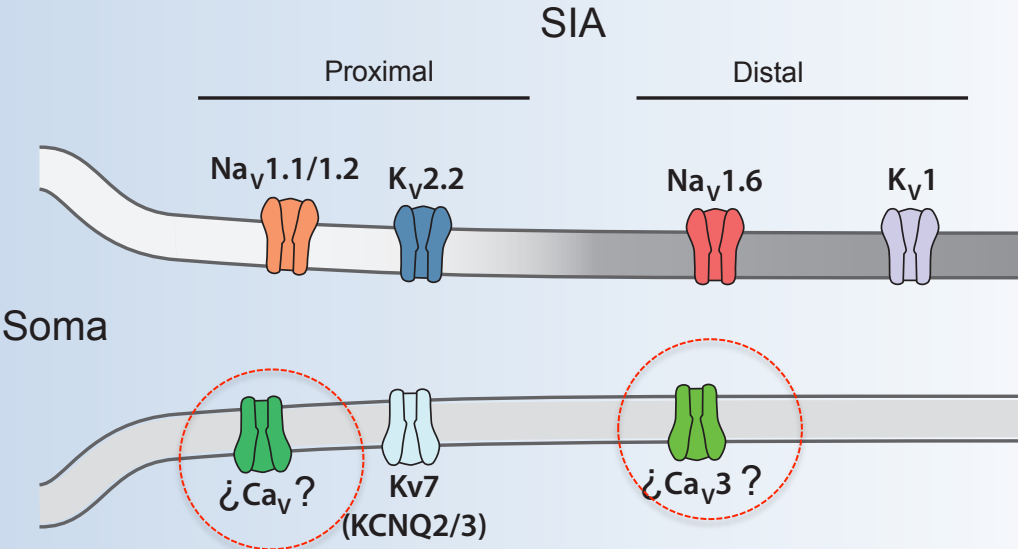
- Kv1.2 y Kv2.2 tienen expresión mutuamente excluyente en el SIA: ¿Diferentes poblaciones neuronales?



- La expresión de AnkG es esencial para la localización de Kv 1.2 y Kv2.2 durante el desarrollo



Canales de calcio en el SIA



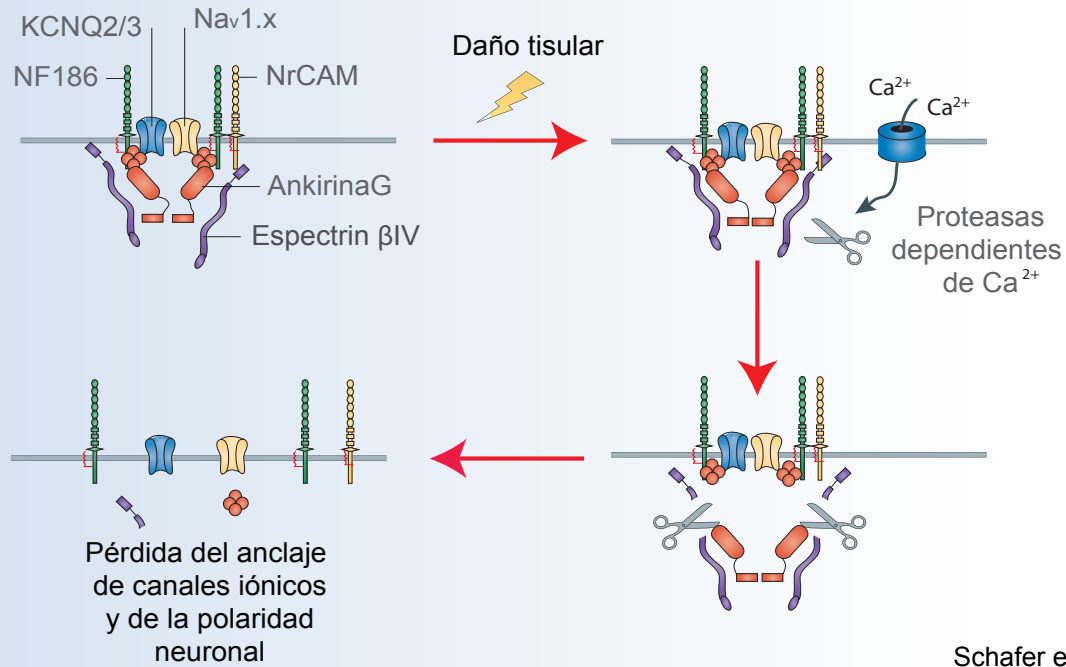
Yu et al., 2010, *J Neurosci*
Bender and Trussell, 2009 *Neuron*

Objetivos

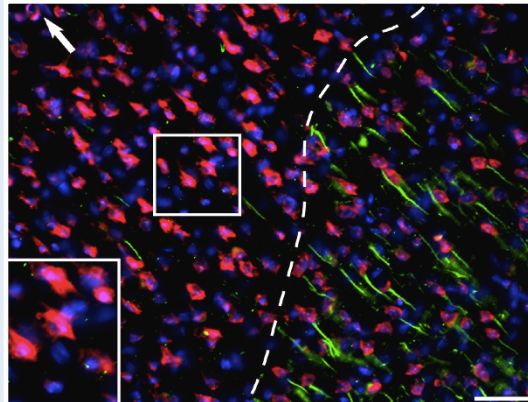
- Estructura y composición y maduración del segmento inicial del axón :
 1. Implicación de las quinasas IKK y CK2 en el establecimiento de la polaridad neuronal y la formación del SIA.
 2. Patrones de expresión de canales de potasio dependientes de voltaje en los distintos subdominios a lo largo del desarrollo *in vitro* del SIA.
 3. Estudio del desarrollo *in vitro* del orgánulo de cisternas del SIA en neuronas hipocampales, los mecanismos de localización, y la expresión de diversas moléculas implicadas en la regulación de los niveles de calcio en el SIA.
 4. Analizar la implicación del orgánulo de cisternas en los procesos de plasticidad del SIA

Canales de calcio en el SIA

• Degradación del SIA por activación de calpaina



Schafer et al, 2009 *J. Neurosci*

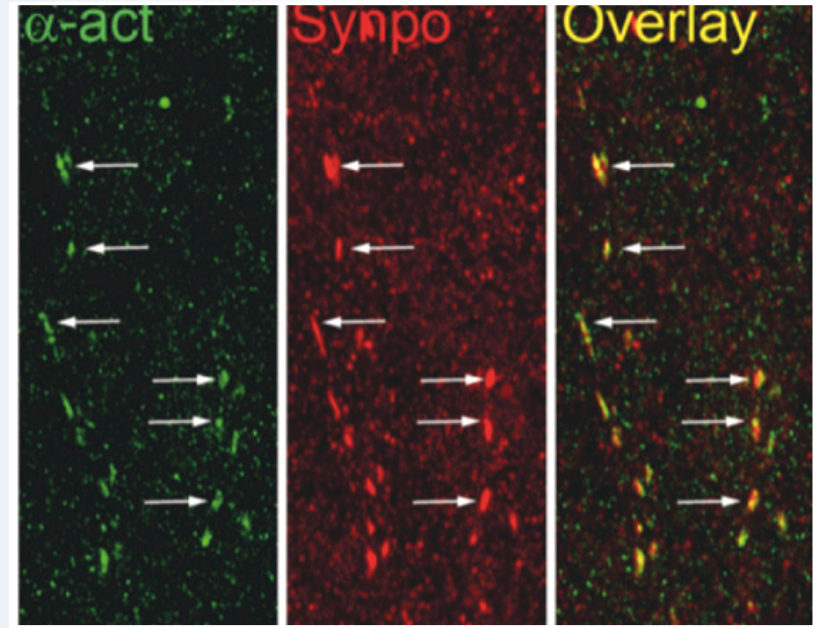
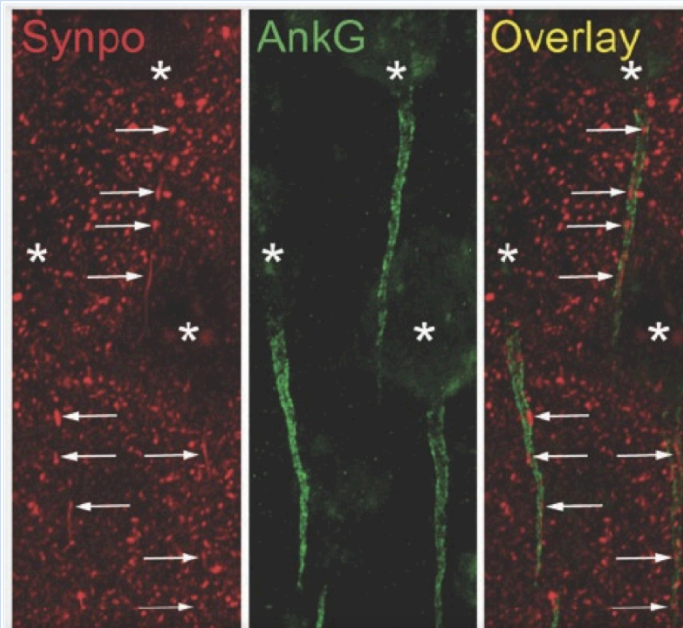


Schafer et al ., 2009 *J. Neurosci*

¿Regulación de los niveles de Ca²⁺ en el SIA ?

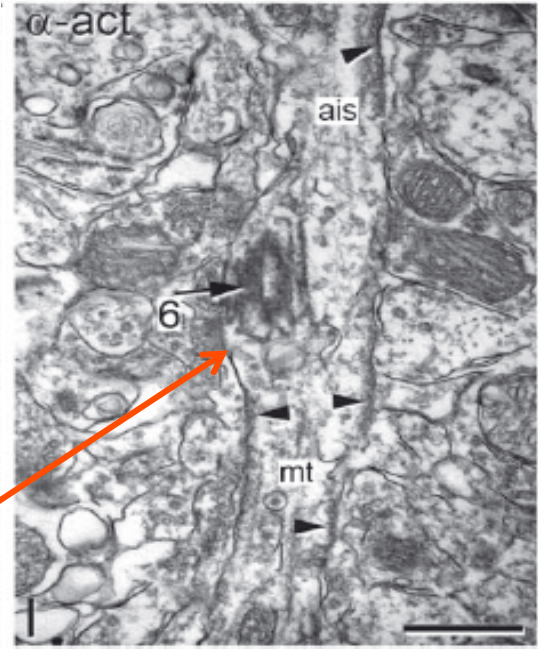
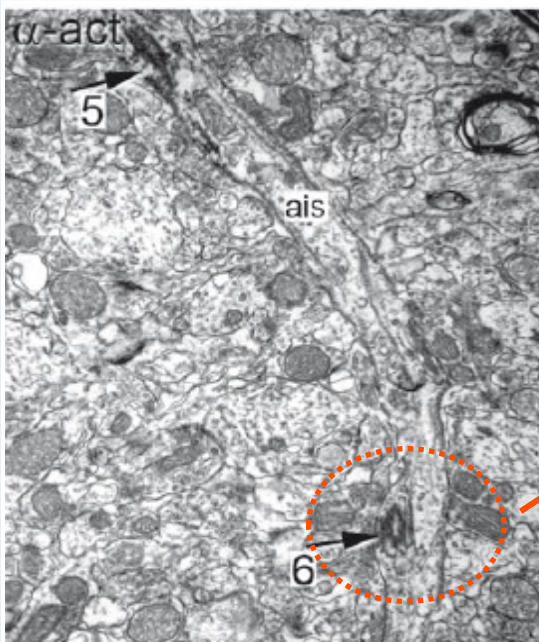
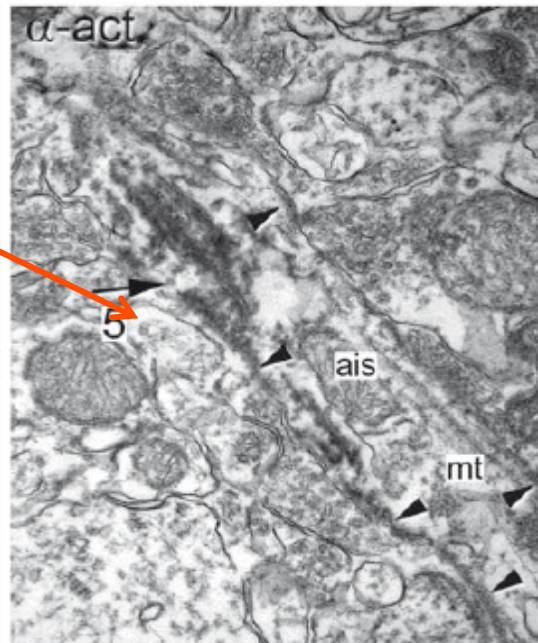
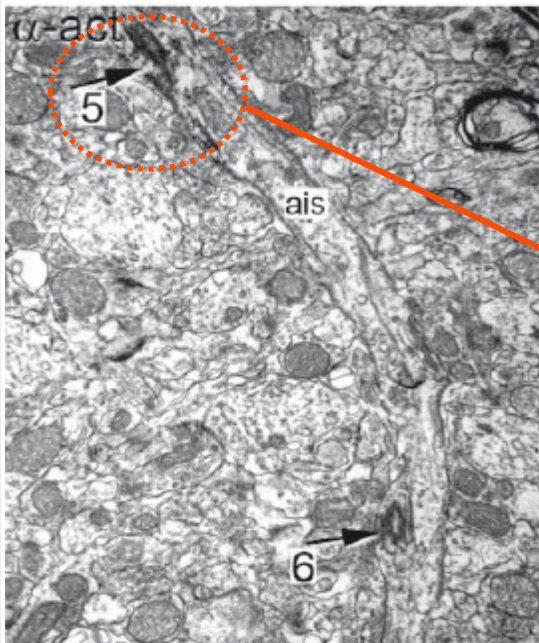
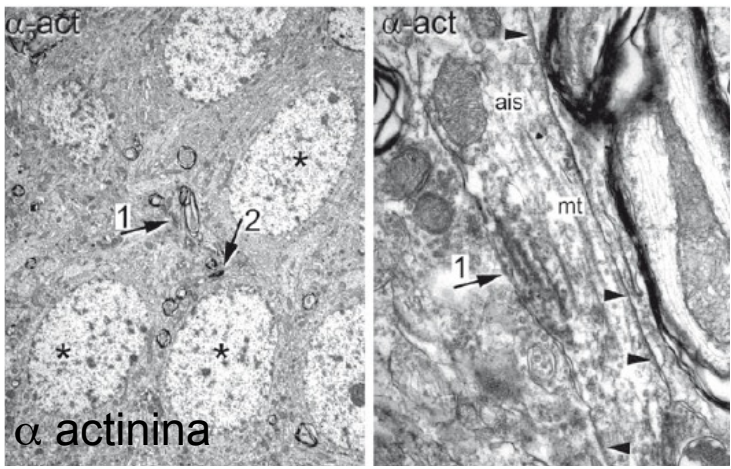
El orgánulo de cisternas : Colocalización de sinaptopodina y α -actinina

- Neocorteza (Capa III)
- Hipocampo (CA1)

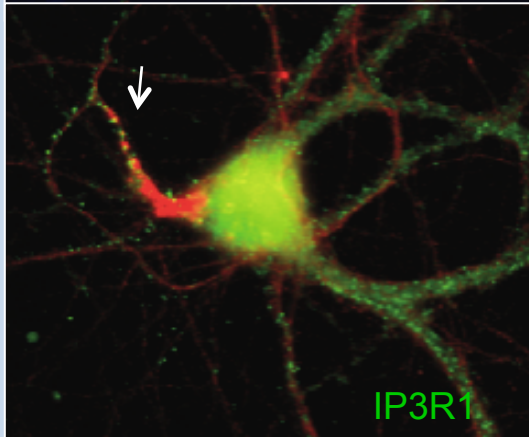
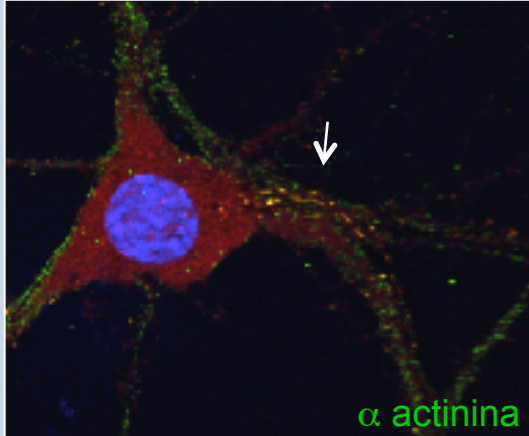
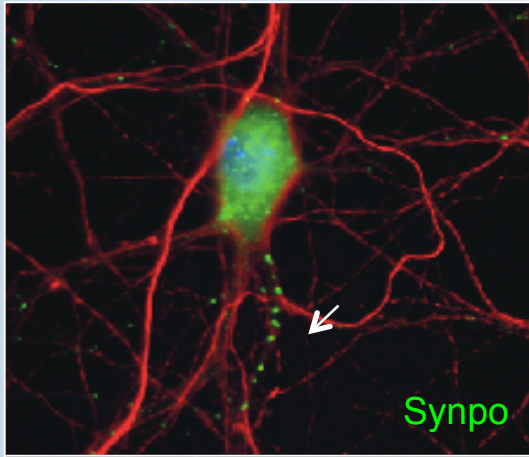


El orgánulo de cisternas: Micr.Electrónica

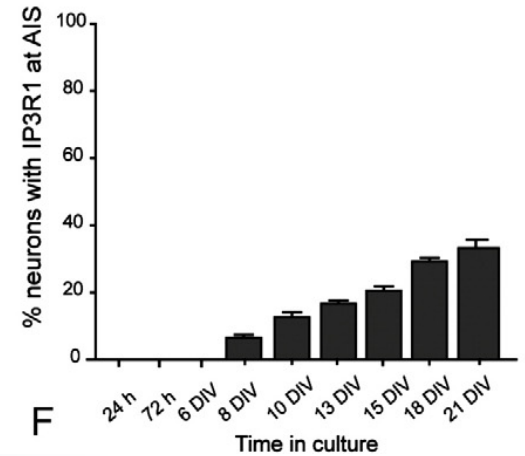
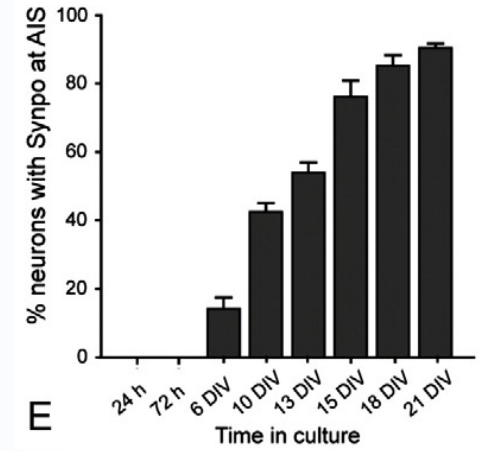
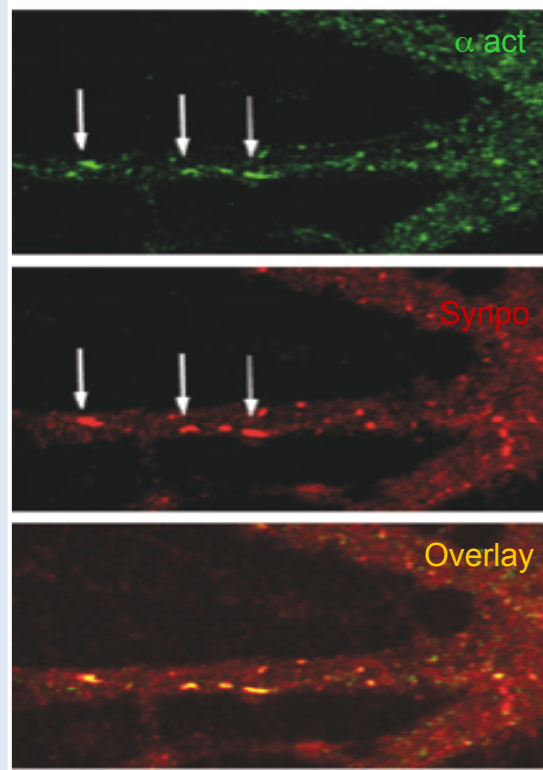
•Neocorteza Capa III



Expresión de proteínas del orgánulo de cisternas durante el desarrollo



Colocalización:

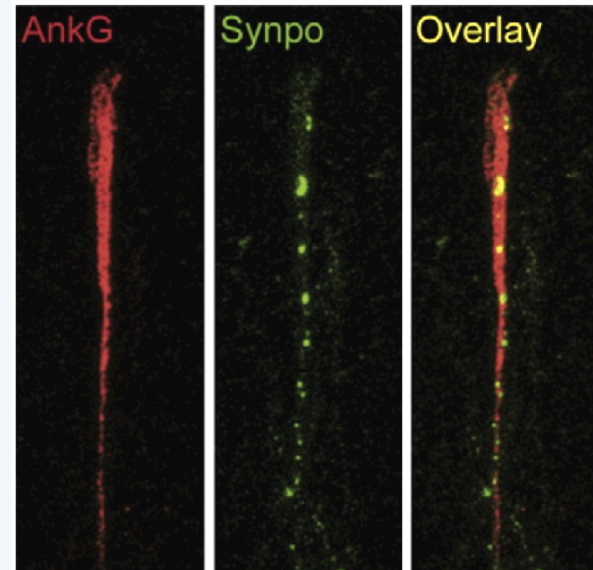


Mecanismos de estabilización del orgánulo de cisternas

• ¿Qué interacciones permiten la estabilización del orgánulo de cisternas?

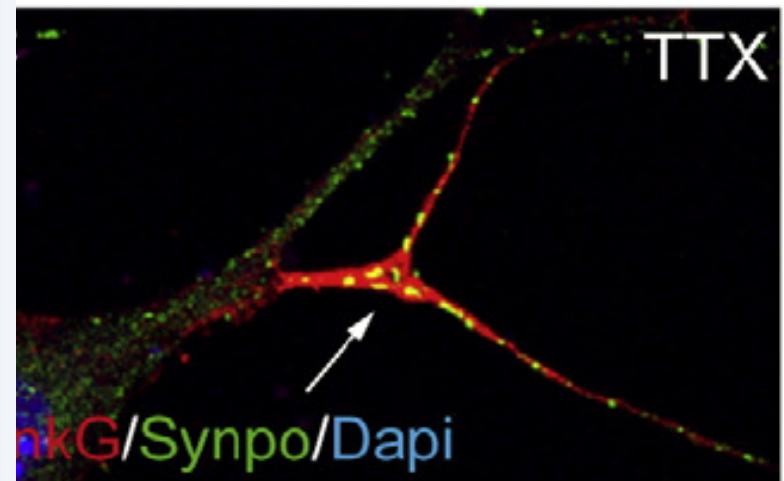
• 1. Extracción con detergente:

Asociación con citoesqueleto o con proteínas de adaptadoras del SIA



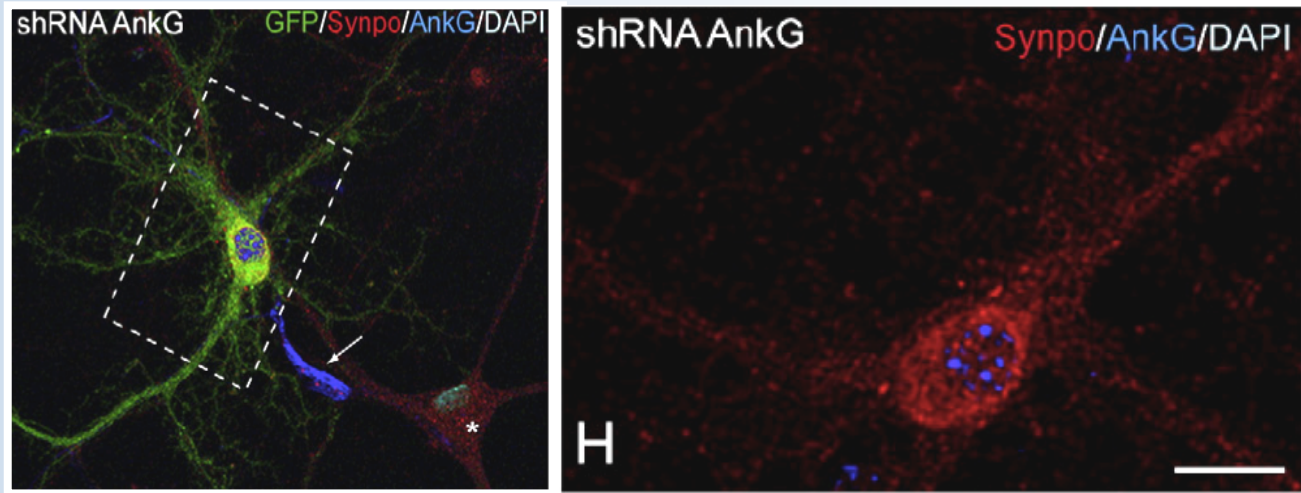
• 2. Tratamiento con Tetrodotoxina (TTX) : Bloqueo de los potenciales de acción

Independiente de la generación de potenciales de acción



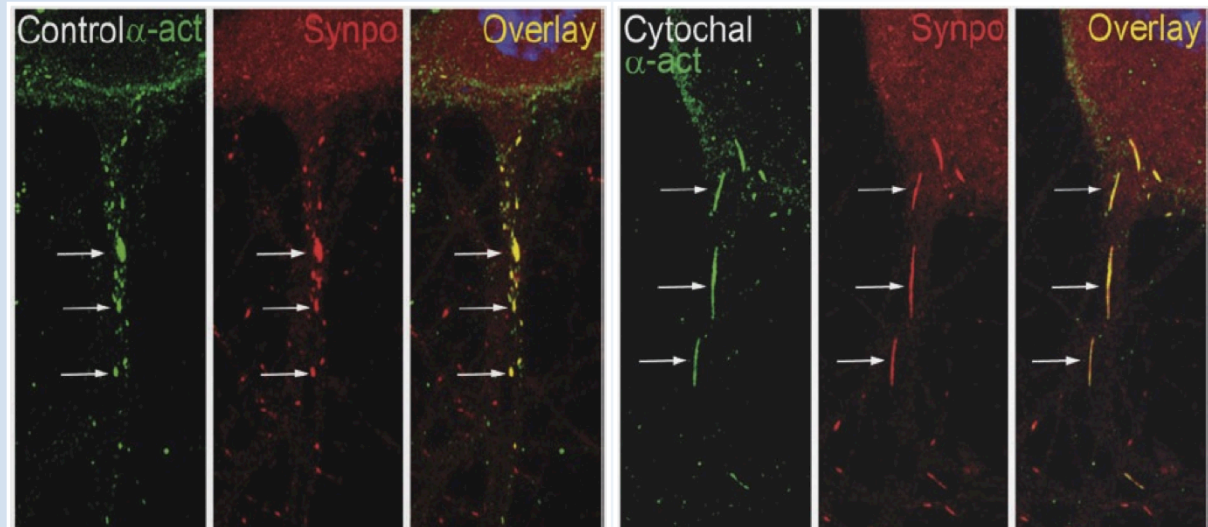
Mecanismos de estabilización del orgánulo de cisternas

•3. Interferencia AnkG shRNA:



Orgánulo de cisternas: Dependiente de la expresión de AnkG en el SIA

•4. Tratamiento con citocalasina D

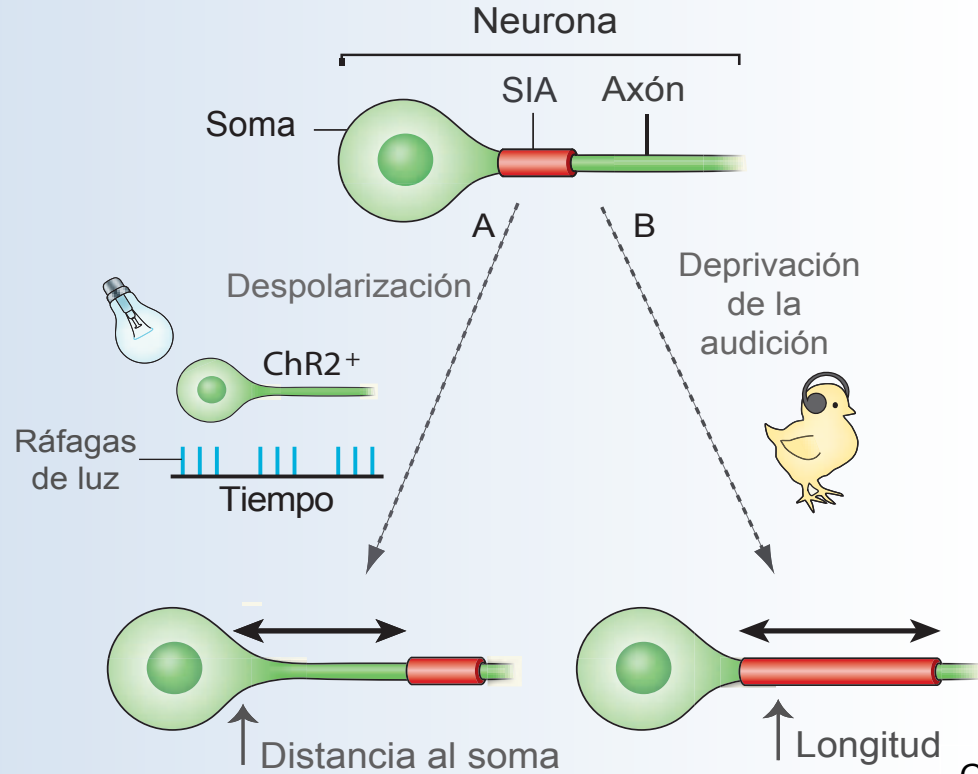


Desestabilización de actina: afecta a la morfología del orgánulo de cisterna

Objetivos

- Estructura, composición y maduración del segmento inicial del axón :
 1. Implicación de las quinasas IKK y CK2 en el establecimiento de la polaridad neuronal y la formación del SIA.
 2. Patrones de expresión de canales de potasio dependientes de voltaje en los distintos subdominios a lo largo del desarrollo *in vitro* del SIA.
 3. Estudio del desarrollo *in vitro* del orgánulo de cisternas del SIA en neuronas hipocampales, los mecanismos de localización, y la expresión de diversas moléculas implicadas en la regulación de los niveles de calcio en el SIA.
 4. Analizar la implicación del orgánulo de cisternas en los procesos de plasticidad del SIA.

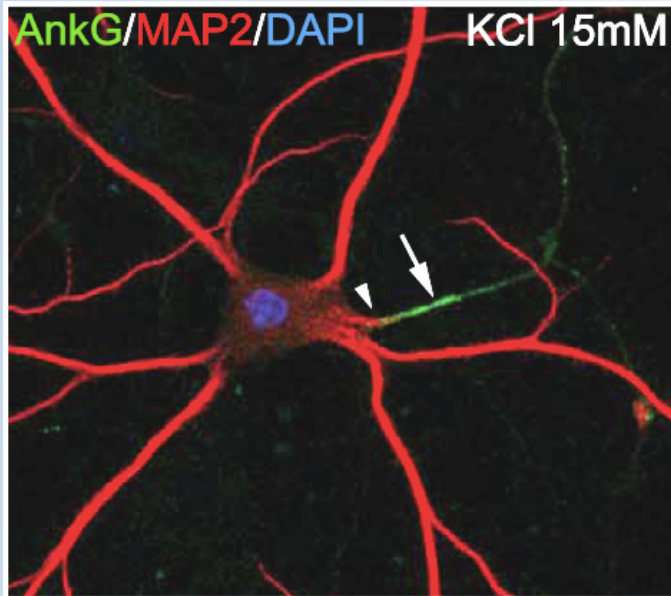
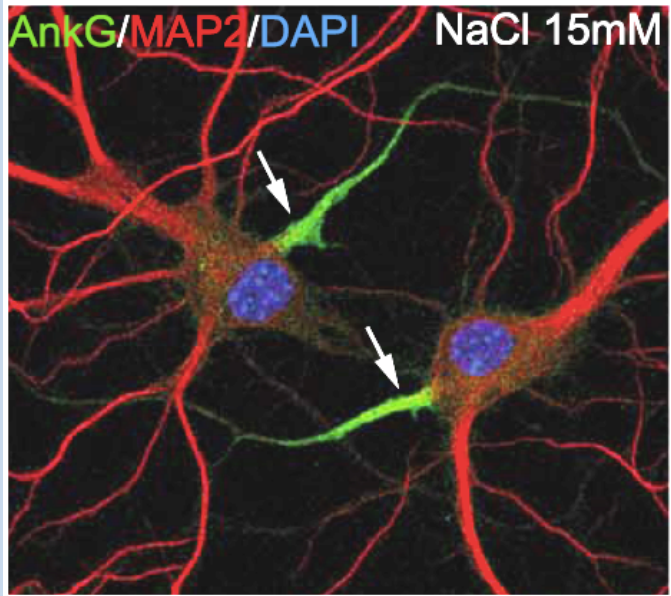
Plasticidad en el segmento inicial del axón



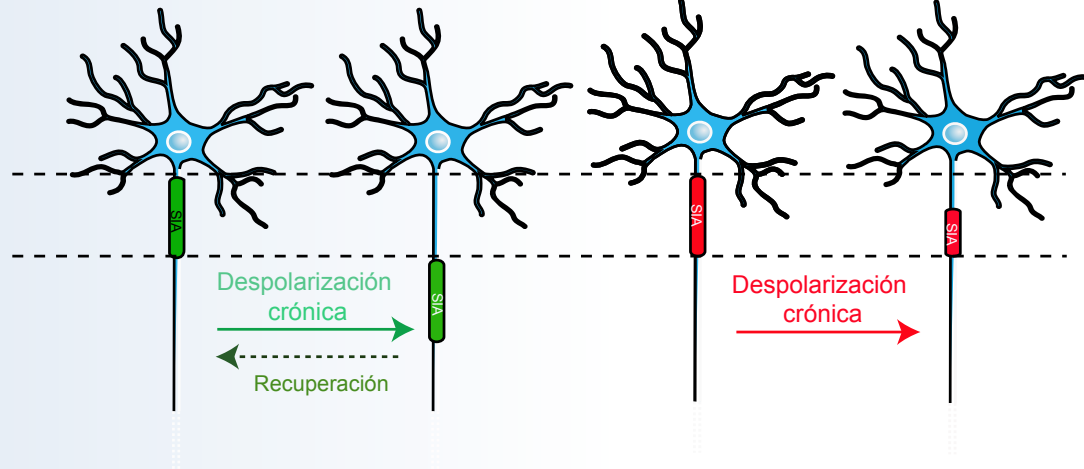
Grubb and Burrone , 2010 *Nature*

Dependiente de la activación de canales de calcio tipo T_o y L

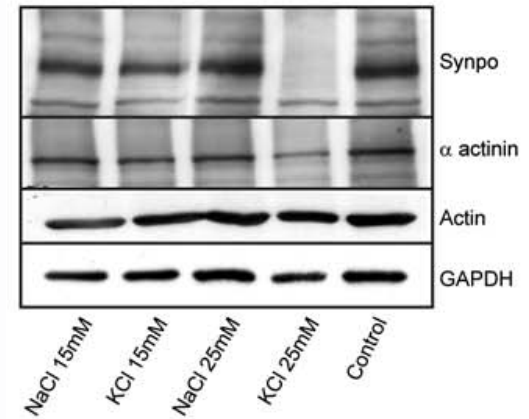
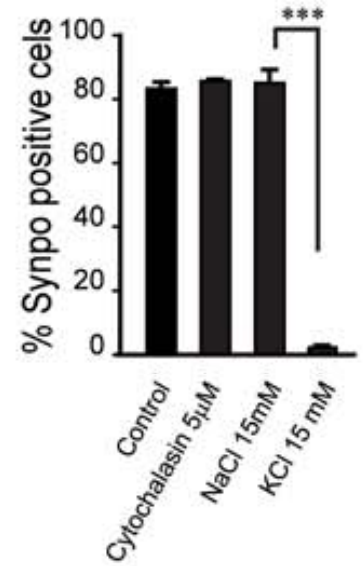
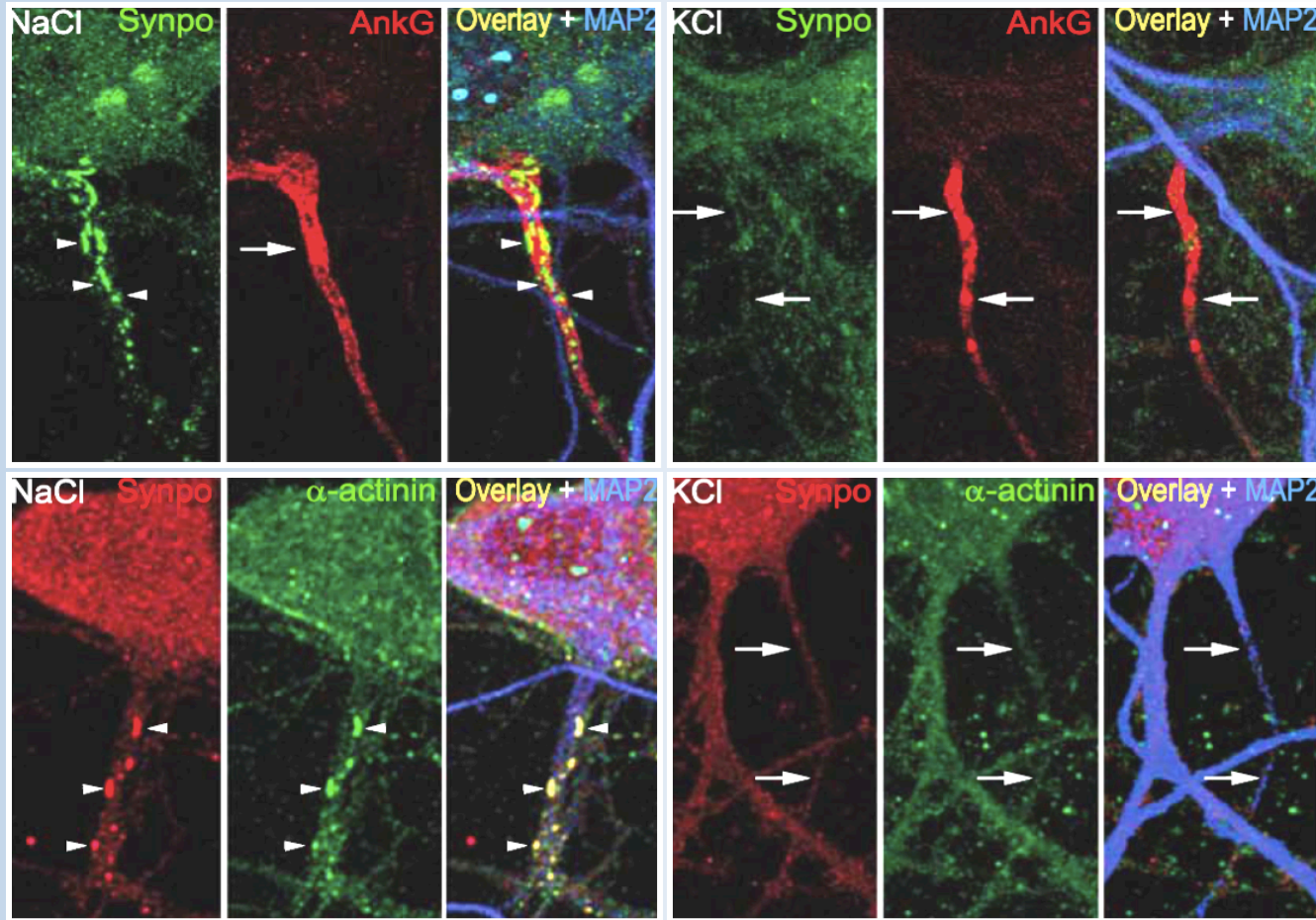
Plasticidad del SIA



NEURONAS
HIPOCAMPALES
DE RATA
Cultivo mixto
Grubb and Burrone



Papel del orgánulo de cisternas en la plasticidad del SIA



Las alteraciones del orgánulo de cisternas pueden estar implicadas en la plasticidad del 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, plkB α , ankirina G y canales de sodio en el SIA.

Conclusiones

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 Ca^{2+} , 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 Ca^{2+} sensible a IP3 que podría regular los niveles intracelulares de Ca^{2+} y el mantenimiento estructural del SIA.

Conclusiones

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. 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 Ca^{2+} en el SIA.

Agradecimientos

- Alberto Muñoz .Laboratorio Cajal de Circuitos Corticales (Centro de Tecnología Biomédica)
- Juan Jose Garrido , Laboratorio Polaridad Neuronal (Instituto Cajal)

