

1. Mecanismos implicados en la axonogénesis, el crecimiento axonal y la localización de proteínas en el axón

JUAN JOSÉ GARRIDO
Y
MIGUEL DÍAZ HERNÁNDEZ

RESUMEN

El inicio de la funcionalidad neuronal comienza por la formación de un axón y la generación de dos dominios funcionales, axonal y somatodendrítico. En estos dominios se forman subdominios especializados en la recepción de señales (espinas dendríticas) y la propagación de los impulsos nerviosos (segmento inicial del axón). La formación del axón depende de la activación de vías de señalización como la de PI3-quinasa, LKB1 o NFκB que regulan la dinámica del citoesqueleto de actina y microtúbulos y la elongación axonal. Además, existen señales que actúan negativamente sobre el crecimiento axonal. Recientemente, hemos demostrado que el ATP y el receptor purinérgico P2X7 forman parte de estas señales negativas y la inhibición farmacológica de P2X7 induce la inhibición de GSK3, la cual está asociada en diferentes trabajos a la elongación y arborización axonal. De hecho, su inhibición o supresión potencian el crecimiento axonal y la arborización del axón. Simultáneamente a la elongación del axón, se forma el segmento inicial del axón, responsable de generar los potenciales de acción. Recientemente, describimos un motivo aminoacídico capaz de localizar proteínas de membrana y canales iónicos en dicha región. Esto es posible gracias a mecanismos de transporte dirigidos por los microtúbulos y la kinesina-1 y a mecanismos de anclaje específicos del segmento inicial del axón. El conocimiento de estos mecanismos moleculares ha permitido encontrar dianas terapéuticas que deban ser estudiadas para el tratamientos de enfermedades neurodegenerativas y relacionadas con el crecimiento del axón y su funcionalidad.

Palabras clave: Segmento inicial del axón. Citoesqueleto. Polaridad neuronal. Receptores purinérgicos. Arborización axonal.

ABSTRACT

Mechanisms involved in axon formation, axonal elongation and protein targeting at the axon

The begging of neuronal functionality starts by the formation of an axon, and the generation of two functional domains, axonal and somatodendritic. Specialized subdomains are formed in these domains to receive signals (dendritic spines) and to propagate nerve impulse (axonal initial segment). Axon formation depends on the activation of signalling pathways, such as PI3-kinase, LKB1 or NFκB, which regulate the dynamics of actin and microtubule cytoskeleton, and so, axonal elongation. Besides, there are signals that act negatively on axonal growth. Recently, we have demonstrated that ATP and the purinergic receptor P2X7 form part of these signals and the pharmacological inhibition of P2X7 induces GSK3 inhibition. GSK3 inhibition has been related in several Studies to axonal elongation and axonal branching. In fact, inhibition of P2X7 or its suppression potentiates axonal growth and branching. Simultaneously to axonal elongation, the axon initial segment is formed. This domain is responsible for action potential generation. Recently, we have described a targeting motif capable of localizing membrane proteins and ionic channels to the axon initial segment. This protein targeting is due to transport mechanisms involving microtubules and kinesin-1, as well as, tethering mechanisms specific of the axon initial segment. A better knowledge of these molecular mechanisms has allowed the finding of new therapeutic targets that should be studied for the treatment of neurodegenerative diseases and diseases affecting axonal growth and its correct function.

Keywords: Axonal initial segment. Cytoskeleton. Neuronal polarity. Purinergic receptors. Axonal branching.

INTRODUCCIÓN

Nuestros movimientos, las percepciones sensoriales de lo que ocurre a nuestro alrededor y la generación de una respuesta a ellas dependen de una compleja red de neuronas en nuestro sistema nervioso central y periférico. Santiago Ramón y Cajal fue el primero en postular la existencia de la neurona como una unidad básica de funcionamiento del cerebro. Además, propuso en su ley de polarización dinámica que la transmisión del movimiento nervioso se produce siem-

pre desde las ramas protoplásmicas y cuerpo celular, al axón o expansión funcional, y que toda neurona posee, pues, un aparato de recepción, el soma y las prolongaciones protoplásmicas (dendritas), un aparato de emisión, el axón, y un aparato de distribución, la arborización nerviosa terminal (1, 2). Con esta idea, Ramón y Cajal abrió dos cuestiones que están plenamente de actualidad, cómo se adquiere la morfología de una neurona y cuáles son los mecanismos celulares y moleculares que permiten la transmisión del impulso nervioso de una neurona a otra. Esta revisión pretende abordar algunos de los avances más importantes que se han producido en el campo de la polaridad neuronal en estos últimos años.

Diversos avances técnicos, entre ellos, modelos de cultivo de neuronas han permitido estudiar de una forma más precisa la morfogénesis neuronal. En la actualidad, conocemos con una mayor precisión que el primer fenómeno en el establecimiento de la polaridad neuronal es la formación de un axón, antes incluso que se desarrollen las otras neuritas como dendritas. En dicha formación están implicadas al menos dos rutas de señalización, la ruta de PI3-quinasa y una ruta menos conocida en la que juega un papel importante la proteína LKB1 («tumor suppressor kinase Lkb1»). Estas rutas regulan la dinámica del citoesqueleto de actina y microtúbulos, el cual juega un papel esencial tanto en el crecimiento del axón como en el transporte al axón de las proteínas de membrana que van a permitir la conducción del impulso nervioso. Dicho impulso se genera en respuesta a las señales recibidas por las dendritas, se integra en el segmento inicial del axón, generando el potencial de acción y se transmite a lo largo del axón hasta llegar a la región presináptica. Para que esta maquinaria funcione correctamente cada dominio de la neurona (somatodendrítico, segmento inicial del axón y axón) debe cumplir su función específica y para ello necesita un conjunto propio y específico de proteínas funcionales (receptores de neurotransmisores, canales iónicos y proteínas capaces de anclar las anteriores en una posición concreta). Por tanto, la desregulación a cualquier nivel de señalización del citoesqueleto, la ausencia o falta de función de las proteínas anteriormente mencionadas, así como una localización imprecisa de estas proteínas puede generar una disfunción de la red de neuronas, generando enfermedades neurodegenerativas o mentales.

1. ADQUISICIÓN DE LA POLARIDAD NEURONAL: FORMACIÓN DEL AXÓN

La neurona es una de las células con una mayor complejidad morfológica y funcional. La adquisición de esta complejidad comienza con la especificación de una de las neuritas como axón y su crecimiento. De este modo,

la neurona adquiere su polaridad morfológica, diferenciando un dominio somatodendrítico (postsináptico) y un dominio axonal (presináptico). Los mecanismos intracelulares que regulan la especificación del axón y su posterior crecimiento son aún poco conocidos. A pesar de los datos conocidos sobre la morfogénesis neuronal *in situ*, la comprensión de los mecanismos intracelulares que regulan la neuritogénesis y la formación del axón requieren sistemas experimentales donde las neuronas puedan ser manipuladas durante su diferenciación. La generación de un modelo estandarizado de cultivo de neuronas de hipocampo, con estadios definidos, ha permitido avanzar en el estudio de los mecanismos moleculares responsables de la formación del axón y su elongación (Figura 1). En este modelo las neuronas reproducen los cambios morfológicos y funcionales que se observan en las neuronas *in situ* y su contribución a la investigación de la función neuronal ha sido de gran importancia (3-5).

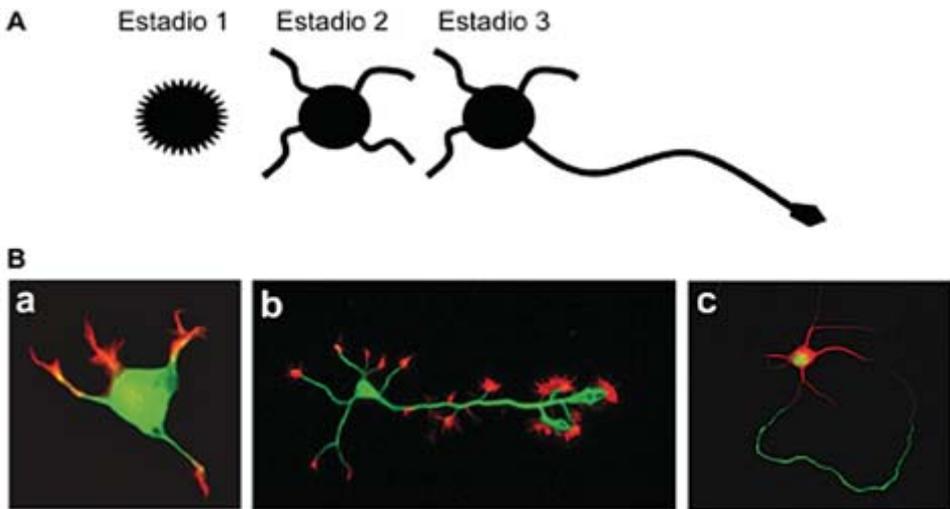


FIGURA 1. **Modelo de adquisición de la polaridad neuronal.** (A) Esquema representativo de los estadios de diferenciación neuronal en el modelo de neuronas de hipocampo en cultivo. (B) En el panel inferior se muestran ejemplos de estas neuronas en estadio 2 (a) y estadio 3 (b y c). En el estadio 2 (a), el axón aún no ha comenzado a crecer y se distinguen varias neuritas que crecen a partir del soma, con conos de crecimiento marcados con Faloidina-Alexa 594 (rojo), mientras que los microtúbulos se marcaron con anti- α -tubulina y un anticuerpo secundario Alexa-488 (verde). En el estadio 3, se observa como el axón ha comenzado a crecer a un mayor ritmo que el resto de neuritas. El patrón del citoesqueleto de microtúbulos y actina se marcó como en a. En c se muestra la diferenciación del citoesqueleto de microtúbulos entre el dominio somatodendrítico (MAP2, rojo) y el dominio axonal (MAP1B fosforilada (SMI-31, verde).

1.1. Ruptura de la neuroesfera y crecimiento de neuritas

Tras la última división, la neurona postmitótica presenta una forma redondeada. En las fases más tempranas, en cultivo, genera un lamelipodio de actina polimerizada a su alrededor (estadio 1). El primer paso en la ruptura de esta simetría es la concentración, en uno o varios puntos, de receptores de factores y proteínas que regulan la polimerización de actina. Se ha descrito que la detección de una señal positiva de crecimiento a través de receptores de membrana transforma RhoA-

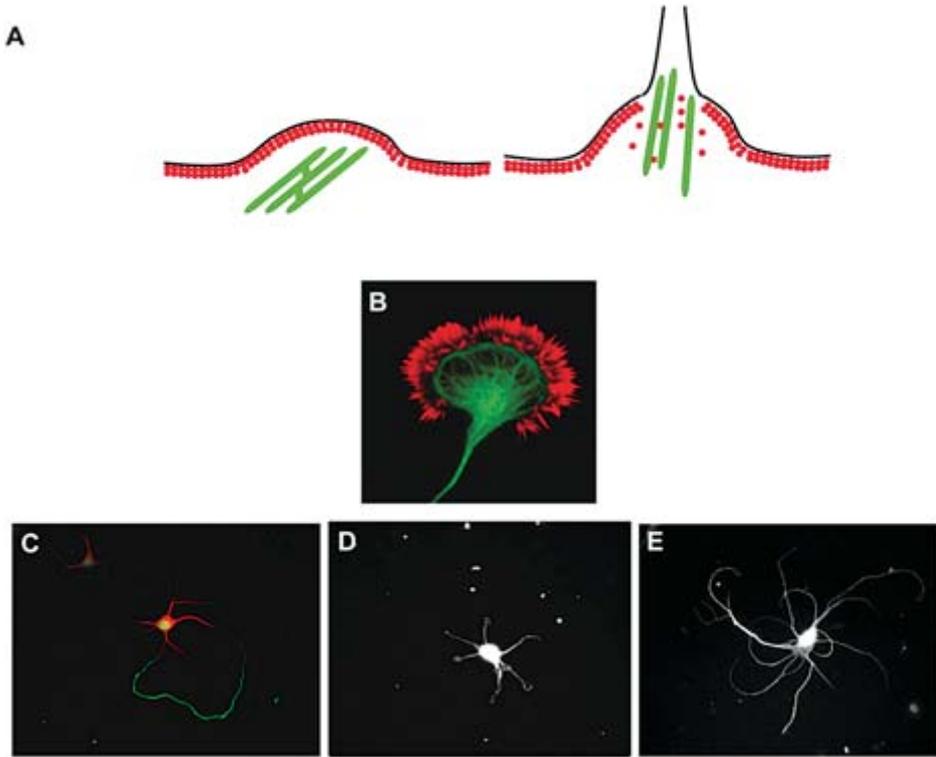


FIGURA 2. **La ruptura de la barrera de actina es necesaria para el crecimiento de neuritas y el axón.** (A) El crecimiento de las neuritas a partir del estadio de neuroesfera y su posterior elongación requieren de la despolimerización de los microfilamentos de actina (rojo) y la ruptura de la barrera de actina. Esto es aprovechado por los microtúbulos (verde) para invadir esta región y promover el crecimiento de las neuritas. (B) Inmunofluorescencia de un cono de crecimiento axonal en sus primeras etapas donde se observa la barrera de actina con su estructura de lamelipodio y filopodios (rojo) y el citoesqueleto de microtúbulos (verde). En comparación con el crecimiento de las neuronas control (C), la estabilización del citoesqueleto de actina mediante el uso de jasplakinolide (D) impide el crecimiento de las neuritas, mientras que su despolimerización con cytochalasina D permite el crecimiento de múltiples neuritas («axon-like»).

GTP a su forma inactiva, RhoA-GDP. Esta inactivación rompe el complejo de RhoA-ROCK-Profilina e induce la despolimerización de actina en este punto concreto (6). Otra proteína asociada a actina que participa en la despolimerización de la actina es la cofilina (7). Esta ruptura de la barrera de actina es utilizada entonces por los microtúbulos para crecer y generar las neuritas (estadio 2, Figura 2). La regulación del citoesqueleto de actina durante el crecimiento neurítico y axonal es aún poco conocida. Además de la regulación de la dinámica de ensamblaje de los filamentos de actina, su nucleación también juega un papel importante en los mecanismos de crecimiento y motilidad neuronal. Quizás el factor de nucleación más conocido es Arp2/3 (8), que necesita de la colaboración de otros factores como WASP (*Wiskott-Aldrich syndrome protein*) y cuya actividad es regulada por miembros de la familia de Rho-GTPasas (9).

1.2. Rho-GTPasas y su relación con el crecimiento de neuritas

Los miembros más conocidos de la familia de Rho-GTPasas son RhoA (*Ras-homologous member A*), Rac1 (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*) y Cdc42 (*cell-division cycle 42*). Las Rho-GTPasas son proteínas que se expresan de forma ubicua y están presentes a lo largo de toda la filogenia. La microinyección de formas constitutivamente activas o dominantes negativos de estas GTPasas ha permitido conocer sus funciones en el control del citoesqueleto de actina. Estas proteínas presentan una forma activa, unida a GTP, y una forma inactiva, unida a GDP. El intercambio de GDP a GTP, y viceversa, está regulado por otras familias de proteínas, GAPs, GEFs y GDIs que regulan este intercambio o lo inhiben (10). Como se ha mencionado anteriormente, el crecimiento de neuritas y con posterioridad del axón depende de la inactivación de RhoA, siendo además esencial la actividad de Rac1. Las Rho-GTPasas regulan el citoesqueleto de actina uniéndose a proteínas asociadas a actina (forminas, WASP, profilina, cofilina, etc.) en función de su estado de actividad y regulando de esta forma la generación de filamentos de actina, su despolimerización y la orientación de estos microfilamentos de actina.

Existe una clara relación entre los citoesqueletos de actina y microtúbulos durante el crecimiento y movimiento celular, aunque no existen muchos datos sobre ello. Un trabajo ha propuesto que RhoA tiene un papel dual en la estabilización y desestabilización de microtúbulos, que Rac1 incrementa el crecimiento de microtúbulos y Cdc42, además de cooperar con Rac1, está implicado en la reorientación del centrosoma hacia la dirección de migración (11).

1.3. Formación del axón y elongación axonal

La adquisición de la polaridad neuronal comienza con la formación de un axón a partir de una de las neuritas generadas (estadio 3). El crecimiento del axón a un mayor ritmo que el resto de neuritas requiere la concentración de mecanismos de regulación del citoesqueleto de actina y microtúbulos, así como de mecanismos de transporte específicos del axón. Se ha descrito que el punto de crecimiento del axón depende de la posición del centrosoma tras la última división (12), lo que supondría un apoyo a la organización de los microtúbulos, su crecimiento y el transporte de proteínas axonales. Sin embargo, el estudio del crecimiento del axón en el modelo de cultivo de neuronas de hipocampo no muestra una relación entre la posición del centrosoma y el punto de crecimiento del axón. Recientemente, un trabajo sugiere que el axón se forma a partir de una de las dos primeras neuritas generadas (13). Si bien, este punto aún necesita de nuevos estudios para determinar con claridad dónde se forma el axón, los mecanismos que lo generan y las proteínas asociadas con la formación del axón son un poco más conocidos.

1.3.1. *Función de PI3-quinasa en la formación del axón*

Utilizando el modelo de neuronas de hipocampo en cultivo se ha descrito que la actividad de PI3-quinasa es esencial para formar un axón (14). Dicha actividad genera PI₃P fosfo-inositidos que regulan la localización polarizada, en el extremo de la neurita que se especifica como axón, de proteínas como mPar3 y mPar6. Además, la actividad de PI3-quinasa activa otras proteínas (p. ej. PKC ζ , Akt, GSK3, Rap1b, Rac1 y Cdc42) relacionadas con el citoesqueleto de actina y microtúbulos que permiten la elongación del axón (15). La actividad coordinada de estas proteínas y sus vías de señalización permiten una mayor despolimerización del citoesqueleto de actina en el punto de crecimiento del axón y la polimerización de microtúbulos que elongan el axón. La importancia de la despolimerización localizada de actina para permitir el crecimiento del axón fue demostrada por el grupo de Carlos Dotti (16). Tratando neuronas de hipocampo en cultivo con cytochalasina D observaron que su aplicación local, en otra neurita diferente a la que había generado el axón, permitía el crecimiento de un segundo axón (Figura 2). Posteriormente, se ha demostrado que proteínas asociadas a la actina, como la profilina, actúan conjuntamente con las proteínas de la familia de Rho-GTPasas, regulando el estado de polimerización de la actina en el punto de crecimiento del axón. En general, el crecimiento del axón depende de un balance a favor de una mayor cantidad de Rac-GTP y una mayor inactividad de Rho (Rho-GDP).

1.3.2. *Otras proteínas relacionadas con la formación del axón*

La importancia de la vía de PI3-quinasa en la formación del axón no sólo se refiere a la actividad de PI3-quinasa. Recientemente, se ha descrito que otras quinastas reguladas por esta actividad son esenciales para la formación o especificación del axón. La inhibición de la actividad de GSK3 impide la formación del axón (17, 18). Aunque durante mucho tiempo se ha puesto énfasis en GSK3 β , mediante el uso de ARNs de interferencia se ha podido demostrar que además de GSK3 β , GSK3 α también es necesaria para la formación del axón en neuronas de hipocampo durante su desarrollo «in vitro» (17). Sin embargo, la elongación posterior del axón es acentuada por la inhibición de la actividad de GSK3 (17, 19). Algunos artículos han descrito que la inhibición de GSK3 también genera múltiples axones, pero dada la compleja regulación de esta proteína y su participación en diferentes procesos celulares, harán falta más estudios para entender de una forma más concreta su participación en la formación del axón (20, 21). La regulación de la actividad de GSK3 es bastante compleja y se conoce mejor su actuación fosforilando proteínas asociadas al citoesqueleto. La fosforilación de proteínas asociadas a microtúbulos como tau o MAP1B regula la estabilidad y polimerización de microtúbulos, participando de esta forma en la regulación del crecimiento axonal. De hecho, las neuronas de hipocampo de ratones con una expresión muy reducida de MAP1B presentan un retraso importante en el crecimiento inicial del axón (22-24). MAP1B fosforilada por GSK3 se localiza específicamente en el axón y es un marcador temprano durante la formación del axón (25). Con posterioridad, la forma de tau no fosforilada por GSK3, tau-1, se localiza específicamente en el axón. Por tanto, GSK3 tiene un papel diferente dependiendo del momento de desarrollo del axón (especificación o elongación). CRMP-2 es una proteína regulada por GSK3 y que actúa polimerizando microtúbulos y permitiendo el crecimiento del axón. CRMP-2 se une a monómeros de tubulina que va incorporando al extremo positivo de los polímeros de tubulina. Su sobreexpresión en neuronas genera múltiples axones (26-28).

GSK3 también fosforila a beta-catenina (29), la cual participa en el crecimiento axonal asociada a APC y al citoesqueleto (30). La regulación de la fosforilación de beta-catenina por GSK3 también juega un papel importante en el transporte de beta-catenina al núcleo y su participación en la transcripción de genes (29). Como posteriormente se tratará, un tipo de receptores capaces de interactuar con la actividad de GSK3 y regular la elongación del axón y su arborización, son los receptores purinérgicos. Otros receptores que regulan la actividad de GSK3 y que han sido más estudiados son los receptores de insulina

e IGF-I, cuya supresión mediante ARN de interferencia impide la formación del axón (31).

Además de GSK3, la actividad de IKK α /IKK β (Quinasa del inhibidor de NF- κ B, I κ B α) es necesaria para formar un axón. Recientemente, hemos demostrado que la supresión de la actividad de IKKs impide la formación del axón (32). Sin embargo, al igual que ocurre con GSK3, una vez establecido el axón, la actividad de IKKs no es necesaria para elongar el axón, aunque si juega un papel muy importante en la formación y maduración del segmento inicial del axón. Esta región aloja una importante concentración de canales de sodio dependientes de voltaje (Na $_v$ 1.2 y Na $_v$ 1.6) y es responsable de la generación del potencial de acción. Diferentes trabajos han mostrado que existe una interrelación entre la actividad de GSK3 y la ruta de señalización de NF κ B, pero la forma en que interaccionan en las neuronas no es aún conocida (33).

Otra vía de señalización implicada en la formación del axón, y por el momento no asociada con la actividad de PI3-quinasa, implica a la proteína LKB1 (Par4). Se ha demostrado que la fosforilación en la serina 431 de LKB1 por PKA es necesaria para que se forme un axón (34).

Asimismo, otras proteínas reguladas por diferentes vías están implicadas en los mecanismos responsables de formar el axón. Por ejemplo, la forma fosforilada de JNK2 está presente en la región distal del axón y dicha fosforilación es necesaria para formar el axón (35). Recientemente, se ha propuesto que Rit, perteneciente a la familia de Ras GTPasas está implicada en el crecimiento del axón y su actividad además de promover el crecimiento axonal, puede actuar como un factor inhibitor del crecimiento de las dendritas (36). Otras proteínas relacionadas previamente con el transporte de proteínas hacia el axón se han identificado en las primeras fases de especificación y crecimiento axonal. Una de ellas es una subunidad de la kinesina-1, cuya localización en la neurita que va a formar axón determina su crecimiento (37). Esta subunidad de la kinesina-1 se localiza con posterioridad en el segmento inicial del axón y su asociación con microtúbulos estables en este dominio determina el transporte y localización axonal de proteínas como la proteína precursora del amiloide (APP) (38).

1.4. Formación del segmento inicial del axón

El segmento inicial del axón (AIS) fue identificado en los años 60 como una estructura que se diferenciaba estructuralmente del resto del axón y del dominio somatodendrítico. Sus principales características son: a) una capa densa

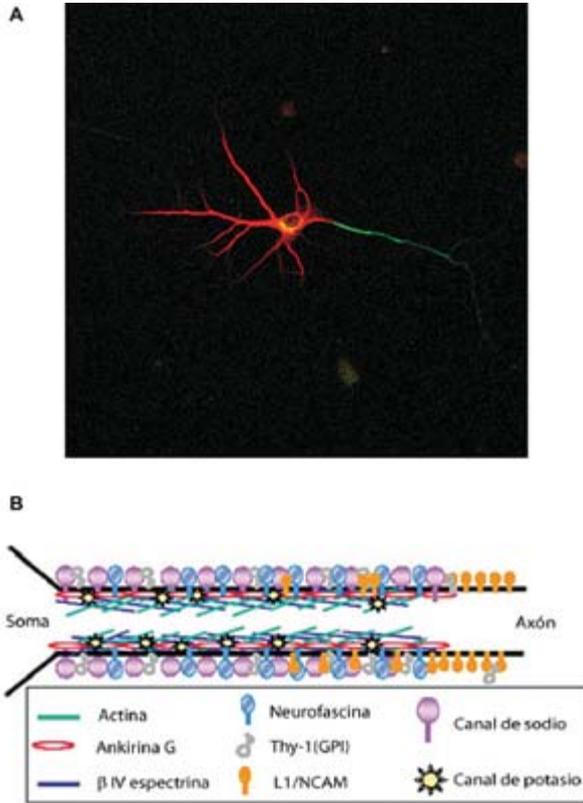


FIGURA 3. **El segmento inicial del axón.** (A) Neurona de hipocampo en cultivo (6 DIV). El dominio somato-dendrítico se identificó mediante el marcaje con anticuerpos dirigidos contra la proteína asociada a microtúbulos, MAP2a+b (rojo), y el segmento inicial del axón utilizando anticuerpos dirigidos contra los canales de sodio dependientes de voltaje (PanNaCh, verde). (B) Esquema representativo de la estructura proteica del segmento inicial del axón. Sobre un citoesqueleto denso de actina submembranoso se anclan proteínas como la β IV-espectrina y la ankirina G, que a su vez ancla proteínas integrales de membrana como los canales de sodio, canales de potasio, neurofascina o L1/NCAM. Esta densidad de proteínas actúa como barrera de difusión en la membrana, controlando el tráfico de proteínas hacia el axón.

granular e intracelular, b) la presencia de algunos grupos de ribosomas, y c) la presencia de fascículos de microtúbulos. Esta estructura se asemeja a la de los nodos de Ranvier (39). Durante muchos años, algunos estudios aislados han seguido describiendo la estructura del segmento inicial del axón en diferentes tipos de neuronas y en diferentes especies. Sin embargo, este dominio axonal sólo ha adquirido una relevancia especial en la funcionalidad neuronal durante los últimos 10 años (Figura 3).

El segmento inicial del axón es la estructura responsable de la generación del potencial de acción y actúa también como una barrera de difusión que controla el tráfico de proteínas hacia el axón (40, 41). La generación del potencial de acción es posible gracias a la concentración de canales de sodio dependientes de voltaje en este dominio axonal (42, 43). Dicha concentración es posible gracias a su anclaje a ankirina G en el segmento inicial del axón a través de la secuencia AIS de aminoácidos presente en el canal de sodio (42). El AIS actúa también como una barrera que impide el tráfico hacia el axón de proteínas que no van a formar parte del axón. Ello es posible gracias a una fuerte concentración de proteínas en la membrana del AIS que limita la difusión de proteínas (44).

Dada la importancia del segmento inicial del axón en la adquisición de la polaridad funcional de las neuronas, diversos grupos han estudiado como se forma su estructura. Estudios en secciones de cerebro de ratones salvajes y ratones *knock-out* para ankirina G y β IV-espectrina han mostrado que la concentración de canales de sodio en el AIS depende de la llegada con anterioridad de ankirina G y β IV-espectrina (45). Dos estudios han mostrado que existe una secuencia de aminoácidos en el canal de sodio neuronal dependiente de voltaje que es responsable de concentrar estos canales en el segmento inicial del axón y que dicha secuencia une estas proteínas a la ankirina G (42, 46). Esta secuencia ha sido con posterioridad identificada en otros canales iónicos, como los canales de potasio KCNQ2/3 (Kv7.2 y Kv7.3), que están relacionados con epilepsias neonatales (47). Además, la mutación de un glutámico en esta secuencia de aminoácidos impide la concentración de proteínas, su anclaje a ankirina G y cuando la mutación está presente en el canal de sodio dependiente de voltaje de músculo cardíaco (Nav1.5), entonces se produce la cardiomiopatía conocida como el síndrome de Brugada (48, 49).

El anclaje de ankirina G y β IV-espectrina necesita a su vez de una estructura de citoesqueleto diferenciada del resto del axón. Así, el segmento inicial del axón se caracteriza por una densidad elevada de actina bajo su membrana plasmática. El uso de agentes despolimerizantes de actina reduce la amplitud del potencial de acción (43). Asimismo, observaciones de nuestro laboratorio y de otro grupo (50) muestran que los microtúbulos del segmento inicial del axón presentan isoformas de tubulina más estables (tubulina acetilada) y su organización es diferente a la del resto del axón o el dominio somatodendrítico.

Estos microtúbulos más estables juegan un papel esencial en el transporte de proteínas hacia el axón, al permitir la unión de la subunidad KIF5B de la kinesina-1 que actúa como proteína de transporte hacia el axón (38). Otra subunidad de la kinesina-1, KIF5C, se une de forma diferencial a microtúbulos ti-

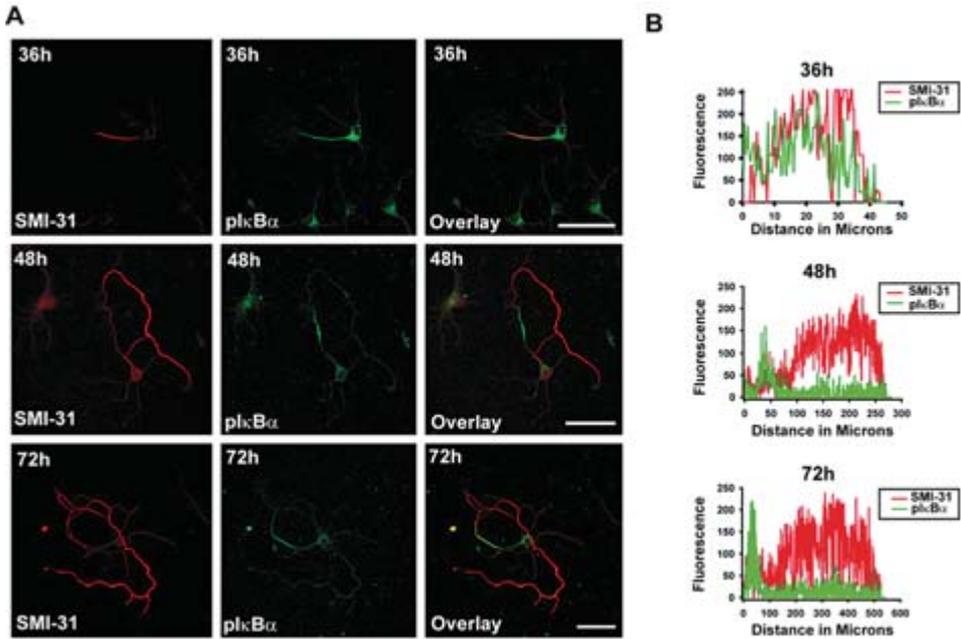


FIGURA 4. *La formación del segmento inicial del axón está asociada a la formación inicial del axón. (A) Neuronas de hipocampo cultivadas durante 36, 48 ó 72 horas y marcadas con anticuerpos dirigidos contra el marcador axonal SMI-31 (MAP1B-P, rojo) y pIκBα (verde). (B) Como se observa en la cuantificación de fluorescencia de ambos marcadores colocalizan en el axón desde su inicio y posteriormente pIκBα se concentra en el segmento inicial del axón (48 y 72 horas).*

rosinados (más dinámicos) y a microtúbulos detirosinados (más estables), siendo la velocidad de transporte más lenta en estos últimos (51). Esta diferencia permitiría al segmento inicial del axón cumplir su función de control de tráfico de las proteínas axonales.

Recientemente, hemos demostrado que la formación del segmento inicial del axón es un evento mucho más temprano de lo que se pensaba y no es necesaria una previa maduración dendrítica (32). La forma fosforilada del inhibidor de NF-κB, pIκBα, se localiza en el segmento inicial del axón de todas las neuronas e interneuronas en el sistema nervioso central (52). Cuando estudiamos la formación del axón en el modelo de neuronas de hipocampo en cultivo, se observó que desde el primer momento que el axón puede ser identificado como tal, la localización de pIκBα está restringida al incipiente axón. Según el axón comienza a elongar pIκBα se comienza a concentrar próximo al axón (Figura 4) y unas 24 horas tras la iniciación del axón, el segmento inicial del axón se ha formado (32).

Aunque los mecanismos que regulan el transporte de proteínas hacia el segmento inicial del axón son poco conocidos y se ha propuesto que la ankirina G es la primera proteína en llegar al segmento inicial del axón, nuestro estudio ha mostrado que la fosforilación de I κ B α es necesaria para el transporte de ankirina G y canales de sodio dependientes de voltaje hacia el axón (32). pI κ B α se asocia a microtúbulos y podría de esta forma regular el transporte de proteínas hacia el axón. Esto supone la implicación de una ruta de señalización tanto en el control de la transcripción de genes como el transporte de las proteínas que estos codifican, siendo de esta forma un mecanismo de coordinación a nivel intracelular de los mecanismos que regulan la morfogénesis y la síntesis de proteínas. Futuros estudios en esta dirección podrían ser útiles para comprender enfermedades del sistema nervioso relacionadas con la pérdida de estructuras en las neuronas.

2. ELONGACIÓN Y ARBORIZACIÓN AXONAL

El axón, una vez formado, debe elongar y alcanzar dianas específicas para generar contactos sinápticos con otras neuronas o células especializadas en diferentes tejidos (p. ej. musculares o sensoriales). Esta elongación está regulada por señales externas positivas y negativas que regulan el crecimiento y guían al axón hacia su diana. Diversos estudios han mostrado que la ramificación axonal está ligada al comportamiento del cono de crecimiento (53, 54). Por ejemplo, la semaforina 3A repele los axones corticales *in situ* e *in vitro* (55, 56) y reduce la arborización axonal (55). Por otro lado, esta misma molécula repele los conos de crecimiento de las neuronas de retina pero induce la ramificación de estos axones una vez que el cono de crecimiento se ha recuperado de su colapso (57). Para ello el cono de crecimiento axonal cuenta con receptores de estas señales que están acoplados a mecanismos de regulación del citoesqueleto de actina y microtúbulos, tales como las neuropilinas, plexinas o integrinas (58). Estos factores pueden regular la dinámica de los microfilamentos de actina o microtúbulos en zonas específicas del cono de crecimiento, permitiendo su giro hacia una u otra dirección o incluso el colapso del cono de crecimiento. La neurona, a través del conjunto de receptores y sensores en su cono de crecimiento, realiza exploraciones y crece en la dirección permitida o colapsa ese cono de crecimiento si el ambiente no permite el crecimiento, impidiendo de esta forma la generación de ramificaciones axonales. En ciertas condiciones, el axón puede ramificarse y generar múltiples ramificaciones (arborización axonal) con múltiples contactos sinápticos. La formación de ramificaciones axonales es necesaria para el desarrollo del sistema nervioso y a su vez, el tamaño y complejidad

de las ramificaciones está determinado por la actividad neural (59, 60). Para que estas ramificaciones se produzcan el citoesqueleto debe remodelarse. Así, el axón a partir del cual se generan las ramificaciones está formado por largos microtúbulos que deben cortarse y moverse hacia la ramificación en formación. Esto es posible gracias a proteínas como la katanina o la spastina que rompen estos microtúbulos en fragmentos más pequeños y móviles (61). La regulación del crecimiento de estas ramificaciones y su extensión con respecto al axón principal depende de diferentes señales. Sin embargo, las bases moleculares que regulan la arborización axonal son poco conocidas. Recientemente se ha descrito, que modificaciones localizadas transitorias de los niveles de calcio intracelular pueden estar implicadas en la toma de esta decisión (62).

Estas variaciones en los niveles de calcio, junto con las vías de señalización dirigidas por otros factores externos pueden regular ese crecimiento y arborización axonal. Recientemente se ha descrito que NGF potencia el crecimiento axonal en neuronas de ganglio de la raíz dorsal (DRG) e induce la inhibición de GSK3. Además, la inhibición de GSK3, en neuronas de hipocampo en cultivo, induce el crecimiento y la arborización axonal (17). Además de GSK-3, tanto RhoA como FAK («focal adhesion kinase») juegan un papel esencial en la regulación de la formación de ramificaciones axonales (63, 64).

Además de las señales que inducen el crecimiento y la arborización axonal, otras señales, como el ATP, pueden impedir o restringir el crecimiento del axón. Como se discute a continuación, los receptores purinérgicos pueden jugar un papel importante en la regulación de la elongación y arborización del axón, aunque su papel en el desarrollo de los circuitos neuronales es aún muy poco conocido.

3. FUNCIÓN DE LOS RECEPTORES PURINÉRGICOS EN LA DIFERENCIACIÓN NEURONAL

Una de las familias de moléculas que más importancia está adquiriendo en los últimos años por el papel que desempeñan en la diferenciación y supervivencia neuronal son los nucleótidos de adenina. Estos compuestos, que presentan una amplia distribución en todo el organismo, ejercen un efecto trófico directo en el desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso central y juegan un papel fundamental en las respuestas frente a enfermedades y traumatismos (65, 66). Como ya se ha mencionado en capítulos anteriores los nucleótidos de adenina, y en particular el ATP, ejercen un papel como neurotransmisor rápido en el sistema nervioso central, ya que solo no activa canales iónicos específicos denominados receptores P2X (67-69), sino que además, las ectonucleotidasas

presentes en la membrana plasmática lo degradan rápidamente a adenosina. Los receptores P2X, están formados por la combinación de al menos 7 subunidades diferentes denominadas P2X1 al P2X7, y conforman un canal funcional cuando se combinan al menos 3 de estas subunidades iguales o diferentes (70). La activación de estos receptores induce la entrada de calcio al interior de la neurona independiente de la activación de los canales de calcio dependientes de voltaje (71). Como consecuencia de esta entrada de calcio, el ATP, es capaz de inducir la liberación de más neurotransmisores, participando así en la propagación del impulso nervioso (72, 73). Además, estos receptores, al inhibir la inducción de la potenciación a largo plazo en el hipocampo, participan en los procesos de plasticidad neuronal, fundamentales en el funcionamiento de los circuitos neuronales implicados en los procesos de memoria (74).

Es precisamente durante el desarrollo del hipocampo donde los receptores P2X juegan un papel importante en la formación de las redes neurales. Así, en estudios realizados en rodajas de hipocampo de ratones neonatos, se observó que la activación de los receptores P2X1, 2 y 4 inducen la formación de fibras nerviosas en el giro dentado (75). Por el contrario, en explantes neuronales se ha descrito que la activación de receptores P2X3 desencadena una disminución de la elongación axonal (76).

La importancia que los nucleótidos de adenina desempeñan en la diferenciación neuronal no solo se limita a los efectos que estos compuestos ejercen sobre la morfología neuronal. Así, otro de los papeles importante que desempeñen los nucleótidos de adenina se centra en el control que células progenitoras poseen para controlar la recepción de las señales procedentes de su entorno (77). Uno de estos mecanismos de control consiste en la alta expresión de ectonucleotidasas en su membrana plasmática, impidiendo de esta manera la llegada de señales que las induzca a diferenciarse (78).

El control que los nucleótidos ejercen sobre los sistemas en crecimiento parece no limitarse al reino animal. Así, recientemente se ha descrito como el ATP y la ectonucleotidasas presentes en la raíz de la planta *Arabinopsis thaliana* ejercen una fuerte regulación sobre su crecimiento y ramificación (79).

3.1. Calcio y crecimiento axonal

Hace unos años, se reportó por primera vez la influencia que el calcio ejercía en los proceso de elongación y ramificación axonal. Así se observó que los incrementos de calcio espontáneos (por lo tanto, producidos por agentes desconocidos)

que se producen en el cono de crecimiento están inversamente relacionados con la capacidad que tiene el axón de migrar y crecer (80, 81). Al analizar en profundidad este fenómeno, se determinó que únicamente los incrementos de calcio de baja frecuencia son capaces de inducir la parada del crecimiento y arborización axónica (62). No debemos olvidar que el efecto primario que inducen los nucleótidos de adenina, al activar sus receptores P2X, es incrementar el calcio intracelular en un punto muy concreto de la neurona. De tal manera, que si estos receptores estuvieran presentes en los conos de crecimiento serían unos excelentes candidatos para ser los agentes causantes de desencadenar los incrementos de calcio espontáneos antes descritos. Si bien existe poca literatura al respecto, no debemos olvidar que los conos de crecimiento son las estructuras primigenias que constituirán el componente presináptico de los contactos sinápticos que se establezcan en los circuitos neurales del cerebro en un animal adulto. Es precisamente en esta localización donde se ha descrito ampliamente la presencia de los receptores de nucleótidos (82-84) y establecido que su activación no solo induce la entrada de calcio a la terminal nerviosa, sino que también, inducen la liberación de los neurotransmisores almacenados en las vesículas sinápticas (73, 85).

Como se mencionará en el capítulo de esta monografía dedicado al sistema purinérgico, de todas las subunidades P2X encontradas a nivel presináptico, la que presenta una mayor abundancia en el SNC es la subunidad P2X7 (86).

3.2. Los receptores P2X y su función en la regulación del crecimiento axonal

Llegados a este punto, la principal pregunta que queda por esclarecer es si los receptores P2X regulan el crecimiento axonal. Para contestarla, el primer punto que debíamos establecer es la presencia de receptores ionotrópicos funcionales de ATP en los conos de crecimiento. Gracias a la utilización de un sistema de videoimagen que nos permite registrar pequeñas variaciones en la concentración de calcio intracelular en puntos muy concretos de la neurona, observamos que la estimulación de las neuronas de hipocampo en cultivo con pulsos de ATP, producía una entrada de calcio en el cono de crecimiento. Además, pudimos constatar que la onda de calcio generada se quedaba restringida a la zona más distal del axón, sin llegar a afectar ni siquiera a la zona del segmento inicial del axón (Figura 5). También constatamos como la activación de los receptores P2X presentes en el cono de crecimiento provocan una disminución de la elongación del axón (Figura 5). Estas observaciones no solo identifican al ATP como uno de los agentes causantes de los incrementos de calcio espontáneos registrados en los co-

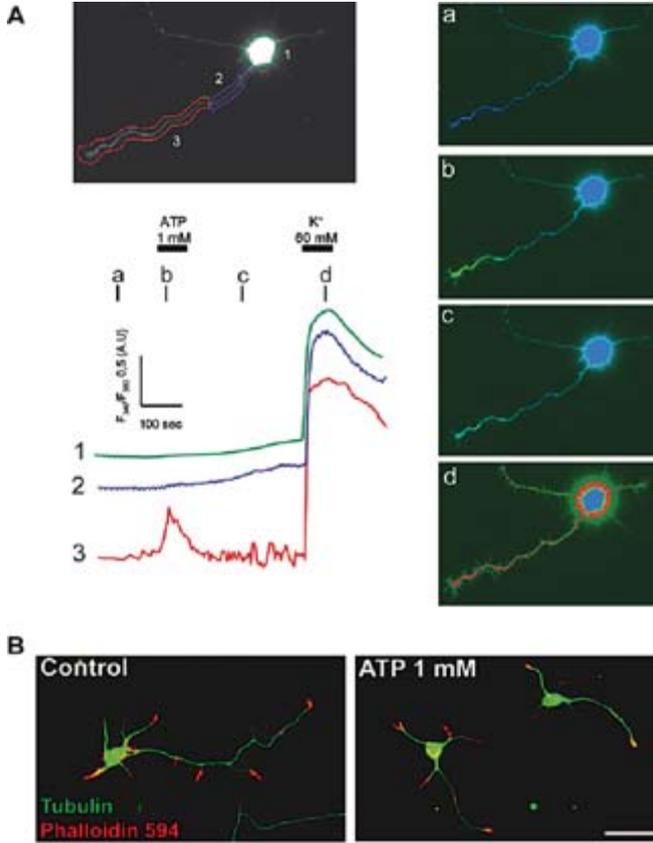


FIGURA 5. *El ATP induce corrientes de calcio en el cono de crecimiento de neuronas de hipocampo en cultivo a través de receptores P2X: A, Imagen de fluorescencia de una neurona hipocámpal en cultivo cargada con la sonda fluorescente fura-2. Además se muestran las diferentes áreas analizadas tanto a lo largo del axón (regiones 2 y 3) como en el compartimento somato-dendrítico (región 1). Las gráficas representan el ratio de los cambios temporales en las longitudes de onda emitidas por el fura-2 al ser este excitado a 340 (F_{340}) o a 380 (F_{380}) nm. La neurona fue estimulada con un pulso de ATP 1mM en el punto b, y con otro de KCl 60 mM en el punto d. Los paneles que se muestran en la derecha se corresponden con las imágenes de fura registradas para la neurona analiza en los puntos temporales indicados como a al d, que se muestran en las gráficas de la izquierda. Los tiempos de estimulación se representan con líneas sólidas y corresponden a 50 segundos. B, Neuronas hipocámpales en su tercer día de cultivo en presencia o ausencia de ATP 1 mM. Las neuronas fueron teñidas con anticuerpos frente a la tubulina (verde) y con la actina (rojo). Escala (50 μ m).*

nos de crecimiento de las neuronas en cultivo, sino que además, constituyen las primeras evidencias funcionales que demuestran que los receptores P2X ejercen un control negativo de la elongación axonal.

3.2.1. *Papel del receptor P2X7 en la regulación del crecimiento axonal*

El siguiente paso a analizar era determinar que tipo de receptores P2X estaban involucrados en el control de la elongación del axón. Para contestar esta pregunta, se optó por realizar un estudio farmacológico, empleando diferentes antagonistas de los receptores P2X. Mediante este abordaje experimental no solo conoceríamos la naturaleza del receptor, sino que también determinaríamos si el bloqueo de estos receptores induce la elongación del axón. De todos los antagonistas utilizados, solamente aquellos que inhiben al receptor P2X7, como son el BBG, el KN62 y el A-438079 indujeron una elongación y ramificación del axón mayor a la observada en las neuronas no tratadas (Figura 6). Confirmamos de la participación del receptor P2X7 mediante el empleo de técnicas de biología molecular, gracias a las cuales pudimos observar la evolución del crecimiento y ramificación axonal en neuronas que carecían o sobre-expresaban el receptor P2X7. Como se observa en la Figura 6, la supresión del receptor P2X7 indujo una elongación y ramificación axonal similar a la obtenida mediante los tratamientos farmacológicos en los que se emplearon antagonistas selectivos del receptor P2X7. Por el contrario, la sobre-expresión de dicho receptor indujo una disminución en la longitud y número de ramificaciones del axón, el mismo efecto observado al activar el receptor P2X7 con ATP (Figura 6).

Una vez determinada la participación del receptor P2X7 en el crecimiento y ramificación axonal solo quedaba determinar el mecanismo molecular por el cual dicho receptor regula negativamente la elongación y ramificación axonal. Al analizar en detalle la morfología que presentaban los conos de crecimiento después de activar o inhibir el receptor P2X7 observamos que si bien la activación del receptor promovía un colapso de los mismos, su inhibición inducía el efecto opuesto (Figura 7). Este hecho correlacionó con una activación la proteína FAK (quinasa de los puntos focales de adhesión) mediada por la inhibición de la proteína quinasa dependiente de calcio CaMKII (87). No debemos olvidar que uno de las proteínas dianas del receptor P2X7 es la CaMKII (88, 89), de tal manera que se ha descrito como la activación de P2X7 induce una fuerte y rápida activación de la quinasa dependiente de calcio CaMKII.

Como se ha mencionado anteriormente, una de las quinasa claves en los procesos de elongación y arborización del axón, es GSK3. Así, se ha descrito que la inhibición sostenida de GSK3 es capaz de inducir una mayor elongación y arborización axonal, una vez que el axón ya esta formado (17). Como cabría esperar, cuando se analizó el estado de activación de la GSK3 después de inducir una inhibición sostenida del receptor P2X7, se observó una clara dismi-

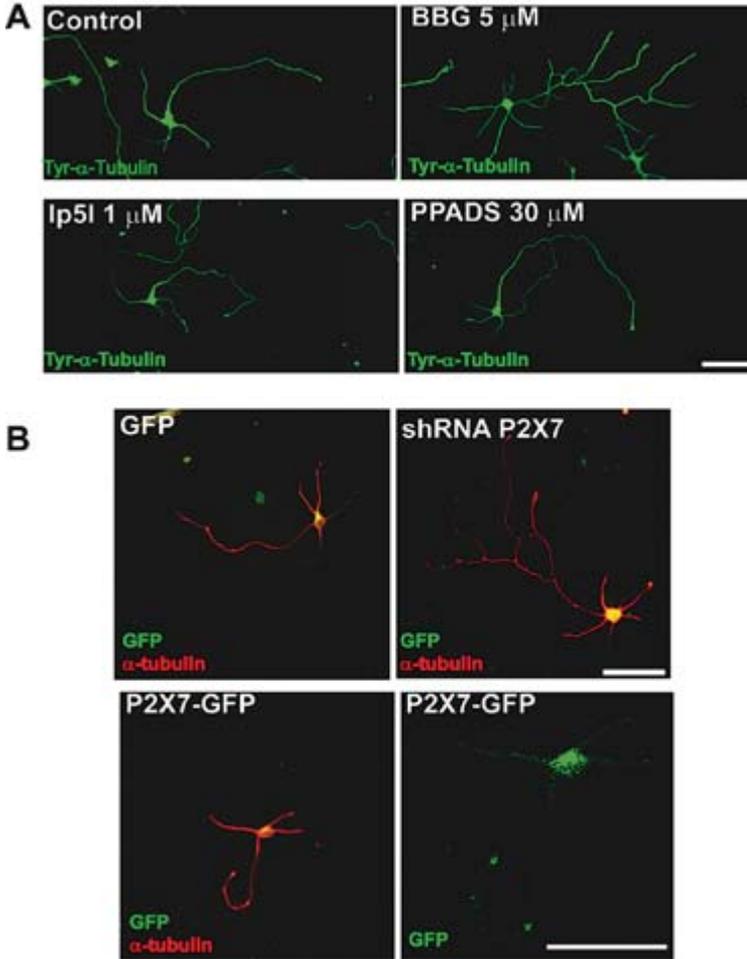


FIGURA 6. *El receptor P2X7 regula el crecimiento y arborización axonal. A, Se muestran neuronas de hipocampo en su tercer día de cultivo tratadas en presencia de diferentes antagonistas de los receptores P2X; BBG (5 μ M), PPADS (50 μ M) e Ip₃I (1 μ M). Las neuronas fueron teñidas con anticuerpos frente a la tubulina para observar su morfología. Escala (100 μ m). B, Se muestran neuronas hipocámpales en cultivo transfectadas con GFP, un RNA de interferencia del receptor P2X7 (shRNA-P2X7) fusionado a GFP (P2X7-GFP). Escala (50 μ m).*

nución en la actividad de la quinasa GSK3. Esta disminución de la actividad de GSK3 no solo correlaciona con la elongación y arborización axonal inducidas por la inhibición del receptor P2X7, sino que ambos fenómenos comparten una secuencia temporal. Así, sabemos que la inhibición del receptor P2X7 desencadena una activación de la quinasa FAK. Dado que un sustrato de FAK es la PI3-

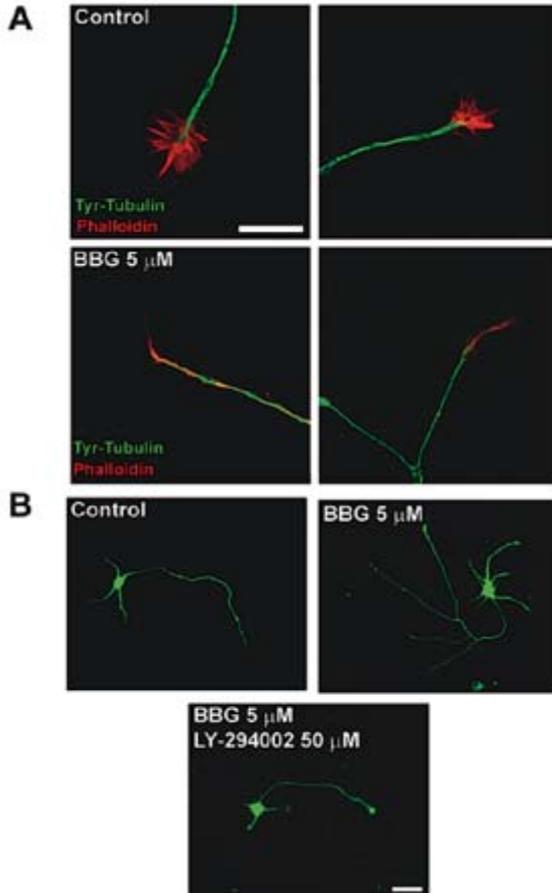


FIGURA 7. La inhibición del receptor P2X7 modifica la morfología del cono de crecimiento de las neuronas de hipocampo mediante la inhibición de la PI3-quinasa. A, Se muestran la morfología de los conos de crecimiento de las neuronas de hipocampo tratadas durante 3 días en presencia o ausente del antagonista del receptor purinérgico P2X7 BBG (5 μM). Mientras los conos de las neuronas control mostraron una morfología mixta de lamedipodio y filopodio, los conos tratados con BBG solo presentan una morfología de lamedipodio. Escala (10 μm). **B,** Se muestran neuronas de hipocampo en su tercer día de cultivo tratadas en presencia y ausencia de BBG (5 μM) y/o del inhibidor de PI3-quinasa LY-294002 (50 μM). El BBG y el inhibidor de la IP3-quinasa fueron añadidos después del primer día de cultivo. Escala (50 μm).

quinasa (90), la activación de FAK desencadenaría una activación de la PI3-quinasa. Esta secuencia de acontecimientos la pudimos constatar en nuestro modelo de neuronas de hipocampo, al observar como la arborización y elongación axonal inducida por el BBG eran revertidas en presencia de un inhibidor de la PI3-quinasa (LY-294002) (Figura 7). Como se ha mencionado con anterioridad,

la activación de PI3-quinasa desencadena la fosforilación e inhibición de GSK3, de tal manera que el receptor P2X7 desencadena finalmente una regulación de la actividad de la quinasa GSK3.

El hecho de que la inhibición de GSK3 promueve el crecimiento y arborización axonal en axones lesionados *in vivo* (91), abre nuevas perspectiva terapéuticas para la utilización de inhibidores del receptor P2X7 en lesiones medulares.

4. MECANISMOS CELULARES Y MOLECULARES QUE REGULAN LA LOCALIZACIÓN POLARIZADA DE PROTEÍNAS AXONALES

Aunque este apartado merecería por sí solo un capítulo propio, a continuación comentamos algunas ideas sobre la forma en que el axón distribuye sus proteínas. Simultáneamente a la estructuración morfológica del axón, en la membrana axonal se van localizando proteínas (canales iónicos, receptores o proteínas de adhesión) que guían el axón, regulan su crecimiento y permiten la generación de potenciales de acción. Como se ha indicado con anterioridad, esta localización polarizada de diferentes proteínas en el axón, depende del citoesqueleto de actina y microtúbulos, así como de las proteínas de transporte (kinesinas, dineinas o mioquinas). En los últimos 10 años el estudio de las secuencias aminoácidicas de proteínas axonales ha permitido demostrar que existen diversos motivos de aminoácidos capaces de localizar proteínas específicamente en el axón. Se ha propuesto que algunas de estas proteínas pueden ser transportadas directamente hacia el axón, como es el caso de NgCAM. Sin embargo, la distribución específicamente axonal de muchas de las proteínas estudiadas depende de su eliminación, mediante endocitosis, de la membrana somatodendrítica (92). Este es el caso del canal de sodio neuronal dependiente de voltaje (92) o de la proteína VAMP-2 (93). Una vez transportadas hacia el axón, estas proteínas deben anclarse en un dominio específico para cumplir su función. Si bien en el dominio somatodendrítico, las proteínas con dominios PDZ, tales como la PSD-95, cumplen la función de anclaje de proteínas funcionales de membrana; en el caso del axón y del segmento inicial del axón, esta función está representada por la ankirina B y ankirina G. Proteínas que actúan como adaptadores entre las proteínas de membrana y el citoesqueleto de actina y microtúbulos. La proteína de adhesión L1 contiene una secuencia de aminoácidos (FIGQY) que la permite unirse a las ankirinas y estabilizarse en la membrana axonal. Dicho anclaje está regulado por mecanismos de fosforilación y una secuencia de aminoácidos (RSLE) que permite su endocitosis (94, 95). Otro ejemplo son los canales de sodio y potasio dependientes de voltaje, Na_v1.2, Na_v1.6 o KCNQ2/3, que se unen a la ankirina G a través del motivo

AIS descrito en los canales de sodio (47). Recientemente, se ha descrito que una proteína de densidades postsinápticas, PSD-93, es capaz de anclar canales de potasio y localizarlos en el axón (96). Durante los últimos 10 años se han descrito motivos aminoacídicos que regulan la localización y anclaje de proteínas en el axón, lo que ha permitido entender las bases estructurales que permiten desarrollar la función del axón en la transmisión de señales.

5. CONCLUSIÓN

La complejidad funcional del sistema nervioso tiene como unidad básica funcional a la neurona, junto con otras células que le sirven de apoyo y con las que intercambia información. A pesar de que ya hace alrededor de un siglo que Santiago Ramón y Cajal propuso la teoría neuronal, solamente durante los últimos 25 años hemos sido capaces de obtener bastante, pero aún no suficiente, información sobre cómo se forma una neurona y que mecanismos intracelulares permiten crear la arquitectura morfológica y funcional de las neuronas. Sabemos cómo se inicia un axón, cómo se forma el citoesqueleto neuronal y cuáles son las causas de algunas enfermedades neurodegenerativas. Para su tratamiento, así como el tratamiento de lesiones axonales, debemos conocer los factores, receptores y vías de señalización que regulan el crecimiento axonal, así como los mecanismos que regulan su posición y que son responsables de que un receptor cumpla su función en un momento concreto y en una localización específica de la neurona. De esta forma, podremos encontrar dianas farmacológicas adaptadas que permitan regular vías de señalización en dominios específicos de las neuronas. Por último, un mayor conocimiento de los mecanismos que regulan el crecimiento axonal también será útil en un futuro para intentar regenerar axones lesionados, junto con otras estrategias centradas en las células de glía.

6. AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren agradecer a los jóvenes científicos que han colaborado en el desarrollo del trabajo sobre la función de los receptores purinérgicos en la elongación y arborización axonal; Ana Del Puerto Del Pino, Juan I. Díaz Hernández y María Diez Zaera. Su trabajo será publicado en breve en *Journal Cell Science*. Este proyecto ha sido financiado por el plan Nacional I+D mediante los proyectos SAF2006-00906 (JJG) y BFU2005-02079 (MDH). También queremos agradecer la ayuda recibida por parte de la Fundación Marcelino Botín y

el entusiasmo y apoyo de la profesora María Teresa Miras Portugal. Por último quisiéramos agradecer el apoyo e intercambio de ideas por parte de los doctores Francisco Wandosell y José J. Lucas.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) RAMÓN Y CAJAL, S. (1891) Comunicación acerca de la significación fisiológica de las expansiones protoplásmicas y nerviosas de la sustancia gris. En: Primer Congreso Médico-Farmacéutico regional. Valencia, 1891. *Revista de Ciencias Médicas de Barcelona*. 17: 671-679, 715-723.
- (2) RAMÓN Y CAJAL, S. (1897) Leyes de la morfología y el dinamismo de las células nerviosas. *Revista Trimestral Micrográfica*. 2: 1-28.
- (3) DOTTI, C. G.; SULLIVAN, C. A. AND BANKER, G. A. (1988) The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci*. 8: 1454-68.
- (4) GOSLIN, K. AND BANKER, G. (1989) Experimental observations on the development of polarity by hippocampal neurons in culture. *J. Cell. Biol.* 108: 1507-16.
- (5) KAECH, S. AND BANKER, G. (2006) Culturing hippocampal neurons. *Nat. Protoc.* 1: 2406-15.
- (6) DA SILVA, J. S.; MEDINA, M.; ZULIANI, C.; DI NARDO, A., WITKE, W. AND DOTTI, C. G. (2003) RhoA/ROCK regulation of neuritogenesis via profilin IIa-mediated control of actin stability. *J. Cell. Biol.* 162: 1267-79.
- (7) ARBER, S.; BARBAYANNIS, F. A.; HANSER, H.; SCHNEIDER, C.; STANYON, C. A.; BERNARD, O. AND CARONI, P. (1998) Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature*. 393: 805-9.
- (8) HIGGS, H. N. AND POLLARD, T. D. (2001) Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 70: 649-76.
- (9) DA SILVA, J. S. AND DOTTI, C. G. (2002) Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neuritogenesis. *Nat. Rev. Neurosci.* 3: 694-704.
- (10) VAN AELST, L. AND D'SOUZA-SCHOREY, C. (1997) Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev.* 11: 2295-322.
- (11) WITTMANN, T. AND WATERMAN-STORER, C. M. (2001) Cell motility: can Rho GTPases and microtubules point the way? *J. Cell. Sci.* 114: 3795-803.
- (12) DE ANDA, F. C.; POLLAROLO, G.; DA SILVA, J. S.; CAMOLETTO, P. G.; FEIGUIN, F. AND DOTTI, C. G. (2005) Centrosome localization determines neuronal polarity. *Nature*. 436: 704-8.

- (13) CALDERON DE ANDA, F.; GARTNER, A.; TSAI, L. H. AND DOTTI, C. G. (2008) Pyramidal neuron polarity axis is defined at the bipolar stage. *J. Cell. Sci.* 121: 178-85.
- (14) SHI, S. H.; JAN, L. Y. AND JAN, Y. N. (2003) Hippocampal neuronal polarity specified by spatially localized mPar3/mPar6 and PI 3-kinase activity. *Cell.* 112: 63-75.
- (15) SCHWAMBORN, J. C. AND PUSCHEL, A. W. (2004) The sequential activity of the GTPases Rap1B and Cdc42 determines neuronal polarity. *Nat. Neurosci.* 7: 923-9.
- (16) BRADKE, F. AND DOTTI, C. G. (1999) The role of local actin instability in axon formation. *Science.* 283: 1931-4.
- (17) GARRIDO, J. J.; SIMON, D.; VAREA, O. AND WANDOSELL, F. (2007) GSK3 alpha and GSK3 beta are necessary for axon formation. *FEBS Lett.* 581: 1579-86.
- (18) KIM, W. Y.; ZHOU, F. Q.; ZHOU, J.; YOKOTA, Y.; WANG, Y. M.; YOSHIMURA, T.; KAIBUCHI, K.; WOODGETT, J. R.; ANTON, E. S. AND SNIDER, W. D. (2006) Essential roles for GSK-3s and GSK-3-primed substrates in neurotrophin-induced and hippocampal axon growth. *Neuron.* 52: 981-96.
- (19) ZHOU, F. Q.; ZHOU, J.; DEDHAR, S.; WU, Y. H. AND SNIDER, W. D. (2004) NGF-induced axon growth is mediated by localized inactivation of GSK-3beta and functions of the microtubule plus end binding protein APC. *Neuron.* 42: 897-912.
- (20) GARTNER, A.; HUANG, X. AND HALL, A. (2006) Neuronal polarity is regulated by glycogen synthase kinase-3 (GSK-3beta) independently of Akt/PKB serine phosphorylation. *J. Cell. Sci.* 119: 3927-34.
- (21) JIANG, H.; GUO, W.; LIANG, X. AND 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: 123-35.
- (22) GONZALEZ-BILLAULT, C.; AVILA, J. AND CACERES, A. (2001) Evidence for the role of MAP1B in axon formation. *Mol. Biol. Cell.* 12: 2087-98.
- (23) GONZALEZ-BILLAULT, C.; ENGELKE, M.; JIMENEZ-MATEOS, E. M.; WANDOSELL, F.; CACERES, A. AND AVILA, J. (2002a) Participation of structural microtubule-associated proteins (MAPs) in the development of neuronal polarity. *J. Neurosci. Res.* 67: 713-9.
- (24) GONZALEZ-BILLAULT, C.; OWEN, R.; GORDON-WEEKS, P. R. AND AVILA, J. (2002b) Microtubule-associated protein 1B is involved in the initial stages of axonogenesis in peripheral nervous system cultured neurons. *Brain Res.* 943: 56-67.
- (25) ULLOA, L.; DIEZ-GUERRA, F. J.; AVILA, J. AND DIAZ-NIDO, J. (1994) Localization of differentially phosphorylated isoforms of microtubule-associated protein 1B in cultured rat hippocampal neurons. *Neuroscience.* 61: 211-23.

- (26) COLE, A. R.; KNEBEL, A.; MORRICE, N. A.; ROBERTSON, L. A.; IRVING, A. J., CONNOLLY, C. N. AND SUTHERLAND, C. (2004) GSK-3 phosphorylation of the Alzheimer epitope within collapsin response mediator proteins regulates axon elongation in primary neurons. *J. Biol. Chem.* 279: 50176-80.
- (27) FUKATA, Y.; ITOH, T. J.; KIMURA, T.; MENAGER, C.; NISHIMURA, T.; SHIROMIZU, T.; WATANABE, H.; INAGAKI, N.; IWAMATSU, A.; HOTANI, H. ET AL. (2002) CRMP-2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly. *Nat. Cell Biol.* 4: 583-91.
- (28) INAGAKI, N.; CHIHARA, K.; ARIMURA, N.; MENAGER, C.; KAWANO, Y.; MATSUO, N.; NISHIMURA, T.; AMANO, M. AND KAIBUCHI, K. (2001) CRMP-2 induces axons in cultured hippocampal neurons. *Nat. Neurosci.* 4: 781-2.
- (29) JOPE, R. S. AND JOHNSON, G. V. (2004) The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem. Sci.* 29: 95-102.
- (30) VOTIN, V.; NELSON, W. J. AND BARTH, A. I. (2005) Neurite outgrowth involves adenomatous polyposis coli protein and beta-catenin. *J. Cell. Sci.* 118: 5699-708.
- (31) SOSA, L.; DUPRAZ, S.; LAURINO, L.; BOLLATI, F.; BISBAL, M.; CACERES, A.; PFENNINGER, K. H. AND QUIROGA, S. (2006) IGF-1 receptor is essential for the establishment of hippocampal neuronal polarity. *Nat. Neurosci.* 9: 993-5.
- (32) SANCHEZ-PONCE, D.; TAPIA, M.; MUNOZ, A. AND GARRIDO, J. J. (2008) New role of IKK alpha/beta phosphorylated IkkappaB alpha in axon outgrowth and axon initial segment development. *Mol. Cell. Neurosci.* 37: 832-44.
- (33) HOEFLICH, K. P.; LUO, J.; RUBIE, E. A.; TSAO, M. S.; JIN, O. AND WOODGETT, J. R. (2000) Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation. *Nature.* 406: 86-90.
- (34) SHELLY, M.; CANCEDDA, L.; HEILSHORN, S.; SUMBRE, G. AND POO, M. M. (2007) LKB1/STRAD promotes axon initiation during neuronal polarization. *Cell.* 129: 565-77.
- (35) OLIVA, A. A., JR., ATKINS, C. M., COPENAGLE, L. AND BANKER, G. A. (2006) Activated c-Jun N-terminal kinase is required for axon formation. *J. Neurosci.* 26: 9462-70.
- (36) LEIN, P. J.; GUO, X.; SHI, G. X.; MOHOLT-SIEBERT, M.; BRUUN, D. AND ANDRES, D. A. (2007) The novel GTPase Rit differentially regulates axonal and dendritic growth. *J. Neurosci.* 27: 4725-36.
- (37) JACOBSON, C.; SCHNAPP, B. AND BANKER, G. A. (2006) A change in the selective translocation of the Kinesin-1 motor domain marks the initial specification of the axon. *Neuron.* 49: 797-804.
- (38) NAKATA, T. AND HIROKAWA, N. (2003) Microtubules provide directional cues for polarized axonal transport through interaction with kinesin motor head. *J. Cell. Biol.* 162: 1045-55.

- (39) PALAY, S. L.; SOTELO, C.; PETERS, A. AND ORKAND, P. M. (1968) The axon hillock and the initial segment. *J. Cell. Biol.* 38: 193-201.
- (40) STUART, G.; SPRUSTON, N.; SAKMANN, B. AND HAUSSER, M. (1997) Action potential initiation and backpropagation in neurons of the mammalian CNS. *Trends Neurosci.* 20: 125-31.
- (41) WINCKLER, B.; FORSCHER, P. AND MELLMAN, I. (1999) A diffusion barrier maintains distribution of membrane proteins in polarized neurons. *Nature.* 397: 698-701.
- (42) GARRIDO, J. J.; GIRAUD, P.; CARLIER, E.; FERNANDES, F.; MOUSSIF, A.; FACHE, M. P.; DEBANNE, D. AND DARGENT, B. (2003) A targeting motif involved in sodium channel clustering at the axonal initial segment. *Science.* 300: 2091-4.
- (43) KOLE, M. H.; ILSCHNER, S. U.; KAMPA, B. M.; WILLIAMS, S. R.; RUBEN, P. C. AND STUART, G. J. (2008) Action potential generation requires a high sodium channel density in the axon initial segment. *Nat. Neurosci.* 11: 178-86.
- (44) NAKADA, C.; RITCHIE, K.; OBA, Y.; NAKAMURA, M.; HOTTA, Y.; IINO, R.; KASAI, R. S.; YAMAGUCHI, K.; FUJIWARA, T. AND KUSUMI, A. (2003) Accumulation of anchored proteins forms membrane diffusion barriers during neuronal polarization. *Nat. Cell. Biol.* 5: 626-32.
- (45) KOMADA, M. AND 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: 337-48.
- (46) LEMAILLET, G.; WALKER, B. AND LAMBERT, S. (2003) Identification of a conserved ankyrin-binding motif in the family of sodium channel alpha subunits. *J. Biol. Chem.* 278: 27333-9.
- (47) PAN, Z.; KAO, T.; HORVATH, Z.; LEMOS, J.; SUL, J. Y.; CRANSTOUN, S. D.; BENNETT, V.; SCHERER, S. S. AND 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: 2599-613.
- (48) FACHE, M. P.; MOUSSIF, A.; FERNANDES, F.; GIRAUD, P.; GARRIDO, J. J. AND DARGENT, B. (2004) Endocytotic elimination and domain-selective tethering constitute a potential mechanism of protein segregation at the axonal initial segment. *J. Cell. Biol.* 166: 571-8.
- (49) MOHLER, P. J.; RIVOLTA, I.; NAPOLITANO, C.; LEMAILLET, G.; LAMBERT, S.; PRIORI, S. G. AND BENNETT, V. (2004) Nav1.5 E1053K mutation causing Brugada syndrome blocks binding to ankyrin-G and expression of Nav1.5 on the surface of cardiomyocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 101: 17533-8.
- (50) SHEA, T. B. (1999) Selective stabilization of microtubules within the proximal region of developing axonal neurites. *Brain Res. Bull.* 48: 255-61.

- (51) DUNN, S.; MORRISON, E. E.; LIVERPOOL, T. B.; MOLINA-PARIS, C.; CROSS, R. A.; ALONSO, M. C. AND PECKHAM, M. (2008) Differential trafficking of Kif5c on tyrosinated and detyrosinated microtubules in live cells. *J. Cell. Sci.* 121: 1085-95.
- (52) SCHULTZ, C.; KONIG, H. G.; DEL TURCO, D.; POLITI, C.; ECKERT, G. P.; GHEBREMEDHIN, E.; PREHN, J. H.; KOGEL, D. AND DELLER, T. (2006) Coincident enrichment of phosphorylated IkappaBalpha, activated IKK, and phosphorylated p65 in the axon initial segment of neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 33: 68-80.
- (53) KALIL, K.; SZEKENYI, G. AND DENT, E.W. (2000) Common mechanisms underlying growth cone guidance and axon branching. *J. Neurobiol.* 44:145-58.
- (54) DENT, E.W.; TANG, F. AND KALIL, K. (2003) Axon guidance by growth cones and branches: common cytoskeletal and signaling mechanisms. *Neuroscientist.* 5: 343-53.
- (55) BAGNARD, D.; LOHRUM, M.; UZIEL, D.; PÜSCHEL, A.W. AND BOLZ, J. (1998) Semaphorins act as attractive and repulsive guidance signals during the development of cortical projections. *Development.* 125: 5043-53.
- (56) POLLEUX, F.; GIGER, R.J.; GINTY, D.D.; KOLODKIN, A.L. AND GHOSH, A. (1998) Patterning of cortical efferent projections by semaphorin-neuropilin interactions. *Science.* 282: 1904-6.
- (57) CAMPBELL, D.S.; REGAN, A.G.; LOPEZ, J.S.; TANNAHILL, D.; HARRIS, W.A. AND HOLT, C.E. (2001) Semaphorin 3A elicits stage-dependent collapse, turning, and branching in *Xenopus* retinal growth cones. *J. Neurosci.* 21: 8538-47.
- (58) ZHOU, Y.; GUNPUT, R.A. AND PASTERKAMP, R.J. (2008) Semaphorin signaling: progress made and promises ahead. *Trends Biochem. Sci.* 33: 161-70.
- (59) HUBEL, D.H.; WIESEL, T.N. AND LEVAY, S. (1977) Plasticity of ocular dominance columns in monkey striate cortex. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 278: 377-409.
- (60) ANTONINI, A. AND STRYKER, M.P. (1993) Rapid remodeling of axonal arbors in the visual cortex. *Science.* 260:1819-21.
- (61) YU, W.; QIANG, L.; SOLOWSKA, J.M.; KARABAY, A.; KORULU, S. AND BAAS, P.W. (2008) The Microtubule severing Proteins Spastin and Katanin Participate Differently in the Formation of Axonal Branches. *Mol. Biol. Cell.* 19: 1485-98.
- (62) HUTCHINS, B.I. AND KALIL, K. (2008) Differential outgrowth of axons and their branches is regulated by localized calcium transients. *J. Neuroscience.* 28: 143-153.
- (63) OHNAMI, S.; ENDO, M.; HIRAI, S.; UESAKA, N.; HATANAKA, Y.; YAMASHITA, T. AND YAMAMOTO, N. (2008) Role of RhoA in activity-dependent cortical axon branching. *J. Neurosci.* 28: 9117-21.

- (64) RICO, B.; BEGGS, H.E.; SCHAHIN-REED, D.; KIMES, N.; SCHMIDT, A. AND REICHARDT, L.F. (2004) Control of axonal branching and synapse formation by focal adhesion kinase. *Nat. Neurosci.* 7: 1059-69.
- (65) RALEVIC, V. AND BURNSTOCK, G. (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* 50: 413-492.
- (66) RATHBONE, M.P.; MIDDLEMISS, P.J.; GYSBERS, J.W.; ANDREW, C.; HERMAN, M.A.; REED, J.K.; CICCARELLI, R.; DI IORIO, P. AND CACIAGLI, F. (1999) Trophic effects of purines in neurons and glial cells. *Prog. Neurobiol.* 59: 663-90.
- (67) BURNSTOCK, G. (2008) Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol. Rev.* 87: 659-797.
- (68) EDWARDS, F.A.; GIBB, A.J. AND COLQUHOUN, D. (1992) ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system. *Nature.* 359: 144-147.
- (69) EVANS, R.J.; DERKACH, V. AND SURPRENANT, A. (1992) ATP mediates fast synaptic transmission in mammalian neurons. *Nature.* 357: 503-5.
- (70) TORRES, G.E.; EGAN, T.M. AND VOIGT, M.M. (1999) Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners. *J. Biol. Chem.* 274: 6653-9.
- (71) KHAKH, B.S. (2001) Molecular physiology of P2X receptors and ATP signalling at synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* 2: 165-74.
- (72) RODRIGUES, R.J.; ALMEIDA, T.; RICHARDSON, P.J.; OLIVEIRA, C.R. AND CUNHA, R.A. (2005) Dual presynaptic control by ATP of glutamate release via facilitatory P2X1, P2X2/3, and P2X3 and inhibitory P2Y1, P2Y2, and/or P2Y4 receptors in the rat hippocampus. *J. Neurosci.* 25: 6286-95.
- (73) DÍAZ-HERNÁNDEZ, M.; PINTOR, J.; CASTRO, E. AND MIRAS-PORTUGAL, M.T. (2002) Co-localizations of functional nicotinic and ionotropic nucleotide receptors in isolated cholinergic synaptic terminals. *Neuropharmacology.* 42: 20-33.
- (74) PANKRATOV, Y.V.; LALO, U.V. AND KRISHTAL, O.A. (2002) Role for P2X receptors in long-term potentiation. *J. Neurosci.* 22: 8363-9.
- (75) HEINE, C.; HEIMRICH, B.; VOGT, J.; WEGNER, A.; ILLES, P. AND FRANKE, H. (2006) P2 receptor-stimulation influences axonal outgrowth in the developing hippocampus in vitro. *Neuroscience.* 138: 303-11.
- (76) CHEUNG, K. K.; CHANB, A.W.Y. AND BURNSTOCK, G. (2005) Expression of p2x purinoceptors during rat brain development and their inhibitory role on motor axon outgrowth in neural tube explant cultures. *Neuroscience.* 133: 937-945.
- (77) ZIMMERMANN, H. (2006) Nucleotide signaling in nervous system development. *Pflugers. Arch.* 452: 573-88.

- (78) SHUKLA, V.; ZIMMERMANN, H.; WANG, L.; KETTENMANN, H.; RAAB, S.; HAMMER, K.; SÉVIGNY, J.; ROBSON, S.C. AND BRAUN, N. (2005) Functional expression of the ecto-ATPase NTPDase2 and of nucleotide receptors by neuronal progenitor cells in the adult murine hippocampus. *J. Neurosci. Res.* 80: 600-10.
- (79) ROUX, R.; WU, J.; HENAFF, E.; TORRES, J. AND GREZ, C. (2008) Regions of growth are regions release of ATP and highest expression of ectonucleotidases AtAPY1 and AtAPY2 in *Arabidopsis*. *Purinergic Signalling.* 4: S112.
- (80) GOMEZ, T.M. AND SPITZER, N.C. (1999) In vivo regulation of axon extension and pathfinding by growth-cone calcium transients. *Nature.* 397: 350-355.
- (81) TANG, F.; DENT, E.W. AND KALIL, K. (2003) Spontaneous calcium transients in developing cortical neurons regulate axonal outgrowth. *J. Neurosci.* 23: 927-936.
- (82) DÍAZ-HERNÁNDEZ, M.; PINTOR, J.; CASTRO, E. AND MIRAS-PORTUGAL, M.T. (2001a) Independent receptors for diadenosine polyphosphates and ATP in rat midbrain single synaptic terminals. *Eur. J. Neurosci.* 14: 918-928.
- (83) DÍAZ-HERNÁNDEZ, M.; GÓMEZ-VILLAFUERTES, R.; HERNANDO, F.; PINTOR, J. AND MIRAS-PORTUGAL, M.T. (2001b) Presence of different ATP receptors on rat midbrain single synaptic terminals. Involvement of the P2X₃ subunits. *Neuroscience. Lett.* 301: 159-162.
- (84) GIRÁLDEZ, L.; DÍAZ-HERNÁNDEZ, M.; GÓMEZ-VILLAFUERTES, R.; PINTOR, J.; CASTRO, E. AND MIRAS-PORTUGAL, M.T. (2001) ATP and diadenosine polyphosphate receptors in rat basal ganglia aminergic terminals. *J. Neurosci. Res.* 64: 174-182.
- (85) GUALIX, J.; GÓMEZ-VILLAFUERTES, R.; DÍAZ-HERNÁNDEZ, M. AND MIRAS-PORTUGAL, M.T. (2003) Presence of functional ATP and dinucleotide receptors in glutamatergic synaptic terminals from rat midbrain. *J. Neurochem.* 87: 160-171.
- (86) MIRAS-PORTUGAL, M.T.; DÍAZ-HERNÁNDEZ, M.; GIRÁLDEZ, L.; HERVÁS, C.; GÓMEZ-VILLAFUERTES, R.; SEN, R.P.; GUALIX, J. AND PINTOR, J. (2003) P2X₇ receptors in rat brain. Presence in synaptic terminals and granule cells. *Neurochem. Res.* 28: 1597-1605.
- (87) FAN, R.S.; JACAMO, R.O.; JIANG, X.; SINNETT-SMITH, J. AND ROZENGURT, E. (2005) G protein-couple receptor activation rapidly stimulates focal adhesion kinase phosphorylation at Ser-843. Mediation by Calcium, calmodulin, and calcium/calmodulin dependent Kinase II. *J. Biol. Chem.* 280: 24212-20.
- (88) DÍAZ-HERNÁNDEZ, M.; SÁNCHEZ-NOGUEIRO, J.; PINTOR, J. AND MIRAS-PORTUGAL, M.T. (2004) Interaction between dinucleotide and epibatidine sensitive-nicotinic receptors in individual cholinergic terminals from rat midbrain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 311: 954-967.
- (89) LEÓN, D.; HERVÁS, C. AND MIRAS-PORTUGAL, M.T. (2006) P2Y₁ and P2X₇ receptors induce calcium/calmodulindependent protein kinase II phosphorylation in cerebellar granule neurons. *Eur. J. Neurosci.* 23: 2999-3013.

- (90) XIA, H.; NHO, R.S.; KAHM, J.; KLEIDON, J. AND HENKE, C.A. (2004) Focal adhesion kinase is upstream of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt in regulating fibroblast survival in response to contraction of type I collagen matrices via beta 1 integrin viability signalling pathway. *J. Biol. Chem.* 279: 33024-34.
- (91) DILL, J.; WANG, H.; ZHOU, F. AND LI, S. (2008) Inactivation of glycogen synthase kinase 3 promotes axonal growth and recovery in the CNS. *J. Neurosci.* 28: 8914-28.
- (92) GARRIDO, J.J.; FERNANDES, F.; GIRAUD, P.; MOURET, I.; PASQUALINI, E.; FACHE, M.P.; JULLIEN, F. AND DARGENT, B. (2001) Identification of an axonal determinant in the C-terminus of the sodium channel Na(v)1.2. *EMBO J.* 20: 5950-61.
- (93) SAMPO, B.; KAECH, S.; KUNZ, S. AND BANKER, G. (2003) Two distinct mechanisms target membrane proteins to the axonal surface. *Neuron.* 37: 611-24.
- (94) KAMIGUCHI, H. AND LEMMON, V. (1998) A neuronal form of the cell adhesion molecule L1 contains a tyrosine-based signal required for sorting to the axonal growth cone. *J. Neurosci.* 18: 3749-56.
- (95) ZHANG, X.; DAVIS, J.Q.; CARPENTER, S. AND BENNETT, V. (1998) Structural requirements for association of neurofascin with ankyrin. *J. Biol. Chem.* 273: 30785-94.
- (96) OGAWA, Y.; HORRESH, I.; TRIMMER, J.S.; BREDT, D.S.; PELES, E. AND RASBAND, M.N. (2008) Postsynaptic density-93 clusters Kv1 channels at axon initial segments independently of Caspr2. *J. Neurosci.* 28: 5731-9.