



Universitat de Lleida

SPINAL CORD MOTONEURONS, MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR STUDY DURING DEVELOPMENT AND PATHOLOGY

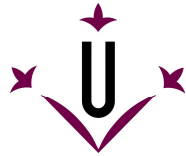
Myriam Gou Fabregas

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSITAT DE LLEIDA
Departament de Ciències
Mèdiques Bàsiques



Universitat de Lleida

INSTITUT DE RECERCA
BIOMÈDICA DE LLEIDA
IRBLLEIDA



**SPINAL CORD MOTONEURONS,
MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR STUDY
DURING DEVELOPMENT AND PATHOLOGY**

Tesis presentada por:

Myriam Gou Fàbregas

Tesis dirigida por:

Dra. Rosa Maria Soler i Tatché

Lleida, Noviembre 2010

Soy de los que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento.

Marie Curie

RESUM

RESUMEN

ABSTRACT

RESUM

La identificació dels mecanismes moleculars que regulen la supervivència i mort de les motoneurons representa una informació important per a la comprensió funcional i l'establiment de potencials dianes terapèutiques per a les malalties que cursen amb degeneració i mort d'aquestes neurones. Per aquest motiu hem dedicat aquest treball a:

a) L'estudi dels mecanismes intracel·lulars dependents de calci que modulen la supervivència de les motoneurons durant el desenvolupament.

Com a efecte inductor de supervivència hem analitzat la participació de la proteïna quinasa dependent de Ca^{2+} /Calmodulina IV (CaMKIV) en motoneurons embrionàries de pollastre, i demostrem que la seva activació calci dependent indueix la fosforilació d'Akt i la supervivència d'aquestes neurones. Per altra banda, com a efecte inductor de mort demostrem que els increments excessius de la concentració del calci intracel·lular induïts per la despolarització de la membrana, són responsables de l'activació de la proteasa Calpaïna i la conseqüent degeneració de les motoneurons de ratolí. Proposem la inhibició de Calpaïna com a mecanisme neuroprotector.

b) La generació d'un model *in vitro* per a l'estudi dels mecanismes patològics que causen la degeneració específica de les motoneurons en Atròfia Muscular Espinal.

En aquesta segona part del treball, amb la finalitat de contribuir a la comprensió de la fisiopatologia d'aquesta malaltia hem desenvolupat un model *in vitro* utilitzant tècniques d'interferència d'RNA. Reduïm l'expressió de la proteïna Survival Motoneuron (SMN) en les motoneurons fins a nivells representatius de la forma severa de la malaltia. L'estudi morfològic i de viabilitat en aquestes cèl·lules ens facilitarà la identificació dels mecanismes moleculars implicats en la malaltia.

Els resultats presentats en aquesta tesi impliquen l'activació de CaMKIV en la regulació de la supervivència de les motoneurons; proporcionen nous coneixements sobre les vies de regulació que en provoquen la seva degeneració (nivells de potassi elevats al medi extracel·lular i Calpaïna), i demostren alteracions d'aquestes neurones en un models d'Atròfia Muscular Espinal (degeneració neurítica i mort).

RESUMEN

La identificación de los mecanismos moleculares que regulan la supervivencia y muerte de las motoneuronas representa una información importante de conocimiento básico y para el establecimiento de potenciales dianas terapéuticas para las enfermedades que cursan con degeneración y muerte de estas neuronas. Por este motivo hemos dedicado este trabajo al estudio de:

a) Mecanismos intracelulares básicos dependientes de calcio que modulan la supervivencia de las motoneuronas durante el desarrollo.

Como efecto inductor de supervivencia hemos analizado la participación de la proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} /Calmodulina IV (CaMKIV) en motoneuronas embrionarias de pollo, y demostramos que su activación calcio dependiente, induce la fosforilación de Akt y supervivencia de estas neuronas. Por otro lado, como a efecto inductor de muerte demostramos que incrementos de la concentración del calcio intracelular inducidos por la despolarización de la membrana, son responsables de la activación de la proteasa Calpaína y la degeneración de las motoneuronas de ratón. Nuestros resultados apoyan el uso de inhibidores de Calpaína como estrategia neuroprotectora.

b) Mecanismos patológicos que causan la degeneración específica de las motoneuronas en Atrofia Muscular Espinal.

En esta segunda parte del trabajo, con la finalidad de contribuir a la comprensión de la fisiopatología de esta enfermedad hemos desarrollado un modelo *in Vitro* utilizando técnicas de interferencia de RNA. Reducimos la expresión de la proteína Survival Motoneuron (SMN) en las motoneuronas hasta niveles representativos de la forma severa de la enfermedad. El estudio morfológico y de viabilidad en estas células nos facilitará la identificación de los mecanismos moleculares implicados en la enfermedad.

Los resultados que presentamos en esta tesis implican la activación de CaMKIV en la regulación de la supervivencia de las motoneuronas; proporcionan nuevos conocimientos sobre las vías de regulación que provocan su degeneración (niveles de potasio elevados al medio extracelular y Calpaína), así como alteraciones específicas de estas neuronas en modelos de Atrofia Muscular Espinal (degeneración neurítica y muerte).

ABSTRACT

Identification of molecular mechanisms that regulate motoneuron survival and death represent valuable basic knowledge to elucidate potential therapeutic targets for those diseases that imply motoneuron degeneration and death. For this reason in the present work we studied:

a) Basic calcium-dependent intracellular mechanisms which modulate motoneuron survival during development.

As a pro-survival effect we analysed the role of the calcium/calmodulin dependent protein kinase IV (CaMKIV) in cultured chicken motoneurons. Results demonstrated that CaMKIV activation induces Akt phosphorylation and motoneuron survival. On the other hand, as a pro-degenerative effect we demonstrate that in mouse motoneurons depolarization induced excessive calcium influx activates the protease Calpain and causes motoneurons death. Our results suggest that Calpain inhibitors may induce neuroprotective effects.

b) Intrinsic motoneuron pathological mechanisms underlying Spinal Muscular Atrophy.

In this second part, with the aim to facilitate the understanding of the physiopathology of SMA we developed an *in vitro* model using RNA interference techniques. We reduce Survival Motoneuron (SMN) protein expression in motoneurons to representative levels from severe Spinal Muscular Atrophy mouse models. Morphologic and survival analysis of these cultured neurons may contribute to the identification of pathologic molecular mechanisms implicated in the disease.

Reported results, obtained from the morphological and molecular analysis of primary motoneuron cultures, provide new knowledge on motoneuron development and survival regulating pathways (implication of CaMKIV activation in motoneuron survival regulation), about regulation pathways involved in motoneuron degeneration (high potassium extracellular levels and Calpain activation), as well as motoneuron alterations in a severe SMA culture model (neurite degeneration and death).

AGRAÏMENTS

AGRADECIMIENTOS

ACKNOWLEDGEMENTS

Per a mi la realització d'aquesta tesi doctoral ha estat molt més que intentar obtenir un determinat títol. Representa una aventura personal plena de moments bons i d'altres més durs, on el més important no és el destí final, sinó tot allò que m'he trobat durant el camí. Entre motoneurons, westerns, mitocondris i microscopis, he trobat un conjunt de persones a les que vull agrair profundament el seu suport, la seva ajuda i la seva presència al meu costat.

Per començar voldria agrair a tot el grup: la Rosa Soler, el Kim, l'Elisa, el Jordi, l'Ana, la Gemma, la Maria Alba, la Stef, l'Armando, l'Èlia, la Maria José, la Rosa Gómez i la Vero perquè tots ells han fet que fos molt fàcil acostumar-me a la vida al laboratori, al món de la recerca. Gràcies per compartir amb mi aquesta etapa.

Vull agrair principalment a la directora de la meua tesis. Rosa, gràcies per haver-me donat l'oportunitat de fer el doctorat amb tu. Recordo els primers dies que venia al laboratori, cada cinc segons apareixia al teu costat per a preguntar-te algun dubte! I tot d'una han passat els anys, ja estem al final, i torno a aparèixer cada cinc minuts per corregir algun apartat de la tesi!!! Vaig començar el gener de 2006, els primers dies em vas ensenyar a realitzar el cultiu primari de motoneurons, i vam començar amb els experiments de supervivències, els factors neurotròfics i la despolarització de membrana. Al novembre va arribar la Stef, i es va dedicar a la via d'NF-KappaB. Al maig de 2007 va incorporar-se l'Ana, amb el projecte d'Atròfia Muscular Espinal i va introduir tècniques més moleculars. Tot d'una ja érem quatre dones estudiant les motoneurons i algú ens va posar el nom *Las chicas de Rosa!* Gràcies per compartir amb mi aquets moments, les xerrades sobre ciència, i no ciència! Gràcies pel Congrés d'Amsterdam!

A l'Ana, gràcies pels moments compartits, per ensenyar-me a construir els *lentis*, per la teva paciència, per les llargues xerrades sobre ciència, futbol i la vida, i per la teva sinceritat en tot moment. Y gracias por las correcciones finales, qué con mi nivel de castellano no ha sido fácil! *Gràcies per l'orxata amb fartons!!!!*

A Stef, durante este tiempo nos hemos ido conociendo ya casi como hermanas, gracias por las charlas compartidas en el laboratorio y fuera de él, por tu constancia, por tu amistad, por la visita a Bulgaria y por los motes que me has puesto *dubriancho* y *pollastre!!*

A la Mary, gràcies per ensenyar-me a utilitzar el Fluo-4 i a registrar les motoneurons, pels *papers* que ens baixaves i per estar sempre disposada a respondre als dubtes que em sorgien. Gràcies!!!

Al Kim, a l'Elisa, i al Jordi, admiro la forma que teniu de treballar, de fer ciència i sobretot com transmeteu tot això al grup. És un plaer haver realitzat la tesi al vostre costat. Gràcies pels moments compartits dins i fora del laboratori, els congressos i reunions (SEBBM i ROSASNET) i les celebracions del grup, gràcies per les *Sacher* i el cava, també gràcies per fer-nos entendre i apreciar el món de l'estrés oxidatiu. MariAlbe, gràcies pels moments compartits al laboratori i fora d'ell, gràcies pel teu optimisme, humanitat i sobretot per la teva gran amistat. Vero, gracias por los momentos compartidos y los ánimos a distància durante mi período de tesis. A Maria José, por los asados y charlas que hemos compartido. A la Rosa Gómez, moltes gràcies per la teva gran ajuda i predisposició i pel teu bon humor. Èlia, gràcies per la teva sensibilitat i esforç. A la Gemma, gràcies per compartir les teves idees sobre política i filosofia, per compartir la teva forma de fer ciència i treball al laboratori. A Don Armando, gracias por las largas charlas sobre coches y economía, y por tu buen humor. A la Montse Rué, gràcies per la teva amabilitat i bon humor, per les anècdotes compartides a la xocolatera i la inestimable ajuda amb l'estadística. A la Xènia per l'ajuda amb el word i impressions en els moments de crisi!! A la Berta gràcies per la teva ajuda. Al Dr. Josep Esquerda i a l'Elisabet, gràcies per l'ajuda amb el microscopi confocal quan tenia algún problema i pels ratolins SMA. Al Serafi, per les estones que vam compartir al laboratori de cultius quan començava la tesi i per la teva gran ajuda als moments finals.

Vull agrair també a la resta de becaris i investigadors dels departaments de Ciències Mèdiques Bàsiques i Medicina experimental, els bons moments compartits i la bona predisposició i ajuda en tot moment. Gràcies a tota la gent que ha realitzat estades al laboratori i tota aquella gent amb qui he compartit sopars, sortides, esmorzars i xerrades durant tot el temps de tesis: Dani, Ester, Hugo, Marta, Hyren, Claudia, Lucía, Laura, Núria, Marina, Isu, Ariel, Ramiro, Alejandra, Nico, etc.

També gràcies a tota aquella gent que no es dedica a la ciència i és sempre al meu costat. Gràcies Petit i Mireia per la vostra gran amistat, sé que sempre puc comptar amb vosaltres. Gràcies a tota la gent de la facultat i el Penya que continua a prop tot i la distància: Maria, Ana, Maite, Bisus I., Martes, etc. Gràcies a la gent de l'Empordà per tants bons moments Núria, Imma, Santi, Nilde, Silvia, etc. També gràcies a en Jordi i la M^a Angels pel vostre bon humor (sé que us dec uns cargols!!!).

A la Rosa altra vegada, gràcies per ser responsable de la meva estada a Marsella, no podria haver escollit un millor laboratori on fer-la, tant a nivell de formació com a nivell personal. Thanks to all the people that I have met in Marseille. Flavio, thanks to receive me in your lab and for the nice welcome during my stay, thanks to share with me phylosofical talks about science and life. Rosanna, thanks to let me work with you in your project and also thanks for the nice farewell dinner that you organized when I was leaving. Lisa, thanks for all that you teached me about stem cells, for the nice walks close to the beach and above all to share with me your strength, enthusiasm and passion for research and life, and your way to do science during my stay. To Filippo-Filippo, to have come to watch the football matches, for the tissue culture cleaning moments and for your jokes!! À Ale, merci pour les moments football, pour les conversations de science et ton amitié. À Sylvie pour ta bonne humeur, ton aide et le Limoncello! À Mathieu pour l'excursion au Mont Saint-Michel et les conversations sur les motoneurons. À Fabienne, merci pour les bons moments que nous avons passe au labo. À Pierre pour sa gentillese et bonne humeur. À Anice pour ne pas trop prendre au serious mes commentaires, et pour ta bonne humeur. To Fabio, for the nice walks to Les Calanques.

Agraeixo a la meva gran família pel seu suport incondicional, per la seva estimació i per permetre que els hi hagi dedicat moltíssim menys temps del que realment es mereixien. Als avis de Terrades que sempre em pregunten quan acabaré d'estudiar, gràcies pel subministrament de til·la, xocolata i fuets! Ah! I les bledes de l'avi!!!! Gràcies també al Papí, per ensenyar-me que ser jove és independent de l'edat. A la Tia i la tieta gràcies per les trucades a las distància, a en Josep i la Montse, la Txell i en Josep petit, gràcies pels pans de tot aquest temps, per les xerrades, acudits i somriures! També gràcies a la Rosina i en Fernando pel seu suport, al Ferran per les xerrades de ciència i els ànims en els moments d'escriure, també a la Pitussa que aviat també et tocarà començar amb l'endnote!, i a la Maria Mercè, també a la Sandra, al Yago, a la Mariona, al Sergi, i al Santi, a tots vosaltres gràcies per ajudar-me a desconnectar de tant en tant, pels moments compartits i els ànims!

A vosaltres pares, gràcies per haver-me permès i ensenyat a fer les coses amb passió, dedicació i intentant donar sempre el millor de mi. Mama, gràcies per la teva constància i a tu papa gràcies per haver-me ensenyat a treballar dur però sense oblidar-se de viure, als dos gràcies per mostrar-me que quan t'equivoques tens dues opcions, et pots queixar i lamentar-te o aprendre dels errors i canviar el que calgui per no tornar-se a equivocar. Aquesta norma que intento seguir en la meua vida personal també m'ha estat molt útil en el dia a dia en el laboratori, quants experiments s'han de realitzar per a trobar les condicions òptimes! Ingrid, a tu gràcies per les visites que m'has anat fent, a Lleida i Marsella, encara que ens veiem poquet sempre estàs aquí, gràcies pel teu *genio*, bon humor i pel teu suport.

A l'Alvaro, gràcies des del fons del meu cor per estar al meu costat en tot moment. Per emocionar-te amb mi en els bons instants, per recolzar-me en tots les moments difícils, per compartir tots i cadascun dels meus pensaments i sentiments. I per tots els moments que has escoltat pacientment mentre t'atabalava amb neurones, calci, puntets y ratlletes diferents!

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	2
1. LAS MOTONEURONAS ESPINALES	3
1.1 LAS MOTONEURONAS	3
1.2 DESARROLLO DE LAS MOTONEURONAS ESPINALES, SONIC HEDGEHOG	4
1.3 DIVERSIDAD FUNCIONAL Y MOLECULAR ENTRE LAS MNs ESPINALES.....	5
2. MUERTE CELULAR PROGRAMADA EN EL SISTEMA NERVIOSO	9
2.1 IMPORTANCIA DE LA PCD PARA ESTABLECER LAS POBLACIONES NEURONALES DEFINITIVAS.....	10
2.2 PERÍODOS DE PCD DEL SISTEMA NERVIOSO DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO	11
2.3 IMPLICACIÓN DEL TEJIDO DIANA EN LA PCD, LA TEORÍA NEUOTRÓFICA.....	11
2.4 PCD DE LAS MOTONEURONAS ESPINALES DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO	13
2.5 TIPOS DE MUERTE NEURONAL PROGRAMADA EN EL SISTEMA NERVIOSO.....	14
3. MECANISMOS DE SUPERVIVENCIA NEURONAL.....	22
3.1 LOS FACTORES NEUOTRÓFICOS	23
3.2 EL CALCIO COMO MODULADOR DE LA SUPERVIVENCIA NEURONAL.....	38
3.3 VÍAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN LA SUPERVIVENCIA Y DIFERENCIACIÓN NEURONAL.....	42
4. VULNERABILIDAD ESPECÍFICA DE LAS MNs ESPINALES.....	49
4.1 MECANISMOS DE DEGENERACIÓN DE LAS MOTONEURONAS	49
4.2 BREVE GLOSARIO DE ENFERMEDADES DE LAS MNs	58
5. ATROFIA MUSCULAR ESPINAL.....	60
5.1 CLASIFICACIÓN DE LOS TIPOS SMA	61
5.2 EL LOCUS SMA	62
5.3 EL GEN <i>SMN</i> (<i>SMN1</i> y <i>SMN2</i>)	63
5.4 LA PROTEÍNA SMN	65
5.5 CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO.....	68
5.6 MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DE SMA	71
5.7 CAUSA(S) DE SMA: UNA PROTEÍNA, DOS HIPÓTESIS	74
5.8 CONTRIBUCIÓN DE LAS MOTONEURONAS Y DEL MÚSCULO A LA PATOLOGÍA..	76
5.9 TRATAMIENTO ACTUAL	78
5.10 POSIBLES TERAPIAS FUTURAS Y ENSAYOS CLÍNICOS	78
OBJETIVOS	83
MATERIALES Y MÉTODOS.....	87
1. CULTIVOS CELULARES	89
1.1 PREPARACIÓN PLACAS DE CULTIVO CON SUSTRATOS DE ADHESIÓN CELULAR..	89
1.2 MEDIOS DE CULTIVO, COMPONENTES Y SOLUCIONES USADAS.....	90

1.3 CULTIVOS PRIMARIOS DE MOTONEURONAS	91
1.4 LÍNEAS CELULARES.....	100
2. TÉCNICAS PARA EVALUAR LA VIABILIDAD NEURONAL	101
2.1 MUERTE NEURONAL:.....	101
2.2 SUPERVIVENCIA NEURONAL.....	102
3. TRANSFECCIÓN CELULAR	104
4. TRANSDUCCIÓN LENTIVIRAL	105
4.1 PRODUCCIÓN DE LENTIVIRUS.....	107
4.2 TITULACIÓN LENTIVIRAL.....	109
4.3 TRANSDUCCIÓN LENTIVIRAL	109
5. TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE IMAGEN	110
5.1 MICROSCOPIOS.....	110
5.2 INMUNOFLUORESCENCIA.....	110
5.3 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE Ca ²⁺ INTRACELULAR.....	112
5.4 DETERMINACIÓN DE LA LONGITUD NEURÍTICA.....	113
5.5 ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DE LA DEGENERACIÓN NEURÍTICA.....	114
6. TÉCNICAS BIOQUÍMICAS PARA EL ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	115
6.1 EXTRACCIÓN PROTEICA DE LISADOS CELULARES TOTALES EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES.....	115
6.2 ELECTROFORESIS EN GELES DE SDS-POLIACRILAMIDA	116
6.3 TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS A MEMBRANAS DE PVDF	117
6.4 INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS.....	118
6.5 STRIPPING DE MEMBRANAS DE PVDF.....	120
6.6 TINCIONES DE MEMBRANAS DE PVDF	120
7. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR:	121
7.1 TRANSFORMACIÓN CELULAR	121
7.2 AISLAMIENTO DE DNA PLASMÍDICO	123
7.3 ANÁLISIS DE DNA EN GELES DE AGAROSA	124
7.4 EXTRACCIÓN DE DNA DE GELES DE AGAROSA	124
7.5 DIGESTIONES CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN	124
7.6 LIGACIONES	125
7.7 DISEÑO DE RNAs DE INTERFERENCIA (RNAi).....	125
7.8 GENERACIÓN DE VECTORES LENTIVIRALES PARA LA INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN PROTEÍNAS	126
8. GENERACIÓN DE VECTORES DE SOBRE-EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS	128
9. PLÁSMIDOS USADOS	129
10. ESTADÍSTICA	134

RESULTS	137
1. NEUROPROTECTION BY NEUROTROPHIC FACTORS AND MEMBRANE DEPOLARIZATION IS REGULATED BY CaMKIV	141
1.1 INTRODUCTION	141
1.2 RESULTS	143
2. SPECIFIC VULNERABILITY OF EMBRYONIC MOUSE MNS TO MEMBRANE DEPOLARIZATION	153
2.1 INTRODUCTION	153
2.2 RESULTS	155
3. ESTABLISHMENT OF IN VITRO MODELS FOR SPINAL MUSCULAR ATROPHY	174
3.1 INTRODUCTION	174
3.2 RESULTS	175
3.2.1 ESTABLISHMENT OF AN SMA MNS PRIMARY CULTURE MODEL	175
3.2.2 PRIMARY CULTURE OF SPINAL CORD MNS FROM AN SMA MOUSE MODEL	183
DISCUSSION	187
1. NTFs AND MN SURVIVAL	190
2. Ca²⁺ AND MN SURVIVAL.....	194
3. CULTURE MODELS TO INVESTIGATE SMA:	206
CONCLUSIONS	213
PUBLICACIONES Y CONGRESOS	217
APPENDIX 1	225
1. INTRODUCTION	227
1.1 Embryonic Stem Cells	227
1.2 ESC neuronal differentiation	229
2. OBJECTIVES.	230
3. MATERIAL AND METHODS:	230
4. RESULTS:	231
4.1 Neuronal differentiation process	231
4.2 Monitoring Neural and Neuronal differentiation.....	232
4.3 Analysis of molecular markers during neuronal differentiation process.....	233
5. DISCUSSION.....	236

APPENDIX 2..... 239

1. INTRODUCTION 241

2. MATERIAL AND METHODS 241

3. RESULTS 242

 3.1 SMN knockdown stable MN like cell line, NSC34..... 242

 3.2 SMN over-expressing stable cell line, HEK 293T 244

4. DISCUSSION..... 245

BIBLIOGRAPHY 247

ÍNDICES DE FIGURAS Y TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sistema nervioso motor humano. 3

Figura 2. Esquema de la formación de la médula espinal y la diferenciación de las MNs, Shh. 4

Figura 3. Clasificación de las MNs según el tipo de fibra muscular de inervación..... 6

Figura 4. Esquema de los diferentes tipos de MNs, su localización y la diana de inervación. 8

Figura 5. Dependencia del tejido diana para la supervivencia de las MNs..... 12

Figura 6. PCD en las MNs espinales..... 13

Figura 7. Conservación evolutiva de las vías apoptóticas. 15

Figura 8. Mecanismos intracelulares implicados en la apoptosis. 16

Figura 9. Mecanismos moleculares de autofagia..... 18

Figura 10. Mecanismos de integración neuronal de señales extra-celulares. 22

Figura 11. Fuentes de NTFs para las MNs espinales..... 25

Figura 12. NTFs que regulan la supervivencia de las MNs. 26

Figura 13 Neurotrofinas y sus receptores 27

Figura 14. Miembros de la familia de GDNF y sus receptores. 29

Figura 15. Activación de Ret por los GFLs, cis- y trans-. 30

Figura 16. Esquema de las citoquinas, sus receptores y activación de la vía intracelular JAK/STAT..... 32

Figura 17. HGF, su receptor y activación de vías intracelulares..... 35

Figura 18. Requerimientos tróficos de las distintas subpoblaciones de MNs espinales.36

Figura 19. Incremento de los niveles de Ca²⁺ intracelular mediado por NTFs y despolarización..... 39

Figura 20. *Calcium set-point hypothesis*. 40

Figura 21. Esquema de la señalización PI3K/Akt. 43

Figura 22. Esquema de la vía de señalización Ras/MAPK..... 44

Figura 23. Esquema de la vía PLC-γ. 46

Figura 24. Estructura de las CaMKs. 47

Figura 25. Esquema de las principales vías de señalización activadas por Ca²⁺/CaM.... 48

Figura 26. Áreas de vulnerabilidad de las MNs. 50

Figura 27. MNs en cultivo, mitocondrias funcionales (rojo). 53

Figura 28. Los genes *SMN*. 60

Figura 29. Esquema que contempla los tipos de SMA según la edad de aparición de los síntomas. 62

Figura 30. Esquema del locus SMA..... 63

Figura 31. Transcripción de los genes *SMN1* y *SMN2*. 64

Figura 32. Estructura de la proteína SMN. 65

Figura 33. Función de SMN en el ensamblaje de snRNPs y detalle del complejo SMN.. 66

Figura 34. Función de SMN en transporte de mRNA hacia el terminal del axón..... 67

Figura 35. Dominios de interacción de la proteína SMN con diversas proteínas. 69

Figura 36. Esquema del genotipo de SMN en el modelo de ratón mutante..... 72

Figura 37. Esquema del modelo de ratón de SMA (*SMN*^{-/-};*SMN2*^{+/+})..... 73

Figura 38. Hipótesis de la afectación específica de MNs por bajos niveles de *SMN*. 75

Figura 39. Esquema de la purificación y cultivo de las MNs de embriones de pollo. 91

Figura 40. Esquema del proceso de disección de la médula espinal de pollo. 91

Figura 41. Detalle de la separación de las meninges de la médula espinal.	92
Figura 42. Gradiente de Optiprep para purificar las MNs espinales.	93
Figura 43. Esquema de la disección, purificación y cultivo de las MNs espinales de ratón.	94
Figura 44. Proceso de disección del embrión de ratón.	94
Figura 45. Esquema de los pasos seguidos para la disección de la médula espinal de embriones de ratón.	95
Figura 46. Detalle de la separación de las meninges de la médula espinal.	95
Figura 47. Centrifugación de las células en medio rico en BSA.	96
Figura 48. Gradiente de Optiprep.	96
Figura 49. MNs en cultivo.	97
Figura 50. Genotipo de los ratones <i>SMN</i> ^{tm1/Msd} , modelo animal de SMA.	97
Figura 51. Gel de agarosa.	99
Figura 52. Morfología de un núcleo apoptótico teñido con Hoechst.	101
Figura 53. Morfología de una célula apoptótica, <i>blebbing</i>	102
Figura 54. Esquema temporal del contaje de supervivencia II.	104
Figura 55. Esquema temporal del contaje de supervivencia III.	104
Figura 56. Vector pLVTHM.	106
Figura 57. Vector psPAX2.	106
Figura 58. Vector pM2.	107
Figura 59. Incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ en MNs en cultivo tratadas detectado por cambios de intensidad de fluorescencia.	112
Figura 60. Representación gráfica esquemática de un registro de los cambios de fluorescencia de MNs.	113
Figura 61. Evaluación de la longitud neurítica con ImageJ, NeuronJ.	114
Figura 62. Detalle de una neurita con morfología sana y una degenerante.	115
Figura 63. Vector pSUPERretro-puro.	129
Figura 64. Vector pEGFP.	130
Figura 65. Vector pcDNA3.1.	130
Figura 66. Vector pLVTHM.	131
Figura 67. Vector psPAX2.	132
Figura 68. Vector pMD2.G.	132
Figura 69. Vector FCIV.	133
Figure 70. CaMKIV is expressed in chicken spinal cord MNs.	143
Figure 71. CaMKIV cellular distribution in cultured primary chicken MNs.	144
Figure 72. CaMKIV _{CA} induces MN survival.	144
Figure 73. Effect of CaMKIV constitutively active form on MN cell death.	145
Figure 74. Constitutively active form of CaMKIV reduces cell death in NTF-deprived MNs.	146
Figure 75. CaMKIV _{CA} induces Akt phosphorylation.	147
Figure 76. Anti-FLAG immunofluorescence showing distribution form CaMKIV _{CA} -KD of the transfected cells.	148
Figure 77. Effect of PI 3-kinase inhibitors on CaMKIV _{CA} -induced MN survival.	149
Figure 78. CaMKIV _{CA} -KD induces Akt phosphorylation.	150
Figure 79. Primary Mouse MNs culture characterisation.	155
Figure 80. NTFs deprivation induces apoptotic cell death to primary cultured mouse MNs.	156

Figure 81. NTF induced mouse MNs survival.	158
Figure 82. Effect of high K ⁺ medium on mouse and chicken MN survival.	159
Figure 83. Membrane depolarization induces cell death on mouse MNs in the presence of NTFs.	160
Figure 84. Percentage of MN survival with different K ⁺ concentrations in the culture media.	161
Figure 85. MN survival evaluation on cultured mouse MNs exposed to 30K + NTFs for different time periods.	162
Figure 86. Effect of VGCC antagonists on membrane depolarization-induced mouse MNs cell death.	163
Figure 87. Effect of glutamate receptor antagonists on mouse MN cell death induced by membrane depolarization.	164
Figure 88. Effect of JNK pathway inhibition on MN cell death induced by membrane depolarization.	165
Figure 89. Changes of intracellular fluorescence induced by membrane depolarization.	166
Figure 90. Changes of intracellular fluorescence induced by membrane depolarization in mouse or chicken MNs loaded with Fluo-4.	167
Figure 91. Effect of membrane depolarization on μ -Calpain activity.	169
Figure 92. Effect of μ -Calpain inhibition on mouse MN cell death induced by membrane depolarization, pharmacological approach.	169
Figure 93. MNs lentiviral transduction efficiency and decrease of μ -Calpain protein levels.	170
Figure 94. Effect of μ -Calpain inhibition on mouse MN cell death induced by membrane depolarization, lentiviral approach.	171
Figure 95. CaMKIV is reduced in MN cultures treated with 30K.	171
Figure 96. SMN localization in cultured mouse MN.	175
Figure 97. Effect of shSMN lentiviral transduction in SMN protein level.	176
Figure 98. SMN protein levels in cultured MNs during the culture period.	177
Figure 99. Effect of SMN knockdown on MN neurites.	178
Figure 100. Effect of SMN knockdown on MN survival.	179
Figure 101. Human SMN over expression on cultured MNs.	180
Figure 102. SMN immunofluorescence microscope images of MN somas.	180
Figure 103. SMN immunofluorescence microscope images of neurites.	181
Figure 104. Over-expression of human SMN on SMN knockdown mouse MNs reduces neurite degeneration.	182
Figure 105. Mouse MNs isolated from a single spinal cord.	183
Figure 106. SMN protein levels in primary cultured MNs from SMN ^{Tm1/Msd} SMA mouse model.	184
Figure 107. SMN knockout Mouse MNs neurite length.	185
Figure 108. Intracellular mechanism proposed for CaMKIV induced MN survival.	198
Figure 109. Proposed mechanisms to induce Ca ²⁺ excessive influx after membrane depolarization, Glutamate receptors and VGCC.	201
Figure 110. Proposed mechanisms to explain selective MN degeneration associated to intracellular calcium increase.	204
Figure 111. Schematic representation of MN neurite length when grow on different substrates.	211

Figure 112. Potential uses of ESC.	228
Figure 113. Stem cells growing with feeder cells.	231
Figure 114. mESCs neuronal differentiation.	232
Figure 115. Stem cells neuronal differentiation.....	233
Figure 116. Nanog positive pluripotent mESC.....	233
Figure 117. Analysis of phospho-histone 3 marker during neuronal differentiation. .	234
Figure 118. Analysis of cleaved caspase-3 during neuronal differentiation.	235
Figure 119. mESC neuronal differentiation.....	236
Figure 120. Microscope images from NSC34 cell clones selection transduced with EV, shSMN3 or shSMN1 constructs or not transduced (Control).	243
Figure 121. SMN protein levels in NSC34 clones.....	243
Figure 122. Microscope images from HEK 293T cell clones selection transduced with EV or SMN Over-expression constructs or not transduced (Control).	244
Figure 123. SMN protein levels from the different selection clones.	245

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los tipos de muerte neuronal programada.....	14
Tabla 2. Esquema de la pérdida de MNs en diferentes ratones knockout para NTF/receptor de NTF.	37
Tabla 3. Fuentes, dianas y mecanismos de control intracelulares de los flujos de Ca ²⁺ .38	
Tabla 4. Correlación del genotipo y cantidad de proteína SMN funcional con el tipo de SMA.....	68
Tabla 5. Proteínas que interactúan con SMN o con el complejo SMN.....	70
Tabla 6. Modelos animales empleados para el estudio de SMA.....	71
Tabla 7. Principales ensayos clínicos para SMA.	79
Tabla 8. Soluciones y medios de cultivo utilizados.	90
Tabla 9. Listado de anticuerpos usados para inmunofluorescencia.	111
Tabla 10. Composición de los geles de archilamida.....	117
Tabla 11. Listado de anticuerpos usados para western blot.....	119
Tabla 12. Soluciones para tinción de membranas de PVDF con plata.	121
Table 13. Intracellular fluorescence measures of cultures treated with 30K medium in the presence of VGCC antagonists.	168
Table 14. Cell Line Culture Mediums.....	241

ABREVIATURAS

(AAV) <i>Adeno-associated Virus</i>	(CNS) <i>Central Nervous System</i>
(AID) <i>Autoinhibitory domain</i>	(CNTF) <i>Ciliary derived neurotrophic factor</i>
(AIF) <i>Apoptosis Inducing Factor</i>	(CREB) <i>cAMP response element binding protein</i>
(ALS) <i>Amiotrophic Lateral Sclerosis</i>	(CT-1) <i>Cardiotrophin-1</i>
(AM) <i>Acetoximetil ester</i>	(DAG) <i>Diacilglicerol</i>
(Apaf-1) <i>Apoptotic Protease Activating Factor-1</i>	(DIV) <i>Days in Vitro</i>
(ARTN) <i>Artemina</i>	(DNA) <i>ácido desoxirribonucleico</i>
(ATG) <i>Autophagy Related Genes</i>	(DRGs) <i>Dorsal Root Ganglia</i>
(BDNF) <i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i>	(E número) <i>Día Embrionario</i>
(BMP) <i>Bone morphogenetic protein</i>	(ER) <i>Endoplasmic reticulum</i>
(BSA) <i>Albúmina Serica Bovina</i>	(ERK1/2) <i>Extracellular Regulated Kinase</i>
(Ca ²⁺) <i>Calcium</i>	(FADD) <i>Fas Associated Death Domain</i>
([Ca ²⁺] _i) <i>Concentración de calcio intracelular</i>	(FasL) <i>Fas Ligand</i>
(CaM) <i>Calmodulin</i>	(FF) <i>Fast Twitch Fatigable Fibers</i>
(CaMKIV) <i>Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein Kinase IV</i>	(FL) <i>Full Length</i>
(CaMKIV _{CA}) <i>Constitutively active form of Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein Kinase IV</i>	(FP) <i>Floor Plate</i>
(CaMKIV _{CA} -KD) <i>Kinase dead form of CaMKIVCA</i>	(FR) <i>Fast Twitch Resistant Fibers</i>
(CaMKs) <i>Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein Kinases</i>	(GDF-15) <i>Growth differentiation factor-15</i>
(CBD) <i>Calmodulin Binding Domain</i>	(GDNF) <i>Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor</i>
(CLC) <i>Cardiotrophin-1-Like Cytokine</i>	(GFLs) <i>Growth Factor Family Ligands</i>
(CMT) <i>Charcot Marie Tooth's disease</i>	(GFP) <i>Green Fluorescent Protein</i>
	(GFR α) <i>GDNF-Family Receptor-α</i>
	(gp130) <i>glicoproteína 130</i>
	(HGF) <i>Hepatocyte Growth Factor</i>

(HMC) Columna Motora Hypaxial	(MN) Motoneurona
(hnRNP) <i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein</i>	(MSH) <i>Mullerian Inhibiting Substance</i>
(HSP) Paraplegia Espastica Hereditaria	(mTOR) <i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
(IAP) <i>Inhibitor of Apoptosis Protein</i>	(NAIP) <i>Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein</i>
(IGFR-1) Receptor tirosina quinasa del factor de crecimiento de insulina-1	(NBMc) Medio Neurobasal Completo
(IGFR-2) Receptor tirosina quinasa del factor de crecimiento de insulina-2	(NF) <i>Neurofilament</i>
(IL) Interleuquina	(NFH) <i>Neurofilament heavy chain</i>
(IP3) Inositol Trifosfato	(NGF) <i>Nerve Growth Factor</i>
(iPSCs) <i>Induced Pluripotent Stem Cells</i>	(NMJ) <i>Neuromuscular Junction</i>
(JAK) <i>Janus Kinase</i>	(NRTN) Neurturina
(JNK) <i>c-Jun N-terminal Kinase</i>	(NT-3) <i>Neurotrophin-3</i>
(K ⁺) <i>Potassium</i>	(NT-4/5) <i>Neurotrophin-4/5</i>
(KO) <i>Knockout</i>	(NTF) <i>Neurotrophic factor</i>
(Lb) <i>Luria Bertrani</i>	(PARP) Proteína Poli-(ADP-Ribosa) polimerasa
(LB) Lysis Buffer	(PBS) <i>Phosphate-buffered saline</i>
(LIF) <i>Leuchemia Inhibitory Factor</i>	(PCD) <i>Programmed Cell Death</i>
(LIFR β) Receptor tirosina kinasa de las citoquinas	(PEI) polietilenimina
(LMC) Columna Motora Lateral	(PFA) Paraformaldehido
(LPF) Lipofectamina	(PGC) Columna motora preganglionar
(LSm) <i>Sm Like Proteins</i>	(PI3K) <i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
(MAPK) <i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>	(PIP) fosfatidil Inositol
(MEF) <i>Mouse Embryonic Fibroblast</i>	(PKC) Proteína Kinasa C
(MMC) Columna Motora Medial	(PLC γ) <i>Phospholipase C Gamma</i>
	(PLS) Esclerosis Lateral Primaria
	(PMA) Atrofia Muscular Progresiva

(PN) Placa Neural	(UNRIP) <i>UNR interacting protein</i>
(PNS) <i>Periferic Nervous System</i>	(VAPB) <i>Vesicle Trafficking protein-B</i>
(PSPN) Persefina	(VEGF) <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
(RNA) ácido ribonucleico	(VGCC) <i>Voltage Gated Calcium channel</i>
(S) <i>Slow Twitch Fibers</i>	(YFP) <i>Yellow Fluorescent Protein</i>
(SBMA) Atrofia Muscular Espinal y Bulbar	
(SDS) <i>Sodiumdodecylsulfate</i>	
(SERF-1) <i>Small EDRK-Rich Factor</i>	
(Shh) <i>Sonic Hedgehog</i>	
(SIP-1) <i>SMN Interacting Protein 1</i>	
(SMA) <i>Spinal Muscular Atrophy</i>	
(SMN) <i>Survival Motoneuron gene</i>	
(SMN) Survival Motoneuron protein	
(SN) Sistema Nervioso	
(SNC) Sistema Nervioso Central	
(SNP) Sistema Nervioso Periférico	
(snRNA) <i>Small Nuclear RNA</i>	
(snRNP) <i>small nuclear Ribonucleo-protein</i>	
(SOD1) Proteína Superoxidodismutasa 1	
(STAT) <i>Signal Transducer Activator Factor</i>	
(TEMED) N,N,N,N'-tetrametilnediamina	
(TK) Tirosina quinasa	
(TN) Tubo Neural	
(TNF) <i>Tumor Necrosis Factor</i>	
(Trk) <i>Tropomyosin-Related Kinase</i>	

INTRODUCCIÓN

1. LAS MOTONEURONAS ESPINALES

1.1 LAS MOTONEURONAS

Las **motoneuronas** (MNs) son las células del **sistema nervioso central** (SNC) encargadas de generar y transmitir los impulsos nerviosos responsables de la contracción muscular. Se dividen en **MNs superiores**, localizadas en la corteza motora del cerebro y en núcleos del tronco encefálico (núcleo rojo y formación reticular entre otros), son las neuronas encargadas de planear y dirigir los movimientos corporales. En **MNs inferiores**, situadas en el asta ventral de la médula espinal (MNs espinales) y en los núcleos motores de los nervios craneales del tronco encefálico, estas neuronas son responsables de la contracción muscular.

En nuestro trabajo nos hemos centrado en el estudio de las **MNs espinales**. Estas neuronas proyectan sus axones fuera del SNC para controlar el movimiento muscular directa (realizando sinapsis con el músculo esquelético), o indirectamente (a través de los ganglios del sistema simpático). La activación de las MNs espinales se dirige a través de *inputs* sinápticos de las MNs superiores (circuitos más complejos), o de circuitos locales, como es el caso del control reflejo (las neuronas de los ganglios dorsales sensoriales (DRGs, del inglés *Dorsal Root Ganglia*) transmiten el impulso a las MNs espinales y estas activan la contracción muscular), (Figura 1).

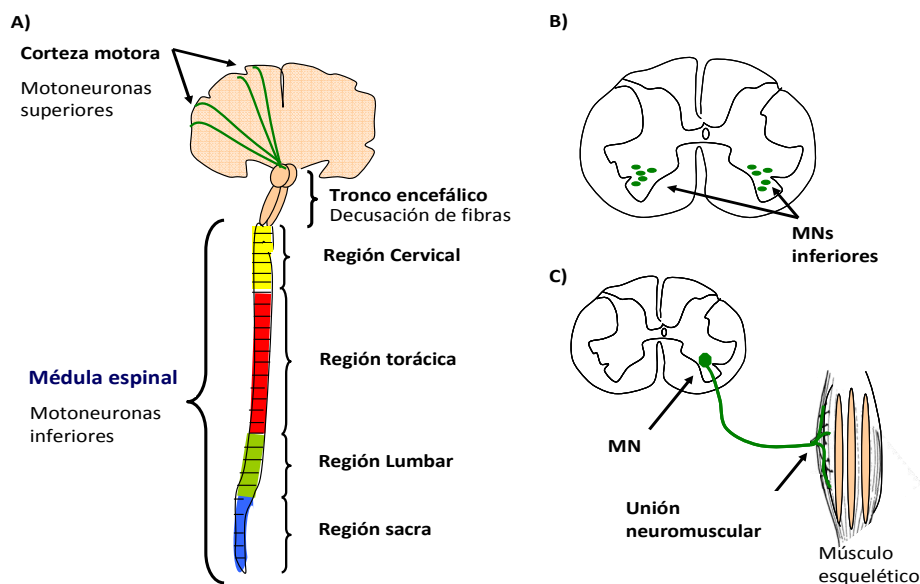


Figura 1. Sistema nervioso motor humano.

A) Subdivisiones y componentes principales del sistema nervioso motor. B) Sección transversal de la médula espinal indicando la localización de las MNs en el asta ventral. C) Esquema de una MN del asta ventral de la médula espinal que extiende su fuera del SNC axón a través de la raíz ventral de la médula hasta llegar a establecer la unión con el músculo esquelético, unión neuromuscular (NMJ, del inglés *neuromuscular junction*).

1.2 DESARROLLO DE LAS MOTONEURONAS ESPINALES, SONIC HEDGEHOG

Durante el desarrollo el sistema nervioso se origina a partir de un engrosamiento ectodérmico denominado placa neural (PN). La PN se fusiona por los extremos y forma el tubo neural (TN, compuesto por células neuroepiteliales), (Cayuso and Martí 2005).

La parte caudal del tubo neural da lugar a la médula espinal. En la parte más ventral, próxima a la notocorda, se empieza a formar una capa de células más gruesa que recibe el nombre de placa del suelo (FP, del inglés de *floor plate*), que se forma a partir de señales que recibe de la notocorda (formación mesodérmica); las células que la componen determinarán la polaridad ventro-dorsal del tubo neural y la diferenciación de los precursores neuronales hacia los diferentes subtipos de neuronas, incluyendo las neuronas motoras (Figura 2, A-D).

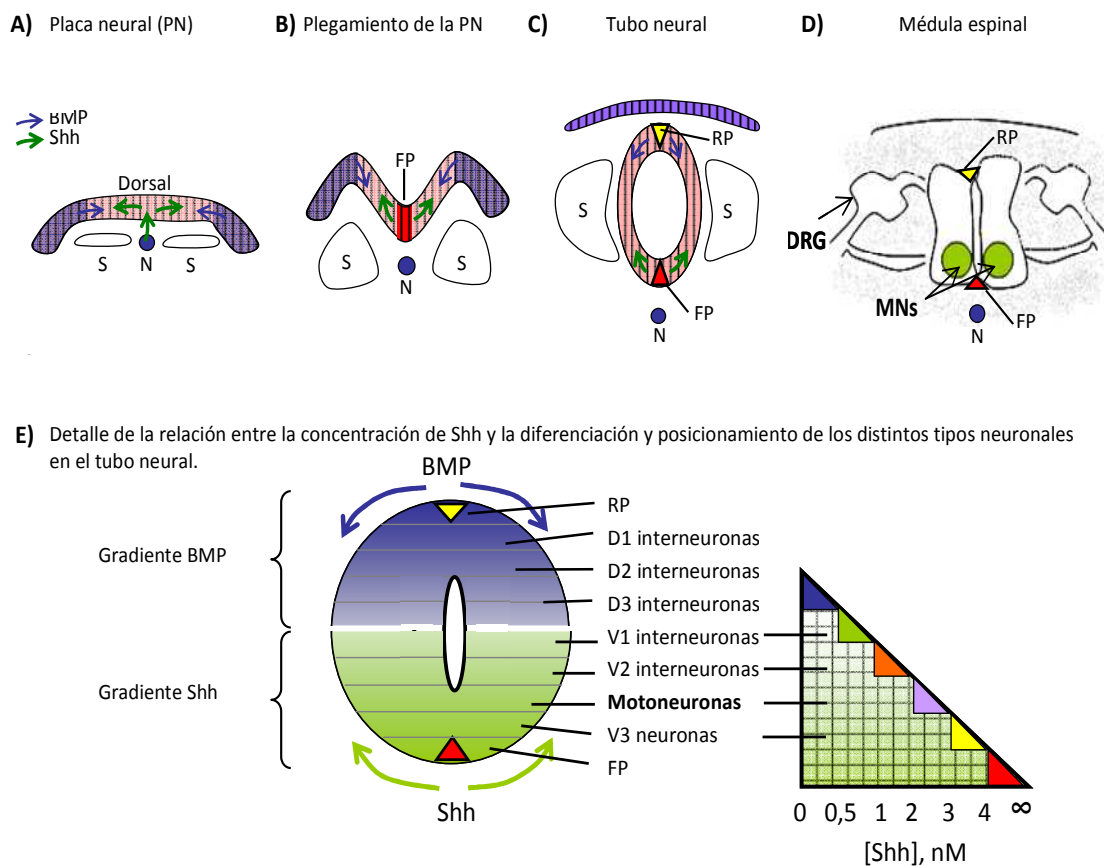


Figura 2. Esquema de la formación de la médula espinal y la diferenciación de las MNs, Shh.

A) Formación de la placa neural a partir de las células del neuroectodermo. B) Invaginación de la placa neural para formar el tubo neural. C) Polarización ventro-dorsal del tubo neural, localización de la *floor plate* y *roof plate*. D) Localización ventral de las MNs en la médula espinal. E) Las proteínas Shh y BMP dirigen la diferenciación y localización dorso-ventral de los distintos subtipos de neuronas del tubo neural. (Jessell, TM2000).

En la región del TN que formará la médula espinal la diferenciación de las células progenitoras del neuroepitelio hacia neuronas motoras depende principalmente de

una glicoproteína llamada Sonic Hedgehog (Shh); esta proteína es secretada por células de la notocorda y por células de la FP.

Se genera un gradiente de concentración de la proteína Shh a lo largo del eje dorso-ventral. Shh regula la cascada transcripcional que actúa sobre los progenitores neuronales especificando su diferenciación, funciona como un morfogeno induciendo la expresión de algunos factores de transcripción del homeodominio NKx, y al mismo tiempo reprimiendo la expresión de otros genes en función de su concentración (Briscoe et al. 2000). Genera un código molecular de expresión/represión de determinados genes que dirigen la diferenciación neuronal regional de las células progenitoras de la parte ventral del TN. Este gradiente es responsable de la generación de 5 dominios distintos (cada dominio presenta una combinación de factores de transcripción característico y único), en cada uno de ellos se generará un subtipo neuronal específico, entre ellos, las MNs (McMahon 2000), (Figura 2, E).

En concreto, las células progenitoras del dominio que genera las MNs expresan **Nkx6.1, Pax6 y Olig2** (Liu et al. 2003). Estas proteínas activan a MNR2, que es la proteína responsable de la inducción de la expresión de factores de transcripción de la familia LIM (*LIM homeodomain transcription factor*) como **Islet-1, Islet-2, Lim-3** y **HB9**, considerados marcadores específicos de MN) (Jessell 2000).

1.3 DIVERSIDAD FUNCIONAL Y MOLECULAR ENTRE LAS MNs ESPINALES

El patrón de inervación del músculo esquelético por las MNs espinales requiere un alto grado de organización espacial. Por ello, a pesar de considerarse como un grupo las motoneuronas espinales son altamente diversas en términos de morfología, conectividad, y propiedades funcionales pudiendo clasificarse en diferentes subtipos (alpha/gamma/beta y las alpha en rápidas/lentas), (Kanning, Kaplan and Henderson 2010).

1.3.1 Clasificación de las MNs según el tipo de fibra muscular que inervan

✓ **α-MNs:** inervan fibras externas del huso muscular y dirigen la contracción muscular. Son las más abundantes. La mayoría reciben innervación monosináptica de las neuronas sensoriales propioceptivas. Se caracterizan por expresar el antígeno NeuN en la etapa postnatal (Frieze et al. 2009). Éstas a su vez pueden clasificarse en subtipos (Burke et al. 1973) según las propiedades contráctiles de las unidades motoras a las que inervan y su tamaño, conductividad y excitabilidad neuronal, en:

- **Rápidas fatigables (FF, del inglés *Fast-twitch fatigable*):** inervan fibras de contracción rápida, son las más grandes, presentan mayor arborización dendrítica y más terminales pre-sinápticos (Cullheim et al. 1987). Son importantes para

aquellos movimientos como correr y saltar que requieren impulsos cortos pero de contracción fuerte.

- **Rápidas resistentes al agotamiento (FR, del inglés *Fast-twitch resistant*):** muestran propiedades intermedias, se diferencian de las FF únicamente por la fibra muscular que inervan.

- **Lentas (S, del inglés *slow-twitch*):** Presentan soma y axones más reducidos y establecen uniones neuromusculares con fibras musculares de contracción lenta. Se encargan de los movimientos para mantener la postura corporal, que no requieren excesiva fuerza de contracción pero sí deben ser prolongados (revisado en (Burke 1999)). Existe un marcador molecular específico que las difiere de las MNs rápidas, las MNs S expresan la proteína de vesícula sináptica SV2A, pero únicamente durante el período postnatal.

✓ **γ -MNs:** inervan fibras internas del huso muscular, dirigen funciones complejas en el control motor. Se caracterizan por presentar conducción axonal lenta, debido a que el axón tiene un diámetro inferior, y menor grado de arborización que las MNs alpha. El diámetro del soma neuronal también es más reducido. Además, no reciben innervación monosináptica de las neuronas sensoriales propioceptivas. En estadios postnatales se diferencian del resto de clases de MNs por la expresión del factor de transcripción Err3 (Friese et al. 2009) y también expresan mayor cantidad del receptor GFR α 1 de GDNF (Glial Cell-Line Derived Neurotrophic Factor), (Shneider et al. 2009).

✓ **β -MNs:** (menos abundantes y poco conocidas), inervan fibras internas y externas del huso muscular.

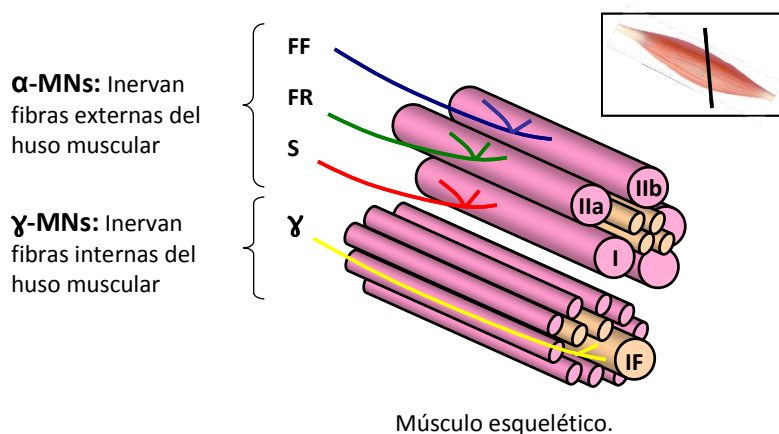


Figura 3. Clasificación de las MNs según el tipo de fibra muscular de innervación.

Esquema de la clasificación de MNs según las fibras musculares a que dirigen sus axones. IF, fibras internas del huso muscular. I, IIa y IIb tipos de fibras externas del huso muscular.

1.3.2 Clasificación de las MNs según su localización: columnas motoras y pools

Los subtipos de MNs que se han mencionado hasta el momento (alpha/gamma/beta) se encuentran distribuidas a lo largo de la médula espinal. No

obstante, para realizar sus funciones de forma coordinada, durante el desarrollo las MNs, se agrupan en columnas motoras que se extienden a lo largo del eje rostro-caudal de la médula espinal (Figura 4, B y C). En los mamíferos los genes codificados por la familia de factores de transcripción Hox determinan la especificidad sináptica de las MNs y su organización en las distintas **columnas motoras** (Dasen and Jessell 2009):

- ✓ **Columna motora preganglionar (PGC):** Neuronas que proyectan sus axones hacia las neuronas de los ganglios simpáticos. Se encuentran a nivel torácico.
- ✓ **Columna motora lateral (LMC):** MNs que envían sus axones a los músculos ventrales y dorsales de las extremidades (LMC_l, LMC_m). Se encuentran a nivel braquial y lumbar de la médula espinal. Los músculos de las extremidades están inervados exclusivamente por LMC.
- ✓ **Columna motora hypaxial (HMC):** inervan músculos intercostales y de la pared corporal en la región ventral del cuerpo (*hypaxial muscles*). También se encuentran a nivel torácico. Los músculos respiratorios están inervados principalmente por HMC.
- ✓ **Columna motora medial (MMC):** proyectan sus axones hacia los músculos axiales (músculos intercostales y de la pared corporal) de la región dorsal del cuerpo (*epaxial muscles*). Se encuentran a lo largo de todo el eje rostro-caudal de la médula espinal. Mayoritariamente inervan músculos posturales.

Las distintas columnas motoras expresan factores de transcripción característicos y específicos. Hasta el momento del nacimiento, todas las MNs expresan **Islet-1** y/o **Islet-2**, pero durante el desarrollo, existen factores de transcripción que muestran un patrón de expresión diferencial, definiendo las subclases funcionales de MNs.

Dentro de una columna motora al conjunto de MNs que proyectan sus axones a un mismo músculo esquelético se le denomina **pool**. Un pool motor típico tiene representados todos los tipos de MNs –rápidas y lentas, alpha y gamma-. Generalmente las MNs gamma representan un tercio de las MNs de un pool (revisado por (Friese et al. 2009)), pero en las α -MNs: el ratio de FF, FR y S varía considerablemente dependiendo de la unidad motora. Así, cada *pool* presenta un ratio característico de MNs de los distintos subtipos adaptadas a su función y las MNs que lo conforman comparten propiedades morfológicas y moleculares características (perfiles de factores de transcripción que confieren la expresión específica de determinadas moléculas de superficie como receptores de guía axonal, receptores de factores neurotróficos y moléculas de adhesión (Dasen and Jessell 2009, Dalla Torre di Sanguinetto, Dasen and Arber 2008)).

El estudio y caracterización de las distintas subpoblaciones de MNs es crucial, puesto que presentan diferentes grados de vulnerabilidad frente a enfermedades y daño neuronal (ver capítulo 4 de la introducción). Un ejemplo claro es que en las enfermedades neurodegenerativas como Atrofia Muscular Espinal (SMA, del inglés *Spinal Muscular Atrophy*) y Esclerosis Lateral Amiotrófica (ALS, del inglés *Amiotrophic Lateral Sclerosis*), y durante el envejecimiento, las unidades motoras de propiedades contráctiles rápidas (FF), son más vulnerables, degeneran rápido y pronto, mientras que las unidades motoras que inervan músculos de contracción lenta (S) y aquellas implicadas en movimiento ocular o en la contracción de los esfínteres son más resistentes a los procesos de degeneración (revisado en (Kanning et al. 2010)).

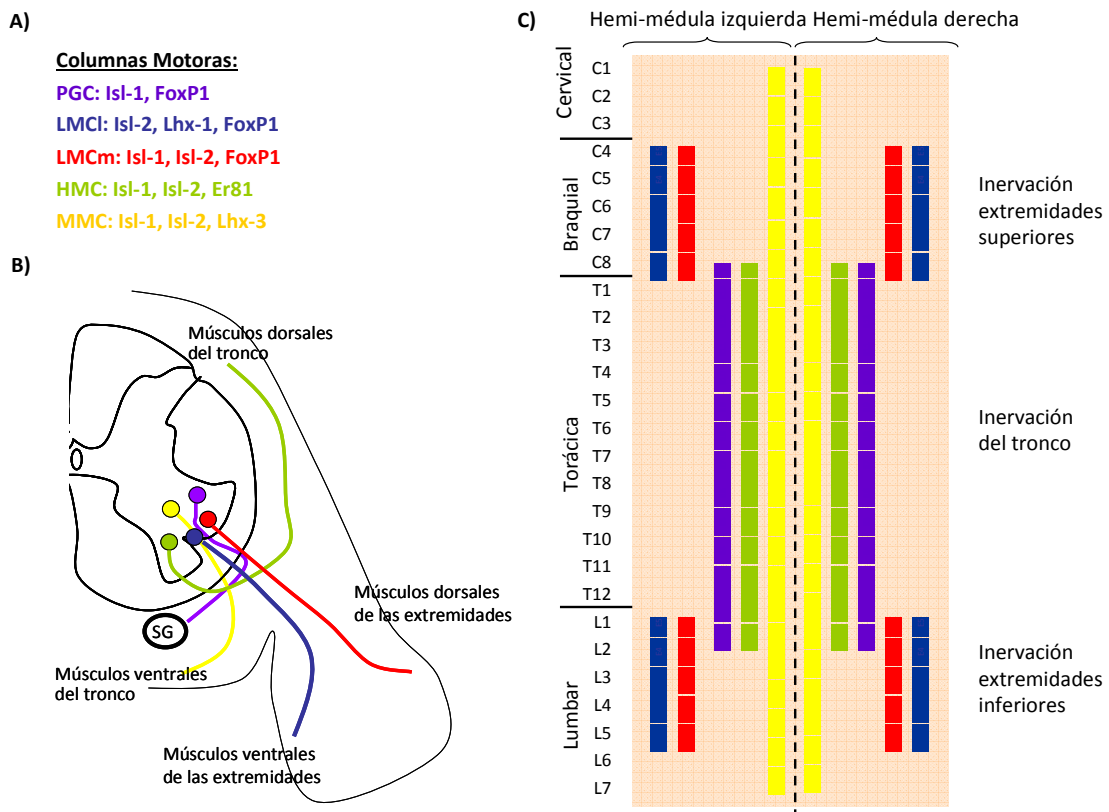


Figura 4. Esquema de los diferentes tipos de MNs, su localización y la diana de inervación.

A) Marcadores moleculares característicos de las MNs de las distintas columnas motoras. B) Detalle de una sección transversal de la médula espinal donde se muestran las proyecciones axonales de las MNs de las distintas columnas motoras. B) Esquema de un corte transversal de la médula espinal donde se representa la organización de las MNs en columnas motoras a lo largo del eje rostro-caudal. SG: ganglio sensorial. (Tsuchida et al. 1994, Kanning et al. 2010).

2. MUERTE CELULAR PROGRAMADA EN EL SISTEMA NERVIOSO

En 1964, Lockshin y colaboradores introdujeron el término **muerte celular programada** (PCD, del inglés *Programmed Cell Death*), para describir el patrón aparentemente predeterminado a través del cual las células morían durante el desarrollo de los insectos (revisado en (Bredesen, Rao and Mehlen 2006)). Este proceso se ha conservado a lo largo de la evolución en las diferentes especies, ocurre desde a nemátodos hasta vertebrados superiores y es un proceso crítico para el establecimiento del patrón neuronal definitivo en la mayoría de especies (Oppenheim 1991, Yeo and Gautier 2004). Actualmente el término PCD se refiere a la muerte celular que se produce en células de lugares anatómicos determinados en períodos de tiempo concretos, durante el desarrollo de un organismo (Yamamoto and Henderson 1999).

La PCD desempeña una función crítica durante el desarrollo del sistema nervioso, y tanto los moduladores pro- y anti-PCD participan en el establecimiento de la arquitectura neuronal de los individuos. Hace ya cien años que se describió la muerte neuronal durante el desarrollo, y más de 50 que Levi-Montalcini mostró que esta muerte fisiológica se inhibía con factores solubles como el *Nerve Growth Factor* (NGF).

Afecta a la mayoría de poblaciones del sistema nervioso (SN): neuronas, interneuronas y células gliales (Kerr, Wyllie and Currie 1972). Estas células se generan en exceso durante el desarrollo embrionario y un porcentaje de ellas morirán de forma **apoptótica** para establecer la población y red neuronal final del individuo (Buss, Sun and Oppenheim 2006). El porcentaje de mortalidad varía entre las diferentes regiones del sistema nervioso (Siman et al. 1999, White and Barone 2001).

El término apoptosis fue descrito en 1972 por J. Kerr y colaboradores para describir un conjunto de muertes celulares, de morfología relativamente uniforme, observados en distintas situaciones (desde períodos de PCD durante el desarrollo, respuesta a ofensas o recambio celular).

Durante mucho tiempo se pensó que las neuronas que iniciaban este proceso morían pasivamente, pero la identificación de genes implicados, en *C.elegans* (Ellis and Horvitz 1986) y sus homólogos en mamíferos (revisado en (Meier, Finch and Evan 2000)), demostraron que este proceso de muerte requiere una participación activa de la célula. Johnson y colaboradores (Martin et al. 1988), aportaron la primera evidencia de que era necesaria la activación de vías intracelulares en las propias neuronas para inducir su fallecimiento durante este período; demostró que la inhibición de la síntesis de RNA y de proteínas bloquea la PCD *in vitro*. Este descubrimiento abrió la posibilidad de examinar el mecanismo de la muerte neuronal a nivel molecular. Posteriormente se

identificaron los principales mecanismos moleculares desencadenantes de la apoptosis, entre ellos la familia de las caspasas, de Bcl-2 y Apaf-1 (*Apoptotic Protease Activating Factor-1*). Se observó que su activación iniciaba un programa de suicidio celular en las neuronas de vertebrados, conocido como **apoptosis** (Revisado en (Yuan and Yankner 2000)). Durante mucho tiempo se ha usado erróneamente el término apoptosis como sinónimo de PCD; si bien es cierto que durante el período de PCD la mayoría de células mueren de forma apoptótica, existen otras formas de muerte programada no apoptóticas (Bredesen et al. 2006).

Por otro lado, la observación de células que activan mecanismos moleculares de PCD en etapas posteriores al desarrollo en condiciones patológicas -por ejemplo en enfermedades neurodegenerativas como la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) y en situaciones de isquemia o de axotomía (Clarke 1990, Schweichel and Merker 1973, Sperandio, de Belle and Bredesen 2000, Clarke et al. 1998)-, sugieren que el estudio de las vías moleculares responsables de la PCD durante el desarrollo embrionario y la identificación de moduladores pro- y anti-PCD es de gran importancia para elucidar posibles dianas terapéuticas frente a enfermedades neurodegenerativas (revisado en (Bredesen et al. 2006)).

2.1 IMPORTANCIA DE LA PCD PARA ESTABLECER LAS POBLACIONES NEURONALES DEFINITIVAS

Existe controversia respecto a la función final de la PCD en las neuronas postmitóticas. Una hipótesis atractiva para explicar este fenómeno sería la corrección de los errores durante la migración y el establecimiento de las conexiones entre neuronas y su tejido de inervación (durante la PCD se eliminarían aquellas neuronas que migran a una posición ectópica, con axones que siguen un camino equivocado y van a inervar dianas inapropiadas). Sin embargo, diversas evidencias ponen de manifiesto que existen otros fenómenos regresivos conservados evolutivamente que realizarían esta función correctora sin pertenecer a la PCD; por ejemplo, la eliminación de las sinapsis. Así, aunque la PCD puede corregir errores, no parece que ésta sea la razón principal para justificar la pérdida normal y masiva de neuronas en el proceso de diferenciación. La idea más aceptada es que las neuronas se producen en exceso durante el desarrollo embrionario y la competitividad de las mismas para establecer los contactos con sus dianas celulares regularían la población final asegurando una inervación correcta y adecuada de estas dianas (Oppenheim 1989). Históricamente, el contexto donde se describió la PCD de las neuronas postmitóticas se hablaba de interacciones entre las neuronas y sus tejidos diana de inervación durante el desarrollo. Esta línea de investigación llevó al descubrimiento del primer factor neurotrófico: *Nerve*

Growth Factor (NGF) (LEVI-MONTALCINI 1964), y al establecimiento de la **teoría neurotrófica** (Purves, Snider and Voyvodic 1988).

2.2 PERÍODOS DE PCD DEL SISTEMA NERVIOSO DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO

Durante el desarrollo del SN se identifican dos etapas de PCD:

- ✓ La primera se observa en etapas tempranas del desarrollo y afecta a precursores neuronales inmaduros de zonas de proliferación y en neuroblastos postmitóticos (Yeo and Gautier 2004).
- ✓ La segunda oleada de muerte afecta a neuronas postmitóticas (Blaschke et al., 1996; Blaschke et al., 1998). Algunos autores denominan a esta última etapa como muerte celular neurotrófica, puesto que coincide con la adquisición de la dependencia neuronal a los factores tróficos del tejido diana y con el momento en que la musculatura es inervada funcionalmente (Yeo and Gautier 2004). (A partir de este momento al referirnos a PCD, estaremos hablando de este segundo período).

2.3 IMPLICACIÓN DEL TEJIDO DIANA EN LA PCD, LA TEORÍA NEUROTRÓFICA

Los estudios iniciales de Víktor Hamburger constataron que el número de neuronas que morían durante el desarrollo varía dependiendo del tamaño del tejido diana (HAMBURGER and LEVI-MONTALCINI 1949). Unos años más tarde observó que las propias dianas de inervación determinan el tamaño de las poblaciones neuronales. El experimento que demostró esta afirmación fue que la amputación del esbozo de la extremidad inferior en el embrión de pollo causaba una reducción del número de neuronas motoras de la médula espinal destinadas a inervar esta extremidad (HAMBURGER 1958), ver Figura 5. La interpretación de estos resultados condujo a postular que, en este caso las neuronas de la médula espinal, competirían por **moléculas o señales extracelulares** derivadas del tejido de inervación que se producirían en cantidades limitantes. Respaldando esta teoría y consolidando la teoría neurotrófica se demostró que muchas de las neuronas motoras espinales que normalmente morirían durante el período de PCD, pueden ser rescatadas con el aumento del tejido diana añadiendo una extremidad adicional (Hollyday and Hamburger 1976), (Figura 5). Dicho de otra forma, el tamaño de las poblaciones neuronales en el adulto se determina en parte por las interacciones entre las neuronas y sus dianas de inervación (revisado en (Purves et al. 1988)).

Los resultados de estos experimentos juntamente con el descubrimiento realizado por Rita Levi-Montalcini de que existían moléculas solubles sintetizadas por el tejido diana que inhibían la PCD (LEVI-MONTALCINI 1964), generaron la **teoría neurotrófica**: la

competencia y accesibilidad de las neuronas a los **factores neurotróficos** (NTFs), señales tróficas producidas en cantidades limitantes por las células del tejido diana, determina su supervivencia. Recientemente, esta teoría se ha ampliado incluyendo la competición por las señales tróficas aportadas por los “*inputs*” aferentes y por otras células presentes en el entorno de las neuronas, entre ellos la glía.

Múltiples experimentos han demostrado que la PCD inducida por falta de tejido diana se puede reducir *in vivo* e *in vitro* administrando NTFs que podrían sustituir aquellos producidos de forma natural por los tejidos de inervación (Comella et al. 1994, Oppenheim et al. 1991). Por ello en nuestro trabajo para mantener las MNs embrionarias en cultivo suplementamos el medio con una mezcla de NTFs, (ver apartado 1.1 en materiales y métodos).

La importancia de este proceso y de los mecanismos que lo rigen durante el desarrollo embrionario es enorme, puesto que la desregulación de los genes apoptóticos puede ocasionar diversas patologías relacionadas con enfermedades neurodegenerativas.

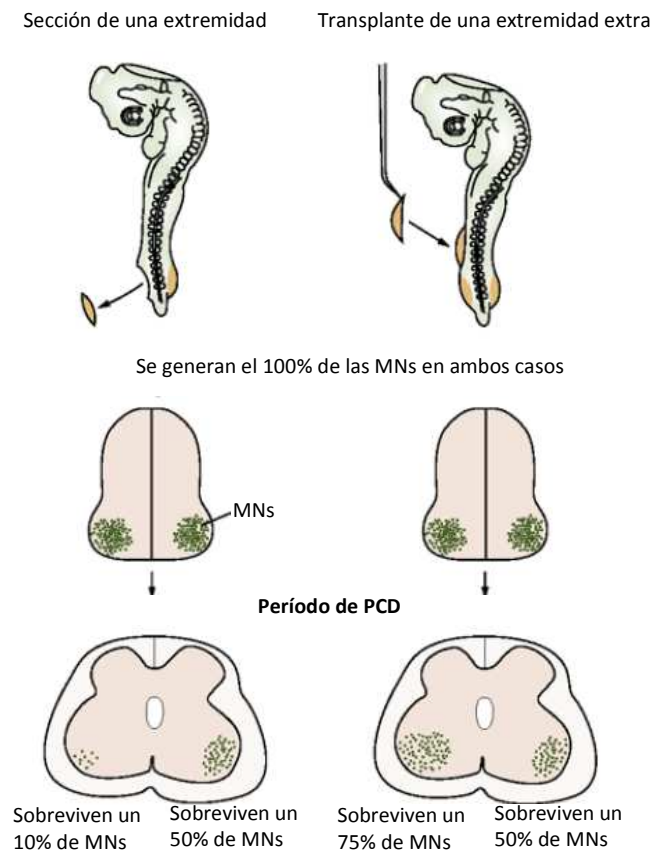


Figura 5. Dependencia del tejido diana para la supervivencia de las MNs.

Durante el período de PCD mueren aproximadamente el 50% de las MNs generadas originariamente, pero si se elimina el esbozo de una extremidad resulta en una disminución aún mayor del número de MNs. Por otro lado si se aumenta el tejido de inervación (la fuente de NTFs) el número de MNs que sobreviven es de un 75% de las MNs generadas inicialmente, un 25% de las MNs que morirían por mecanismos de PCD consiguen sobrevivir. Adaptación de (Purves et al. 1988).

2.4 PCD DE LAS MOTONEURONAS ESPINALES DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO

Los procesos de PCD de las MNs espinales suceden a diferentes períodos en cada especie y región de la médula espinal. En nuestro trabajo cultivamos MNs de embriones de pollo y de embriones de ratón y aislamos las MNs diferenciadas antes de que se inicie el segundo período de PCD.

En el embrión de pollo la PCD en las MNs espinales ocurre entre los días embrionarios 4.5 y 9 (E4.5 y E9) (Hamburger 1975), y en ratón entre E13 y E18 (Yamamoto and Henderson 1999, Sun et al. 2005). En ambas especies la PCD en la médula espinal se inicia en la región cervical y finaliza en la región sacra; no obstante, no sigue completamente una secuencia rostro-caudal. En el ratón, después de la aparición de los núcleos apoptóticos en la región cervical se detectan neuronas apoptóticas en las regiones torácica, braquial, lumbar, y sacra; y en el embrión de pollo, después de la región cervical la PCD se observa apoptosis en la región lumbar, seguidamente en la torácica, braquial y finalmente en la sacra (Yamamoto and Henderson 1999), (Figura 6). La mayoría de MNs inician la PCD coincidiendo con la adquisición de la dependencia neurotrófica y en el momento en que la musculatura queda funcionalmente inervada, durante la sinaptogénesis.

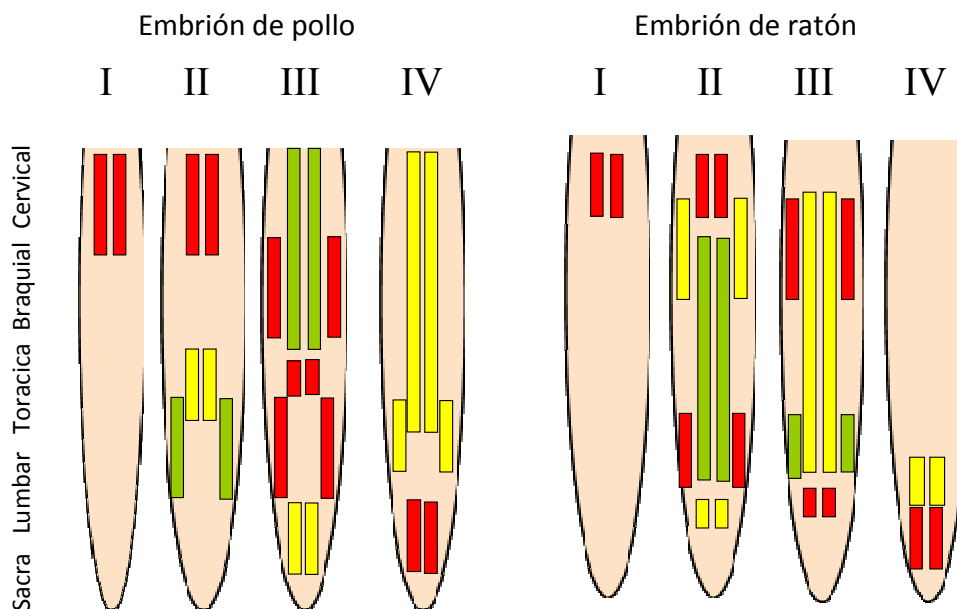


Figura 6. PCD en las MNs espinales.

Representación esquemática del patrón y período de PCD determinado por el método de TUNEL (identificación de núcleos apoptóticos) de embriones de pollo y ratón. Cada médula está usada para representar el patrón de muerte celular de un estadio embrionario (I, II, III y IV representan etapas embrionarias sucesivas de un día de diferencia). Los colores indican la intensidad de apoptosis: rojo indica alta densidad de núcleos apoptóticos, verde indica intermedia y amarillo baja. Esquema modificado de (Yamamoto and Henderson 1999, Sun et al. 2005).

2.5 TIPOS DE MUERTE NEURONAL PROGRAMADA EN EL SISTEMA NERVIOSO

Durante mucho tiempo la muerte apoptótica se ha considerado sinónimo de PCD, pero existen formas de muerte no apoptóticas que requieren una participación activa de la célula que también podrían clasificarse como PCD porqué implican síntesis *de novo* de RNA y proteínas. Por ello se ha ampliado la clasificación de los tipos de PCD (Bredesen et al. 2006).

Los estudios clásicos de desarrollo respaldan la idea de que existen al menos tres formas distintas de PCD: **Tipo1**, conocida también como nuclear o apoptótica; **tipo2** o autofagia; y **tipo3** o paraptosis, denominada también citoplasmática o no lisosomal (Clarke 1990). *(Las formas de PCD tipo1 y 2 están ampliamente aceptadas por la comunidad científica, pero todavía existe controversia sobre el tipo3. Algunos autores siguen agrupando estos tipos de muerte como tipos de muerte necrótica aunque requieran la activación de vías intracelulares, transcripción génica y traducción proteica para desencadenarse).* Además se han descrito formas de muerte celular que no concuerdan con los criterios de ninguno de los tres grupos mencionados (detallados en la Tabla 1), que requieren un análisis más profundo para determinar si también podrían incluirse en la clasificación de tipos de PCD.

Tabla 1. Clasificación de los tipos de muerte neuronal programada.

	Características	Morfología	Mecanismos desencadenantes	Mediadores	Inhibidores	Ejemplos
Formas de PCD aceptadas	Apoptosis	Condensación de la cromatina, fragmentación nuclear, cuerpos apoptóticos	Receptores de muerte, privación trófica, daño al DNA, infecciones virales	Caspasas, BH1-3, proteínas BH3	Inhibidores de caspasas y de proteínas BH1-4	PCD tipo-1
	Autofagia	Vacuolas de autofagia	Deprivación de suero y aminoácidos, agregados proteicos	JNK1?, MKK7?, ortólogos de ATG	Inhibidores de JNK?	PCD tipo-2
	Paraptosis	hinchazón del retículo endoplásmico y mitocondrias	Trofotoxicidad	ERK2, NUR77	MEK, DN NUR77	PCD tipo-3
Formas de PCD atípicas	Mediada por calcio	espirales membranosas	Entrada excesiva de calcio	Calpaínas, Catepsinas	Calreticulina, inhibidores de calpina	Mutante <i>Celegans deg</i>
	AIF/PARP	Condensación suave de la cromatina	Daño al DNA, exceso de Glutamato o de oxido nítrico	PARP, AIF	Inhibidores de PARP	PCD causada por excitotoxicidad
	Oncosis	Hinchamiento celular	Isquemia, excitotoxicidad	JNK	Inhibidores de JNK	PCD isquémica

Actualmente solamente se aceptan como PCD los tipos de muerte apoptótica y autofágica, pero diversos estudios han propuesto como candidatos adicionales que pueden representar nuevas formas de PCD las formas atípicas descritas en la tabla. Modificada de (Bredesen et al. 2006).

2.5.1 Clasificación de los diferentes tipos de PCD en el sistema nervioso

2.5.1.1 PCD Tipo1, APOPTOSIS

Es el tipo de PCD mejor caracterizado, se considera un proceso de muerte activo que comprende la activación de vías intracelulares, la síntesis de RNA y de proteínas (Martin et al. 1988). Morfológicamente se caracteriza por la condensación de cromatina y citoplasma, que provocan una fragmentación nuclear y citoplasmática, formando los cuerpos apoptóticos.

Estos cuerpos son fragmentos de citoplasma y núcleo rodeados de membrana plasmática, que son fagocitados y digeridos rápidamente por macrófagos o células fagocíticas cercanas (por ejemplo la glía). Estos cambios histoquímicos y morfológicos aparecen como resultado de la activación de cisteína proteasas, las caspasas. La maquinaria celular que dirige la apoptosis está altamente conservada evolutivamente entre especies (Jozsa, Kroemer and Penninger 2002), (Figura 7).

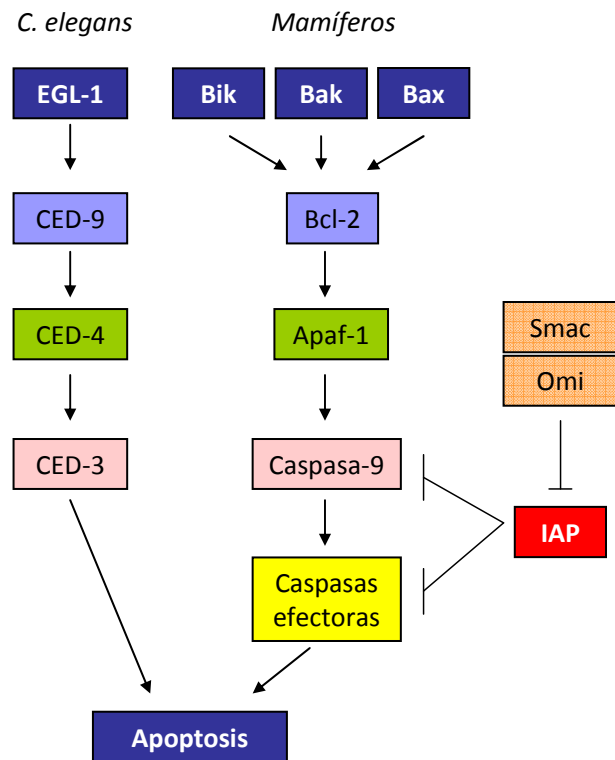


Figura 7. Conservación evolutiva de las vías apoptóticas. Principales proteínas de mamíferos que participan en la activación y ejecución de la apoptosis, y proteínas homólogas en *C. elegans*.

La activación bioquímica de la apoptosis clásica ocurre a través de dos vías distintas (Figura 8). Son la **vía extrínseca**, que se inicia a través de la activación de receptores de la superficie celular de la familia del TNF (Tumor Necrosis Factor), como Fas y el receptor de TNF α , y resultan en la activación de las caspasas iniciadoras 8 o 10 (Choi and Benveniste 2004), y la **vía intrínseca**, que se inicia por varios estímulos, como son deprivación trófica o estrés oxidativo entre otros, provocan la liberación de citocromo c y de Smac/Diablo de las mitocondrias y se asocia con la activación de la caspasa-9 (caspasa iniciadora). Algunos autores consideran una tercera vía menos caracterizada que se ha observado en enfermedades neurodegenerativas que conllevan agregación de proteínas y su acumulo en el retículo (enfermedad de Huntignton, Alzheimer y ALS). Esta tercera vía se inicia por **estrés de retículo endoplásmico**, que activa caspasa-12

por un lado y caspasa-9 por otro, como una segunda vía intrínseca de forma dependiente de proteínas de la familia Bcl-2 (Li, Lee and Lee 2006). Otras organelas, como el núcleo y el aparato de Golgi, también tienen sensores de daño que desencadenan la activación de las vías apoptóticas.

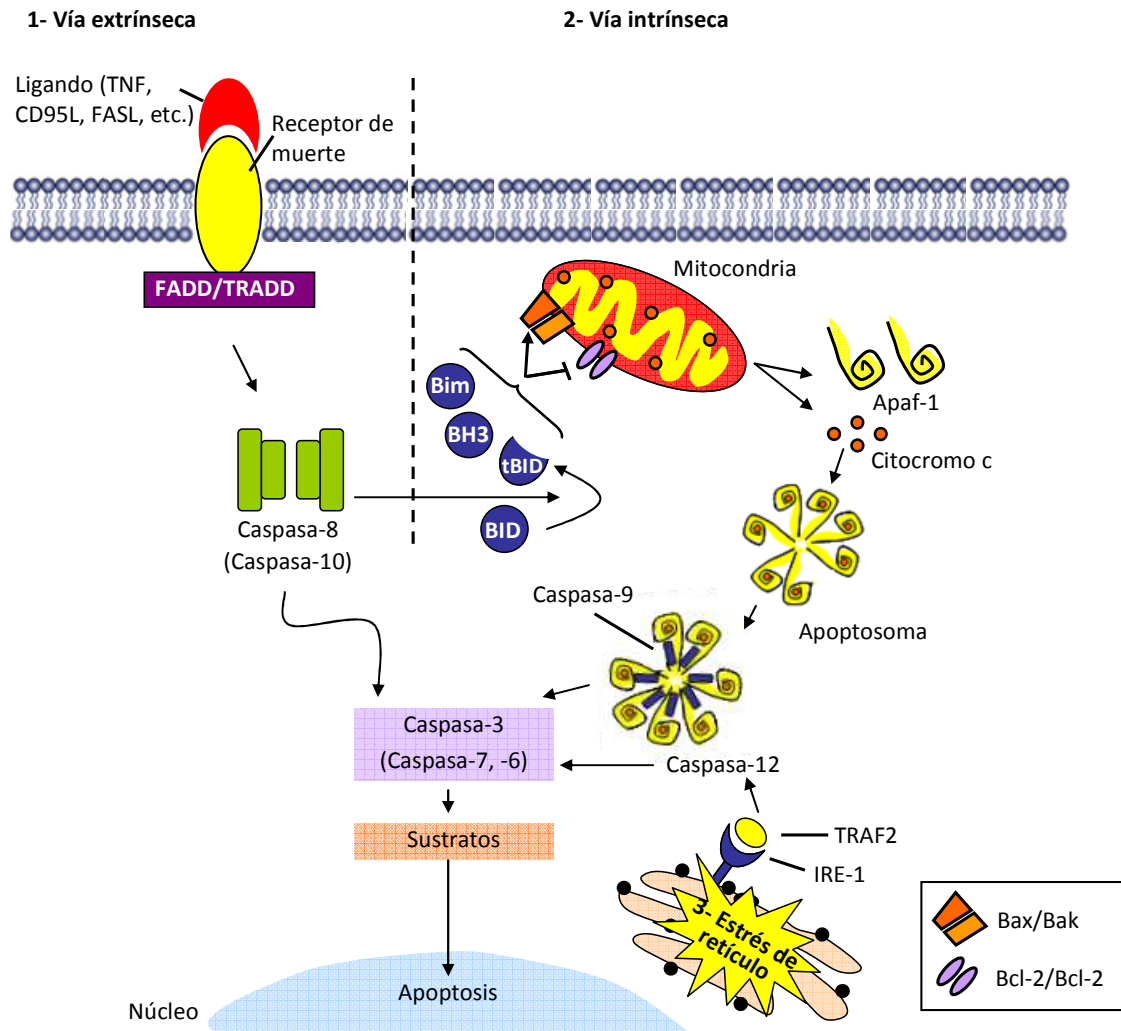


Figura 8. Mecanismos intracelulares implicados en la apoptosis.

La activación de estas vías converge en los últimos pasos en la activación de las caspasas efectoras (principalmente Caspasa-3). Se postula que los sustratos de las caspasas comprenden entre un 0.5 y un 5% de las proteínas celulares y contribuyen al fenotipo apoptótico de varias formas: por activación de cascadas proteolíticas, inactivación de vías de reparación, fragmentación de DNA, permeabilización mitocondrial e iniciación del proceso de fagocitosis para eliminar los restos de la célula (los cuerpos apoptóticos). La propensión que tienen las células a iniciar el proceso apoptótico depende fundamentalmente del balance de proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas de la familia de Bcl-2. Dicho de otra forma, los miembros de la familia

de Bcl-2 actúan como moduladores de la muerte celular apoptótica de las vías intrínseca, extrínseca y de estrés de retículo (Bredesen et al. 2006).

Bioquímicamente, la célula apoptótica se caracteriza por la exposición de residuos fosfatidilesterasa en la parte externa de la membrana celular, por la digestión del DNA, por la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, por un aumento de las proteínas pro-apoptóticas y por la activación de las caspasas. La morfología apoptótica típica se puede detectar a nivel nuclear (fragmentación de DNA y formación de los cuerpos apoptóticos) usando diversas técnicas, como la tinción de DNA (Hoechst) y la técnica de detección TUNEL (*Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Mediated dUTP Nick-End Labeling*); o a nivel citoplásmico mediante técnicas de microscopia electrónica o con fluorescencia se pueden observar las protuberancias características de la membrana plasmática (**blebbing**). Por otro lado, puesto que las Caspasas se activan por proteólisis y forman complejos oligoméricos hidrolizando otras proteínas celulares, la detección de estas proteínas activas con anticuerpos (anti-cleaved caspase-3, etc.) y de los fragmentos de sus sustratos proteicos específicos resultado de la proteólisis mediada por caspasas también son buenos indicadores de apoptosis (por ejemplo, Caspasa-3 activa lisa la proteína de citoesqueleto α -Fodrina de 220KDa y como resultado se observan fragmentos de 120 y 150 KDa).

2.5.1.2 PCD Tipo2, AUTOFAGIA

La muerte por autofagia se caracteriza por la aparición de vacuolas de autofagia al citoplasma celular, actividad lisosomal incrementada, picnosis nuclear y repliegues en la membrana (Levine and Klionsky 2004). Este tipo de muerte puede presentarse tanto durante el desarrollo neuronal como en enfermedades neurodegenerativas (Petersén A et al. 2001, Oppenheim et al. 2008).

La autofagia es un proceso activo en condiciones fisiológicas en todas las células, ejerciendo un papel importante para el recambio de orgánulos y la homeostasis celular (Levine and Klionsky 2004, Mizushima 2005). Su activación en casos de privación nutricional, puede tener efectos neuroprotectivos; las células realizan una fagocitosis intracelular de mitocondrias dañadas o agregados proteicos, estos autofagosomas se fusionan con lisosomas y, de esta forma, la célula recupera aminoácidos (aa) y energía para sintetizar nuevas proteínas.

No obstante, se observó que estímulos apoptóticos sobre células en las cuáles se ha inhibido la maquinaria apoptótica, en muchos casos siguen causando muerte, una muerte caracterizada por activación masiva o sostenida de la autofagia. Por ejemplo, los ratones *knockout* para Apaf-1 (considerada una proteína esencial para la activación de las vías apoptóticas), también presentan muerte neuronal durante el período de

PCD, pero no apoptótica, siguen la muerte tipo2 o autofagia (Oppenheim et al. 2008); Estas observaciones condujeron a pensar en la autofagia como un proceso inductor de muerte diferente a la apoptosis y sugirieron el uso de inhibidores de autofagia para bloquear estos tipos de muerte (Bredesen et al. 2006). Ejemplos de algunos estudios en fibroblastos *knockout* para Bax y Bak (proteínas pro-apoptóticas) demuestran que cuándo estos se tratan con inductores de la apoptosis mueren por autofagia y, la muerte de estas células se bloquea usando inhibidores de autofagia (Shimizu et al. 2004). Este hecho, alerta de la posibilidad que las terapias anti-apoptóticas pueden no ser suficientes para prevenir la muerte apoptótica característica de algunas enfermedades neurodegenerativas, y que se podrían requerir tratamientos dirigidos a múltiples tipos de muerte celular para conseguir una eficacia óptima. Así pues, la autofagia es un proceso catabólico que resulta de la degradación lisosomal de los autofagosomas que envuelven contenido citoplásmico, que generalmente se hiperactiva en condiciones de privación de nutrientes, pero también en procesos fisiológicos como el desarrollo o la diferenciación, y en procesos patológicos como enfermedades neurodegenerativas, infecciones y cáncer.

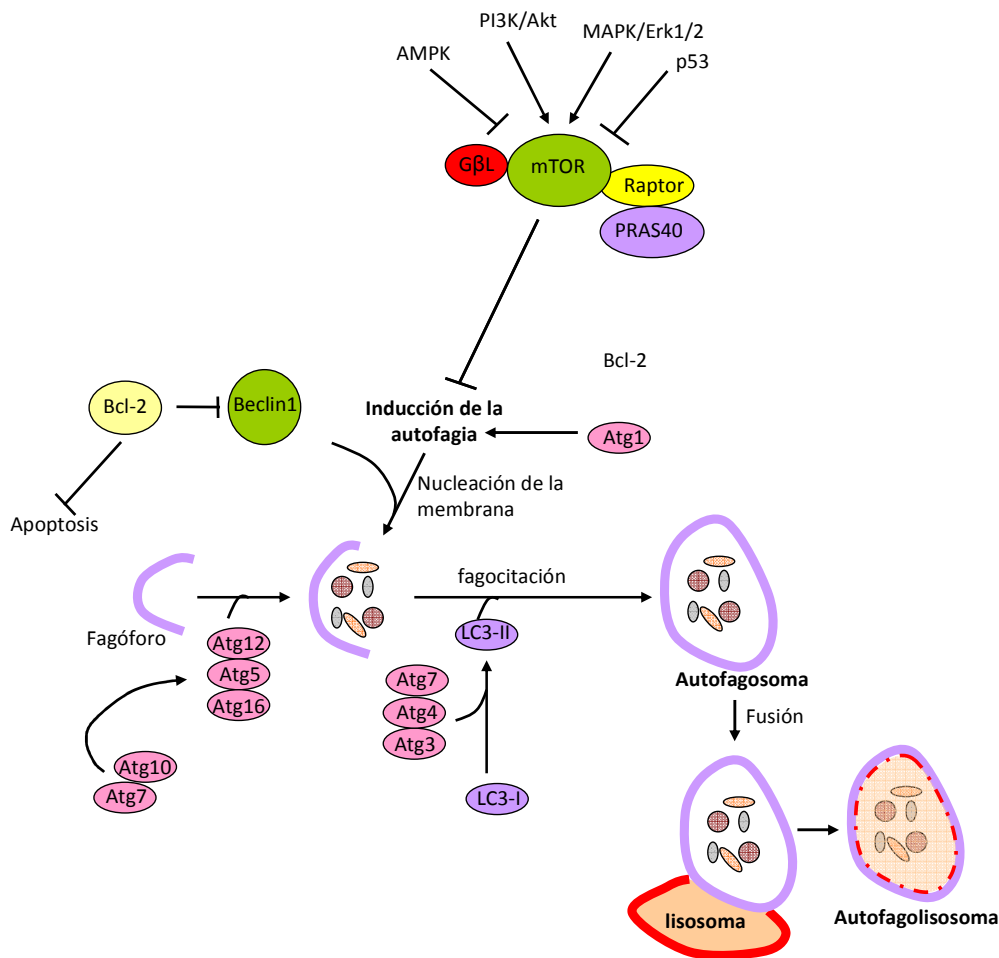


Figura 9. Mecanismos moleculares de autofagia.

Este proceso de muerte se inicia por la inactivación de mTOR (*Mammalian Target of Rapamycin*); la activación de mTOR suprime la autofagia (Akt y MAPK lo activan), y una regulación negativa de mTOR (a través de AMPK y p53) la promueve. Los componentes de la maquinaria molecular responsables de este mecanismo de muerte son los genes ATG (autophagy-related genes), que se activan una vez bloqueado mTOR. Estos genes controlan numerosos aspectos del proceso de muerte, incluyendo su inducción por Beclin-1 (ATG6) y formación de vesículas autofagosómicas a través de ATG12-ATG5 y LC3 (ATG8), (Figura 9).

Durante una deficiencia nutricional la autofagia actúa como un mecanismo de pro-supervivencia; no obstante, un exceso de autofagia conlleva a la muerte celular siguiendo un proceso morfológico distinto al de la apoptosis. Varios señales pro-apoptóticas como TNF, TRAIL y FADD, también inducen autofagia y, por otro lado, la activación de la vía PI3K/Akt/mTOR por los factores neurotróficos bloquea el proceso (Lum et al. 2005). Además, Bcl-2 también regula negativamente esta muerte, al unirse a Beclin-1, hecho que inhibe la autofagia dependiente de Beclin-1 (Shimizu et al. 2004).

Otras proteínas esenciales para la ejecución de la vía autofágica son las proteínas lisosómicas transmembrana (LAMP-2 y CLN3), imprescindibles para la fusión de los lisosomas con los autofagosomas, y proteínas de digestión lisosomal (proteasas y catepsinas), (Levine and Kroemer 2008).

2.5.1.3 PCD Tipo3, CITOPLASMÁTICA

Es una forma de PCD parecida a la necrosis, presenta hinchamiento (*swelling*) de retículo endoplásmico y mitocondrias, y no presenta las características típicas de la apoptosis como la fragmentación nuclear o la formación de cuerpos apoptóticos.

Se ha descrito que la hiperactivación del receptor tirosina quinasa del factor de crecimiento de insulina-1 (IGFR-1) induce una muerte no apoptótica que no se puede bloquear ni con inhibidores de Bcl-2 ni con inhibidores de caspasas. No obstante, puesto que requiere transcripción y traducción se considera muerte programada, se ha denominado paraptosis. Se puede bloquear con inhibidores de la quinasa regulada por señales extracelulares ERK2 (pero no por ERK1) y por AIP-1 (PCD interacting protein). Este fenómeno, que la hiperactivación de un receptor de un factor de crecimiento induzca muerte celular, se denomina trofotoxicidad. Aunque parezca un efecto contradictorio puede explicarse por el hecho que podría representar un efecto protector frente a neoplasias. Durante procesos de excitotoxicidad incrementan algunos factores tróficos y la trofotoxicidad podría eliminar aquellas células que se dirigieran hacia la oncogénesis. Puesto que los factores tróficos inactivan la señalización apoptótica, el proceso desencadena hacia un tipo de PCD no apoptótica.

Otro ejemplo de PCD tipo3 se observa en las neuronas de ratones Knockout para caspasa-3 y para caspasa-9, también mueren durante los períodos de PCD embrionarios, pero presentan una morfología de muerte no apoptótica, presentan dilatación de retículo endoplásmico y mitocondrial (Oppenheim et al. 2001a).

2.5.1.4 Formas atípicas de PCD

Durante los últimos 12 años se han descrito formas de muerte celular que no concuerdan con los criterios de ninguno de los tres grupos descritos.

✓ Un primer ejemplo es el tipo de muerte neuronal descrito por Driscoll y colaboradores (Syntichaki et al. 2002) en *C. elegans*, **mediada por calcio**. No se observa morfología apoptótica, no hay activación de caspasas y no concuerda con los tipos de muerte descritos 2 y 3. Observan una muerte uniforme parecida a necrosis (caracterizada por prolongaciones membranosas en forma de espiral, *membrane whorls*), que es causada por entrada de calcio, mediada por calpaínas y catepsinas e inhibida por calreticulina (Syntichaki et al. 2002).

✓ Otra forma aparente de PCD fue descrita por Dawsons y colaboradores. Demuestran que la activación de la proteína poli-(ADP-ribosa) polimerasa (**PARP**), conlleva la translocación de la proteína *apoptosis-inducing factor* (**AIF**) de la mitocondria al citoplasma y núcleo causando una muerte no apoptótica (Yu et al. 2002). Esta forma de PCD se activa por agentes que inducen daño al DNA incluso en presencia de inhibidores de caspasas, indicando su implicación en una muerte neuronal caspasa-independiente (Yuan, Lipinski and Degterev 2003). Muestra una morfología y bioquímica distintas de los tipos 1, 2 y 3.

✓ Otro posible tipo de PCD considerando un criterio morfológico sería la **onicosis** (todavía no se han descrito los desencadenantes bioquímicos). Se refiere a la muerte observada típicamente resultado de isquemia que se caracteriza por una morfología de hinchamiento celular. Se piensa que la causa es un fallo de las bombas iónicas de la membrana plasmática y que la familia de proteasas de las calpaínas son mediadores potenciales de este tipo de muerte (posiblemente una calpaína mitocondrial), (Liu, Van Vleet and Schnellmann 2004).

2.5.2 Las vías de PCD como posibles dianas terapéuticas en enfermedades neurodegenerativas

La desregulación de los programas de muerte celular desencadena desordenes del desarrollo y neoplásicos del sistema nervioso. Existen evidencias que sugieren que en

desordenes neurodegenerativos, infecciosos, traumáticos, isquémicos, metabólicos y de desmielinización, también existe desregulación de formas de PCD.

Los estudios temporales en modelos neurodegenerativos sugieren que la PCD es un evento que aparece relativamente tarde en el proceso degenerativo, y que la muerte es causa de alteraciones funcionales precedentes, por ejemplo, déficit electrofisiológico, activación de vías de estrés celular o déficit micro-anatómico, como retracción neurítica y pérdida de la sinapsis. Sin embargo, diferentes experimentos han obtenido resultados positivos en modelos neurodegenerativos inhibiendo mecanismos de PCD; ejemplos de ello son la sobre-expresión de Bcl-xL (proteína antiapoptótica) en modelos de SMA que protege a las MNs de la degeneración y muerte (Tsai et al. 2008), y que la inhibición de Bax (proteína pro-apoptótica) rescata un porcentaje de MNs en respuesta a axotomía (Sun and Oppenheim 2003). Estos estudios indican que las vías moleculares inductoras de PCD pueden tener un papel importante en el proceso neurodegenerativo.

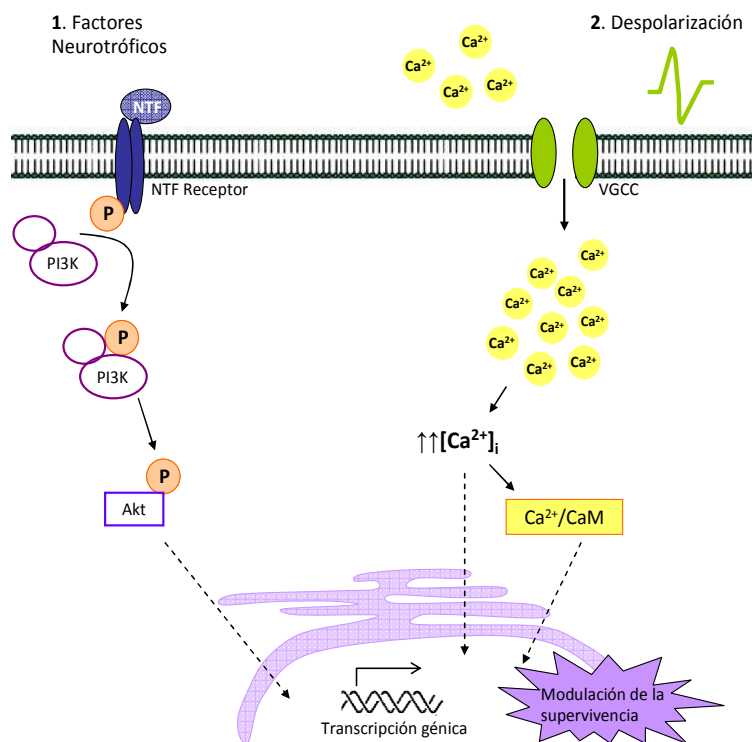
Así pues, la asociación de eventos patológicos con la inducción de la activación de la PCD en enfermedades neurodegenerativas, como por ejemplo: proteínas mal plegadas, producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, privación de factores tróficos y activación de receptores de muerte, ofrece potenciales herramientas terapéuticas para estas enfermedades.

3. MECANISMOS DE SUPERVIVENCIA NEURONAL

Actualmente se asume que la regulación de la supervivencia y muerte neuronal es un fenómeno complejo y multifactorial en el cual intervienen multitud de variables. La comunicación de las células nerviosas con su entorno rige procesos fisiológicos que abarcan desde la diferenciación, supervivencia y plasticidad neuronal. Las neuronas reciben señales bioquímicas extracelulares de otras neuronas y células del entorno como señales eléctricas, neurotransmisores, NTFs o hormonas que deben integrar, procesar y responder para adaptarse a las diferentes situaciones fisiológicas. Estas moléculas de señalización extracelular activan receptores específicos y estimulan la activación de cascadas de señalización intracelulares en las que intervienen proteínas de unión a GTP, canales iónicos, proteínas quinasas y movilizaciones iónicas (Ca^{2+} , P^-) y muchas otras proteínas efectoras que dirigen cambios temporales del estado fisiológico de la célula, (Figura 10). Estas vías de transducción de señal intracelular también pueden causar cambios de larga duración alterando los patrones de transcripción génica y la consecuente alteración de la composición proteica de la célula. Durante el período de PCD y a lo largo de la vida de los individuos las aferencias del tejido periférico y neuronal (NTFs) y la actividad neuronal (Ca^{2+}) desempeñan un papel importante en el mantenimiento y regulación de la supervivencia neuronal.

Figura 10. Mecanismos de integración neuronal de señales extra-celulares.

La figura muestra ejemplos de la transducción de señal neuronal inducida por NTFs o despolarización de la membrana. Los NTFs se unen a sus receptores y activan cascadas de señalización a través de cadenas de fosforilación de proteínas de diversas vías intracelulares, en la figura como ejemplo se muestra la activación de la vía PI3K/Akt descrita más adelante. Por otro lado, la despolarización de la membrana conlleva una entrada de Ca^{2+} del medio extracelular a través de los canales de Ca^{2+} Voltaje dependientes (VGCC), este Ca^{2+} se une a proteínas citosólicas y modifica su función activando vías de señalización que también modulan la supervivencia celular.



3.1 LOS FACTORES NEUROTRÓFICOS

Los trabajos de Víktor Hamburger, Rita Levi-Montalcini y el bioquímico Stanley Cohen establecieron las bases del modelo de la teoría neurotrófica. Sus estudios les llevaron al descubrimiento en los años 50 de una proteína que ellos denominaron NGF, el primer factor neurotrófico aislado. La importancia de esta molécula en la historia de la neurobiología constituye uno de los mayores hitos del siglo XX en este campo de la ciencia. La demostración que NGF se producía por el tejido diana de las neuronas sensoriales, que se transportaba de forma retrograda desde el terminal axonal hacia el soma y que era un factor necesario y suficiente para la supervivencia de estas neuronas tanto *in vivo* como *in vitro*, llevó a pensar que debía haber moléculas similares capaces de rescatar otras poblaciones neuronales (Korsching 1993). En los últimos 25 años se han descubierto varias moléculas que actúan como NTFs, son moléculas de señalización que se unen a sus receptores específicos presentes en la membrana de las neuronas e inducen la activación de vías de señalización celular que, a su vez, activarán genes implicados en los procesos de supervivencia y diferenciación neuronal o que impedirán la activación de las vías de PCD. Por ello la identificación de las dependencias tróficas de las neuronas durante el desarrollo, la edad adulta y en los estados de degeneración neuronal, junto con el desarrollo de nuevas técnicas para su administración, permitirán avanzar en la utilización de estas proteínas en la terapéutica de las enfermedades neurodegenerativas.

La mayoría de los NTFs se han identificado por similitud molecular o a partir de la habilidad por parte de determinados tejidos o medios condicionados de células en cultivo para promover la supervivencia y diferenciación de las neuronas.

Existen distintas familias de factores neurotróficos agrupados por sus homologías estructurales. La primera de estas familias descrita es la de las **neurotrofinas**, siendo las proteínas que la forman estructuralmente homologas a NGF; su segundo representante, *Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) se describió en 1982 (Barde, Edgar and Thoenen 1982). Aunque los factores pertenezcan a una misma familia, su especificidad de acción puede ser totalmente distinta. Un miembro de las neurotrofinas puede promover la supervivencia de una población neuronal determinada que no se ve afectada por otro miembro de la misma familia. Por ejemplo, BDNF promueve la supervivencia de las MNs espinales, sin embargo, NGF no tiene ningún efecto conocido de supervivencia sobre estas mismas células. Por otro lado, una misma neurotrofina puede promover la supervivencia de varias poblaciones neuronales distintas.

En los últimos años, los estudios de recombinación homóloga y la generación de ratones deficientes para algunos de estos factores y sus receptores, han permitido aproximar fisiológicamente la implicación de los mismos en el desarrollo del SN. Estos estudios en ratones *knockout* de neurotrofinas o de sus receptores, evidencian que algunas poblaciones neuronales siguen la teoría neurotrófica mientras otras parecen seguir patrones discordantes. Por ejemplo, estudios en ratones *knockout* para NGF y para TrkA (su receptor) presentan una ausencia completa de neuronas sensoriales simpáticas y nociceptivas, como se predeciría por la hipótesis neurotrófica puesto que expresan el receptor, sin embargo no se observa pérdida de las neuronas colinérgicas del lóbulo frontal que en condiciones normales también expresan receptores TrkA. De forma parecida, mientras las neuronas sensoriales que expresan TrkB (receptor de BDNF) en el ganglio vestibular dependen de BDNF para su supervivencia durante el período de PCD, las neuronas hipocampales que también expresan el receptor no requieren ni BDNF ni TrkB para su supervivencia. Finalmente, mientras las neuronas sensoriales propioceptivas requieren el NTF *neurotrophin-3* (NT-3) y Trk-C (receptor para NT-3) para sobrevivir, las neuronas granulares del cerebelo sobreviven en su ausencia aunque también expresen el receptor en condiciones normales (Snider 1994).

Por otra parte se ha observado que las neuronas del CNS requieren diversas neurotrofinas para sobrevivir, un ejemplo claro lo aporta el hecho que la eliminación combinada de los receptores TrkB y TrkC, pero no de ellos individualmente, incrementa el número de neuronas que degeneran en el giro dentado y cerebelo durante la PCD. Estos estudios *in vivo* indican que **las** neurotrofinas pueden actuar de forma redundante durante la PCD del desarrollo del CNS, pero no del PNS.

3.1.1 NTFs que regulan la supervivencia y diferenciación de las MNs

Los NTFs que influyen en la supervivencia de las MNs los proporcionan distintas fuentes (Oppenheim 1996). Algunos de ellos son sintetizados por la diana sináptica de las MNs, otros son proporcionados por células gliales, etc., (Figura 11). Los NTFs se unen a sus receptores específicos, éstos se activan generando residuos tirosina fosforilados en su dominio intracelular. Los residuos fosforilados de los receptores constituyen lugares de unión para distintas proteínas intracelulares (proteínas adaptadoras), las cuales se fosforilan y a su vez, constituyen lugares de unión y activación de otras proteínas; y así sucesivamente. Un mismo receptor puede activar distintas vías de señalización, generando cada una de ellas una respuesta específica en la neurona.

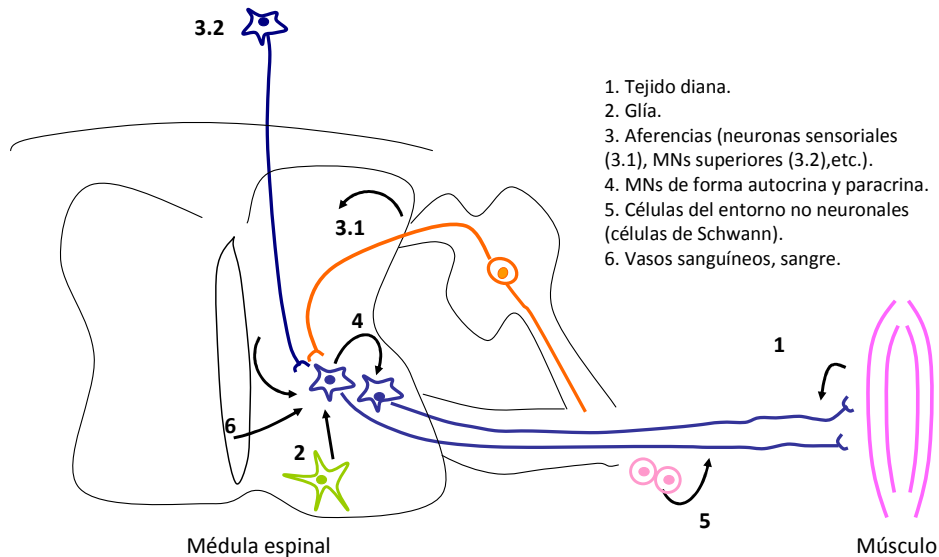


Figura 11. Fuentes de NTFs para las MNs espinales.

Adaptado de (Burek and Oppenheim 1996)

Más de 15 factores polipeptídicos expresados en el entorno de las MNs participan en el mantenimiento de la supervivencia de las neuronas motoras tanto *in vivo* como *in vitro* (Henderson 1996, Oppenheim 1991), (Figura 12). En esta lista se incluyen la familia de las neurotrofinas, donde todos los miembros promueven la supervivencia de las MNs, excepto NGF (Henderson et al. 1993, Barde et al. 1982, Hughes, Sendtner and Thoenen 1993, Dolcet et al. 1999); todos los factores de la familia de ligandos del GDNF (GFLs, del inglés GDNF Family Ligands), (Airaksinen and Saarma 2002, Pérez-García et al. 2004, Soler et al. 1999) y algunos de los factores neurotróficos de la familia de ligandos de la interleuquina-6 (IL-6, del inglés Interleukine), a la cual pertenecen las siguientes citoquinas: el factor neurotrófico ciliar (CNTF, del inglés Ciliary Neurotrophic Factor), Leucemia Inhibitory Factor (LIF), cardiotrofina 1 (CT-1) y Cardiotrophin-1-Like Cytokine (CLC) (Arakawa, Sendtner and Thoenen 1990, Forger et al. 2003, Pennica et al. 1996, Dolcet et al. 2001, Soler et al. 1999). Otros factores que promueven la supervivencia de las MNs son el factor de crecimiento de insulina (IGF-1, del inglés Insulin-Like Growth Factor 1); (IGF-2, del inglés Insulin-Like Growth Factor-2) (Arakawa et al. 1990, Neff et al. 1993); el factor de crecimiento hepático (HGF, del inglés Hepatocyte Growth Factor) (Maina and Klein 1999, Ebens et al. 1996, Wong et al. 1997) y el factor endotelial vascular del crecimiento (VEGF, del inglés Vascular Endothelial Growth Factor), (Van Den Bosch et al. 2004, Tolosa et al. 2008).

El número de factores neurotróficos que regulan la supervivencia de las MNs sigue aumentando con resultados recientes que demuestran actividad trófica de factores como son la Pleiotrophin (Mi, Chen and Höke 2007), la Neuropoietina (Derouet et al. 2004), la Mullerian inhibiting substance (MSH) (Wang et al. 2005), el Growth

Differentiation Factor-15 (GDF-15) (Strelau et al. 2009), la Progranulina (Van Damme et al. 2008) y la Angiogenina (Kieran et al. 2008). Los receptores para los NTFs se expresan en subconjuntos de MNs a lo largo de toda la médula espinal. Las distintas subpoblaciones de MNs expresan diferentes receptores y en diferentes proporciones. Así, cada subpoblación de MNs presenta una proporción característica de receptores para distintos NTFs (Garcès et al. 2000, Gould and Oppenheim 2004). Existen evidencias que en el período postnatal, las MNs continúan dependiendo de los tejidos y las células de su entorno como aporte trófico aunque muestren dependencias moleculares específicas diferentes que la del desarrollo (Holtmann et al. 2005).

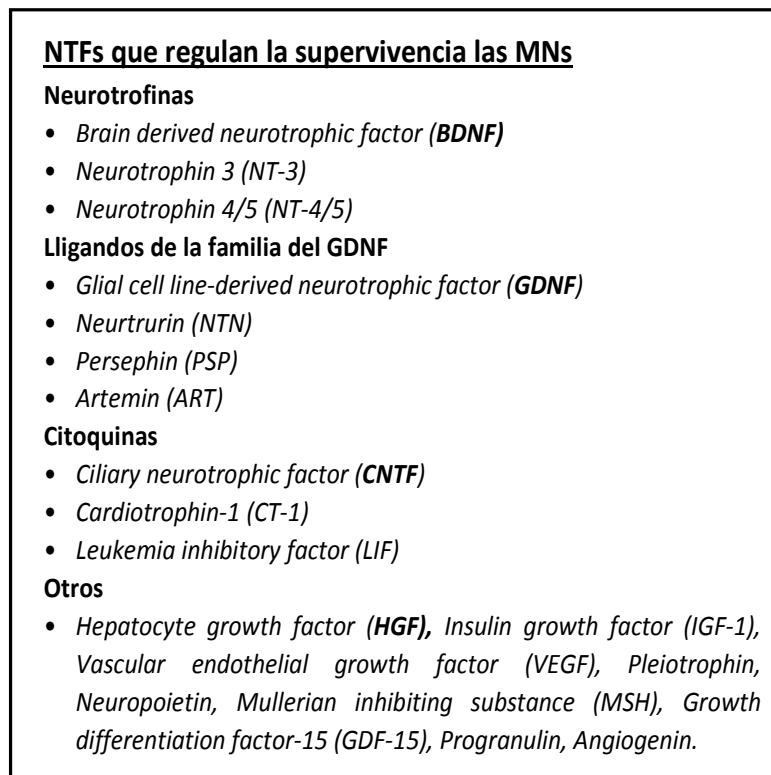


Figura 12. NTFs que regulan la supervivencia de las MNs.

Para mantener las MNs embrionarias de pollo y de ratón en cultivo en nuestro laboratorio usamos un cóctel de factores neurotróficos que comprende BDNF, GDNF, CNTF, CT-1 y HGF. Por ello, a continuación describimos las familias de estos factores y los receptores a través de los cuales activan la señalización intracelular en las MNs.

3.1.1.1 Familia de las neurotrofinas

Las neurotrofinas conforman una familia de NTFs con una estructura altamente conservada entre las diferentes especies. Son moléculas pequeñas, de 13 KDa que dimerizan para ser biológicamente activas. Esta familia incluye NGF, BDNF, NT-3, NT4/5, NT6 i NT7. Cada neurotrofina esta especializada en la supervivencia de una

población concreta de neuronas periféricas. En general, las neurotrofinas también están implicadas en la plasticidad sináptica y en la modulación de la neurotransmisión.

Las neurotrofinas se sintetizan en forma de precursores inmaduros o pro-neurotrofinas, las cuales por rotura proteolítica se convierten en proteínas maduras de unos 12 kDa. Las proteasas encargadas de producir este corte dando lugar a la neurotrofina activa son las furinas y las pro-convertasas (Chao 2003). En algunos modelos, se ha descrito que el pro-NGF puede ser biológicamente activo, mediando algunas vías intracelulares de señalización (Schor 2005). Los péptidos maduros de esta familia a pesar de ser muy diferentes en su secuencia primaria, poseen estructuras terciarias semejantes. Estas neurotrofinas maduras, se sintetizan como monómeros y son capaces de formar dímeros activos (Chao and Hempstead 1995).

Estos factores neurotróficos al dimerizar ejercen su función uniéndose a dos tipos de **receptores**: los **Trk** (Tropomyosin-related kinase), de los que existen tres isoformas **TrkA**, **TrkB** y **TrkC**, y **p75^{NTR}** (Figura 13). Éstos no comparten homología en su secuencia y además, activan diferentes vías de señalización. Frente a algunos estímulos Trk y p75^{NTR} pueden colaborar mediando los efectos de las neurotrofinas (Roux, PP y Barker, PA2002).

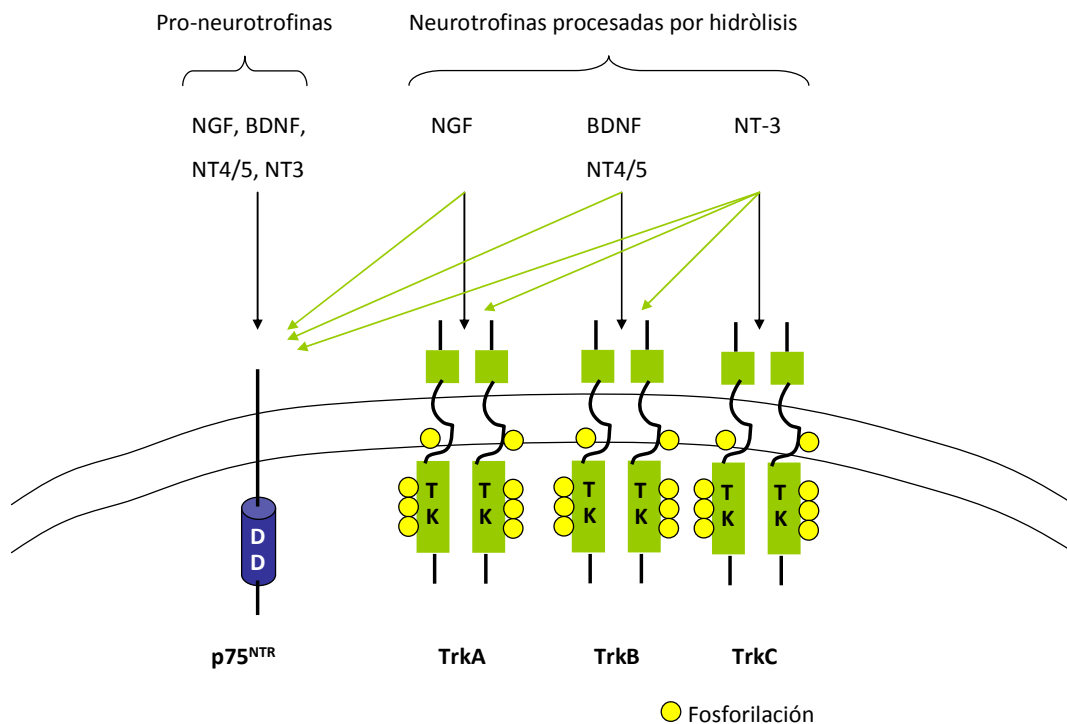


Figura 13 Neurotrofinas y sus receptores

Las pro-neurotrofinas presentan afinidad por p75^{NTR}, mientras que las neurotrofinas (al activarse por proteólisis) confieren mayor afinidad por los receptores Trk. Se observa con una flecha en negro la unión preferente de cada neurotrofina con el Trk específico, y en verde uniones cruzadas posibles. Adaptado de (Segal 2003).

Los receptores Trk confieren especificidad para responder a determinadas neurotrofinas y hay neuronas capaces de responder a diferentes neurotrofinas a la vez. La unión de la neurotrofina al receptor Trk provoca la dimerización del mismo y posterior fosforilación activadora de sus dominios quinasa intracelulares. Este hecho comporta una señalización intracelular, específica y diferencial para los diferentes receptores Trk (Nikoletopoulou et al. 2010). La activación de estos receptores modula la activación de diferentes vías intracelulares: la vía PLC- γ , la vía de las MAPK y la vía PI3K/Akt promoviendo supervivencia, proliferación y diferenciación celular (Freund-Michel and Frossard 2008).

El receptor p75^{NTR} es un receptor que se une a todas las neurotrofinas que se caracteriza por la presencia de un dominio de muerte capaz de activar rutas apoptóticas. También es capaz de unirse con gran afinidad a las pro-neurotrofinas. La activación de p75^{NTR} desencadena apoptosis o supervivencia dependiendo de las proteínas adaptadoras presentes o de los co-receptores que es capaz de reclutar. Un ejemplo es que cuando se une a NGF señala supervivencia, pero cuando se une al pro-NGF induce apoptosis en neuronas en cultivo (Pedraza et al. 2005). Las principales rutas intracelulares activadas por p75^{NTR} son la vía JNK y PI3K/Akt, con activación del factor de transcripción NF-kappaB (revisado en (Kaplan and Miller 2000)).

3.1.1.1.1 BDNF

En el cultivo primario de MNs complementamos el medio con BDNF como factor representante de la familia de las neurotrofinas. Este fue aislado originariamente como factor trófico de extractos de cerebro (Barde et al. 1982).

El receptor de BDNF y NT4/5 es el TrkB (tropomyosin related quinasa B) y, por eso, estas dos neurotrofinas presentan un espectro de acciones solapado en algunas poblaciones neuronales. Diversos estudios han demostrado que la administración de BDNF exógeno rescata las MNs de la PCD (Henderson et al. 1998), y también en situaciones de muerte neuronal provocadas por axotomía *in vitro* (Oppenheim 1996). Además, se ha observado que al inducir una lesión medular separando las dos hemimédulas, se produce la sobre-expresión de BDNF, NGF y NT-3 en las MNs del asta ventral en ratas, este hecho podría explicarse por la implicación de las neurotrofinas en la plasticidad sináptica.

Los ratones *knockout* para BDNF o su receptor no presentan pérdida de MNs después del período de PCD (Silos-Santiago et al. 1997, Rauskolb et al. 2010). No obstante, la administración exógena de este factor rescata un porcentaje de MNs durante el período de PCD (McKay et al. 1996) y en períodos postnatales después de una axotomía (Alcántara et al. 1997).

3.1.1.2 *Ligandos de la familia del GDNF (GLFs)*

Los GLFs son importantes para el desarrollo y el mantenimiento de distintas poblaciones neuronales del SNC y SNP. Se conocen 4 miembros de esta familia: el GDNF (Glial cell line-derived neurotrophic factor), Neurturina (NRTN), Artemina (ARTN) y Persefina (PSPN), y todos ellos pertenecen a la superfamilia TGF- β por la presencia del motivo estructural típico de esta familia, implicado en dimerización y estabilización de la proteína (siete residuos de cisteína que se unen por tres puentes disulfuro). El GDNF fue el primer factor descubierto (Lin, LF y col. 1993); poco tiempo después se purificó el segundo miembro, NRTN (Kotzbauer, PT y col. 1996), y por último, utilizando técnicas de homología, se clonaron los restantes miembros, ARTN (Baloh, RH y col. 1998b) y PSPN (Milbrandt, J y col. 1998).

El análisis genómico de los GLFs demuestra un origen ancestral común de todos los factores; no obstante en diferentes especies se encuentran diferentes GLFs, por ejemplo, en el pollo únicamente se encuentran los genes ortólogos a los que codifican para GDNF, NRTN y ARTN en mamíferos, pero no PSPN (Hätinen et al, 2007).

Estos factores se sintetizan en forma de precursores (pre-pro-GLFs). Durante la secreción a la matriz extracelular, el péptido señal es eliminado (pro-GLFs) y al producirse una rotura proteolítica más, queda liberado el GLF activo. Una vez que están activos, los GLFs se unen a las cadenas de heparán-sulfatos de los proteoglicanos de la matriz extracelular, de esta forma regulan su difusión, aumentan la concentración local del ligando y ejercen su efecto en la célula diana (Airaksinen and Saarma 2002).

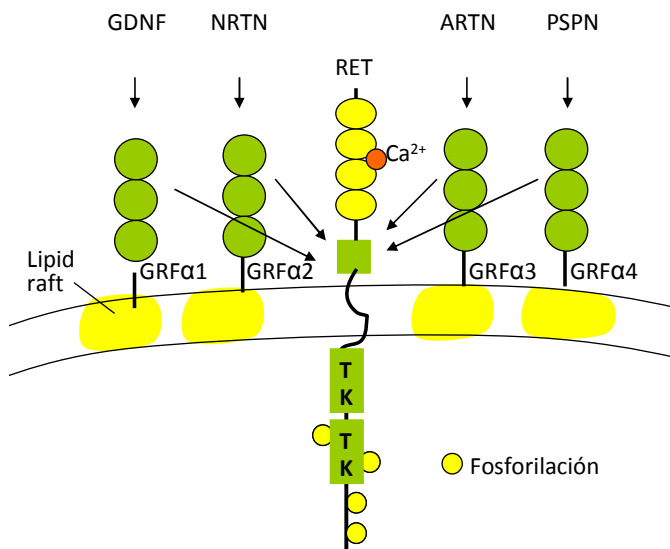


Figura 14. Miembros de la familia de GDNF y sus receptores.

Todos los GLFs activan la actividad tirosina quinasa de Ret después de haberse unido a los diferentes GFR α . A) Cada GLF interacciona preferentemente con su receptor específico, pero también existen interacciones cruzadas entre GDNF y NRTN, y GDNF y ARTN. Adaptado de (Airaksinen and Saarma 2002).

Los GLFs señalan a través del **Receptor Ret**. Fue identificado por Takahashi y colaboradores (1985), se expresa durante la embriogénesis del sistema nervioso en algunas zonas concretas del cerebro, en neuronas simpáticas, sensoriales,

dopaminérgicas, noradrenalinérgicas (Pachnis, Mankoo and Costantini 1993) y en MNs (Yu et al. 1998), sugiriendo un papel importante en la supervivencia y diferenciación de estas neuronas. El receptor Ret en el extremo N-terminal (extracelular) consta de un dominio Cadherina y una región rica en cisternas. Posee un dominio transmembrana y en la parte carboxiterminal (intracelular) posee dos dominios tirosina quinasa separados por 27 aa.

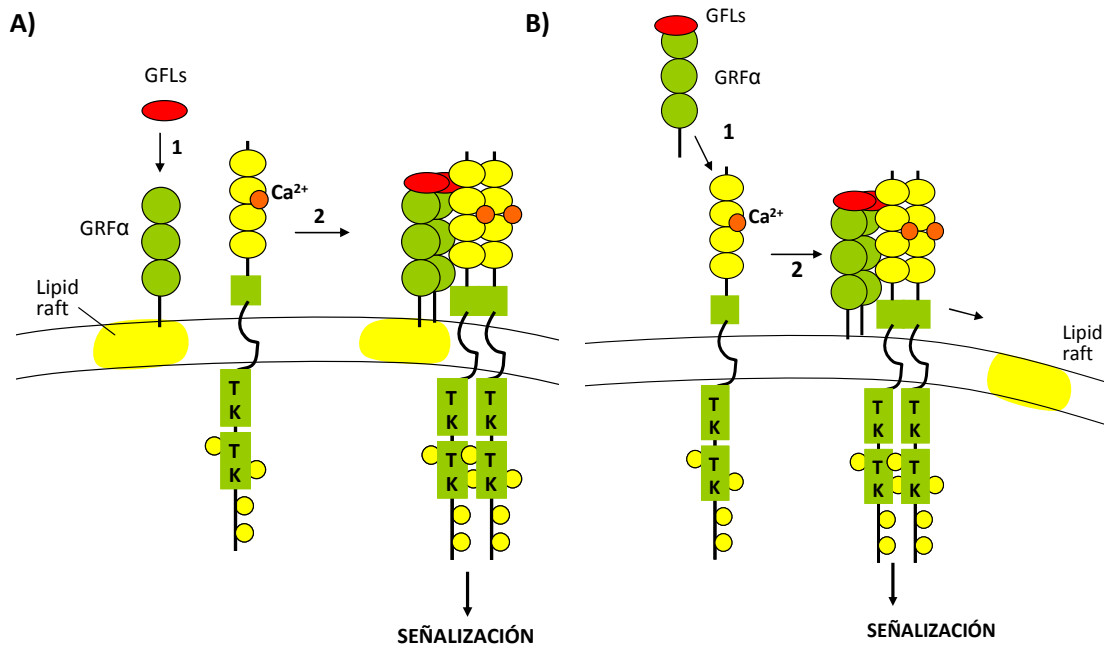


Figura 15. Activación de Ret por los GFLs, cis- y trans-.

Todos los GFLs activan la actividad tirosina quinasa de Ret después de haberse unido a los diferentes GFR α . Cuando los GFLs se han unido a los receptores GFR α , estos dimerizan y se unen a Ret. Los receptores GFR α existen unidos a la membrana celular (activación de Ret en cis- (A)), o en forma soluble (activación de Ret en trans- (B)). Adaptado de (Airaksinen and Saarma 2002).

Como hemos comentado los GFLs señalizan a través de Ret, pero cada factor presenta especificidad de unión a un receptor GFR α , (GDNF-family receptor- α , GFR α 1-4), (Figura 15). Los receptores GFR α activan Ret en forma cis-, cuando se encuentran unidos a través de una cola glicosil fosfatidilinositol a las zonas de balsas de lípidos (lipid rafts) de la membrana celular, o en forma trans-, cuando se encuentran en forma soluble al medio extracelular. GDNF se une preferencialmente al receptor GFR α 1, pero existen reacciones cruzadas entre ellos. GDNF unido a GFR α 1 se une a dos moléculas Ret que homodimerizan y se activan por autofosforilación cruzada de sus dominios catalíticos intracelulares tirosina quinasa. Una vez fosforilados estos dominios reclutan otras proteínas de señalización como Shc, FRS2, etc., y se activan vías que regulan supervivencia celular, proliferación, diferenciación, migración, crecimiento neurítico, plasticidad sináptica, y quimiotaxis a través de las vías PI3K y Ras/MAPK (Sariola and Saarma 2003).

3.1.1.2.1 GDNF

El GDNF fue purificado a partir del medio de cultivo de una línea glial de rata (B49). Inicialmente se le atribuyó la capacidad de promover supervivencia y diferenciación morfológica a las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo *in vitro* (Lin et al. 1993). Aunque actualmente se sabe que promueve la supervivencia de la mayoría de poblaciones del SNC, incluyendo las MNs espinales. Es uno de los factores tróficos más potentes promoviendo supervivencia en las MNs de mamíferos y de pollo tanto *in vivo* como *in vitro* (Henderson et al. 1994, Soler et al. 1999). Este factor también regula la diferenciación de neuronas del SNP, neuronas simpáticas, parasimpáticas, sensoriales y entéricas (revisado por (Sariola and Saarma 2003). GDNF también participa en la nefrogénesis y en la diferenciación de las espermatogonias (revisado por (Airaksinen and Saarma 2002)).

Se sintetiza principalmente en células musculares, gliales y de Schwann en forma de pre-pro-GDNF no funcional. También se sintetiza en astrocitos de la médula espinal como respuesta a daño excitotóxico. Se activa por proteólisis del fragmento N-terminal. Su forma madura es de unos 30 kDa y, para ser biológicamente activa debe encontrarse en forma de homodímero. El efecto del GDNF mediando la supervivencia de las MNs requiere la activación de la vía de señalización PI3K (Gould et al. 2008).

El receptor para GDNF se expresa en todas las MNs antes del período de PCD y su depleción durante el desarrollo causa la pérdida de un 20-30% de MNs, pero a pesar que el receptor se exprese en las MNs y sus tejidos diana expresen GDNF, el ratón *knockout* para GDNF pierde únicamente a las γ -MNs (no se afectan las α MNs), (Gould et al. 2008, Soler et al. 1999)).

GDNF también es considerado como un factor trófico **neuroprotector** por su efecto en enfermedades neurodegenerativas (Henderson et al. 1994) y también por defecto observado en modelos de daño o toxicidad neuronal *in vitro*. Ejemplos de ello se recogen en diferentes trabajos:

- ✓ Pre-tratamientos con GDNF reducen la toxicidad debida al NMDA en neuronas corticales en cultivo (Nicole, O y col. 2001) y en cultivos organotípicos de cerebro (Bonde, C y col. 2000).
- ✓ *In vivo*, la oclusión de la arteria cerebral media y el posterior tratamiento con GDNF ha demostrado su efecto protector (Abe and Hayashi 1997).
- ✓ En animales adultos con daño neuronal, la administración de GDNF, disminuye los niveles de caspasa-3, incrementando la supervivencia neuronal (Kilic, U y col. 2003).

✓ La administración de GDNF en ratones modelo de Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) hSOD^{G93A} mediante vectores adenovirales consigue retardar el inicio de la enfermedad y alargar la vida de estos animales (Acsadi 2002, Manabe 2002).

Otros estudios también lo relacionan con la plasticidad sináptica. Un ejemplo es que la actividad física de los animales de experimentación provoca un aumento moderado de GDNF muscular (Wehrwein 2002), este dato explica el incremento de ramificaciones nerviosas observadas en los animales que entrenan respecto sus controles.

GDNF regula diferentes mecanismos del desarrollo en distintos subtipos de MNs. Por ejemplo, tiene efectos en la regulación de la conectividad de pools de MNs específicos, regula el crecimiento axonal de columnas específicas y la supervivencia de subtipos específicos (γ -MNs), (revisado en (Kanning et al. 2010)).

3.1.1.3 Citoquinas

Las citoquinas constituyen una extensa familia de factores neurotróficos. Actúan en muy bajas concentraciones (nano o pico molar) regulando la supervivencia, el crecimiento neurítico o la diferenciación. También son fundamentales en la respuesta inmune. Las citoquinas se consideran factores pleiotrópicos, por que una misma citoquina puede desempeñar respuestas distintas según el tejido diana, y redundantes, puesto que entre ellas usan los mismos receptores (Vergara y Ramirez, 2004). Dentro de la familia de citoquinas

tienen efecto sobre la supervivencia de las MNs el factor neurotrófico ciliar (CNTF, del inglés Ciliary Neurotrophic Factor), la cardiotrofina-1 (CT-1, del inglés Cardiotrophin-1), la *cardiotrophin like cytokine* (CLC) y el factor inhibitorio de la leucemia (LIF, del inglés leukemia inhibitory factor), entre otras.

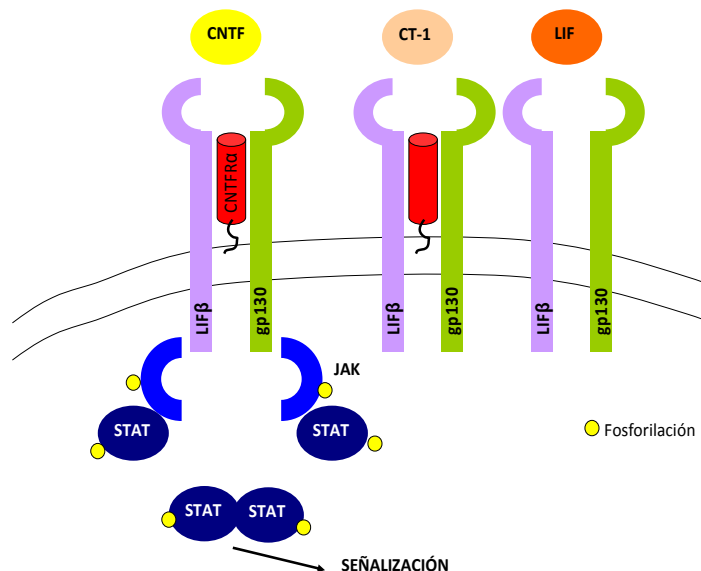


Figura 16. Esquema de las citoquinas, sus receptores y activación de la vía intracelular JAK/STAT.

Adaptado de (Hendry and John 2004).

Es una familia de factores muy potentes para la supervivencia de las MNs *in vivo* e *in vitro* (Arakawa 1990, Sendtner, 1990), que actúan a través de la activación de un

receptor heterodimérico compuesto por la glicoproteína 130 (gp130) y el receptor de las tirosina quinasas LIF (LIFR β) (Hibi et al, 1996). CNTF y CLC requieren un *GPI-linked* co-receptor (CNTFR α) y CT-1 requiere un co-receptor similar pero todavía no identificado, para unirse al receptor heterodimérico y activarlo, (Figura 16). Una vez activo el receptor activa la vía de señalización janus kinase/signal transducer and activator of transcription-3 (JAK/STAT). En algunos tipos celulares, estos receptores activan también otras vías de señalización como la PI-3K/PKB, la Ras/MAPK y NF-kappaB (Dolcet et al. 2001).

3.1.1.3.1 CNTF

Fue descrito en primer lugar como molécula capaz de promover la supervivencia en neuronas parasimpáticas del ganglio ciliar de embriones de pollo (Varon, Manthorpe and Adler 1979), pero también actúa sobre neuronas y glía del SNC y del SNP promoviendo supervivencia y diferenciación (Vergara and Ramirez 2004).

Respecto a las MNs, CNTF tiene un papel trófico importante, tanto *in vivo* como *in vitro*, en embriones de pollo la administración de CNTF humano evita la muerte de un 50% de MNs durante el período de PCD (Oppenheim et al. 1991, Arakawa et al. 1990).

Contrariamente a otros NTFs, el CNTF se expresa mayoritariamente en tejido nervioso más que en músculo esquelético, y después del período de PCD, por lo cual se le atribuyen principalmente funciones en el mantenimiento y plasticidad sináptica y *sprouting*. Se piensa que es secretado por células de Schwann y transportado retrógradamente por las MNs espinales hacia el soma, donde ejerce su función.

La inactivación de CNTF en modelos de ratón no presenta ninguna reducción en el número de MNs en el período de PCD, pero conlleva atrofia y pérdida de un conjunto de MNs postnatal, resultando en debilidad muscular (revisado en (Sendtner et al. 2000).

Debido a su presencia abundante en el nervio ciático durante la edad adulta, el CNTF parece ser un NTF importante para el *sprouting* en situaciones como la denervación o parálisis neuromuscular, actuando como mecanismo endógeno compensatorio de la lesión (Siegel et al 200). También se ha demostrado el efecto neuroprotector del CNTF sobre estas MNs tras una axotomía (Sendtner, M y col. 1990; Vejsada, R y col. 1995).

Mutaciones que conllevan pérdida de función o deleciones del gen que codifica para CNTF generan un fenotipo que se asocia a una variedad de ELA de manifestación prematura tanto en humanos como en ratones hSOD^{G93A} (Geiss i col, 2002). También se ha demostrado que CNTF actúa preservando las MNs en un modelo murino de

Atrofia Muscular Espinal tipo III (SMA, del inglés Spinal Muscular Atrophy), puesto que la delección de CNTF agrava el fenotipo de la enfermedad (Simon et al. 2010).

3.1.1.3.2 CT-1

Fue identificada en 1996 por su actividad hipertrófica en cardiomiocitos en cultivo (Pennica et al. 1996), pero también actúa como promotor de la supervivencia y maduración de diferentes tipos neuronales en cultivo, como las neuronas de ganglio ciliar, neuronas simpáticas, neuronas dopaminérgicas y MNs espinales. *In vivo* se ha visto que se expresa en altas cantidades en el músculo esquelético embrionario, al contrario que CNTF.

Este factor neurotrófico se expresa durante el desarrollo embrionario promoviendo supervivencia en MNs (Holtmann et al. 2005), y no se requiere para la supervivencia postnatal de las MNs (Oppenheim et al. 2001b). No obstante, en ratones transgénicos para hSOD1^{G93A} ha demostrado ser un NTF capaz de retardar el inicio de la enfermedad, enlentecer la degeneración axonal y reducir la atrofia muscular (Bordet et al. 2001). También se muestra eficaz reduciendo los defectos motores en modelos murinos de Atrofia Muscular Espinal. (Lesbordes et al. 2003).

3.1.1.4 HGF

HGF pertenece a la *plasminogen-related growth factor family*. Inicialmente, este factor fue considerado como a un polipéptido promotor de motilidad, proliferación y morfogénesis en diferentes tipos de células epiteliales. Estudios posteriores han demostrado que esta involucrado en la regeneración de órganos, angiogénesis, invasión tumoral, crecimiento axonal y quimiotaxis en MNs. El HGF es capaz de hacer sobrevivir algunas subpoblaciones de MNs a través de su receptor c-Met. Tanto HGF como c-Met se expresan en neuronas pero también en células no neuronales del sistema nervioso como microglía y células de Schwann, dónde actúa como mitógeno. Diversos estudios en embriones de pollo han evidenciado la participación del HGF en las etapas iniciales de la inducción del fenotipo neuronal durante el desarrollo. Los picos de expresión de HGF en las extremidades durante el desarrollo y de su receptor en las MNs coinciden durante el período de PCD. Es un factor importante únicamente para las MNs que inervan las extremidades (Novak et al. 2000, Yamamoto et al. 1997). En las neuronas adultas los niveles de expresión del receptor disminuyen.

Cuando c-Met se une a HGF activa las proteínas efectoras que están unidas a su dominio C terminal. Para la señalización neurotrófica de HGF se requiere la unión de los residuos tirosina del receptor c-Met a PI3K (Maina et al. 2001).

A pesar de que únicamente subtipos específicos de MNs requieran HGF para su supervivencia, diversas observaciones demuestran que la administración exógena de este factor genera efectos tróficos en MNs en cultivo, MNs neonatales después de procesos de axotomía y MNs adultas en condiciones patológicas, indicando un papel importante de HGF en la supervivencia de las MNs durante el período de desarrollo (Funakoshi et al. 2007).

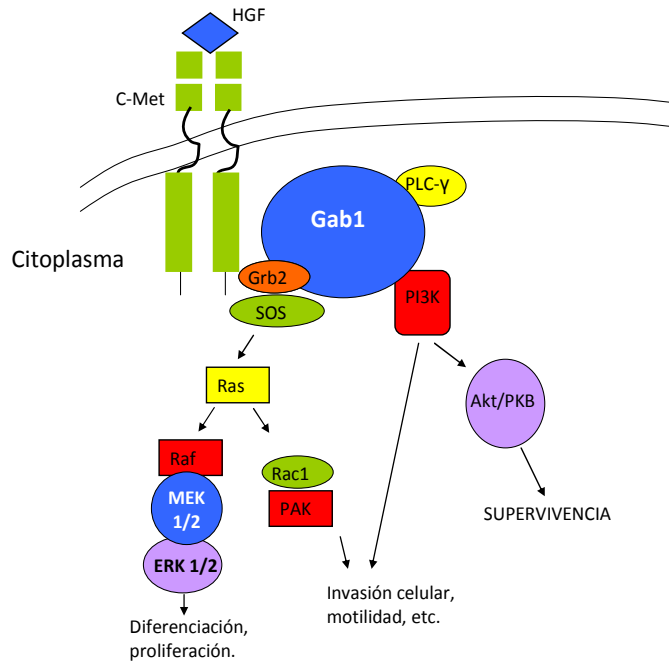


Figura 17. HGF, su receptor y activación de vías intracelulares.
Adaptado de (Funakoshi et al. 2007).

3.1.2 Contribución de los ratones knockout en el estudio de la dependencia neurotrófica de las MNs

Los ratones knockout de un factor neurotrófico, para el cual las MNs presentan el receptor, o del propio receptor, presentan pérdida de algunas subpoblaciones de MNs, se observa una pérdida máxima del 40% de las MNs totales. El hecho que la inactivación de cada factor trófico de forma individual resulte en la pérdida de diferentes subpoblaciones de MNs durante la PCD (Figura 18), indica que las neuronas motoras presentan heterogeneidad trófica durante el desarrollo (Henderson et al. 1998). El análisis de ratones deficientes para los siguientes NTFs o sus receptores: GDNF, CNTF, IGF-I, HGF y VEGF nos aportan evidencias claras de esta heterogeneidad (ver Tabla 2). Esta heterogeneidad trófica (diferentes poblaciones de MN responden de forma diferente a los diferentes NTFs), puede explicarse desde dos puntos de vista distintos: por un lado podría reflejar diferentes entornos tróficos para las diferentes subpoblaciones de MNs, es decir, las distintas dianas de inervación expresarían factores específicos; o alternativamente, podría ser que las propias MNs expresen receptores específicos para los diferentes NTFs dependiendo de la región de la médula espinal donde deben posicionarse, del tejido al que deban inervar, y del estado de maduración.

Existen diversas observaciones que ponen de manifiesto el efecto de NTFs únicamente sobre subpoblaciones de MNs determinadas. Algunos ejemplos son: la expresión exógena de BDNF únicamente rescata MNs lumbares del último período de PCD porqué el receptor no se expresa hasta ese momento (McKay 1996); el receptor de HGF únicamente se expresa en MNs que inervan las extremidades (Yamamoto 1997); CLC es específico únicamente para MNs lumbares y faciales durante la PCD (Forger et al. 2003); los subconjuntos neuronales que inervan músculos individuales (*motor pools*) expresan combinaciones específicas y características de receptores de NTFs únicos para cada *pool*, cada MN del mismo pool expresa la misma combinación de receptores para NTFs, (Gould and Oppenheim 2004).

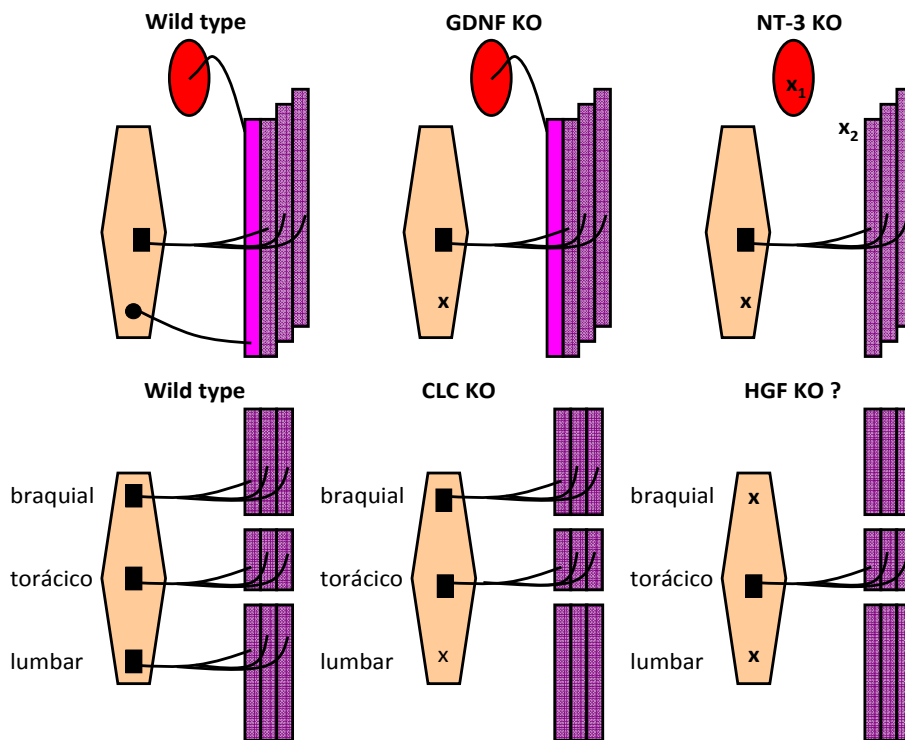


Figura 18. Requerimientos tróficos de las distintas subpoblaciones de MNs espinales.

Distintas subpoblaciones de MNs espinales requieren distintos NTFs para su supervivencia. En la médula espinal (figuras naranja pálido) se encuentran las α MNs (rectángulo negro) que inervan las fibras extrafusales y las γ -MNs (fusimotor MNs, círculo negro) que inervan fibras intrafusales. Los husos musculares también reciben inervación de las neuronas de los ganglios sensoriales superiores (círculo rojo). El ratón knockout para GDNF muestra una pérdida específica de β -MNs, el knockout para NT-3 también presenta pérdida de ellas pero en este caso como consecuencia de la pérdida de las neuronas sensoriales x_1 . Por otro lado los ratones knockout para CLC presentan pérdida específica de MNs de la zona lumbar pero no las de las regiones torácica, braquial o cervical. Los ratones Knockout para HGF no se han analizado de esta forma, pero basado en la expresión de su receptor en la médula espinal debería afectar a las MNs que inervan las extremidades. En la figura no se muestran los knockout para CNTF y BDNF porqué no muestran pérdida de MNs durante el período de PCD, ni los knockout para CT-1 e IGF1 porqué no se han definido qué subpoblaciones motoneuronales pierden. Esquema modificado de (Gould and Enomoto 2009).

Estos estudios conjuntamente con el análisis de los ratones *knockout* de NTFs y sus receptores, sugieren que la expresión específica de los NTFs en las diferentes regiones

de inervación acoplado a la expresión específica y diferencial de los receptores en cada subpoblación de MNs, regula la supervivencia de las MNs.

Otra observación que apoya la idea que cada NTF se requiere para la supervivencia de subtipos específicos de MNs, más que para la supervivencia parcial de la población general de MNs la aporta el ratón *knockout* condicional del receptor de GDNF. En este ratón se pierden única y prácticamente en su totalidad las γ -MNs. También se ha observado que los ratones heterocigotos para GDNF muestran un fenotipo intermedio en número de MNs afectadas, sugiriendo que la cantidad disponible, de GDNF también es un factor limitante para el rescate de las MNs durante la PCD (Gould et al. 2008).

Tabla 2. Esquema de la pérdida de MNs en diferentes ratones knockout para NTF/receptor de NTF. Modificado de (Gould and Enomoto 2009).

NTF	Receptor(es) de los NTFs	Subpoblación de MNs afectada durante el período de PCD en ratones KO
GDNF	GFR α 1; Ret	MNs espinales: pérdida del 20-30% de MNs (Gould et al., 2008; Moore et al., 1996); ?MNs (pérdida del 90%) (Gould et al., 2008). MNs faciales: 20% pérdida -Sí (Oppenheim et al. 2000); -No (Moore et al. 1996; Sanchez et al. 1996). A nivel trigeminal: pérdida del 25% de MNs (Oppenheim et al. 2000; Sanchez et al. 1996). A nivel del Hipogloso: pérdida del 20% (Oppenheim et al. 2000).
BDNF, NT-4/5	TrkB, p75	MNs espinales: No déficit en BDNF KO (Liu and Jaenisch 2000; Snider 1994), ni NT-4/5 KO (Liu and Jaenisch 2000; Snider 1994), TrkB KO (Snider 1994) o p75 KO (Ferri et al.).
NT-3	TrkC, p75	MNs espinales: pérdida completa de las ?MNs (Gould et al. 2008; Woolley et al. 2005). MNs Faciales: No déficit (Kucera et al. 1995).
CNTF, LIF	CNTFR α 1, LIFR β ; gp130	CNTF or LIF KO: MNs espinales: No déficit; CNTFRα1, LIFRβ; gp130 KO: MNs espinales: pérdida del 40% de MNs (Sendtner et al. 2000).
LIF	LIFR β ; gp130	Igual que el anterior.
CT-1	LIFR β ; gp130	CT-1 KO: MNs espinales: pérdida de un 20-30%; MNs faciales: 20%; A nivel del Hipogloso: pérdida de un 20% (Openheim et al. 2001).
CLC/CLF	CNTFR α 1, LIFR β ; gp130	CLC/CLF KO: A nivel de médula espinal: 25% de pérdida de MNs lumbares, no se afectan las MNs de la región torácica ni braquial; A nivel Facial: 30%; A nivel del Hipogloso: No déficit (Forger et al. 2003).
HGF	Met	Met KO: A nivel de médula espinal: no se han realizado contajes de MNs (letalidad embrionaria).
IGF-I, IGF-II	IGFR-1, IGFR-2	IGF-I KO: MNs espinales: pérdida del 30%; A nivel Facial: pérdida del 25% (Vicario-Abejón et al. 2004); IGR-1,2 KO no analizado.
VEGF	Flk-1; Flt-1; Flt-4	VEGF KO: MNs espinales: no se han realizado contajes de MNs (letalidad embrionaria); MNs faciales: Migración (Schwarz et al. 1994).

A pesar de los efectos selectivos de cada NTF sobre los subtipos particulares de MNs, prácticamente la sobre-expresión o administración exógena de todos los NTFs de forma individual, muestra efectos positivos de supervivencia durante el período de PCD y en casos de axotomía o daño neuronal (revisado en (Gould and Enomoto 2009)).

Finalmente, los NTFs también parecen tener un efecto neuroprotector sobre las MNs en situaciones de daño neuronal en la edad adulta. La pérdida de CNTF, NT-3 o VEGF causan la muerte de MNs únicamente después del período embrionario y su administración exógena en modelos murinos de enfermedades degenerativas tiene efectos protectores (Gould et al. 2008, Hwang et al. 2009). Estos hechos sugieren a los NTFs como candidatos potenciales para ensayos clínicos.

3.2 EL CALCIO COMO MODULADOR DE LA SUPERVIVENCIA NEURONAL

El Ca^{2+} es quizás el mensajero intracelular más común en las neuronas. Diversos estímulos provocan aumentos transitorios de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, estos aumentos a nivel intracelular se traducen en la modulación de la actividad de diversas proteínas que contienen dominios de unión a Ca^{2+} . De estas, la más estudiada es la Calmodulina (CaM), una proteína de localización citoplasmática que se activa al unirse a Ca^{2+} y una vez activada, activa otras proteínas, como por ejemplo quinasas o proteínas con actividad quinasa.

Habitualmente la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es baja (50-100 nM). En cambio en el espacio extracelular la concentración de este ión es varios ordenes de magnitud superior, generalmente se encuentra a niveles del orden mM. Para mantener este gradiente las células requieren varios mecanismos:

- ✓ El Ca^{2+} intracelular es enviado al medio extracelular gracias a las ATPasas, bombas de Ca^{2+} y a los intercambiadores de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la membrana citoplasmática.
- ✓ El Ca^{2+} también es bombeado hacia el interior del retículo endoplásmico (ER, del inglés endoplasmic reticulum) y las mitocondrias. Así estas organelas actúan como reservorios de iones de Ca^{2+} que liberarán para participar en eventos de señalización intracelular.
- ✓ Finalmente, las células contienen otras proteínas de unión a Ca^{2+} (como Calbindina) que sirven como *buffers* de Ca^{2+} , se unen a Ca^{2+} de forma reversible y así controlan la magnitud y cinética de las señales mediadas por Ca^{2+} en las neuronas.

Tabla 3. Fuentes, dianas y mecanismos de control intracelulares de los flujos de Ca^{2+} .

CALCIO	
<i>Fuentes</i>	<i>Membrana plasmática:</i> VGCC, Varios canales dependientes de ligando. <i>Retículo endoplásmico:</i> Receptores IP3, Receptores de ryanodine.
<i>Dianas intracelulares</i>	Calmodulina , Proteínas quinasas (CaMKs), Proteínas fosfatasas, Canales iónicos, Calpaína y otras proteínas de unión a calcio.
<i>Mecanismos de control intracelulares</i>	<i>Membrana plasmática:</i> bombas de calcio y intercambiadores sodio/calcio. <i>Retículo endoplásmico:</i> bombas de calcio. <i>Mitocondrias</i>

Los iones de Ca^{2+} que actúan como señales intracelulares entran en el citosol desde el espacio extracelular a través de uno o varios canales iónicos (VGCC o canales dependientes de ligando) de la membrana plasmática; o bien en presencia de señales de activación, son liberados del retículo endoplásmico hacia el citosol a través de canales de Ca^{2+} (IP_3 , Ryanodine). Todos estos mecanismos de control para incorporar o eliminar iones de Ca^{2+} del citosol, permiten a las neuronas un control preciso del tiempo y la localización de la activación de diferentes vías de señalización. Así los cambios de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ regulan multitud de eventos, incluyendo división celular, supervivencia y diferenciación (revisado en (Clapham 2007)).

Tanto los niveles apropiados de NTFs (De Bernardi et al. 1996, Perez-Garcia et al. 2004), como la actividad neuronal (despolarización de la membrana neuronal) (Franklin and Johnson 1992, Soler et al. 1998), inducen incrementos transitorios de la concentración de Ca^{2+} intracelular (Figura 19). Estos flujos de Ca^{2+} a través de la membrana celular (en el caso de despolarización de la membrana) o entre los compartimentos intracelulares (liberación de Ca^{2+} del ER , NTFs) constituyen un mecanismo fundamental en las funciones neuronales implicadas en la regulación del crecimiento axonal y dendrítico, la sinaptogénesis, la transmisión y la plasticidad sináptica, y la supervivencia celular (revisado en (Clapham 2007)).

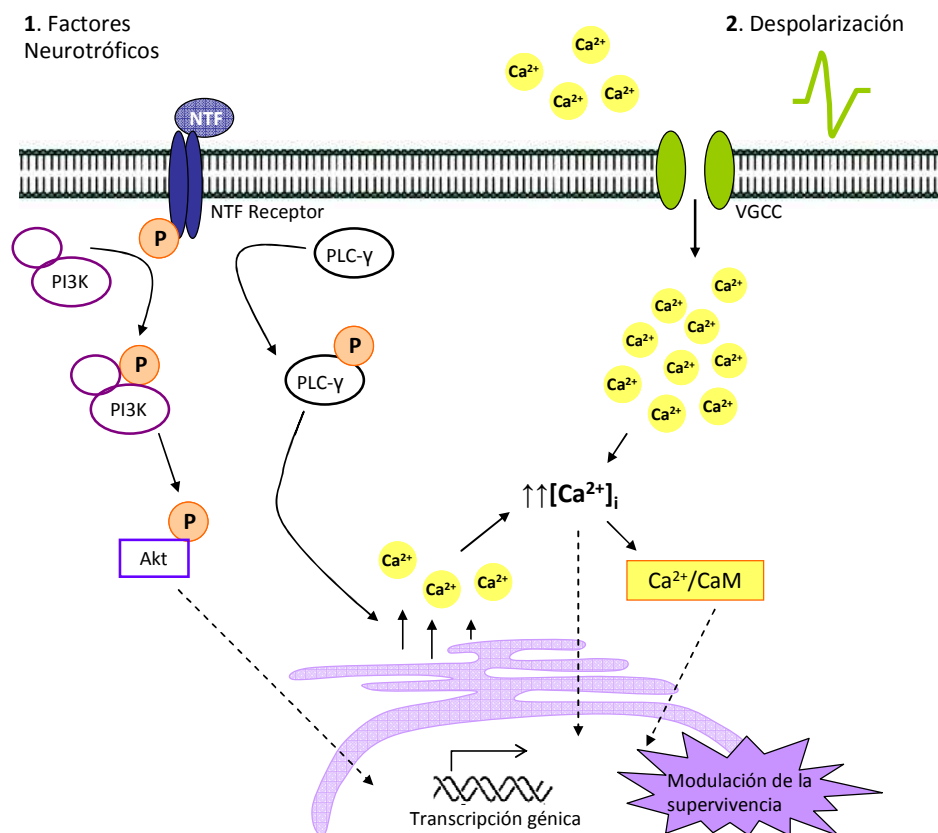


Figura 19. Incremento de los niveles de Ca^{2+} intracelular mediado por NTFs y despolarización.

En estados patológicos y también durante el envejecimiento, las neuronas pierden la capacidad de controlar los flujos de Ca^{2+} , y la recuperación de los niveles normales queda comprometida, siendo uno de los mecanismos implicados en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas (Zündorf and Reiser 2010).

3.2.1 Modulación de la supervivencia inducida por la despolarización

La coincidencia temporal del período de PCD con el establecimiento de los contactos sinápticos, hizo pensar que la actividad eléctrica podría ser otro factor importante en la regulación de la supervivencia y muerte neuronal. La implicación de la actividad eléctrica en la supervivencia neuronal ha sido especialmente estudiado en sistemas *in vitro*. La despolarización crónica de la membrana plasmática inducida por elevadas concentraciones de K^+ en el medio extracelular es capaz de mantener la supervivencia de determinados tipos neuronales en ausencia de soporte trófico. El responsable de esta supervivencia es la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular a través de canales de Ca^{2+} voltaje dependientes (VGCC).

En las neuronas, como respuesta a la **actividad eléctrica**, se despolariza la membrana y como consecuencia se abren los VGCC permitiendo la **entrada de Ca^{2+} del medio extracelular** (Catterall 2000). Cuando este incremento de Ca^{2+} es moderado, induce la supervivencia de las neuronas incluso en ausencia de NTFs (Soler et al. 1998, Gallo et al. 1987). Para explicar la independencia de las neuronas a los NTFs se postuló la teoría del reóstato de calcio (*calcium set-point hypothesis*) (Franklin and Johnson 1992). Esta teoría postula que, en un primer nivel, cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es baja, las neuronas mueren incluso en presencia de NTFs. En un segundo nivel, cuando los niveles de Ca^{2+} no son los suficientemente altos, las neuronas dependerían únicamente de los factores neurotróficos.

En un tercer nivel, los incrementos moderados en las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ serían suficientes para mantener a las neuronas vivas en ausencia de soporte trófico. Por último, un cuarto nivel, en presencia de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ excesivas, las neuronas mueren incluso en presencia de NTFs (Figura 20).

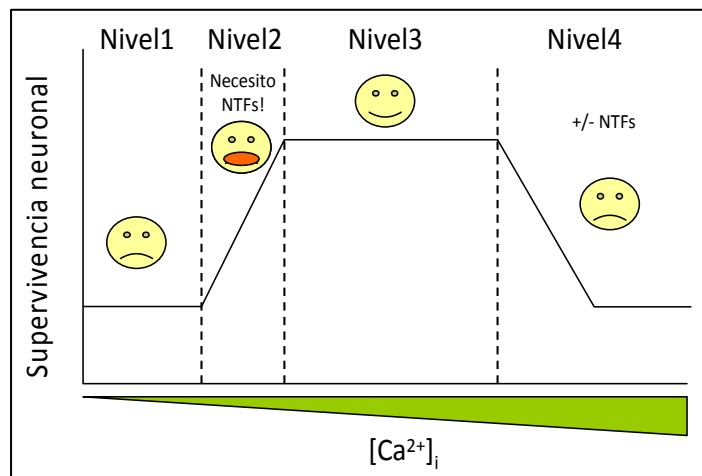


Figura 20. *Calcium set-point hypothesis*. Adaptado de (Franklin and Johnson 1992).

3.2.1.1 *Canales de Calcio Dependientes de Voltaje*

Los VGCC traducen las señales de los cambios de potencial de membrana en incrementos de Ca^{2+} intracelular que inician diferentes procesos fisiológicos. En las neuronas, los VGCC median la entrada de Ca^{2+} en respuesta a la despolarización de la membrana y regulan procesos intracelulares como la secreción, neurotransmisión y expresión génica. Su actividad es esencial para asociar las señales eléctricas de la superficie celular a eventos fisiológicos.

Los VGCC pertenecen a una superfamilia de genes que codifican para canales iónicos transmembrana que incluyen también los canales de sodio y potasio voltaje dependientes (Yu and Catterall 2004). Son complejos proteicos compuestos por cuatro o cinco subunidades distintas que en mamíferos están codificadas por múltiples genes (Catterall 2000).

Todos los VGCC están formados por una subunidad α_1 de 190 a 250 KDa, esta subunidad incorpora el poro de conducción iónica, el sensor de voltaje y el mecanismo de apertura, una subunidad intracelular β y una subunidad α_2 unida por un puente disulfuro a la subunidad transmembrana δ . Algunos VGCC además también comprenden una subunidad más, la γ . Existen al menos 10 subunidades α_1 distintas codificadas por 10 genes distintos, estas subunidades confieren a los VGCC propiedades fisiológicas y farmacológicas específicas que nos permiten clasificarlos en los siguientes grupos (Tsien et al. 1995):

- ✓ VGCC Tipo-L: requieren despolarización fuerte para su activación, permanecen abiertos un período largo (*long-lasting*). Se bloquean por antagonistas orgánicos como la Nifedipina.
- ✓ VGCC Tipo-N, Tipo-P/Q y Tipo-R: Estos canales se expresan fundamentalmente en neuronas y también requieren despolarizaciones fuertes para su activación. Se bloquea su activación con toxinas específicas presentes en el veneno de caracoles marinos del género *Conus* (ω -conotoxina, los Tipo-N) y arañas (ω -agatoxina, de tarántula, para los Tipo-P/Q), no se conocen antagonistas naturales específicos para los VGCC Tipo-R, para bloquear este canal se usa el compuesto sintético SNX-482.
- ✓ VGCC Tipo-T: A diferencia de los demás canales se activan por despolarizaciones débiles y su activación es transitoria.

3.3 VÍAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN LA SUPERVIVENCIA Y DIFERENCIACIÓN NEURONAL

Las células deben adaptarse constantemente a los cambios de su entorno para poder sobrevivir. Para ello han desarrollado mecanismos complejos que traducen los estímulos externos en movilizaciones iónicas intracelulares que dirigirán la señalización celular (Clapham 2007). En las neuronas las movilizaciones principalmente de iones fosfato (fosforilación/defosforilación de proteínas) y Ca^{2+} (entrada a través de VGCC por depolarización de la membrana, etc.) actúan como interruptores que dirigen la activación o bloqueo de las vías de señalización que tienen como consecuencia la activación de proteínas, factores de transcripción y genes que rigen cada aspecto de la vida celular. A pesar de la diversidad de señales: factores neurotróficos, actividad eléctrica, etc. que llegan a las neuronas, muchas comparten la activación de las mismas vías de señalización. La utilización de técnicas bioquímicas, de biología molecular y celular han permitido elucidar vías de señalización que rigen procesos neuronales básicos para la supervivencia neuronal.

3.3.1 Vía de la PI3K/Akt/mTor

La activación de esta vía de señalización intracelular está relacionada con la inhibición de la apoptosis y la supervivencia neuronal. Como se ha mencionado anteriormente, la fosforilación de determinados residuos tirosina del dominio intracelular de los receptores de los factores neurotróficos induce el reclutamiento de proteínas adaptadoras, como por ejemplo: Shc, Shp2 y Grb2. Una de ellas, Grb2, posee dominios SH3, los cuales interactúan con otra proteína adaptadora llamada Gab1. Ésta se transloca a la membrana y es fosforilada por la actividad tirosina quinasa del receptor, originándose centros SH2 que pueden ser reconocidos por la proteína PI3K. La acción de esta proteína se realiza básicamente en la parte intracelular de la membrana neuronal.

PI3K contiene dos subunidades p85 o unidad reguladora y p110 o unidad catalítica. La unión de p85 a los residuos SH2 de Gab1 y su posterior fosforilación en dos residuos tirosina, provoca un cambio de conformación en p110, la cual se activa y se encarga de generar moléculas de fosfatidil inositol (PIP) hiperfosforiladas (PIP_3 i PIP_2). La fosforilación de estas moléculas genera lugares de unión a dominios plecstrina de las proteínas. PIP_3 se une a los dominios plecstrina de PDK-1 y la quinasa serina-treonina Akt y provoca su translocación a la membrana plasmática.

Akt es fosforilada en sus residuos Thr308 por PDK1 activa, y Ser473 por diversas quinasas (el complejo de proteínas mTOR-Rictor-G β L, la propia Akt, la ILK (integrin-linked kinase), la *DNA-dependent protein kinase*, etc.). La fosforilación de PKB implica

su activación y como consecuencia se produce la fosforilación de sus sustratos (todos ellos disponen de la secuencia consenso RXXR(S/T) flanqueada por residuos hidrofóbicos) o su interacción con otras moléculas. En las neuronas la activación de Akt generalmente resulta en supervivencia y diferenciación celular a la vez que bloquea la muerte apoptótica (LoPiccolo et al. 2008, Frebel and Wiese 2006).

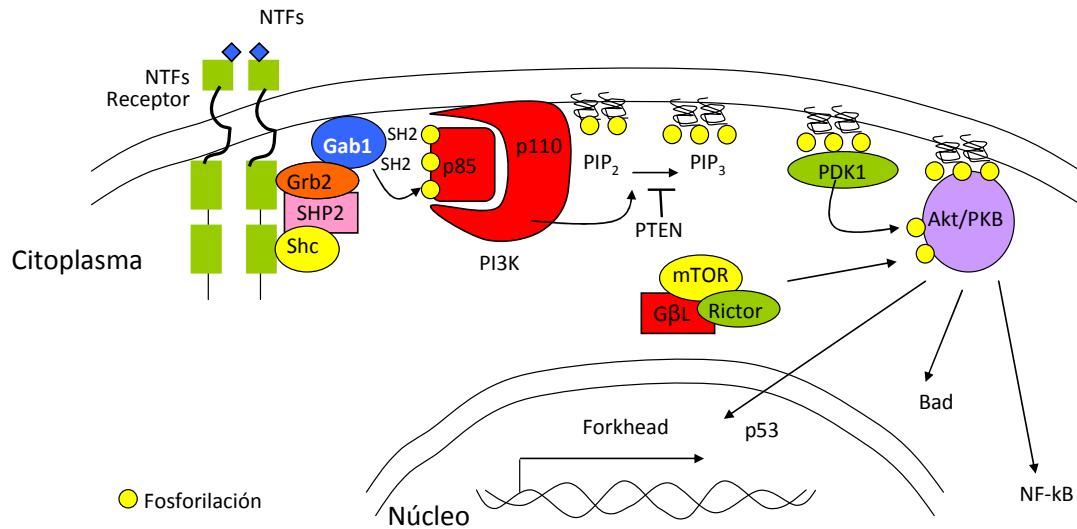


Figura 21. Esquema de la señalización PI3K/Akt.
Adaptado de (Sarbasov, Ali and Sabatini 2005).

Muchos de los sustratos de Akt están implicados en procesos de apoptosis y se han identificado diversos mecanismos a través de los cuales Akt inhibe la muerte celular. La acción de Akt puede desarrollarse como elemento inhibidor de moléculas pro-apoptóticas mediante su fosforilación (Bad, Bax, Caspasa-9) o su interacción (Htra2/Omi, AIF), o bien como elemento activador de moléculas que regulan negativamente la apoptosis (hexoquinas). Akt también puede desplazarse al núcleo donde inhibe la condensación y fragmentación del ADN regulando negativamente la transcripción de las moléculas responsables de estas acciones (acinus y CAD) (LoPiccolo et al. 2008, Frebel and Wiese 2006). Existen distintas isoformas de Akt (Akt α , Akt β , Akt γ), los ratones deficientes de Akt γ muestran una reducción en el tamaño del cerebro (Tschopp et al. 2005). Esta isoforma de Akt es la que se encuentra mayoritariamente expresada a nivel del SNC. Estos estudios también han permitido establecer que pequeñas cantidades de Akt activa son suficientes para bloquear la apoptosis, pero las células que se encuentran bajo situaciones de estrés requieren más cantidad de Akt para poder sobrevivir. En resumen, la activación de Akt constituye un elemento regulador central de los mecanismos intracelulares implicados en la supervivencia de las neuronas mediada por los factores neurotróficos y constituye una de las dianas terapéuticas en los procesos de neurodegeneración.

3.3.2 Vía de la Ras/MAPK/ERK

La vía de señalización de las extracelular signal-regulated kinase (ERKs) se ha implicado en distintos procesos celulares como son la diferenciación, la proliferación, la plasticidad sináptica, el estrés y la apoptosis. Puede activarse a partir de receptores con actividad tirosina quinasa, receptores de integrinas, receptores ligados a la proteína G y por mensajeros como el ión Ca^{2+} . La activación del receptor por unión con su ligando implica la activación de unas proteínas con actividad GTPasa (p21Ras, Rap) que se encargan de activar la proteína Raf. Las quinasas Raf (en particular B-Raf) activas fosforilan y activan las MAPKs (Raf fosforila la MAPK MKK1/2 la cual se encarga de fosforilar las ERKs; la activación final de ERK comporta su translocación nuclear donde activará otras proteínas quinasas como p90rsk (Williamson et al. 2006) y factores de transcripción como CREB, c-Myc, Elk1, ATF-2 y c-Jun entre otros), o interaccionan con otras proteínas como Bag1 (Frebel and Wiese 2006).

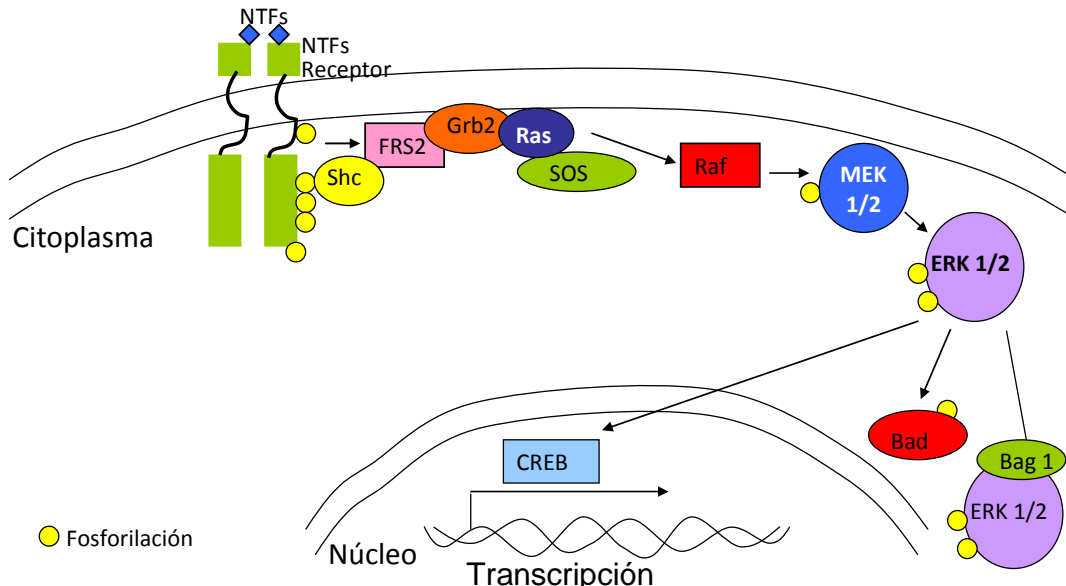


Figura 22. Esquema de la vía de señalización Ras/MAPK.

Modificado de (Bodart 2010).

Una de las dianas centrales de la activación tanto de la vía de señalización PI3K y como de ERK/MAPK, es la fosforilación de la proteína pro-apoptótica Bad favoreciendo que pueda ser secuestrada por las proteínas 14-3-3 (Bonni et al, 1999). Bad forma parte de la familia de proteínas relacionadas con Bcl2. Cuando se halla en forma no fosforilada, se encuentra interaccionando con proteínas anti-apoptóticas, induciendo el proceso que conduce a la muerte apoptótica de las células. Una vez se fosforila interactúa con proteínas 14-3-3 y permite la liberación de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 o Bcl-xL, las cuales impedirán la salida del citocromo C de la

mitocondria y la activación de las caspasas, en definitiva la muerte apoptótica de la célula. Así pues favorecen la supervivencia celular inhibiendo la ruta apoptótica.

3.3.3 Vía de las JNKs/SAPKs

Hay tres genes de JNK (*c-Jun N-terminal protein kinases or stress activated protein kinases, SPAKs*): JNK1, JNK2 y JNK3. JNK1 y JNK2 son ubicuas pero JNK3 se expresa únicamente en sistema nervioso, corazón y testículos. No obstante, se obtienen unas 10 isoformas distintas por splicing alternativo de los transcritos de estos genes. Cada JNK se expresa en forma de proteína corta (46 KDa) y larga (54 KDa) y se activan en situaciones de estrés como son la privación trófica, excitotoxicidad, irradiación ultravioleta, hipoxia y en la etapa de PCD (Mielke and Herdegen 2000, Ribera, Ayala and Casas 2007). Por lo tanto, en determinadas ocasiones la activación de esta vía esta estrechamente relacionada con la acción de los estímulos perjudiciales para las células, (Herdegen and Leah 1998).

Igual que las vías de las MAPKs, las JNKs forman parte de un módulo de 3 quinasas. MKK4 y MKK7 serían las responsables de activar la JNK fosforilandola a nivel de la secuencia de activación TXY. También existen las JIP's (JNK interacting proteins) que se encargan de secuestrar las proteínas quinasas necesarias para la activación de las JNKs. Una vez activadas, las JNKs fosforilan/activan proteínas a nivel citoplásmico y nuclear. En el citosol AP-1 interacciona con la proteína pro-apoptótica p53 y la estabiliza. En el núcleo, las JNKs fosforilan c-Jun, que actúa como componente del factor de transcripción nuclear AP-1, el cual se encarga de regular la transcripción de genes implicados en apoptosis. JNK activa también se ha descrito que puede inactivar las proteínas Bcl-2 y Bcl-xL mitocondriales hecho que conlleva la activación de las caspasas efectoras de muerte celular.

La implicación de las JNK en la apoptosis se ha demostrado a través del ratón knockout de JNK3. Habitualmente, el tratamiento de animales de experimentación con ácido kaínico provoca la muerte apoptótica de las neuronas del hipocampo mientras que en el ratón JNK3 knockout estas células son resistentes a la muerte, revisado en (Johnson and Nakamura 2007).

Además de activarse en situaciones perjudiciales para las células, también se ha descrito que c-jun puede activarse en situaciones de neuroprotección y regeneración axonal (Raivich et al. 2004). ATF2 y ATF3 son proteínas de la familia de los factores de transcripción ATF/CREB que se expresan diferencialmente en situaciones de lesión (si se realiza una axotomía la expresión de ATF3 aumenta mientras la de ATF2 disminuye); c-jun al unirse a **ATF2** relacionaría la vía de las JNK con **supervivencia celular** mientras

que al unirse a **ATF3** conduciría a la activación de **vías de muerte celular** (Takeda et al. 2000).

3.3.4 Vía de la PLC- γ /PKC

La activación de PLC- γ tiene lugar a través de los receptores con actividad tirosina quinasa, como Ret o Trk. PLC- γ se une a tirosinas específicas en la parte intracelular del receptor gracias a los dominios SH2. Esta unión provoca la fosforilación y la activación de la proteína (Obermeier et al. 1994).

PLC- γ promueve la hidrólisis de los PtdIns(4,5)P₂ (fosfatidil inositoles bifosfato) para generar inositol 3-fosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG), (Figura 23).

El DAG junto con el Ca²⁺ actúa de cofactor de la proteína quinasa C (Protein Kinase C, PKC) (Berridge 1993). Por su parte, IP₃ se une a los receptores de inositol-1-4-5-trifosfato (Inositol- 1-4-5-triphosphate, InsP₃R), promoviendo la liberación de Ca²⁺ de los reservorios intracelulares (revisado por (LaFerla 2002). Estos incrementos de Ca²⁺ activan a su vez otras proteínas implicadas en la supervivencia y la diferenciación, como algunas isoformas de la proteína quinasa C (PKC) y las quinasas reguladas por Ca²⁺/Calmodulina (CaMK), así como la propia Calmodulina. En neuronas, los incrementos de Ca²⁺ intracelular después de la activación de los receptores Ret o TrkB y la consecuente activación de la Calmodulina son eventos necesarios para la activación tanto de PI3K, como la vía de las ERKs (Egea et al. 2000, Becker et al. 1998, Soler et al. 1998).

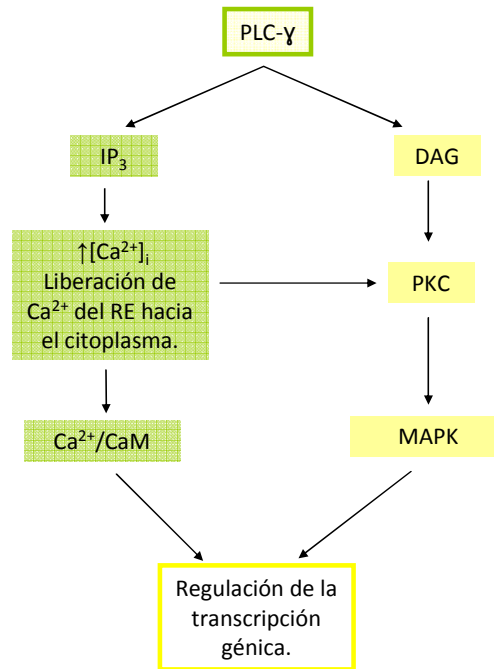


Figura 23. Esquema de la vía PLC- γ .

3.3.5 Vías de señalización por Calmodulina/CaMK

Uno de los principales efectores del incremento en la concentración de Ca²⁺ intracelular es la activación de la proteína CaM. Esta proteína está altamente conservada entre las diferentes especies; tiene 148 aminoácidos y un peso molecular de aproximadamente 16.6 kDa. Es una proteína adaptadora de expresión citosólica y ubicua que actúa como mediadora de la señal a consecuencia del incremento de Ca²⁺

intracelular, (revisado en (Clapham 2007)). La estructura tridimensional de la CaM comprende dos dominios globulares con 2 motivos *EF-hand* cada uno, separados por una alfa-hélice flexible. Los 4 dominios *EF-hand* tienen diferentes afinidades por el ión Ca^{2+} (Meador, Means and Quioco 1992, Meador, Means and Quioco 1993).

En el sistema nervioso CaM se ha implicado en procesos como la biosíntesis de neurotransmisores (Griffith and Schulman 1988), la extensión neurítica (Liu and Storm 1990), el acoplamiento de elementos del citoesqueleto (Wang et al. 1985) y la plasticidad neuronal (Tokumitsu et al. 2010). En respuesta a aumentos de los niveles de Ca^{2+} intracelular cada dominio globular de la CaM adopta una conformación abierta, exponiendo el bolsillo hidrofóbico que le permite la unión a las secuencias diana de diversas proteínas y modificar su función (revisado en (Clapham 2007)). Entre las proteínas reguladas por la CaM se encuentran canales iónicos, proteínas relacionadas con el ciclo celular, elementos implicados en la organización del citoesqueleto, adenilato ciclasa, fosfodiesterasas, ATPasas y proteínas quinasas (como las ***Ca²⁺-CaM dependent kinases, CaMKs***) (revisado en (Clapham 2007)). Se han desarrollado inhibidores farmacológicos específicos que bloquean la activación de CaM (W12, W13, W5 y W7) para estudiar su función y su implicación en vías de señalización (Hidaka, Asano and Tanaka 1981, Hidaka and Shikano 1983, Tanaka, Ohmura and Hidaka 1983). De las CaMKs, está bien establecido que a nivel de SN, CaMK-II actúa modulando la plasticidad sináptica, el aprendizaje y la memoria. No obstante estudios recientes indican que algunas de estas acciones atribuidas a CaMK-II estarían mediadas además por otros miembros de la familia como CaMKI y CaMKIV (revisado en (Wayman et al. 2008)).

En nuestro trabajo hemos estudiado la implicación de la **CaMKIV** en la supervivencia de las MNs espinales. CaMKIV pertenece a la familia de las CaMKs. Esta familia de proteínas particularmente abundantes en el cerebro, son un grupo de enzimas con actividad Serina-Treonina quinasa activadas por unión a complejos Ca^{2+}/CaM y la consecuente fosforilación. Las CaMKs tienen una estructura característica que consta de un dominio catalítico, seguido de un dominio de unión a CaM (denominado calmodulin binding domain, CBD) y solapando a este último dominio, el dominio autoinhibitorio (autoinhibitory domain, AID), (revisado en (Wayman et al. 2008)), ver Figura 24.



Figura 24. Estructura de las CaMKs.

CaMKIV participa en la expresión de diferentes genes regulados por Ca^{2+} , a través de la fosforilación de factores de transcripción como ATF-1 o CREB (Hook, SS y Means, AR 2001), además también se ha descrito su implicación en la activación de NF-kappaB (Jang et al. 2001). En neuronas despolarizadas, CaMKIV contribuye especialmente en la fosforilación del factor CREB, desempeñando una función importante en la regulación de la memoria y la plasticidad sináptica (Kang et al. 2001) y en procesos de crecimiento neurítico (Tai et al. 2008, Zhou et al. 2008) (Figura 25). Se han descrito otras funciones para CaMKIV fuera del SN, como su participación en la espermatogénesis (Wu et al. 2000), en la hipertrofia cardíaca (Passier et al. 2000) y en la biogénesis de las mitocondrias del músculo esquelético (Wu et al. 2002).

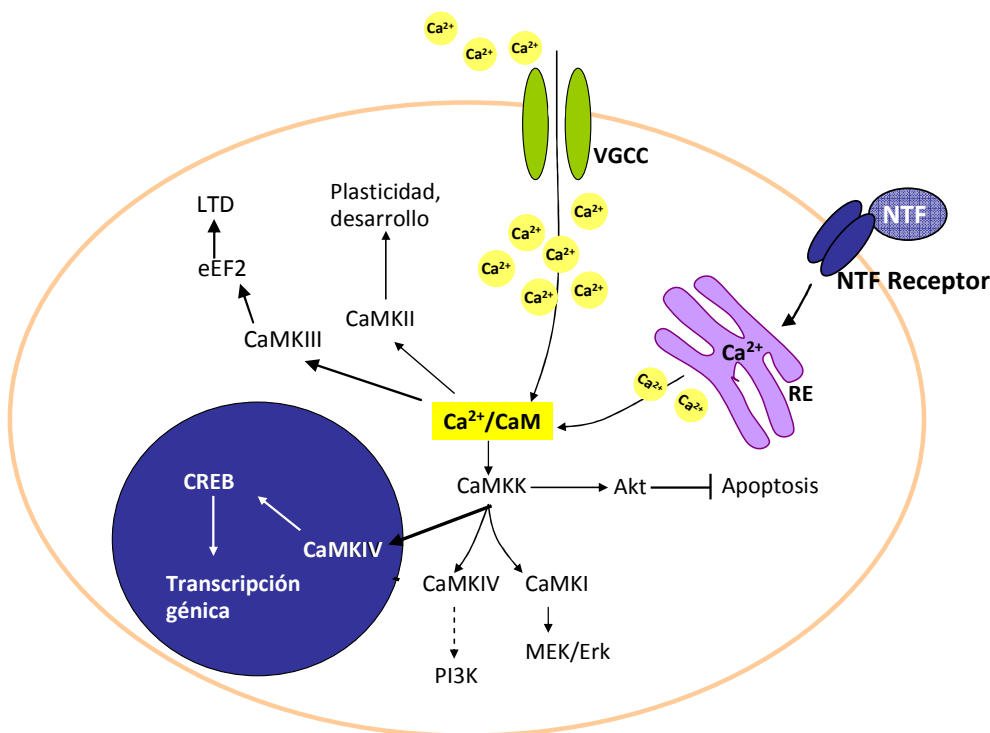


Figura 25. Esquema de las principales vías de señalización activadas por Ca^{2+}/CaM . Esquema modificado de (Wayman et al. 2008).

4. VULNERABILIDAD ESPECÍFICA DE LAS MNs ESPINALES

Existen diversas patologías neurodegenerativas caracterizadas por la muerte selectiva de las MNs. Algunas de estas enfermedades están causadas por mutaciones de proteínas de expresión ubicua, como por ejemplo la forma familiar de Esclerosis Lateral Amiotrófica (ALS, del inglés *Amiotrophic Lateral Sclerosis*) causada por formas mutadas de la proteína SOD1 o la Atrofia Muscular Espinal (SMA, del inglés *Spinal Muscular Atrophy*) causada por mutaciones asociadas a la pérdida de función o deleción del gen *SMN1*. Estas enfermedades comportan principalmente afectación de la movilidad, respiración y en la mayoría de los casos conducen a un desenlace fatal. Actualmente no existe tratamiento curativo para estas enfermedades. No obstante, el estudio de las MNs de pacientes y modelos de laboratorio han revelado mecanismos desencadenantes de muerte de las MNs y han puesto de manifiesto tanto puntos de vulnerabilidad específica, como moléculas candidatas para posibles terapias. El modelo de trabajo de nuestro grupo, el cultivo primario de MNs aisladas, es un buen modelo para estudiar características específicas de las MNs espinales frente a condiciones patológicas de las enfermedades que afectan específicamente las MNs, como por ejemplo la sobre-expresión del gen que codifica para *SOD1* mutado o la inhibición de expresión de *SMN*. Por ello, en el laboratorio hemos establecido un modelo de estudio de SMA en MNs aisladas en cultivo.

En esta sección mostramos mecanismos de degeneración de las MNs identificados en distintas patologías y genes implicados. Al final de esta sección aparece un breve glosario de las diferentes enfermedades de las MNs que nombramos (Lambrechts, Robberecht and Carmeliet 2007).

4.1 MECANISMOS DE DEGENERACIÓN DE LAS MOTONEURONAS

Las MNs son células polarizadas que consisten en un soma con dendritas cortas y un único axón que en humanos puede llegar a medir un metro de longitud. La habilidad de las MNs para mantener esta morfología especializada las hace más dependientes de ciertos factores comparado con otras células. Muchas de las enfermedades de las MNs son causadas por mutaciones genéticas de proteínas ubicuas (*SMN* para SMA, *SOD1* en algunos casos de ALS). Todavía no se puede explicar con precisión el porqué alteraciones que ocurren a nivel de todas las células del organismo afectan selectivamente a las MNs. En este apartado revisaremos algunos mecanismos celulares y moleculares descritos que confieren vulnerabilidad específica en las MNs.

4.1.1 Características moleculares y vulnerabilidad específica de las MNs

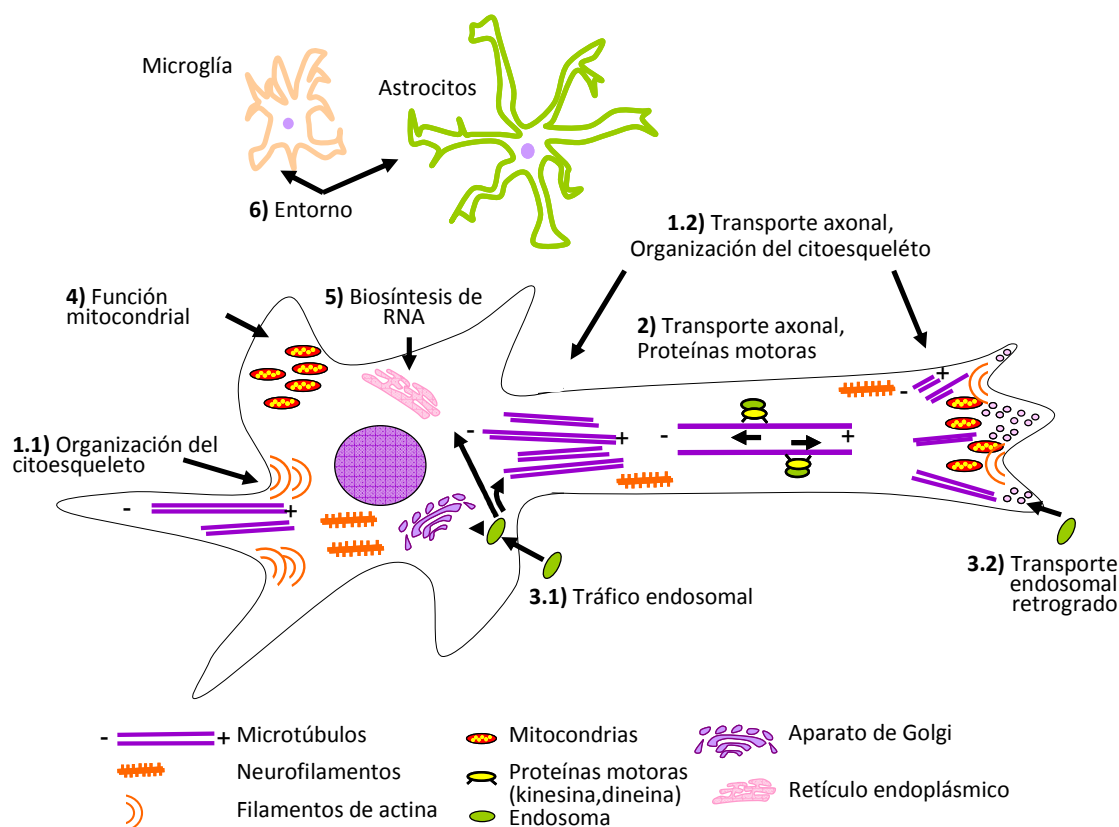


Figura 26. Áreas de vulnerabilidad de las MNs.

La identificación de genes que causan enfermedades de las MNs han puesto de manifiesto las áreas de vulnerabilidad de estas neuronas. Procesos críticos que se ven interrumpidos o afectados en las enfermedades de las MNs son: el tráfico endosomal y transporte axonal, ensamblaje del citoesqueleto, funcionamiento mitocondrial, procesamiento del RNA y el entorno de las MNs (células gliales, otras neuronas, células musculares), todos ellos influyen la severidad del fenotipo de la degeneración de las MNs. Modificado de (Diether Lambrechts et al. 2007).

4.1.1.1 Defectos en el citoesqueleto neuronal

La organización del citoesqueleto (complejas redes de microtúbulos, filamentos de actina y neurofilamentos (NF)) es vital para las MNs. Alteraciones en él conllevan la disrupción del transporte axonal generando consecuencias fatales. La mayoría de proteínas del terminal sináptico se sintetizan en el soma y se transportan a lo largo del axón o se transporta su mRNA para traducir a proteína en el terminal del axón. Una disrupción de este transporte causa la degeneración de la MN. Diversos estudios en enfermos y modelos de enfermedad de la MN revelan alteraciones del citoesqueleto.

Los **neurofilamentos (NF)** son las proteínas estructurales más abundantes en las neuronas. Existen tres subunidades: NF pesado NF-H, medio NF-M y ligero NF-L. Estas subunidades se ensamblan formando una estructura filamentosa que determina el calibre del axón y la integridad celular. Mutaciones en las diferentes subunidades se han relacionado con distintas enfermedades de las MNs. Por ejemplo, mutaciones

heterocigotas en **NF-L** causan Charcot Marie Tooth (CMT), mientras que mutaciones en la subunidad **NF-H** pueden causar ALS. Además, en modelos animales de ALS se detectan acumulaciones de NF en el soma y axones proximales de las MNs espinales (Mizusawa et al. 1989, Gurney et al. 1994). En modelos de SMA se observan acumulaciones de NF en las uniones neuromusculares (Cifuentes-Diaz et al. 2002, Murray et al. 2008a).

Aparte de los NF, se han implicado diferentes genes y proteínas que regulan la estabilidad de otros componentes del citoesqueleto que indican una vulnerabilidad específica en las MNs, ejemplos de ello son: *Stathmin* una proteína desestabilizadora de **microtúbulos** que se encuentra aumentada en SMA, y las mutaciones en genes como *spastin (SPG4)* y *vesicle-trafficking protein-B (VAPB)*, proteínas que afectan la integridad de la red sináptica de microtúbulos también están asociadas con la muerte de las MNs (Pennetta et al. 2002, Errico et al. 2004, Trotta et al. 2004). Por otro lado, mutaciones que afectan a **ALSIN**, un factor de intercambio de nucleótidos de guanina que activa **Rac1**, proteína que a su vez regula la dinámica de **actina** en los conos de crecimiento, se han relacionado con formas juveniles de ALS y PLS, y con formas infantiles de HSP (revisado en (Lambrechts et al. 2007)). En el caso de SMA, en un modelo murino de SMA se observa una disrupción de la dinámica del citoesqueleto de actina (Bowerman et al. 2009).

4.1.1.2 Defectos de los motores moleculares del transporte axonal

Las superfamilias de los motores moleculares, quinesinas y dineinas, ejecutan el transporte axonal moviéndose sobre las redes de microtúbulos. La afectación de estos motores moleculares altera la homeostasis sináptica y contribuye a la degeneración de las MNs debido a su morfología altamente polarizada y a la longitud de sus axones. Dependiendo si se interrumpe el transporte anterogrado o el retrógrado las MNs se afectan de forma diferencial. Alteraciones de las proteínas motoras responsables del **transporte** anterogrado (**Kinesinas**) resultan en déficit energético a la región terminal del axón, puesto que se afecta el transporte mitocondrial, de vesículas y otras proteínas esenciales hacia el terminal sináptico. Por otro lado, las alteraciones en proteínas motoras responsables del **transporte retrogrado (Dineinas)** resultan en interrupción de la señalización por los factores neurotróficos producidos por las células diana que son esenciales para la supervivencia y mantenimiento neuronal.

Respecto a la familia de las quinesinas se han identificado mutaciones en:

- ✓ **KIF1B** (proteína encargada de transportar precursores de vesículas sinápticas) en una familia con *Charcot Marie Tooth's disease* (Zhao et al. 2001, Bissar-Tadmouri et al. 2004).

- ✓ **KIF5A** en individuos que padecen paraplegia espástica hereditaria (HSP) (Reid et al. 2002).

Respecto al transporte retrógrado se han identificado diferentes mutaciones que se asocian con la vulnerabilidad específica de las MNs, algunas de ellas son:

- ✓ **Dinactina (DCTN1)**, (Puls et al. 2003), se han encontrado mutaciones de este gen en pacientes de ALS.
- ✓ **Dineína**, la disrupción de esta proteína conlleva pérdida de MNs. Puesto que las neurotrofinas producidas por el tejido diana se unen a sus receptores específicos, los complejos receptor-ligando se internalizan por endocitosis dependiente de Clatrina y se translocan retrógradamente de forma dependiente de dineína hacia el soma para transmitir su señal de supervivencia al soma de las MNs; alteraciones de dineína conducen a una disminución de la señalización del soporte trófico y desencadenan en formas de aparición tardía de ALS (Hafezparast et al. 2003). No obstante, la disrupción de dineína en el modelo de ALS de ratón hSOD1²⁹³, atenúa la pérdida de MNs y alarga la esperanza de vida. Este hecho podría explicarse porque la disminución del transporte retrógrado en este modelo reduciría el transporte de proteína SOD1 mutada (Kieran et al. 2005).

4.1.1.3 Defectos en el tráfico endosomal

Durante la endocitosis los receptores y proteínas de membrana se internalizan en endosomas y estos se dirigen hacia otros compartimentos celulares para propagar la señalización intracelular o hacia lisosomas para su degradación. Por ello alteraciones en el tráfico endosomal pueden resultar en efectos opuestos: propagación o atenuación de la señal. Ambos efectos, alteración en la propagación de señal e interrupciones en el tráfico endosomal inducen muerte de MNs.

Genes implicados en la homeostasis de las MNs implicados en tráfico endosomal son:

- ✓ **ALSIN**, activa a **RAB5**, miembro de la familia superfamilia RAB GTPasa (*Ras-related protein*), estimula la formación de endosomas y la internalización, transporte y anclaje de complejos de receptores activados (Topp et al. 2004). Así pues, las mutaciones en este gen relacionadas con algunos casos de ALS, PLS y HSP, alteran el tráfico endosomal y la propagación de señales intracelulares. Por otro lado, mutaciones heterocigotas en el gen **RAB7**, esencial para la biogénesis de lisosomas, causan CMT (Verhoeven et al. 2003).
- ✓ **Vacuolar protein sorting 54 homolog (VPS54)**, proteína implicada en el transporte retrogrado endosomal hacia el Golgi. Mutaciones de este gen causan muerte de MNs en los ratones *Wobber* (Schmitt-John et al. 2005).

- ✓ **Chromatin-modifying protein 2B (CHMP2B)**, importante para la internalización endosomal, se encuentra alterado en pacientes con demencia frontotemporal y en algunos pacientes que padecen ALS (Skibinski et al. 2005).

4.1.1.4 Toxicidad mitocondrial

Las mitocondrias son orgánulos de vital importancia para las células por sus funciones básicas como la generación de ATP, la regulación de los niveles de Ca^{2+} citoplásmico y el control de los niveles de oxidación. La morfología y la actividad eléctrica de las MNs las hacen especialmente dependientes de un correcto funcionamiento mitocondrial.

En las MNs, las mitocondrias, están presentes en el soma y neuritas, pero se observa una mayor acumulación en los terminales sinápticos, hecho que refleja la elevada demanda de energía y *buffer* de calcio que requieren estas estructuras.

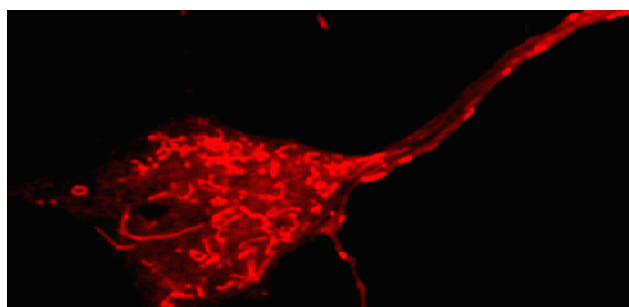


Figura 27. MNs en cultivo, mitocondrias funcionales (rojo).

Es importante destacar que mutaciones que afectan al genoma mitocondrial conllevan desordenes neurológicos serios que raramente afectan a las MNs; mientras que mutaciones en genes mitocondriales codificados a nivel nuclear causan típicamente muerte de las MNs, algunos ejemplos de ello son:

- ✓ **Mutaciones en el gen paraplegin (SPG7)**, gen mutado en HSP, causan axonopatía distal con acumulo de mitocondrias a los terminales axonales. Esta proteína procesa la proteólisis de la proteína ribosómica mitocondrial L32 (MRPL32) implicada en el ensamblaje de ribosomas mitocondriales (Nolden et al. 2005).
- ✓ **Mutaciones en mitofusina-2 (MFN2)**, producen alteración del transporte mitocondrial en los axones causando varias formas de CMT (Baloh et al. 2007). MFN2 se localiza en la membrana mitocondrial externa dónde regula los procesos de fisión y fusión (Züchner et al. 2004).
- ✓ **La proteína SOD1**, habitualmente se encuentra en el citosol dónde ejerce una función antioxidante, pero la forma mutada presente en enfermos de ALS y en el modelo murino, se acumula en el espacio intermembrana y en la matriz mitocondrial en los tejidos afectados por la enfermedad, mientras que en aquellos tejidos que no se ven afectados no se acumula. La localización mitocondrial de la

forma mutada de SOD1 interfiere su funcionamiento: altera la maquinaria de translocación, aumenta la generación de radicales libres (peróxido de hidrógeno y peroxinitrito (revisado en (Rothstein 2009)), forma agregados que promueven la vacuolización de la membrana mitocondrial externa y causa una reducción de la actividad respiratoria. Además, la proteína SOD1 mutada puede unirse a la proteína Bcl-2 bloqueando su actividad antiapoptótica. El modelo de ratón SOD1 para el estudio de ALS presenta un metabolismo energético alterado, acompañado de la liberación de factores apoptóticos de la mitocondria. En periodos tempranos del desarrollo de la enfermedad, ya se detectan vacuolas en las mitocondrias, este hecho indica que el daño a nivel mitocondrial contribuye a la muerte de las MNs.

Por otro lado también se han detectado alteraciones mitocondriales en SMA y Atrofia Muscular Espinal y Bulbar (SBMA) (Berger et al. 2003, Ranganathan et al. 2009, Acsadi et al. 2009).

4.1.1.5 Capacidad reducida de controlar los niveles de Calcio intracelulares

En general las MNs tienen **baja capacidad de buffer de Ca^{2+}** . Expresan cantidades muy reducidas de proteínas fijadoras de Ca^{2+} como Calbindina y Parvalbumina, que ayudan a controlar los incrementos de este ión. Esta característica es ventajosa en condiciones fisiológicas puesto que facilita una relajación rápida frente a los flujos de Ca^{2+} durante actividades rítmicas de alta frecuencia, pero en condiciones patológicas tiene un efecto potencialmente peligroso porque acelera la disrupción mitocondrial, e incrementa el daño excitotóxico. Además, la capacidad de *buffer* de Ca^{2+} de las subpoblaciones de MNs más afectadas en ALS (MNs espinales, faciales y del hipogloso) es mucho más reducida que las que tienen aquellas MNs que raramente se afectan en los enfermos (MNs del núcleo Onuf's, del nervio oculomotor, etc.) (revisado en (von Lewinski and Keller 2005)). Los *pools* de MNs menos afectadas en ALS expresan concentraciones mayores de Parvalbumina (Reiner et al. 1995). Se ha demostrado que la sobre-expresión de Parvalbúmina rescata MNs de la muerte inducida por axotomía (Dekkers et al. 2004), y también retrasa la aparición de la enfermedad en ratones SOD1 (Beers et al. 2001). Así pues, la capacidad de regular los niveles de calcio intracelular que tienen las MNs correlaciona con la vulnerabilidad que presentan en ALS (revisado en (von Lewinski and Keller 2005)).

Otro efecto que contribuye a un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular, es la presencia de proteínas mal plegadas que se acumulan en mitocondrias y retículo endoplásmico (generan estrés de retículo endoplásmico). Este hecho afecta a la función tamponadora que realizan estos orgánulos frente a excesos de los niveles de

Ca²⁺ intercelular. A su vez el aumento de los iones de calcio estimula la formación de agregados proteicos (Kim et al. 2007).

4.1.1.6 *Maquinaria del RNA*

Las MNs también presentan una sensibilidad única frente a defectos en la maquinaria de RNA. Genes y proteínas implicados en el procesamiento de RNA que se encuentran alterados en enfermedades que afectan específicamente a las MNs son:

- ✓ **Proteína *survival motorneuron (SMN)***, la enfermedad SMA está causada por niveles reducidos de esta proteína. SMN participa en funciones implicadas en splicing, biogénesis y transporte de RNA. Estudios recientes demuestran que SMN interacciona y transloca el mRNA de β -actina a los conos de crecimiento de los axones en las MNs (Rossoll et al. 2003, Bowerman et al. 2009, Carrel et al. 2006).
- ✓ ***Immunoglobulin μ -binding protein (IGHMBP2)***, asociada con SMA tipo-1 acompañada de insuficiencia respiratoria. Esta proteína contiene un dominio de unión a DNA y co-localiza con la maquinaria de RNA (Grohmann et al. 2001).
- ✓ ***Senataxin (SETX)***, se encuentra alterada en familias atípicas de ALS. Esta proteína también contiene un dominio de unión a DNA y co-localiza con la maquinaria de RNA (Chen et al. 2004).
- ✓ ***Glycyl y tyrosyl tRNA synthase (GARS y YARS)***, mutaciones en estas proteínas impiden a los tRNAs que se unan con sus ligandos afines. Se han detectado estas mutaciones en la neuropatía CMT (Jordanova et al. 2006). Así, defectos en la carga de los tRNAs parecen involucrados en la patogénesis de las MNs.
- ✓ ***Isoleucine-tRNA synthetase***, se han detectado mutaciones en el gen que codifica para esta proteína en un paciente con una forma de ALS atípica (Borthwick et al. 2006). Esta proteína interacciona con SOD1 mutada pero no con la forma wild type, así pues, la translación defectiva de RNA puede contribuir a ALS (Antonellis et al. 2006).

4.1.1.7 *Entorno celular*

Se han implicado diferentes tipos celulares en la degeneración específica de las MNs. El entorno celular de las MNs y su implicación en la degeneración de las mismas se ha documentado más profundamente en el modelo murino SOD1 que presenta un fenotipo atribuible a ALS. Para introducir este punto nos centraremos en este modelo. Los ratones quiméricos, que expresan SOD1 mutada y normal únicamente en las MNs, manifiestan una parálisis menos agresiva cuando las neuronas de su entorno expresan la forma no modificada (Boillée, Vande Velde and Cleveland 2006a). Además, la expresión de SOD1 mutada bajo varios promotores neuronales específicos es

insuficiente para causar la muerte de las MNs, mientras que la eliminación selectiva de SOD1 mutada de las MNs retrasa, pero no previene, la parálisis (Boillée et al. 2006b). Así, parece que hay factores externos a las MNs que pueden regular la homeostasis del entorno de las MNs e influir en la vulnerabilidad específica de estas células. Existen evidencias claras de la implicación de:

- ✓ Activación de la **astroglía y microglía, neuroinflamación**. Estas células pueden ejercer efectos beneficiosos (aporte trófico mantenimiento de la homeostasis del entorno), pero también dañinos (inflamación) para las MNs. La reducción de los niveles de la proteína mutada en microglía retrasa la progresión de la enfermedad en ratones SOD1 (Boillée et al. 2006b). Entre otras funciones las células de la glía se encargan de recoger los excesos de glutamato y potasio del medio extracelular adyacente a las MNs. Por ello, las mutaciones en los transportadores astrogliales de glutamato (EAAT2) y de potasio (KGNJ10, Kir4.1) conllevan **acumulación de glutamato y K⁺ en el medio extracelular** (Wilson et al. 2003, Banner et al. 2002, Kaiser et al. 2006b). El aumento de estos compuestos en el medio extracelular induce una entrada exagerada de Ca²⁺ en las MNs, y éstas degeneran. Por otro lado, los factores pro-inflamatorios TNF- α e INF- γ , contribuyen a la muerte de las MNs únicamente en presencia de células gliales, no en cultivos aislados de MNs (Mir et al. 2009).
- ✓ El **músculo esquelético** también proporciona factores de señalización que influyen la supervivencia, el crecimiento axonal y el mantenimiento de las conexiones sinápticas en las MNs. De hecho, la sobre-expresión de IGF1 o GDNF en tejido muscular de ratones mutantes SOD1 estabiliza las uniones neuromusculares y retrasa la muerte de las MNs (Dobrowolny et al. 2005), o retrasa el inicio de la enfermedad (Li et al. 2007). Los factores neurotróficos aportados por las células del entorno son importantes para la integridad de las MNs. Polimorfismos en un único nucleótido en VEGF y CNTF se han asociado con un aumento del riesgo de sufrir ALS. Además, deleciones del gen VEGF en ratones causan un fenotipo característico de enfermedad de la MN. Tanto en pacientes y modelos animales de ALS como de SMA, se han detectado niveles alterados de factores neurotróficos (GDNF, NT-3, IGF y CNTF entre otros) en fluido cerebroespinal y músculo (Ekester 2004, Murray et al. 2010).
- ✓ **Autoinmunidad**. Otro ejemplo que señala la vulnerabilidad de las MNs a incrementos elevados de Ca²⁺ a nivel intercelular. Se ha observado que en algunos pacientes de ALS existen IgGs contra VGCC que activan la entrada de calcio generando toxicidad a las MNs (Engelhardt 1995 y Offen (Engelhardt et al. 1995).

4.1.2 Mecanismos morfológicos observados durante la muerte de las MNs cuando se interrumpe el tráfico sináptico

Las MNs son neuronas altamente especializadas, responsables del control motor de los individuos. Este hecho las hace especialmente dependientes del tejido de inervación. Por ello, el mantenimiento y correcto funcionamiento de las uniones que establecen con el tejido muscular es vital para su supervivencia y las interrupciones axonales son generalmente fatales para estas neuronas. Los estudios más recientes indican que la rotura de la comunicación entre las MNs espinales y los músculos (uniones neuromusculares) conducen a la degeneración de las MNs. Acciones externas como un corte axonal, conducen a la muerte de las MNs conocida como degeneración Walleriana, mientras que aquellas alteraciones moleculares intrínsecas de las MNs o células musculares que alteran la sinapsis conducen a la degeneración de las mismas por un proceso de degeneración denominado *dying-back* (muerte hacia atrás).

4.1.2.1 Degeneración WALLERIANA

Degeneración de los axones precedida por trauma directo sobre el nervio. Parte del axón degenera sin afectar el soma neuronal, ocurre en MNs en que los axones que han sido seccionados y separados del soma (el axón degenera desde la parte del corte hasta el terminal sináptico), o por pinzamiento durante el tiempo suficiente para crear una lesión irreversible sobre el nervio (Beirowski et al. 2005). Se caracteriza por una fragmentación sináptica y axonal rápida con pérdida y alteración de organelas y membrana plasmática, rotura del recubrimiento mielínico axonal y fagocitosis de los restos de fragmentos de axones y de la sinápsis (Gillingwater and Ribchester 2001).

4.1.2.2 Degeneración por *dying-back*

Degeneración neuronal debida a alteraciones moleculares o tóxicas que alteran la comunicación soma-axón. Se caracteriza por una onda de degeneración que empieza en la parte distal de la neurona (terminal axónico) y prosigue retrógradamente hacia el soma. Este proceso ocurre en ausencia de fragmentación importante y fagocitosis (Gillingwater and Ribchester 2003). En las neuropatías de las MNs este fenómeno se traduce en una clínica de atrofia muscular simétrica.

A pesar de las diferencias morfológicas obvias entre la patología por *dying-back* y la degeneración Walleriana, se ha propuesto que mecanismos moleculares comunes podrían desencadenar ambas formas de degeneración sináptica y axonal (Coleman 2005). Esta sugerencia se basa parcialmente en las observaciones que demuestran que la mutación espontánea neuroprotectora *Wallerian Degeneration Slow (Wld^s)*, protege a los axones y a las sinapsis en: modelos de lesión que inducen degeneración

Walleriana en el CNS y PNS, y en algunos –pero no todos- modelos murinos con patologías de *dying-back* (Gillingwater et al. 2006, Lunn et al. 1989, Ferri et al. 2003). No obstante, un estudio reciente de ambos tipos de degeneración, en el modelo murino *Wasted* (que muestra degeneración de motoneuronas inferiores a etapas tempranas), ha revelado que la pérdida del factor de elongación **eEF1A2** causa el fenómeno patológico de *dying-back*. Este estudio ha demostrado que al menos en ciertas circunstancias los dos mecanismos de muerte pueden ocurrir por distintas vías moleculares (Murray et al. 2008b).

Los análisis de las MNs degenerantes en pacientes y modelos de ALS y SMA presentan evidencias morfológicas que indican que la muerte de estas células sigue un proceso degenerativo concordante con *dying-back* (Lesbordes et al. 2003, Kanning et al. 2010).

4.2 BREVE GLOSARIO DE ENFERMEDADES DE LAS MNs

4.2.1 Esclerosis Lateral Amiotrófica

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (**ALS**, del inglés Amyotrophic Lateral Sclerosis) es la enfermedad de las MNs más común en adultos. La enfermedad se manifiesta generalmente entre los 50 y 60 años, y tiene una incidencia de 2 de cada 100.000 individuos por año. Se caracteriza por una parálisis progresiva resultado de la muerte selectiva de MNs superiores (de la corteza motora) e inferiores (de la médula espinal y tronco cerebral). La esperanza de vida de los pacientes es de 2 a 5 años desde el diagnóstico de la enfermedad, aunque un 10% de los pacientes pueden presentar una evolución más lenta con una supervivencia superior a 10 años.

Las variantes clínicas pueden afectar inicialmente sólo las MNs espinales inferiores (variante de atrofia muscular progresiva, **PMA**), sólo a las MNs superiores (variante de esclerosis lateral primaria, **PLS**) o sólo la musculatura bulbar (variante de parálisis bulbar progresiva). Ciertos grupos de MNs, como los que controlan los movimientos oculares o los músculos pélvicos, resultan menos afectados por la enfermedad.

Únicamente un 10% de los casos de ALS son hereditarios, el resto son esporádicos y de etiología desconocida. No obstante, los casos genéticos de ELA han empezado a esclarecer mecanismos celulares de la patología puesto que derivan de mutaciones genéticas y han permitido la identificación de genes y proteínas afectadas. Aproximadamente el 20% de los casos de herencia familiar presentan mutaciones en el gen *SOD1*, también se conocen mutaciones que afectan a los genes *TARDBP* (codifica para la proteína **TDP-43**), *FUS/TLS* y *ANG* (codifica por angiogenina), *VARP*, etc. En algunos casos la enfermedad presenta un componente de autoinmunidad.

La identificación de componentes genéticos ha permitido desarrollar modelos animales de la enfermedad (en especies como ratones, ratas, pez zebra y *Drosophila*) que están siendo de vital importancia para esclarecer eventos patogénicos moleculares y morfológicos *in vivo*.

4.2.2 Atrofia Muscular Espinal

Enfermedad genética causada por la pérdida o mutaciones de pérdida de función del gen *SMN1*, que causa la degeneración de las MNs inferiores en la médula espinal. La SMA se caracteriza por debilidad de la musculatura proximal. Y tiene una prevalencia de 10 casos por cada 100.000 habitantes. El apartado 5 de la introducción dedica una explicación más detallada a esta enfermedad.

4.2.3 Charcot-Marie-Tooth's Disease

Comprende un grupo heterogéneo de neuropatías periféricas que afectan a los axones de motoneuronas y neuronas sensoriales. Causa debilidad y atrofia muscular en las extremidades distales y altera la sensibilidad. En base a las velocidades de conducción de los nervios motores, la neuropatía CMT puede dividirse en dos tipos: desmielinizante y axonal, aunque también existen formas intermedias. Tiene una prevalencia de 30-40 casos por cada 100.000 habitantes.

4.2.4 Hereditary Spastic Paraplegia

Enfermedad de la MN que se caracteriza por espasticidad en las extremidades inferiores causado por degeneración de los axones de los tractos córtico-espinales. Se afectan los axones ascendentes de las neuronas sensoriales y axones espino-cerebelares. Tiene una prevalencia de 1.5 - 9.6 casos por 100.000 habitantes.

5. ATROFIA MUSCULAR ESPINAL

La SMA es una enfermedad neuromuscular hereditaria caracterizada por la afectación de las MNs espinales, debilidad proximal simétrica y atrofia muscular progresiva. Es un trastorno autosómico recesivo causado por la alteración (ausencia o mutación) del gen Survival Motor Neuron 1 (*SMN1*) localizado en la región cromosómica 5q13. El locus SMA está duplicado y en la parte centromérica de este locus existe un gen homólogo conocido como Survival Motor Neuron 2 (*SMN2*). Mientras el gen *SMN1* está siempre alterado en los pacientes y es considerado el determinante de la enfermedad, el gen *SMN2* está siempre presente en diferente número de copias en los afectados, (Figura 28). Cuantas más copias de *SMN2*, en general es más benigno el fenotipo.

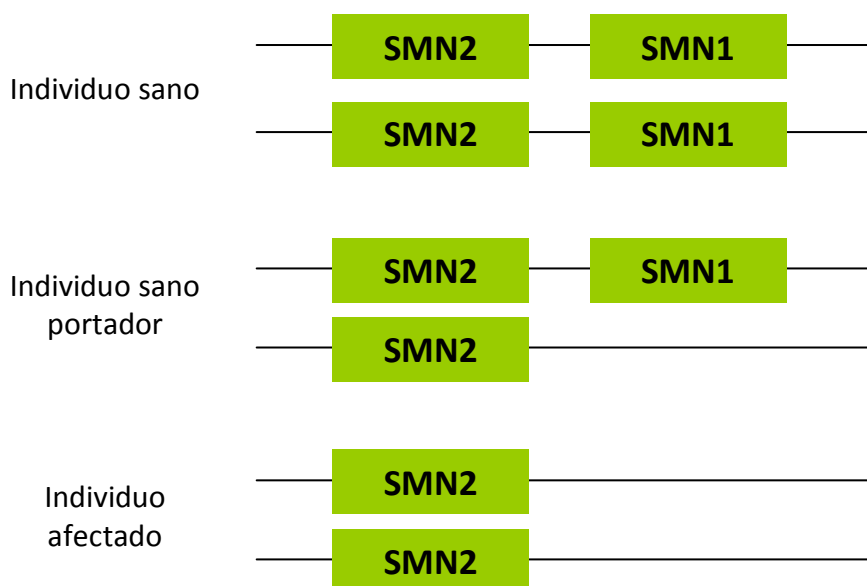


Figura 28. Los genes *SMN*.

Individuo sano, con cuatro copias de gen *SMN* (dos de *SMN1*, en la región telomérica y dos de *SMN2*, en la región centromérica del cromosoma 5). Individuo portador sano, con una copia del gen *SMN1* y dos de *SMN2*. Individuo afectado, sin copias de *SMN1* y dos de *SMN2*. La ausencia concomitante de *SMN1* y de *SMN2* es letal. El número de copias del gen *SMN2* en la población es variable.

En 1891 el neurólogo austriaco Guido Werdnig describió la enfermedad por primera vez en dos hermanos que padecían SMA proximal. Dos años después, Johan Hoffmann, neurólogo alemán, describió cuatro casos más de dos familias diferentes, en que los síntomas aparecían durante el primer año de vida. A mediados de los años 50, Kugelberg y Welander describieron 12 pacientes en que la enfermedad empezaba a presentarse entre los 2 y 17 años de vida.

En la actualidad la incidencia de esta enfermedad es de aproximadamente 1 de cada 6.000-10.000 nacimientos, constituyendo uno de los trastornos autosómicos recesivos letales más frecuente en la infancia y el segundo trastorno neuromuscular más frecuente después de la fibrosis quística (Pearn 1980). Además la frecuencia de portadores en la población general es muy elevada, aproximadamente 1 de cada 40-50 individuos son portadores (McAndrew et al. 1997). De acuerdo con estas cifras se calcula que en España existen más de 1.000 familias afectadas y que nacen de 60 a 80 casos nuevos por año, de los cuales la mitad tendrá la forma grave tipo I y fallecerá antes de los dos años de vida. Existen aproximadamente entre 800.000 y 1.000.000 de individuos portadores de la enfermedad en España.

5.1 CLASIFICACIÓN DE LOS TIPOS SMA

Debido a la diferencia en el grado de severidad, edad de aparición de los síntomas y evolución de la enfermedad de los enfermos, la SMA se clasifica en cuatro grupos (Figura 29) (Russman 2007):

5.1.1 SMA tipo I o enfermedad de Werdnig-Hoffmann

Se manifiesta en el momento del nacimiento o antes del sexto mes de vida. Los bebés afectados tienen una marcada disminución de los movimientos y del tono muscular. Nunca llegan a sentarse porque el tronco no alcanza a desarrollar la suficiente fuerza. Lo mismo les ocurre a los músculos respiratorios intercostales, por ello padecen complicaciones importantes de tipo respiratorio que conllevan un desenlace fatal (en general, mueren antes de los dos años de edad). También existen movimientos anormales de la lengua (fasciculaciones) y trastornos de deglución y alimentación.

5.1.2 SMA tipo II o forma intermedia

Los síntomas aparecen antes de los 18-24 meses de edad. Los niños con esta forma llegan a sentarse y hasta en algún momento ponerse de pie aunque siempre con ayuda. No pueden caminar y dependen de la silla de ruedas para moverse. La debilidad muscular causa una escoliosis muy importante y deformidad del tórax. La evolución y supervivencia dependen de muchos factores como una rehabilitación adecuada para evitar las contracturas, cirugía de escoliosis y ventilación mecánica no invasiva. Viven hasta la adolescencia o un poco más.

5.1.3 SMA tipo III o enfermedad de Kugelberg-Welander

Comienza a manifestarse después de los 18-24 meses e inclusive puede comenzar en la adolescencia. Los pacientes pueden sentarse y deambular por sus propios medios y posteriormente la debilidad se va haciendo más pronunciada. Algunos casos se estabilizan pero otros llegan a la edad adulta sin poder andar y precisan de silla de ruedas. La esperanza de vida es normal.

5.1.4 SMA tipo IV

Forma de aparición tardía (aparecen en adultos durante la segunda o tercera década de vida). Se caracteriza por un proceso de evolución lento y una afectación clínica lenta o moderada. No se ve afectada la esperanza de vida.

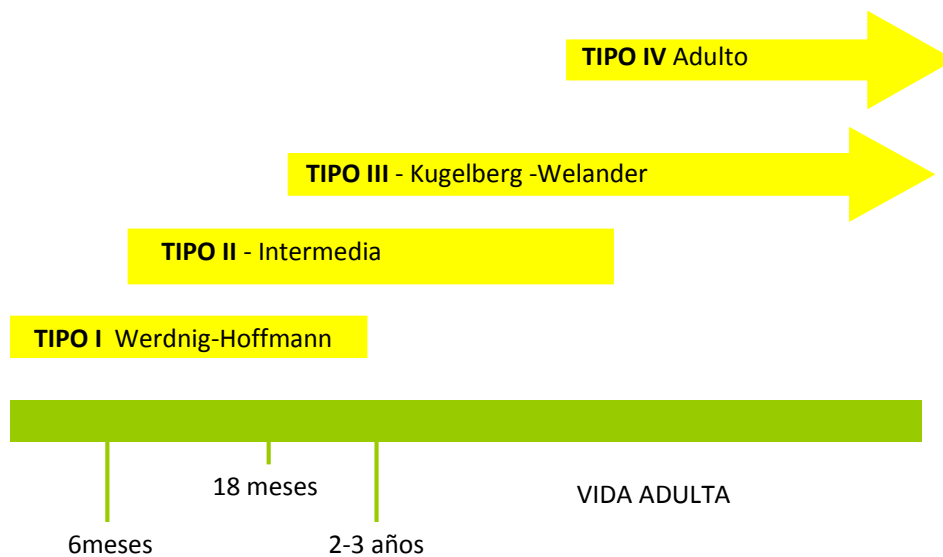


Figura 29. Esquema que contempla los tipos de SMA según la edad de aparición de los síntomas.

5.2 EL LOCUS SMA

El año 1990 se realizaron análisis de ligamiento genético de enfermos de los tipos I, II y III de SMA, se localizó la región que contenía el gen responsable de la enfermedad en el cromosoma 5 en la región q11.2-13.3 (Melki et al. 1990). Estudios posteriores permitieron obtener un mapa físico del *locus* responsable de la enfermedad (Figura 30). Es una región compleja que contiene una duplicación invertida de más de 500Kb con secuencias múltiples repetidas; esta característica hace que sea una región propensa a sufrir deleciones (Melki et al. 1994).

Se han identificado cuatro genes en esta región:

- ✓ Gen *SMN* (*Survival Motor Neuron*), (Lefebvre et al. 1995).
- ✓ Gen *NAIP* (*Neural Apoptosis Inhibitory Protein*).

- ✓ Gen *p44*, codifica para una subunidad del factor de transcripción basal TFIIF (Bürglen et al. 1996, Carter et al. 1997).
- ✓ Gen *SERF1* (*Small EDRK-Rich Factor*) de función desconocida (Scharf et al. 1998).

Estos cuatro genes están duplicados únicamente en el genoma humano presentando una copia telomérica y otra centromérica (Figura 30).

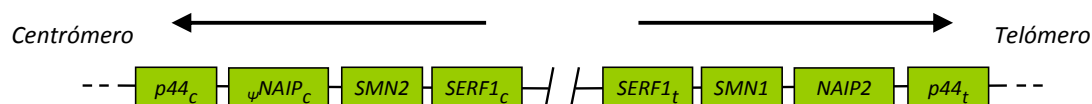


Figura 30. Esquema del locus SMA.

Se muestra la posición de los genes *p44*, *NAIP*, *SMN1* y *SMN2* y *SERF1*; ψ *NAIPc* indica pseudogen. Modificado de (Schmalbruch and Haase 2001).

En los enfermos de SMA se pueden detectar mutaciones de cualquier de estos genes, pero las cuatro formas de SMA están causadas por mutaciones en el gen telomérico *SMN1*, ya sea por delección, conversión génica o mutaciones puntuales.

5.3 EL GEN *SMN* (*SMN1* y *SMN2*)

El gen responsable de esta enfermedad se identificó en 1995 y se le denominó "survival motor neuron" (*SMN*) (Lefebvre et al. 1995). Como se ha mencionado, este gen está duplicado en los humanos, existiendo una versión telomérica (*SMN1*) y otra centromérica (*SMN2*) separadas por unas 500 kb en el brazo largo del cromosoma 5 (5q13). Prácticamente todos los enfermos de SMA presentan delecciones homocigotas, o mutaciones que conllevan la pérdida de función del gen telomérico *SMN1*. La delección homocigota de los genes *SMN1* y *SMN2* en un mismo individuo es letal a etapas embrionarias tempranas (Taylor et al. 1998).

Los genes *SMN1* y *SMN2* son 99.9% idénticos a nivel de secuencia (Monani et al. 1999). Tienen unas 20 Kb y presentan 9 exones. La diferencia esencial entre estos dos genes es un nucleótido del exón 7 (posición +6, codón 280) que en *SMN2* cambia de Citosina (C) a Timina (T). Este cambio no altera la secuencia de aminoácidos (aa), pero sí hace que el gen *SMN1* genere el transcrito completo (294 aa) mientras que, en la gran mayoría de casos, el transcrito correspondiente al gen *SMN2* carezca del exón 7 (reemplazando los 16 aa del extremo C terminal de los transcritos de *SMN1* correspondientes a aa codificados por el exón 7, por una secuencia de 4aa del exón 8), (Figura 31), ((Lorson and Androphy 2000, Kashima and Manley 2003)).

La exclusión del exón 7 es debida a la falta de reconocimiento como exón al potenciarse un ESS (*exonic splicing silencer*) (Kashima et al. 2007a, Kashima, Rao and Manley 2007b). Así *SMN2* transcribe mayoritariamente una proteína altamente

inestable que se degrada rápidamente (Burnett et al. 2009) y únicamente un 10% de los transcritos evitan el splicing alternativo y codifican para la proteína completamente funcional (*full-length SMN*). La pérdida de *SMN1* resulta en niveles reducidos de la proteína SMN en la mayoría de los tejidos.

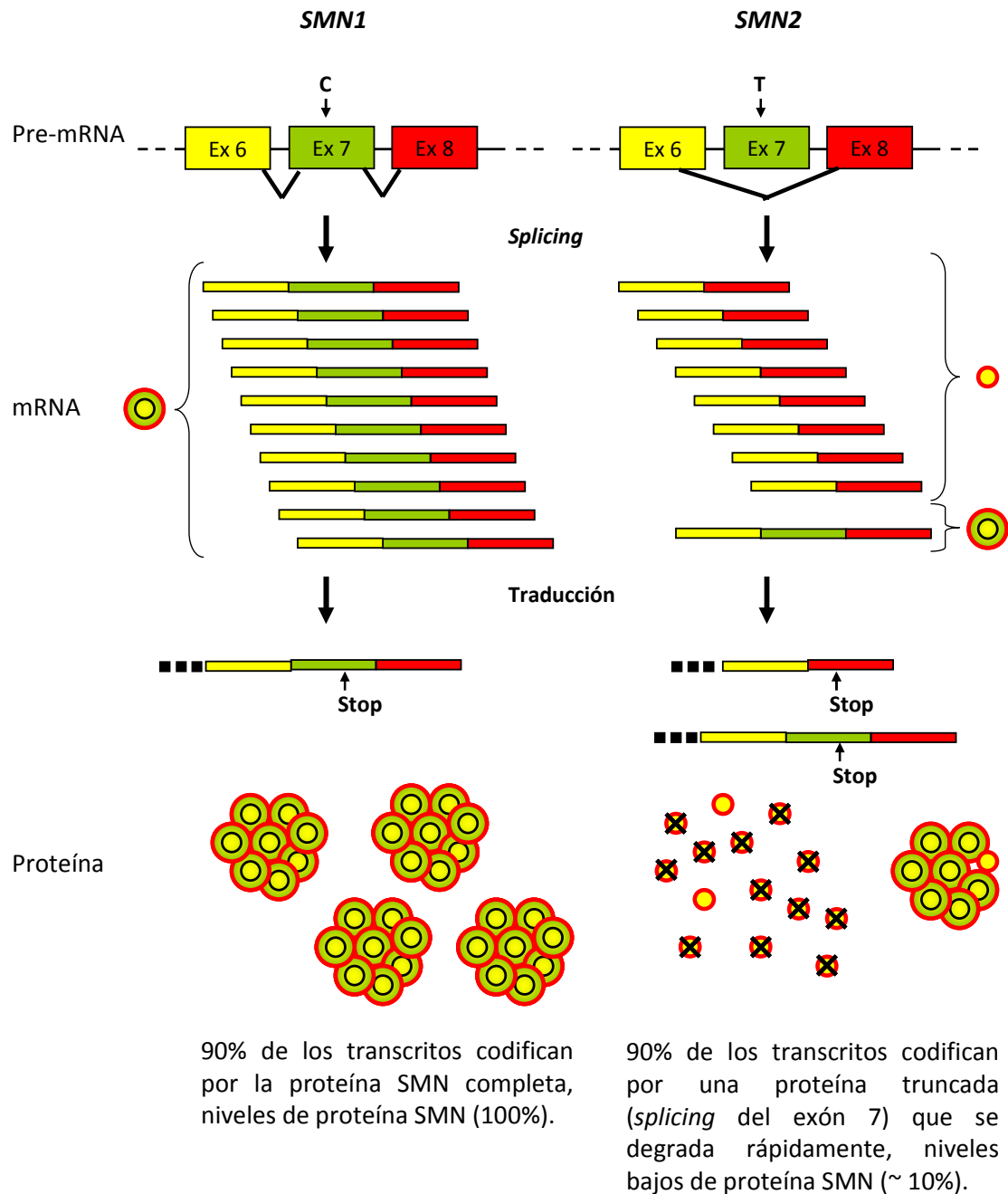


Figura 31. Transcripción de los genes *SMN1* y *SMN2*.

La gran mayoría de proteína completa proviene del gen *SMN1*. No obstante, el gen *SMN2* es capaz de producir la suficiente proteína completa como para que el individuo nazca, aunque insuficiente para que las neuronas motoras no degeneren y evitar la enfermedad cuándo el individuo tiene pocas copias del gen. (Esquema modificado de (Burghes and Beattie 2009)).

El gen *SMN1* está deletado o interrumpido en más del 90% de los pacientes cualquiera que sea la forma clínica, y un 5% de los afectados únicamente presenta deleción del exón 7. El resto de enfermos presentan mutaciones intragénicas puntuales que conllevan pérdida de función (Lefebvre et al. 1995, Wirth 2000).

5.4 LA PROTEÍNA SMN

SMN es una proteína de expresión ubicua de 38 kDa que consta de 294 aa. Mediante estudios inmunohistoquímicos se ha localizado en el núcleo y en el citoplasma. En el núcleo la proteína SMN se localiza en unas estructuras nucleares llamadas *Gems* en los Cuerpos de Cajal, estructuras descritas por Ramón y Cajal en 1903. Las células de los individuos sanos presentan de 2 a 8 *Gems* mientras que en aquellas de individuos que padecen SMA el número se ve reducido de forma significativa (Coovert et al. 1997, Lefebvre et al. 1997). El SMN citosólico presenta una distribución granular y también se observa en axones (Setola et al. 2007), conos de crecimiento neuronales (Zhang et al. 2006) y en las bandas Z de músculo estriado (Rajendra et al. 2007), esto sugiere que la patogénesis podría no implicar únicamente el soma de las motoneuronas. Estructura de la proteína SMN (Figura 32):

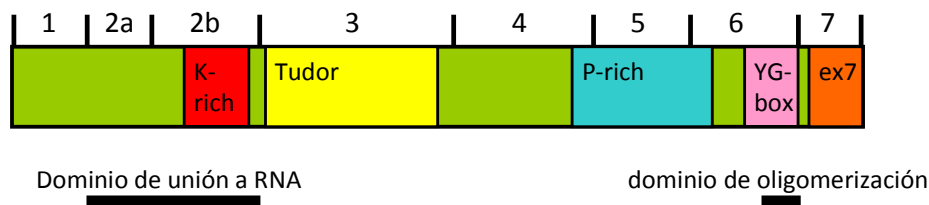


Figura 32. Estructura de la proteína SMN.

Dominios y regiones codificadas por los exones 1-7.

- ✓ **Dominio Tudor** (aa 91-151) flanqueado por una secuencia rica en lisinas (*(K)-rich-domain*) hacia la región N-terminal y por un dominio rico en prolina (*(P)-rich domain*) hacia la región C-terminal. Media la interacción de SMN con los motivos arginina-glicina (RG-motifs) de diversas proteínas (entre ellas coilina (marcador de los Cuerpos de Cajal) y proteínas Sm (Meister and Fischer 2002)). Promueve la localización nuclear.
- ✓ **(K)-rich-domain**, dominio conservado de unión a RNA (Lorson et al. 1998).
- ✓ **(P)-rich domain**, (aa 195-248) se asocia con la proteína de unión a actina profilina (Giesemann et al. 1999).
- ✓ Una caja tirosina-glicina (aa 268-279), (**tyrosine-glycine (YG)-box**), dominio implicado en la interacción SMN-SMN (Lorson et al. 1998). Coopera con el dominio Tudor para la localización en los Cuerpos de Cajal.
- ✓ Dominios putativos codificados por el exón 7, señal de retención citoplásmica (Lefebvre et al. 2002, Zhang et al. 2003).

5.4.1 Funciones de la proteína SMN

✓ **Modulador de la regeneración y reciclaje de las snRNP.** Es la función de SMN más estudiada (ver Figura 33). En el citoplasma se auto-asocian monómeros de proteína SMN (Lorson et al. 1998, Le et al. 2005) formando parte de un complejo que consta de un oligómero de SMN, Gemin 2 o SIP1 (*SMN interacting protein 1*), Gemin 3-8 y UNR *interacting protein* (UNRIP) (Otter et al. 2007). El complejo SMN acopla anillos heptaméricos de proteínas Sm a los U *small nuclear RNA* (snRNA) (U1, U2, U4, U5, U11 o U12) para generar partículas snRNP activas (Pellizzoni 2007, Raker et al. 1999). El complejo SMN junto con los snRNAs unidos con las proteínas de unión a RNA Sm, entran conjuntamente al núcleo donde desarrollarán su función de reconocimiento de secuencias y *splicing*. Se ha descrito que la capacidad de auto-asociación de la proteína SMN para formar oligómeros con ella misma es crucial para que sea una proteína funcional (Lorson et al. 1998, Pellizzoni, Charroux and Dreyfuss 1999).

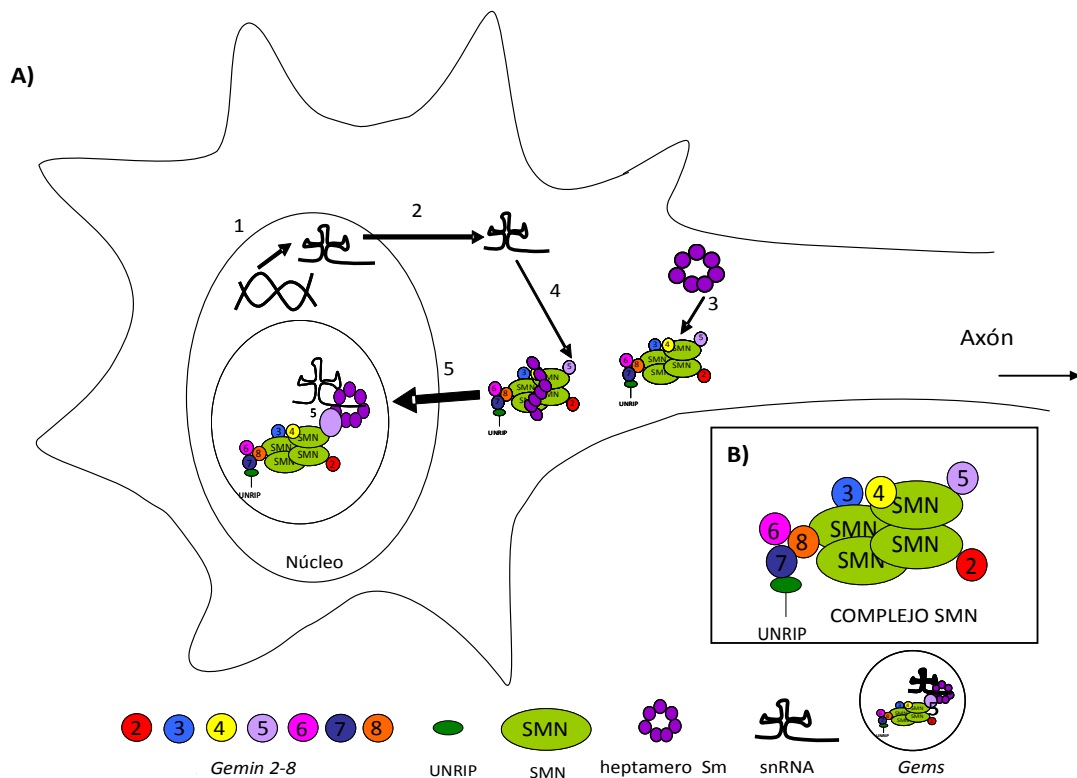


Figura 33. Función de SMN en el ensamblaje de snRNPs y detalle del complejo SMN.

A) Función de SMN en ensamblaje de snRNPs. 1) Transcripción de RNA. 2) El pre-snRNA se transporta al citoplasma. 3) El complejo SMN acopla anillos heptaméricos de proteínas Sm. 4) El snRNA se une al complejo SMN en la Gemin 5, de esta forma el complejo SMN ensambla las proteínas Sm al snRNA. 5) El complejo SMN con el snRNP ensamblado se transporta al núcleo. 6) El complejo SMN con el snRNP se localizan en las Gems donde las snRNPs madurarán. B) Detalle del complejo SMN. Modificado de (Burghes and Beattie 2009).

- ✓ **Reconocimiento de regiones de *splicing*, eliminar los intrones del pre-mRNA.** Se postula que la proteína SMN además de participar en el ensamblaje de snRNPs también podría participar directamente en el reconocimiento de lugares de *splicing* y la modificación del transcrito primario o pre-RNA mensajero en el núcleo (Liu et al. 1997). El complejo SMN y los snRNPs a nivel nuclear se localizan en las Gems.
- ✓ **Estabilizar y transportar mRNA citoplásmico y axonal.**
 - **Ensamblaje de los complejos RNP con LSm en citoplasma.** Se ha descrito la posible participación de SMN en el ensamblaje de los complejos RNP que contienen LSm (*Sm like proteins*) en citoplasma y en axones y dendritas, puesto que las proteínas LSm contienen dominios RG que podrían unirse al dominio Tudor de SMN (Friesen and Dreyfuss 2000). Estos complejos participan en la estabilización y transporte de mRNA y se ha descrito que SMN puede unirse a LSm4 (Brahms et al. 2001).
 - **Ensamblaje de complejos de ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas Q y R (hnRNP-Q/R) y proteínas Z de unión a DNA (ZBPs) con mRNA para su transporte a nivel axonal.** Relacionado con su localización axonal, SMN funcionaría en un único complejo con hnRNP-Q/R y ZBPs transportando mRNAs, β -actina entre otros, ver Figura 34 (La Bella et al. 1998, Rossoll et al. 2003, Jablonka, Wiese and Sendtner 2004, Fallini, Bassell and Rossoll 2010, Rossoll et al. 2002). Evidencias recientes sugieren que también formarían parte de este complejo varias *Gemin* (entre ellas *Gemin* 2 y 3) (Todd et al. 2010).

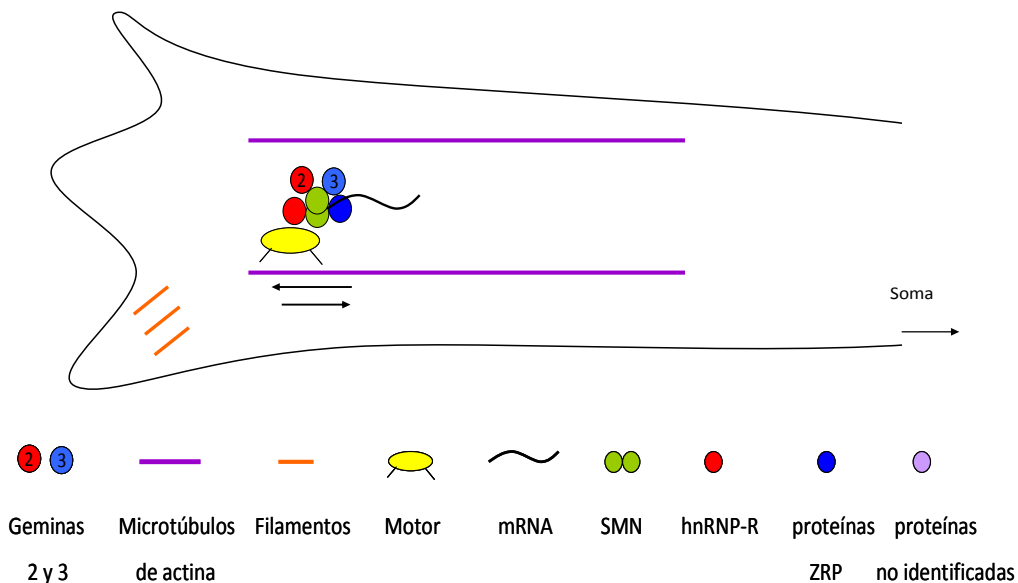


Figura 34. Función de SMN en transporte de mRNA hacia el terminal del axón.

SMN ensambla los hnRNP-R y juntos median la localización de mRNA al axón. También se ha descrito la presencia de las Geminas 6, 7 y UNRIP junto a SMN y mRNA de actina a nivel de neuritas y conos de crecimiento en las líneas celulares PC12, SHSY5Y y MNs de ratón en cultivo (Todd et al. 2010) (Sharma et al. 2005, Zhang et al. 2006).

- ✓ **Ensamblaje de pequeñas ribonucleoproteínas nucleolares (snoRNPs).** Se ha sugerido que SMN es importante para el ensamblaje de snoRNPs (Jones et al. 2001), proteínas que actúan como guías para la modificación de rRNA, tRNA y snRNA (metilación y pseudouridilación).
- ✓ **Modulación de la apoptosis.** En algunos modelos neuronales se ha descrito que niveles bajos de proteína SMN comportan una desregulación de proteínas involucradas en la apoptosis como Bcl-2 y Bcl-XL (Soler-Botija et al. 2003), (Kerr et al. 2000).
- ✓ **Factor de transcripción.** SMN se asocia con RNA polimerasa II, por ello podría actuar como factor de transcripción (Pellizzoni et al. 2001).

5.5 CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO

Al estudiar el DNA genómico de pacientes que padecían SMA mediante electroforesis se observó que en las muestras de SMA tipo III la banda que correspondía al gen *SMN2* (o centromérico en el artículo) aparecía más intensa que en las muestras de pacientes con SMA tipo I. Estudios posteriores confirmaron que una de las diferencias más importantes entre los tipos de SMA es el número de copias del gen *SMN2* (Lefebvre et al. 1995).

Tabla 4. Correlación del genotipo y cantidad de proteína SMN funcional con el tipo de SMA.
Menos proteína implica fenotipo más grave. Modificado de (Simic 2008).

	Copias de <i>SMN2</i>	Copias de <i>SMN1</i>	Porcentaje de proteína SMN
SMA-I	2-3	-	9
SMA-II	3	-	14
SMA-III	4-8	-	18
SMA-IV	> 8	-	23
Portadores sanos	0-...	1	45-55
Gente sana	0-...	2 o 1	100

Aquellos individuos que carezcan del gen *SMN1* presentarán un fenotipo más o menos severo de la enfermedad dependiendo del número de copias presentes en su genoma del gen *SMN2*, puesto que más copias de este gen implican más cantidad de transcripción de proteína SMN funcional. Así, el grado de severidad de la enfermedad correlaciona con el porcentaje de proteína SMN funcional de cada individuo (Tabla 4).

Puesto que ***SMN2*** produce una pequeña cantidad de proteína SMN, el número de copias de este gen en la mayoría de casos influencia el fenotipo de la enfermedad, existe una gran correlación entre el número de copias *SMN2* y el grado de severidad de

la enfermedad. No obstante, se han descrito casos con el mismo número de copias pero diferente sintomatología (Coovert et al. 1997, DiDonato et al. 1997, McAndrew et al. 1997). Esto sugiere la existencia de otros factores modificadores además de *SMN2*.

Como por ejemplo:

✓ **NAIP:** En 1996 Liston et al. demostraron su efecto antiapoptótico y que se expresaba en MNs y no en neuronas sensoriales. En el 50% de pacientes de SMA tipo I se encuentra deletado junto con *SMN1*, mientras que en solo un 15-20% de los enfermos de tipo III y IV. Los pacientes que no tienen deletado NAIP manifiestan la enfermedad más tarde.

✓ **Reguladores de la dinámica de Actina como Profilin II, Plastin 3 and RhoA:** SMN juega un papel importante en la regulación de la dinámica de actina en células neuronales (Rossoll et al. 2003, Bowerman et al. 2009). Se ha confirmado una correlación entre los niveles de Plastina 3 y el grado de severidad en mujeres que padecen SMA (Oprea et al. 2008). Recientemente se ha descrito que inactivadores de RhoA prolongan la supervivencia en un modelo murino intermedio de SMA (Bowerman et al. 2010).

✓ **BMP signalling:** análisis genéticos realizados en *Drosophila melanogaster* indican una clara influencia de SMN sobre la actividad de la vía de señalización BMP, además en este modelo animal el incremento de la señalización de esta vía corrige las alteraciones de los botones sinápticos en las uniones neuromusculares debidos a bajos niveles de SMN (Chang et al. 2008).

Se han identificado diversas proteínas que interactúan directamente o a través de las Gems con la proteína SMN. No se sabe todavía qué implicación funcional pueden tener estas interacciones, pero todas ellas podrían actuar como modificadores del fenotipo. Algunas de ellas se representan en la Figura 35 y/o en la Tabla 5:

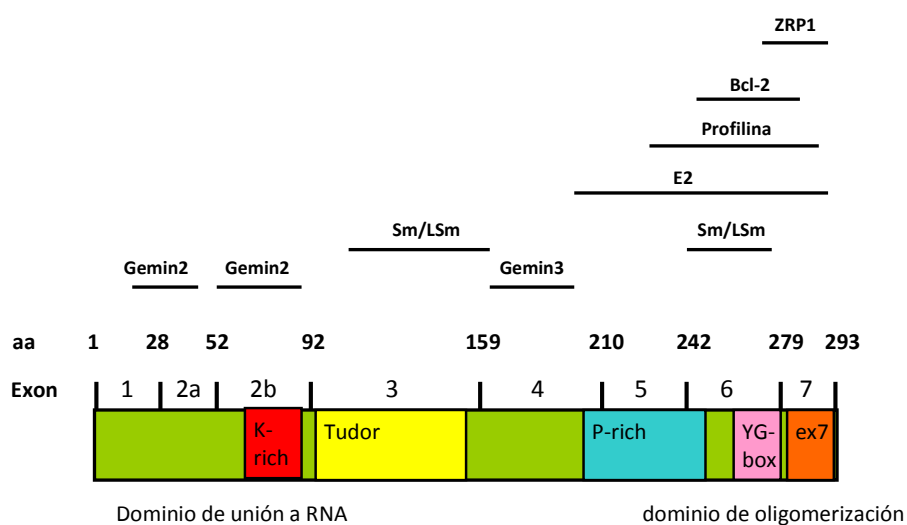


Figura 35. Dominios de interacción de la proteína SMN con diversas proteínas.

Tabla 5. Proteínas que interactúan con SMN o con el complejo SMN.

PROTEÍNA	FUNCIÓN	REFERENCIA
Bcl-2	Anti-apoptótica	Sato et al., 2000
Coilina	Biogénesis de las snRNPs	Pellizzoni et al., 1998
E2	Activador de la transcripción	Strasswimmer et al., 1999
FBP	Regulación de la transcripción y estabilidad del mRNA	Williams et al., 2000
Fgf-2	Factor de crecimiento celular	Claus et al., 2003
<i>Fragile-X mental retardation protein (FMRP)</i>	Traducción de mRNA local	Piazzon et al., 2008
Fibrilarin	Procesamiento de pre-rRNA o metilación	Pellizzoni et al., 2001
GAR1	Acoplamiento y metabolismo de los snoRNPs	Pellizzoni et al., 2001
Geminas (2-8)	Funciones varias: unión y acoblamiento de snRNA al complejo SMN, etc.	Pellizzoni et al., 2002; Baccon et al., 2002; Liu et al. 1996; Battle et al., 2006
hnRNP Q	Tratamiento, transporte y <i>splicing</i> de mRNA	Rossoll et al., 2002
hnRNP R	Tratamiento, transporte y <i>splicing</i> de mRNA	Rossoll et al., 2002
hnRNP U	Tratamiento y transporte de mRNA	Liu et al. 1996
LSm4	Unión a RNA	Friesen et al., 2000; Brahms et al., 2001
<i>Myb-binding protein 1a</i>	Desconocida	Fuller et al., 2010
Profilina	Proteína de unión a actina	Giesemann et al. 1999; Bowerman et al. 2010
RHA	RNA helicasa	Pellizzoni et al., 2001
RNA polimerasa II	Transcripción de DNA a RNA	Pellizzoni et al., 2001
Sm	Unión a RNA	Friesen et al., 2000
SMN	Funciones descritas previamente en el apartado 5.4 de la introducción	Liu et al., 1996; Lorson et al., 1998
ZPR1	Se une al factor de elongación EF1- α y participa en el transporte de los hnRNPs	Gangwani et al 2001

5.6 MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DE SMA

Los modelos animales de la enfermedad permiten profundizar en el análisis de la patogénesis y realizar ensayos con posibles tratamientos clínicos. Se han generado modelos animales de SMA en diferentes especies: *Schizosaccharomyces pombe*, *Caenorhabditis elegans*, *D. melanogaster*, *Zebrafish* y ratones (Tabla 6). Todas estas especies presentan un único gen *SMN* equivalente a *SMN1* la delección del cual es letal embrionaria, además el momento del desarrollo en el que mueren los embriones *knockout* de *SMN* depende de los niveles de proteína SMN maternos (en los ratones que carecen del gen *SMN* los niveles de proteína materna son bajos, por ello la muerte ocurre temprano en el desarrollo, mientras que en animales como *Zebrafish* y *D. melanogaster* los niveles de SMN materno en las larvas o huevos son mayores y mueren más tarde). El hecho que la especie humana sea la única que presenta un gen *SMN2* y que la proteína SMN sea fundamental para la supervivencia celular durante el desarrollo embrionario ha dificultado la generación de modelos animales que reproduzcan el fenotipo de la enfermedad.

Tabla 6. Modelos animales empleados para el estudio de SMA.

Modelos animales de SMA y su fenotipo. Modificado de (Burghes and Beattie 2009).

ORGANISMO	MUTACIÓN O PERTURBACIÓN	FENOTIPO
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Pérdida de función o delección del gen <i>SMN</i>	Letal. (Owen et al., 2000)
<i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>SMN knockdown</i> con RNA de interferencia o delección	Letal embrionario y defectos en el desarrollo. (Miguel-Aliga et al., 1999; Burt et al., 2006)
<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>SMN^{7A}</i> y <i>SMN^B</i> , mutaciones en el gen <i>SMN</i> que impiden la autoasociación de SMN y pueden considerarse como alelos nulos.	Muerte de la larva o letal embrionario si se extrae el SMN materno. (Chan et al., 2003)
<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>SMN^{E33}</i> mutación que causa la pérdida de SMN en el tórax del adulto.	Pérdida de la habilidad de volar y saltar. (Rajendra et al., 2007)
<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>SMN knockdown</i> con siRNA	Letal a diferentes estadios. Depende del <i>Knockdown</i> . (Chang et al., 2008)
Zebrafish	<i>SMN knockdown</i> con morpholinos antisentido, resulta en niveles de SMN reducidos en estadios tempranos pero que se recuperan después.	Patrón axonal anormal y muerte. (McWhorter et al., 2003)
Ratón	Pérdida de SMN por delección del gen <i>SMN</i>	Letal embrionario. (Schrank et al., 1997)
Ratón	Pérdida condicional dirigida por cre-lox del gen <i>SMN</i> en tejidos específicos a tiempos de desarrollo específicos.	Muerte de las células del tejido en el cual se ha eliminado <i>SMN</i> . (Frugier et al., 2000; Fuentes-Díaz et al., 2001; Vitte et al., 2004)
Ratón	Pérdida del gen <i>SMN</i> o expresión de <i>SMN1</i> humano con mutaciones que causa SMA	Letal embrionario. (Workman, 2009)
Ratón	Niveles de SMN reducidos por pérdida del <i>SMN</i> de ratón e introducción del transgen humano <i>SMN2</i>	El fenotipo depende del número de copias de <i>SMN2</i> . 1 copia: letal embrionario, 2 copias: causa muerte al día postnatal 5, 8 copias: fenotipo sano. (Hsieh et al., 2000; Monani et al., 2000)

Durante los últimos años los modelos animales de ratón han sido los más estudiados y están siendo de gran ayuda para elucidar los mecanismos patogénicos de la SMA.

Los embriones de **ratón *SMN knockout* ($SMN^{-/-}$)** sufren una apoptosis masiva en el estadio de blastocisto y mueren antes de la implantación (Schrank et al. 1997). Este hecho evidencia de nuevo que *SMN* es un gen esencial durante el desarrollo.

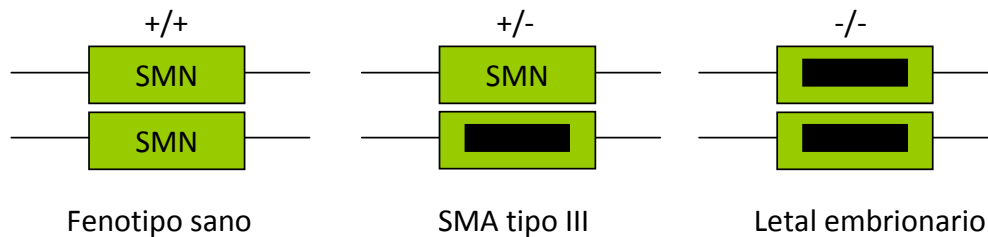


Figura 36. Esquema del genotipo de *SMN* en el modelo de ratón mutante.

Los rectángulos grises indican la presencia del gen funcional y los rectángulos negros la inserción de un casete de resistencia a neomicina interrumpiendo el gen *SMN* de ratón.

Los ratones heterocigotos ($SMN^{+/-}$): Solamente presentan una copia de *SMN*. Muestran una disminución de los niveles de proteína en la medula espinal de un 50%. Reproducen un fenotipo característico de una SMA leve (tipo III). La proteína disminuye considerablemente en el citoplasma, mientras que el número de *Gems*, no presenta variaciones. Al nacer, el número de MNs es normal, pero durante los primeros 6 meses de vida pierden un 50% de MNs y el resto se mantienen durante la vida del animal (Jablonka S et al., 2000). Pese a una pérdida tan grande de MNs no se observan la denervación ni el déficit motor característicos de la enfermedad humana.

Para intentar solucionar este problema y conseguir modelos animales de la enfermedad, en una primera aproximación se generaron ratones knockouts específicos de tejido usando el sistema Cre-loxP en el laboratorio de la Dra. Melki. Se realizaron knockouts neuronales, musculares y de hígado, en todos los casos comportan la muerte de las células del tejido candidato debido a la función esencial de *SMN* en el desarrollo.

Puesto que los ratones $SMN^{-/-}$ presentan un fenotipo letal embrionario y el heterocigoto es únicamente modelo para el estudio de la forma de SMA leve tipo III se tuvo que recurrir a técnicas de ingeniería más complejas para crear modelos murinos de la enfermedad más adecuados. Por ello se crearon modelos en los que a la vez que se silenció el gen *SMN* murino insertando el transgén humano (*SMN2*) para que los ratones resultantes expresen niveles reducidos de proteína *SMN*, pero suficientes para permitir el desarrollo embrionario). Se han realizado diferentes aproximaciones:

- ✓ ($SMN^{-/-};SMN2^{+/-}$): Inserción de 1 copia de *SMN2*, continua mostrando un fenotipo letal embrionario (McGovern et al. 2008).
- ✓ ($SMN^{-/-};SMN2^{+/+}$): Insertando 2 copias, los ratones modificados desarrollan SMA tipo I y mueren 5 días después de nacer. Estos ratones ($SMN^{-/-};SMN2^{+/+}$) a día

postnatal 0 (P0) no se pueden distinguir fenotípicamente de sus hermanos sanos ($(SMN^{+/-};SMN2^{+/+})$ y $(SMN^{+/+};SMN2^{+/+})$); a P3 empiezan a mostrarse más débiles y pequeños, paran de amamantarse a P4 y mueren entre P5 y P6. En estos ratones a P1 no se observa pérdida de MNs, mientras que a P5 han degenerado entre un 30 y 40% de MNs espinales y faciales, (Figura 37).

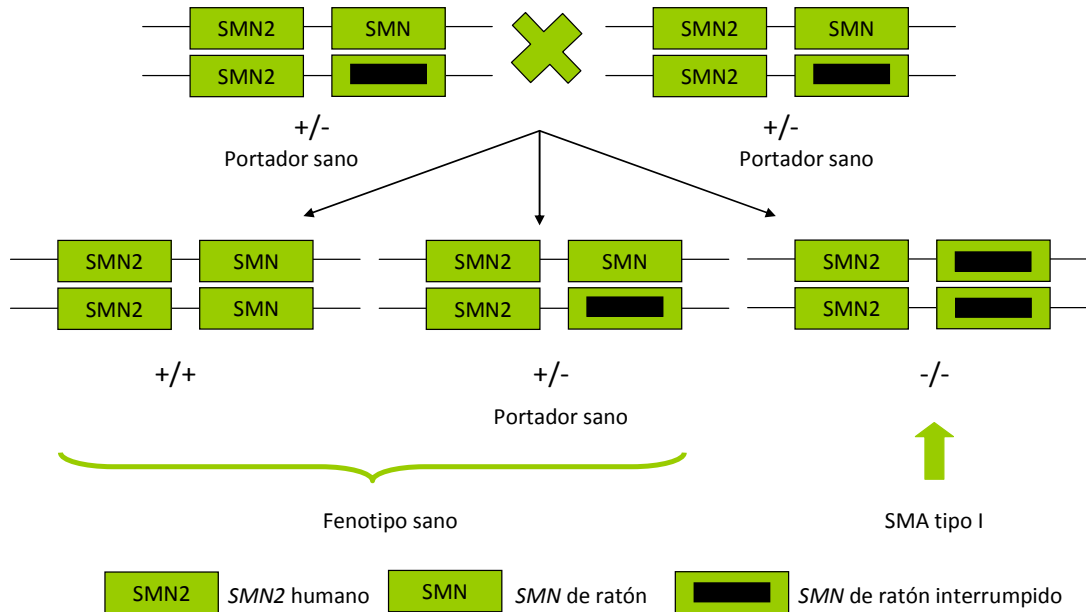


Figura 37. Esquema del modelo de ratón de SMA ($SMN^{-/-};SMN2^{+/+}$).

Los rectángulos negros indican la inserción de un casete de resistencia a neomicina que interrumpe el gen *SMN*.

- ✓ **Ratones ($SMN^{-/-};SMN2^{+/+}$) con 8 copias del gen *SMN2*:** implica niveles más elevados de proteína SMN. Ratones con fenotipo sano (Monani, 2000; Hsieh, 2000).
- ✓ **($SMN^{-/-};SMN2^{+/+}; SMN\Delta7^{+/+}$):** Añadiendo el transgén *SMN Δ 7* (el mayor producto de transcripción de *SMN2*) a ratones ($SMN^{-/-};SMN2^{+/+}; SMN\Delta7^{+/+}$), se alarga la vida de los afectados una semana, mueren entre 10 y 16 días después de nacer, fenotipo menos severo. No presentan un fenotipo distrófico (no se observan anomalías en el complejo asociado a la distrofina) pero sí una evidencia clara de denervación de uniones neuromusculares y clusters reducidos de receptor de acetilcolina (AChR), (Le et al. 2005).
- ✓ **($SMN^{-/-};SMN2^{+/-};SMN A2G^{+/-}$):** Añadiendo el transgén SMN A2G (gen con una mutación que comporta cambio de aa, traduce una proteína SMN parcialmente funcional). Estos ratones muestran un fenotipo de SMA tipo III, presentan degeneración tardía de MNs y anomalías en electromiografía y *sprouting* axonal.

Estos modelos son muy útiles realizar ensayos terapéuticos dirigidos a mejorar el fenotipo de la enfermedad, pero también permiten elucidar mecanismos patogénicos y de desarrollo de la enfermedad gracias al avance de las técnicas de manipulación genética, así como también son modelos excelentes para ensayos básicos de terapia génica.

En los últimos años el uso de estos modelos ha aportado respuestas a preguntas tan básicas e importantes como:

¿En qué tejido(s) es crítico recuperar los niveles de SMN para prevenir el fenotipo de la enfermedad?

En el modelo ($SMN^{-/-}; SMN2^{+/+}$) si se incrementan los niveles de proteína SMN únicamente en músculo se observan efectos mínimos de rescate del fenotipo, mientras que un incremento en tejido neuronal resulta suficiente para ampliar el tiempo de vida de los ratones de 5 hasta 210 días post natales (Gavrilina et al. 2008). Aumentar los niveles de SMN únicamente a nivel muscular no es suficiente para reducir la gravedad de la enfermedad.

¿En qué momento(s) durante el desarrollo de la enfermedad recuperar los niveles de SMN hasta la normalidad previene la evolución de la misma?

Los resultados obtenidos en estudios realizados en modelos de ratón de SMA tipo II indican que debería ser importante recuperar los niveles de proteína en los primeros momentos después de nacer. En el modelo de ratón la recuperación de niveles de proteína SMN a día P1 conlleva una recuperación de la función motora, fisiología neuromuscular y esperanza de vida, a P5 un incremento de proteína SMN consigue una recuperación parcial mientras que a P10 tiene efectos mínimos (Foust et al. 2010); (Passini et al. 2010).

5.7 CAUSA(S) DE SMA: UNA PROTEÍNA, DOS HIPÓTESIS

Mientras que la base genética de la enfermedad está bien establecida, todavía no está claro porqué una proteína con una función tan importante y general para el mantenimiento celular comporta un fenotipo de degeneración de las MNs inferiores y atrofia muscular. Para explicar la afectación selectiva de las MNs y del tejido muscular han surgido dos hipótesis distintas (Monani 2005). La primera considera que la SMA es consecuencia directa del defecto en la biogénesis de los snRNPs y splicing de pre-mRNA y, la segunda, señala que la enfermedad afectaría principalmente a las MNs

debido a una función específica de SMN en estas células como el transporte de mRNA axonal. Existen estudios que apoyan las dos hipótesis:

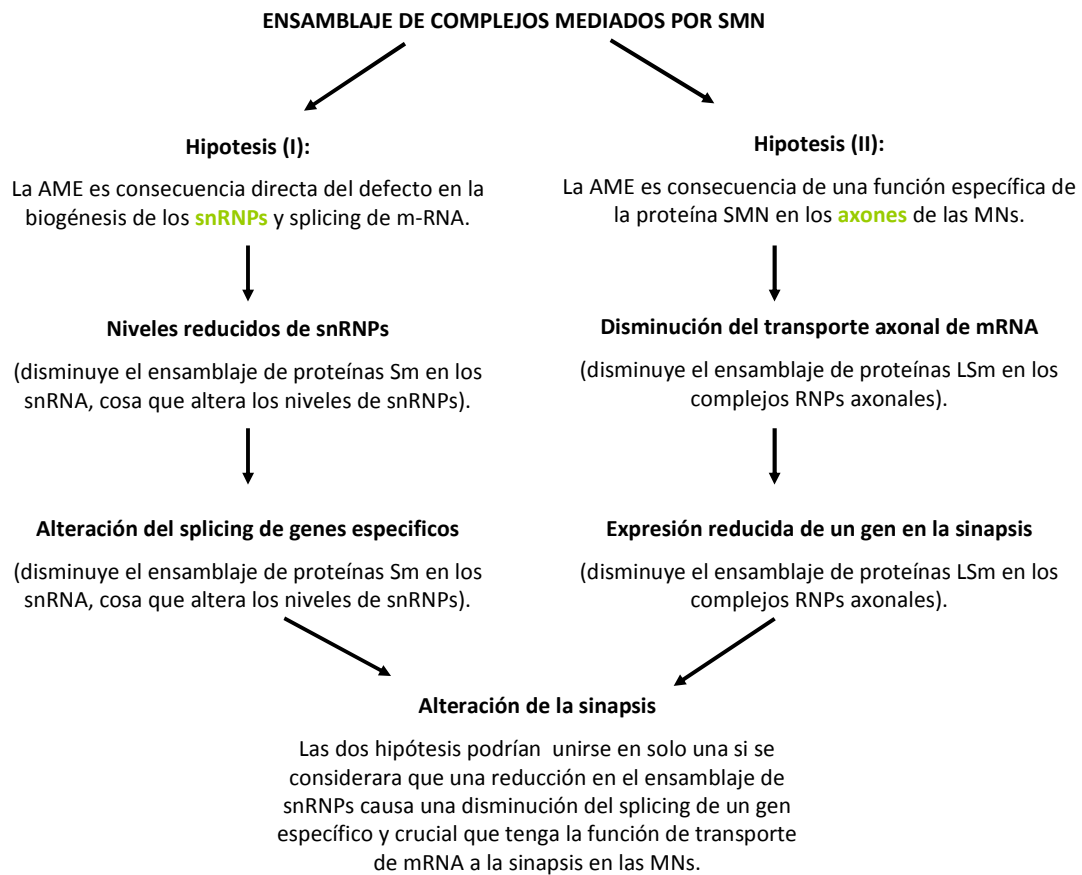


Figura 38. Hipótesis de la afectación específica de MNs por bajos niveles de SMN. Mecanismos propuestos para explicar como bajos niveles de SMN afectan principalmente a las MNs, modificado de (Burghes and Beattie 2009).

5.7.1 Hipótesis I, biogénesis de snRNPs

Esta visión propone que las MNs al ser células más largas y de elevado requerimiento energético serían más sensibles que otros tipos celulares a la disminución de snRNPs y *splicing* de pre-mRNA ineficiente. Existen diferentes trabajos que apoyan esta hipótesis, uno de ellos indica alteraciones a nivel de snRNAs y defectos de *splicing* específicas de tejido, señala que en médula espinal se observa una reducción preferencial de snRNPs que contienen el snRNA U11 (Zhang et al. 2008, Gabanella et al. 2007). Otro trabajo demuestra una correlación entre la habilidad de la proteína SMN para realizar el ensamblaje de los snRNPs y la habilidad de esta para rescatar o mejorar el fenotipo de modelos animales de SMA (Workman et al. 2009, Gabanella et al. 2007).

5.7.2 Hipótesis II, defectos en el transporte axonal

La proteína SMN tiene una función axonal específica en las MNs que se ve interrumpida en SMA (McWhorter et al. 2003, Carrel et al. 2006): SMN está presente en axones y conos de crecimiento de las MNs formando parte de complejos que no contienen proteínas Sm asociados a hnRNP-R y Q. Recientemente se ha demostrado su transporte activo (anterogrado y retrogrado) en axones de MNs en cultivo. En 2003, Rossoll y colaboradores aportaron evidencias que SMN interaccionaba con el mRNA de β -actina a través de hnRNP-R y que en cultivos primarios de MNs de un modelo murino de SMA se observaban niveles de β -actina reducidos. Esto hizo pensar que SMN tendría un papel importante en el transporte de mRNA de β -actina hacia los axones. Esta teoría es apoyada por diferentes observaciones, la correlación entre los niveles de Plastina 3 y el grado de severidad en mujeres que padecen SMA (Oprea et al. 2008, Bowerman et al. 2009), y el hecho que usando inactivadores de RhoA se haya conseguido aumentar considerablemente el tiempo de vida en un modelo murino de SMA (Bowerman et al. 2010) son factores que apoyan esta teoría.

Las dos corrientes de pensamiento podrían tener una explicación común (Figura 38), si se considera que bajos niveles de SMN producirían una reducción en el ensamblaje de snRNPs causando una disminución del splicing de un gen específico y crucial con función de transporte de mRNA a la sinapsis en las MNs (Burghes and Beattie 2009).

5.8 CONTRIBUCIÓN DE LAS MOTONEURONAS Y DEL MÚSCULO A LA PATOLOGÍA

La SMA causa degeneración de MNs inferiores y atrofia muscular. La alta dependencia que tienen ambos tejidos el uno del otro a través de las uniones neuromusculares dificulta esclarecer en cual de ellos se produce la alteración primaria en el desarrollo de la enfermedad; no está claro si es la afectación de las MNs que causa la atrofia muscular o que alteraciones a nivel muscular causan la degeneración de las MNs. Existen evidencias que demuestran afectación de ambos tejidos.

5.8.1 Componente muscular

La primera evidencia de que un componente muscular podría contribuir a la degeneración motoneuronal SMA se obtuvo al observar que extractos musculares de biopsias de pacientes afectados inhibían el crecimiento neurítico de MNs espinales de embriones de pollo (Henderson et al. 1987). Más recientemente se ha demostrado que SMN es una proteína de localización sarcomérica en *D. melanogaster* y que su disrupción resulta en alteración de la función y arquitectura muscular (Rajendra et al. 2007, Walker et al. 2008). De forma similar, cultivos primarios de músculo de pacientes

humanos sin estar en contacto con MNs presentan alteraciones en la expresión de receptores de acetilcolina y en la formación de fibras (Arnold et al. 2004). Estas evidencias hicieron pensar que una terapia dirigida a prevenir la atrofia muscular podría ser beneficiosa para pacientes de SMA. Un ensayo en un modelo murino de SMA dirigido a aumentar la masa muscular usando Folistatina (un antagonista de la Miostatina) consigue alargar la vida un 30% a estos ratones (Rose et al. 2009).

5.8.2 Afectación principal de las MNs

Otras evidencias apoyarían una afectación primaria de las MNs. Si se reestablece la expresión de SMN en el modelo de ratón de SMA ($SMN^{-/-};SMN2^{+/+}$) únicamente en el tejido muscular, se observan efectos mínimos en el fenotipo y en el tiempo de vida de los ratones afectados, sugiriendo que la pérdida de SMN muscular no puede ser la única responsable de la degeneración neuromuscular. En cambio, reestableciendo la expresión de SMN en el tejido neuronal incrementa de forma muy significativa el tiempo de vida, de 5 a 210 días (Gavrilina et al. 2008). Estas observaciones están de acuerdo con los resultados obtenidos en un modelo de SMA en *Caenorhabditis elegans*, en el que se describe que la recuperación de expresión de SMN neuronal rescata parcialmente el fenotipo SMA, mientras que la recuperación muscular no (Briese et al. 2009). Datos recientemente publicados indican no solo el componente neuronal como causa principal desencadenante de la enfermedad, sino más específicamente la pérdida de SMN en MNs; en este trabajo Monani y colaboradores describen que niveles reducidos de SMN únicamente en precursores de MNs causan SMA en un modelo murino que expresa el gen centromérico humano *SMN2* (Park et al. 2010). Todos estos trabajos apuntan a la dependencia de SMN de las MNs cómo causa primaria de la enfermedad y sugieren que el reestablecimiento de los niveles de SMN únicamente en el tejido muscular no sería suficiente para mejorar el fenotipo de la enfermedad. No obstante, en el campo de los ensayos clínicos además de contemplar el aumento de los niveles de proteína SMN y el uso de fármacos neuroprotectores también se destinan recursos para reforzar el tejido muscular.

Las observaciones de los últimos años apuntan a que en enfermos de SMA se establecerían las uniones neuromusculares apropiadas durante el desarrollo. Por lo tanto, la enfermedad no sería causada por defectos en el desarrollo de las MNs, el problema estaría en una alteración en el mantenimiento de las sinapsis neuromusculares (Monani 2005). Aunque las MNs y el músculo sean las células más afectadas los bajos niveles de SMN también podrían estar afectando células de Schwann periféricas o células gliales puesto que estas desarrollan un papel importante

en el desarrollo y mantenimiento de las uniones neuromusculares y en regeneración/*sprouting* de terminales nerviosos.

5.9 TRATAMIENTO ACTUAL

En la actuación clínica se crea un plan de intervención multidisciplinario usando fármacos y estrategias terapéuticas para tratar los síntomas y reforzar la musculatura y se realiza un estudio genético. El hecho que la Atrofia Muscular Espinal requiera un tratamiento multidisciplinar, comporta que en diferentes centros se pueda tratar de forma distinta, la cual cosa puede afectar de forma diferencial al desarrollo de la enfermedad. Para intentar reducir esta variabilidad y facilitar la interpretación de futuros ensayos clínicos en 2005 se creó un comité internacional para la SMA *The International Standard of Care Committee for Spinal Muscular Atrophy* con la finalidad de establecer una guía práctica de atención clínica a los enfermos de SMA. En 2007 se publicó el *Consensus statement for standard of care in spinal muscular atrophy* (Wang et al. 2007), esta guía contempla consenso de actuación clínica en cinco áreas:

- ✓ Diagnostico de SMA: estudio genético, biopsia muscular, electromiografía y apoyo familiar. Posibles ensayos clínicos.
- ✓ Tratamiento respiratorio y pulmonar (es la causa mayoritaria de morbilidad y mortalidad de los enfermos tipo I y II), fisioterapia postural y soportes mecánicos para ayudar a la respiración, inmunización y profilaxis para prevenir infecciones respiratorias.
- ✓ Tratamiento nutricional y gastrointestinal, incluye neutralizadores de ácidos, agentes pro-motilidad o inhibidores de la secreción de ácidos, en los casos más graves gastrostomía.
- ✓ Ortopedia y rehabilitación, la debilidad muscular y la movilidad reducida característica de la SMA son responsables de contracturas y escoliosis.
- ✓ Curas paliativas, actividad física regular (sobretudo acuaterapia), control de peso, etc.

5.10 POSIBLES TERAPIAS FUTURAS Y ENSAYOS CLÍNICOS

Los ensayos clínicos analizan el efecto de moléculas candidatas diseñadas a partir de estrategias distintas:

- ✓ Moléculas neuroprotectoras: para reducir la muerte de las neuronas motoras, (Riluzol, análogos del GABA).
- ✓ Aumento del metabolismo energético: podrían ayudar a mantener durante más tiempo la fuerza y masa muscular, (Carnitina, Creatina, Somatropina).

Tabla 7. Principales ensayos clínicos para SMA.

Se muestran los ensayos clínicos actuales para la SMA (Modificado y actualizado de (Oskoui and Kaufmann 2008)), para información más detallada consultar www.clinicaltrials.gov.

Fármaco	Diseño	País	Cohorte	Comentarios
Hidroxiurea	ensayo abierto	Taiwan	AME tipo I	Aumenta levemente la fuerza muscular
Hidroxiurea	doble ciego placebo	Taiwan	AME tipo II y III	Falta analizar resultados
Hidroxiurea	doble ciego placebo	EUA	AME tipo II y III	Falta analizar resultados
Ácido Valproico + carnitina	doble ciego placebo	EUA	AME tipo II y III	terminado, negativo
Ácido Valproico + carnitina	doble ciego placebo	EUA	AME tipo I	Activo
Ácido Valproico	doble ciego placebo	EUA	AME tipo I, II y III	terminado, faltan los resultados
Ácido Valproico	doble ciego placebo	Alemania	AME tipo I, II y III y portadores	incrementa mRNA y proteína en algunos casos
Fenilbutirato sódico	ensayo abierto	EUA	AME tipo I, II	mejora la fuerza y función
Fenilbutirato sódico	ensayo abierto	Italia	AME tipo II	incrementa mRNA
Fenilbutirato sódico	doble ciego placebo	Italia	AME tipo II	negativo
Riluzole	doble ciego placebo	EUA	AME tipo I	puede aumentar la supervivencia
Riluzole	doble ciego placebo	EUA	AME tipo II y III	en curso
Gabapentina	doble ciego placebo	EUA	AME tipo II y III	Negativo
Gabapentina	doble ciego placebo	Italia	AME tipo II y III	Negativo
Albuterol	ensayo abierto	Reino Unido	AME tipo II y III	Beneficio modesto en la fuerza
Tirotropina	doble ciego placebo	EUA	AME tipo II y III	Mejora la fuerza
Acetil-L-carnitina	doble ciego placebo	Europa	AME tipo I, II	Negativo
Creatina	doble ciego placebo	EUA	AME tipo II y III	Negativo
Somatropina	doble ciego placebo	Alemania	AME tipo II y III	en curso

- ✓ Activación de la expresión del gen SMN2 y restablecer el patrón de *splicing* correcto del gen SMN2: Los fármacos más recientes se centran en la activación farmacológica de la expresión del gen SMN2 (inhibidores de histonadeacetilasas, hidroxiurea, valproato, butiratos, etc.) y en restablecer el patrón correcto de *splicing* del gen SMN2, aumentar la cantidad de la proteína SMN completa producida a partir del gen SMN2. Hofmann y colaboradores en el año 2000,

describieron un factor de *splicing* de la familia de las proteínas *SR-like* (proteínas ricas en serinas y argininas) llamado Htra2-B1, que reconoce específicamente la secuencia ESE (*exonic splicing enhancer*) del exón 7 del gen *SMN2*, y promueve su inclusión en el transcrito, estimulando la expresión de la forma completa (FL) del gen. Demostraron que el procesamiento del mRNA del gen *SMN2* se puede modular *in vivo* y eso permite un posible tratamiento ya que todos los pacientes SMA retienen por lo menos una copia del gen *SMN2* (Hofmann et al. 2000, Hofmann and Wirth 2002). Otro compuesto, el butirato de sodio, aumenta los niveles de proteína SMN completa (aumenta la inclusión de los aa codificados por el exón 7) en cultivos de linfoblastos y en fibroblastos de pacientes de SMA *in vitro*, y en modelos animales *in vivo* (Chang et al. 2001, Andreassi et al. 2004).

- ✓ Terapia génica: La estrategia más directa comprendería el remplazo del gen *SMN1* defectuoso en los pacientes de SMA por uno funcional. Para transferir el gen *SMN1* en la médula espinal se ha propuesto la utilización de vectores virales capaces de transducir las MNs *in vivo*. Este tipo de terapia ha mostrado beneficios importantes en modelos murinos, tres grupos independientes han conseguido transducir las MNs de la medula espinal de ratones modelo de SMA, inyectando virus asociados a Adenovirus (AAV) generados para sobre-expresar la proteína SMN humana (Passini et al. 2010, Valori et al. 2010, Foust et al. 2010). Con ello han conseguido alargar la vida a estos ratones de 5-10 días a más de 100. Además, se ha demostrado que el uso de AAV es eficiente para transducir MNs en primates (Foust et al. 2010).
- ✓ Células madre: Otra posible terapia en investigación contempla el uso de células madre. La diferenciación de estas a fenotipo de MNs podría permitir reemplazar aquellas que mueran. Se ha demostrado que las células madre pueden diferenciarse a MNs *in vitro* (Wichterle et al. 2002, Harper et al. 2004), y que estas células diferenciadas al inyectarse en modelos murinos consiguen establecer conexiones, crean sinapsis y forman uniones neuromusculares funcionales (Gao et al. 2005, Gao et al. 2007). Células madre trasplantadas en modelos de parálisis en ratas han resultado en crecimiento axonal y recuperación (Deshpande et al. 2006). Recientemente, la diferenciación de células adultas como fibroblastos de pacientes hacia células pluripotentes (induced pluripotent stem cells, iPSCs) que pueden dirigirse y diferenciarse a neuronas motoras *in vitro* (Dimos et al. 2008), abre la posibilidad de trasplantarlas a los pacientes sin generar problemas de autoinmunidad. Este hecho hace de esta una estrategia prometedora de la que existen resultados esperanzadores en la enfermedad de Parkinson, se ha comprobado que neuronas dopaminérgicas diferenciadas a

partir de iPSC de fibroblastos al ser transplantadas a ratones que padecen la enfermedad son funcionales y disminuyen los síntomas de la enfermedad (Wernig et al. 2008). También se ha sugerido que podría ser beneficioso el trasplante de células de soporte: células gliales o células modificadas genéticamente para que secreten factores tróficos que confieran cierta protección a las MNs afectadas, puesto que se han descrito efectos protectores de los factores neurotróficos CNTF y CT-1 en la preservación de la función motora en modelos murinos de SMA (Simon et al. 2010, Lesbordes et al. 2003). Estas técnicas todavía deben corregir algunos aspectos como son la aparición de teratoma, expresión de transgenes, etc. antes de poder ser ampliamente usadas como terapia. Sin embargo, ya han empezado algunos ensayos clínicos en humanos para la enfermedad de Parkinson, y los resultados en modelos animales apuntan a que será una alternativa prometedora (Ronaghi et al. 2010). Recientemente, la compañía de biotecnología Geron comunicó que una persona de Estados Unidos que sufrió una lesión medular se ha convertido en la primera del mundo en recibir un tratamiento basado en células madre embrionarias.

OBJETIVOS

1. CHAPTER 1:

ANALYSIS OF CaMKIV INVOLVEMENT ON SPINAL CORD MNs SURVIVAL

- 1- TO ANALYSE THE CELLULAR DISTRIBUTION OF CaMKIV IN MNs.
- 2- TO ANALYSE CaMKIV CONTRIBUTION TO MN SURVIVAL.
- 3- TO ANALYSE INTRACELLULAR SIGNALLING PATHWAYS ACTIVATED BY CaMKIV.

2. CHAPTER 2:

ANALYSIS OF NTFs AND MEMBRANE DEPOLARIZATION EFFECTS ON CULTURED MOUSE MNs

- 1- CHARACTERIZATION OF THE SURVIVAL EFFECTS OF NTFs AND NEURONAL ACTIVITY (DEPOLARIZATION) ON DEVELOPMENTAL MOUSE MNs PRIMARY CULTURE.
- 2- TO ANALYSE THE INTRACELLULAR CALCIUM INCREASE FOLLOWING MN MEMBRANE DEPOLARIZATION.
- 3- TO ANALYSE THE MOLECULAR MECHANISMS ACTIVATED BY INTRACELLULAR CALCIUM INCREASE FOLLOWING MN MEMBRANE DEPOLARIZATION.

3. CHAPTER 3:

ANALYSIS OF THE EFFECT CAUSED BY SMN PROTEIN REDUCTION IN ISOLATED MNs

- 1- TO ESTABLISH AN SMA PRIMARY CULTURE MODEL.
- 2- ISOLATION AND CULTURE OF MNs FROM AN SMA MOUSE MODEL.
- 3- TO ANALYSE SMN KNOCKDOWN MN MORPHOLOGY AND SURVIVAL.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. CULTIVOS CELULARES

1.1 PREPARACIÓN PLACAS DE CULTIVO CON SUSTRATOS DE ADHESIÓN CELULAR

1.1.1 *Poli-D-Lisina*

A partir de una solución de 5 mg/ml de poli-D-lisina (Sigma) con agua MilliQ estéril se diluye a una concentración de trabajo de 0.01 mg/ml. Se cubren las placas de cultivo con el volumen adecuado durante 30-60 min a temperatura ambiente y se aspira el exceso de medio. Una vez secas se pueden utilizar o guardar a 4°C durante como máximo 15 días.

1.1.2 *Colágeno*

Se diluye colágeno tipo I de cola de rata (BD Biosciences) a una concentración 100 µg/ml en ácido acético 0.02N. Se cubren las placas con el volumen adecuado y se dejan evaporar durante toda una noche dentro de una cabina de flujo para mantener la esterilidad. Una vez secas se pueden utilizar o guardar a 4°C durante como máximo 15 días.

1.1.3 *Poli-DL-Ornitina/Laminina*

A partir de una solución de 10 mg/ml de poli-DL-ornitina (Sigma) en tampón bórico-borato (150mM tetraborato sódico, 150 mM ácido bórico, pH 8.3) se diluye a una concentración de trabajo de 35 µg/ml con el mismo tampón. Se cubren las placas de cultivo con el volumen adecuado durante 4h a temperatura ambiente. Se lavan 3 veces con H₂O Milli-Q (volumen suficiente para que cubra toda la superficie de los pocillos), se aspira el agua del último lavado y se dejan secar 30 minutos a temperatura ambiente. En este punto se pueden usar o guardar a 4°C durante 15 días o usarlas inmediatamente. Seguidamente se prepara la laminina: 3.8 µg/ml Laminina (Sigma) en medio L15 basal sin suero y se cubren de nuevo las placas pre-tratadas con poli-DL-Ornitina, se dejan toda una noche a 37°C. Estas placas pueden usarse durante una semana una vez añadida la laminina siempre que no se sequen. Las placas preparadas deben utilizarse aspirando el medio con laminina y sustituyéndolo por medio con las células pertinentes.

1.2 MEDIOS DE CULTIVO, COMPONENTES Y SOLUCIONES USADAS

Tabla 8. Soluciones y medios de cultivo utilizados.

<u>SOLUCIONES</u>	<u>COMPOSICIÓN</u>
<u>Solución GHEBS:</u>	137 mM NaCl, 2.6 mM KCl, 25 mM glucosa, 25 mM Hepes, 20 µg/ml de Penicilina- Streptomycin (P/S).
<u>HI-HS:</u>	Suero de caballo (<i>Horse serum</i> , Invitrogen) descomplementado por calor. Para ello se mantiene 30 min a 56°C.
<u>HI-FBS:</u>	Suero bovino fetal (<i>Fetal Bovine Serum</i> , Invitrogen) descomplementado por calor. Para ello se mantiene 30 min a 56°C.
<u>L15-H:</u>	Medio L15 (Gibco, Invitrogen) suplementado con 10% de HI-HS.
<u>L15c:</u>	Medio L15 suplementado con 2% HI-HS, 1% N2 (Invitrogen) y P/S.
<u>NBMc:</u>	Medio neurobasal (Gibco, Invitrogen), 2% B27 (Invitrogen), 2% HI-HS, 125 mM L-glutamina (Gibco, Invitrogen), 50 µM β-mercaptoethanol.
<u>NBMc + NTFs:</u>	NBMc suplementado con un cóctel de factores neurotróficos (CNTF, GDNF, HGF a una concentración de 10ng/ml y BDNF a 1ng/ml, (Bio-nova)).
<u>Medio de congelación:</u>	90% HI-FBS y 10% de DMSO (Sigma).
<u>Medio de cultivo para PC12:</u>	Medio DMEM (Gibco, Invitrogen) suplementado con 10% HI-FBS, 15% HI-HS y 20 µg/ml de P/S (Gibco).
<u>Medio de cultivo para HEK 293T:</u>	Medio DMEM (Gibco, Invitrogen) suplementado con 10% HI-FBS y 20 µg/ml de P/S (Gibco).
<u>Solución KREBS (Ph=7.4):</u>	145 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl ₂ , 1 mM MgCl ₂ , 10 mM Hepes, 11 mM Glucosa.

1.3 CULTIVOS PRIMARIOS DE MOTONEURONAS

1.3.1 Cultivo primario de MNs de pollo

Para la obtención de MNs espinales se utilizaron embriones de pollo de 5.5 días (E5.5). Una vez extraído el embrión del huevo, se obtiene por disección la médula espinal. Tras una disociación mecánica y una separación de las células utilizando un gradiente de densidad, obtenemos las MNs purificadas. Se obtienen aproximadamente entre $2.5 \times 10^5 - 3 \times 10^5$ células por cada médula.

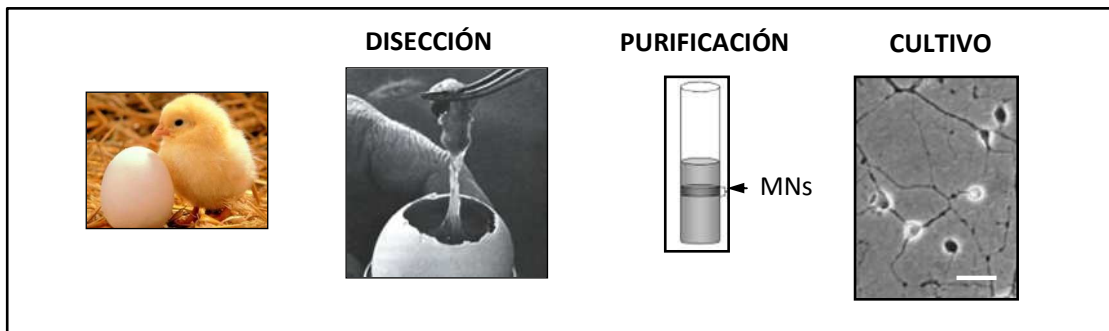


Figura 39. Esquema de la purificación y cultivo de las MNs de embriones de pollo.

Disección del embrión: En primer lugar, esterilizamos los huevos vaporizándolos con etanol al 70%. Se extrae el embrión a través de un pequeño orificio en la parte superior del huevo. Una vez extraído se coloca en una placa con solución salina, GHEBS. Se eliminan las membranas que cubren el embrión y se corta la cabeza, para facilitar su manipulación.

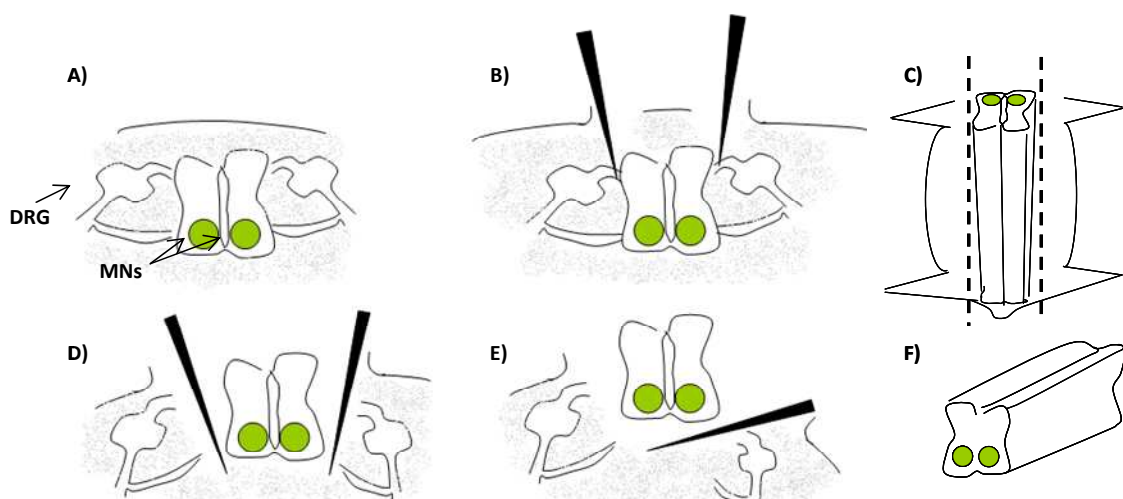


Figura 40. Esquema del proceso de disección de la médula espinal de pollo.

Seguidamente procedemos a realizar la extracción de la médula, se dispone al embrión boca-abajo en una placa de silicona y se fija por las extremidades, con la ayuda de pequeñas agujas.

Una vez fijado, se realizan dos cortes longitudinales paralelos a la médula espinal (figura 41, B i C), y se retira la capa de piel que la cubre, permitiéndonos la observación directa de la médula. A continuación se procede a realizar su extracción con ayuda de las pinzas (figura 41 D, E, F).

Se limpia de las meninges ayudándonos de dos pinzas y se dispone en un tubo de fondo cónico con GHEBS. Se disponen 4-5 medulas por tubo.

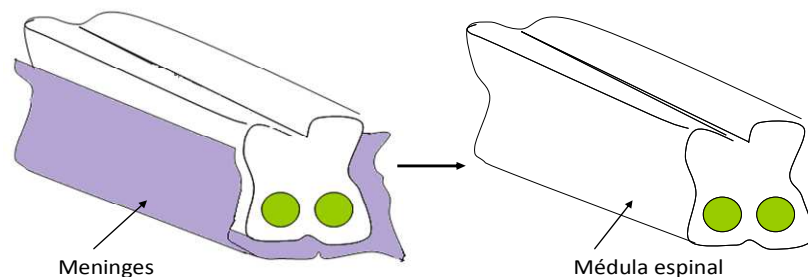


Figura 41. Detalle de la separación de las meninges de la médula espinal.

Purificación de las motoneuronas de la médula espinal de embriones de pollo:

Una vez extraído el embrión y diseccionado la médula purificamos las MNs del resto de células. Para ello hemos seguido el siguiente protocolo:

- Lavamos las medulas cambiando la solución GHEBS tres veces, para eliminar sangre y pequeños trozos de embrión.
- Realizamos una **disociación enzimática** del tejido. Se incuban las médulas a 37°C durante 13 minutos (min) en presencia de GHEBS y Tripsina (0.5 g/l; Tripsina 1X (2.5 g/l), Sigma).
- Tras la digestión enzimática, las médulas se colocan en un tubo con 3 ml de medio L15H.
- Se realizan 3 lavados más con este medio.
- Para disgregar las células que forman la médula la digestión enzimática no es suficiente, por ello realizamos una **disociación mecánica**: resuspendemos las células en 1 ml de medio L15H suplementado con 0.2 mg/ml de DNAsa (Roche) y 2 mM de piruvato (Fluka) y pasamos suavemente las células 10 veces por una punta de pipeta de diámetro $\varnothing = 13''/16''$ con filtro.

- Seguidamente, la solución de células se pasa por una malla de nylon (sin ejercer presión, la suspensión de células atraviesa la malla por gravedad), para eliminar los grupos grandes de células que no se han disgregado.
- Se centrifuga la solución con células disgregadas en un gradiente de Albúmina sérica Bovina (BSA) al 4% (Sigma), se centrifuga durante 5 min a 140 g.
- Se descarta el sobrenadante y se resuspenden las células con 1 ml de GHEBS.
- Para purificar las MNs del resto de células que componen la medula se realiza un gradiente de densidad con Optiprep (Axis-Shield). Se prepara una relación de Optiprep al 30% en GHEBS y disponemos cuidadosamente las células (resuspendidas en 1 ml) sobre la solución de Optiprep.
- Se centrifuga durante 10 min a 520 g; así obtenemos una banda que corresponde a las MNs.

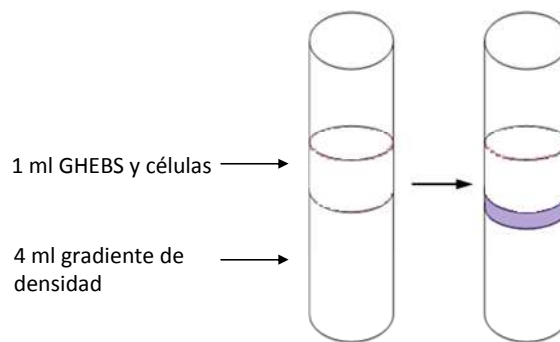


Figura 42. Gradiente de Optiprep para purificar las MNs espinales.
La banda morada señalaría la localización de las MNs en el gradiente.

- Recogemos cuidadosamente la banda con ayuda de una pipeta y pasamos las células a un tubo estéril.

Recuento y siembra de las MN: Para el recuento de las MNs obtenidas se utiliza la cámara de Burker o de Neubauer. Las MNs se siembran en placas de cultivo (Falcon o NUNC) previamente tratadas con 35 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de poli-DL-ornitina e incubadas con 3.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de laminina (Sigma) en medio L15H.

Una vez purificadas, las MNs se mantienen *in vitro* en presencia de:

1. medio L15H en presencia de cóctel de NTFs, o en los casos indicados en presencia de un único factor (a la misma concentración que en el cóctel de NTFs, especificado en el apartado 6.2 de Materiales y Métodos).
2. o para experimentos específicos en medio NBMc y NBMc+NTFs

Las neuronas se mantienen entre 4-7 días en cultivo en todos los medios descritos.

1.3.2 Cultivo primario de MNs de ratón

En este caso para la obtención de MNs espinales se utilizan embriones de ratones CD-1 de 12.5 días (E12.5). Una vez extraído el embrión de la placenta, se obtiene la médula espinal por disección. Tras una disociación mecánica y una separación de las células utilizando un gradiente de densidad, obtenemos las MNs purificadas. Se obtienen aproximadamente entre $2.5 \times 10^4 - 4 \times 10^4$ células por cada médula.

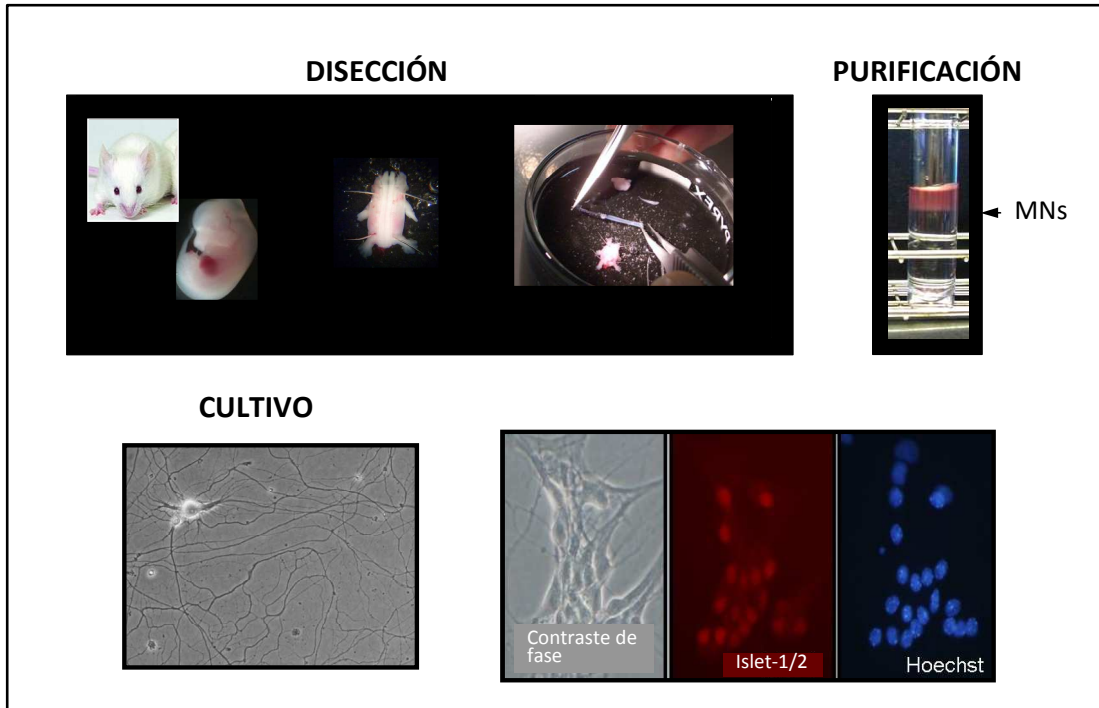


Figura 43. Esquema de la disección, purificación y cultivo de las MNs espinales de ratón.

Disección del embrión: En primer lugar, se extraen los embriones de la placenta y se colocan en una placa con solución salina, GHEBS.

Para la extracción de la médula, se corta la cabeza del embrión (para facilitar la manipulación) y se dispone al embrión boca-abajo sobre una placa de silicona con GHEBS y se fija por las extremidades, con la ayuda de pequeñas agujas.

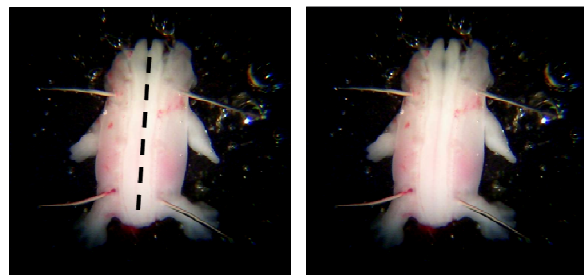


Figura 44. Proceso de disección del embrión de ratón.

Una vez fijado, se realiza un corte longitudinal sobre la parte central de la médula espinal de una profundidad de 1-2mm (Figura 44 i Figura 45 B) permitiéndonos la observación directa de la médula.

Se corta y descarta la parte dorsal (Figura 45 C.1 i C.2), puesto que las MN se encuentran en la parte ventral, y se procede a extraer la médula con la ayuda de las

pinzas. Primero se despega cuidadosamente por los laterales (Figura 45) y seguidamente por debajo (Figura 45 E y F).

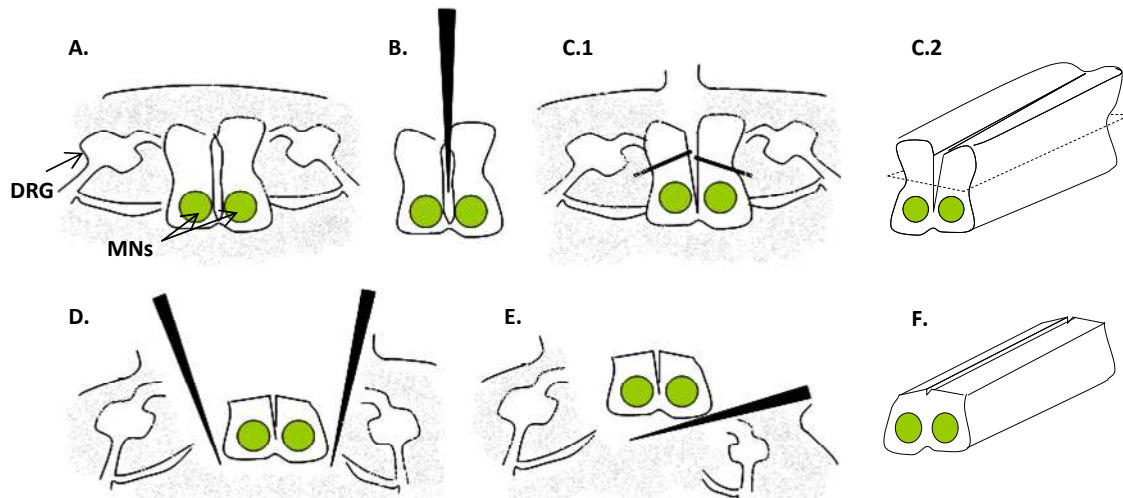


Figura 45. Esquema de los pasos seguidos para la disección de la médula espinal de embriones de ratón.

Una vez extraída la médula espinal es importante separar bien las meninges con la ayuda de las pinzas.

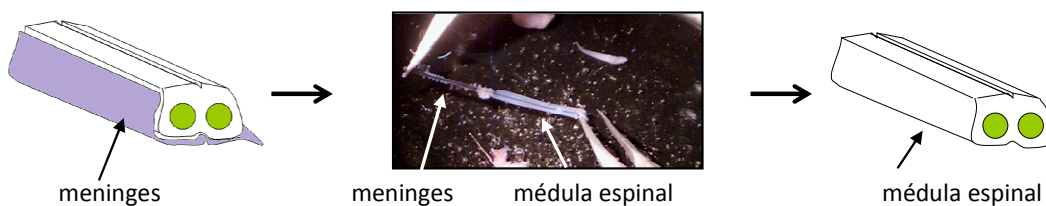


Figura 46. Detalle de la separación de las meninges de la médula espinal.

Cada médula se trocea en fragmentos de 2-3mm y se colocan 3-4 médulas en un tubo de fondo cónico con GHEBS.

Purificación de las motoneuronas de la médula espinal de embriones de ratón:

El proceso de purificación debe realizarse lo más rápido posible, pero siempre tratando la muestra con suavidad y precisión. Se ha seguido el siguiente protocolo:

- Se realizan 2 lavados con GHEBS, para eliminar restos de hematíes u otras células.
- Realizamos una **disociación enzimática** del tejido tratando los fragmentos de médula espinal con tripsina al 0.025% (Sigma) en medio GHEBS durante 9 min a 37 °C.
- Se recoge el tejido con una pipeta Pasteur (aspirando la menor cantidad posible de tripsina), y se dispone en un tubo de fondo cónico con 100 μ l de BSA al 4% + 800 μ l de medio L15c. Se añade la DNAsa (100 μ l de una solución 1mg/ml en L15) y se agita durante 2 minutos.

- Seguidamente se procede a realizar la **primera disociación mecánica** pasando los trozos de tejido de médula espinal tripsinizado 4 veces a través de una punta de pipeta de 1ml con filtro.
- Se dejan los tubos en posición vertical 2 min sin agitar (tiempo suficiente para que los trozos de tejido no disociados precipiten al fondo del tubo).
- Se recoge el sobrenadante, dónde las células disociadas permanecen en suspensión y se coloca en un nuevo tubo de fondo cónico.
- Se realiza una **segunda disociación mecánica** sobre los trozos de médula que quedan al fondo del tubo añadiendo 900 μ l L15c + 100 μ l BSA 4% + 20 μ l DNAsa (de una solución 1mg/ml en L15) y pasando los trozos de tejido 7 veces a través de una punta de pipeta de 1ml con filtro.
- Se recoge el sobrenadante y se coloca en el mismo tubo.
- Se añaden 4ml de la solución de BSA al 4% y se centrifuga durante 5 minutos (min) a 140 g.
- Se resuspende el pellet en 1ml de L15c, pasando 4 veces a través de la punta de pipeta con filtro.

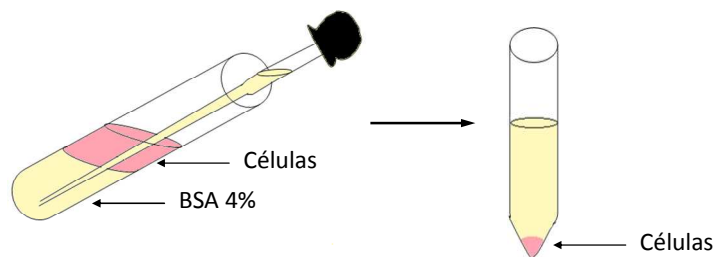


Figura 47. Centrifugación de las células en medio rico en BSA.

- Se realiza un gradiente de densidad con Optiprep (Axis-Shield), para purificar las MNs del resto de células que componen la médula. Se prepara una relación de Optiprep al 12.5% en GHEBS y se centrifuga durante 10 min a 520 g.

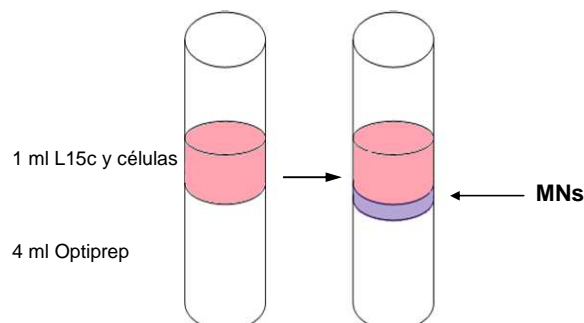


Figura 48. Gradiente de Optiprep.

- Obtenemos una banda que corresponde a las MNs, recogemos cuidadosamente la banda con la pipeta y disponemos las células en un tubo estéril.

Recuento y siembra de las MNs: Para el recuento de las MNs obtenidas se utiliza la cámara de Burker o de Neubauer. Las MNs se siembran en placas de cultivo (Falcon o NUNC) previamente tratadas con poli-DL-ornitina e incubadas con laminina en medio L15. Las células se siembran en medio NBMc+NTFs. Las neuronas se mantienen entre 12-15 días en cultivo. Para cultivos que mantenemos durante más de 72 horas añadimos Aphidicolina (2 µg/ml) al medio de cultivo.

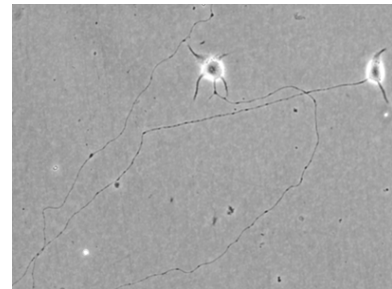


Figura 49. MNs en cultivo.

1.3.3 Cultivo primario de MNs de ratones *SMN^{tm1/Msd}* :

Los ratones *SMN^{tm1/Msd}* son un modelo de estudio de las formas severas de la enfermedad SMA. Estos ratones presentan dos copias del transgén *SMN2* humano en un fondo genético heterocigoto para *SMN* (ratones con una copia del gen *SMN* funcional y otra copia interrumpida por un casete de resistencia a neomicina).

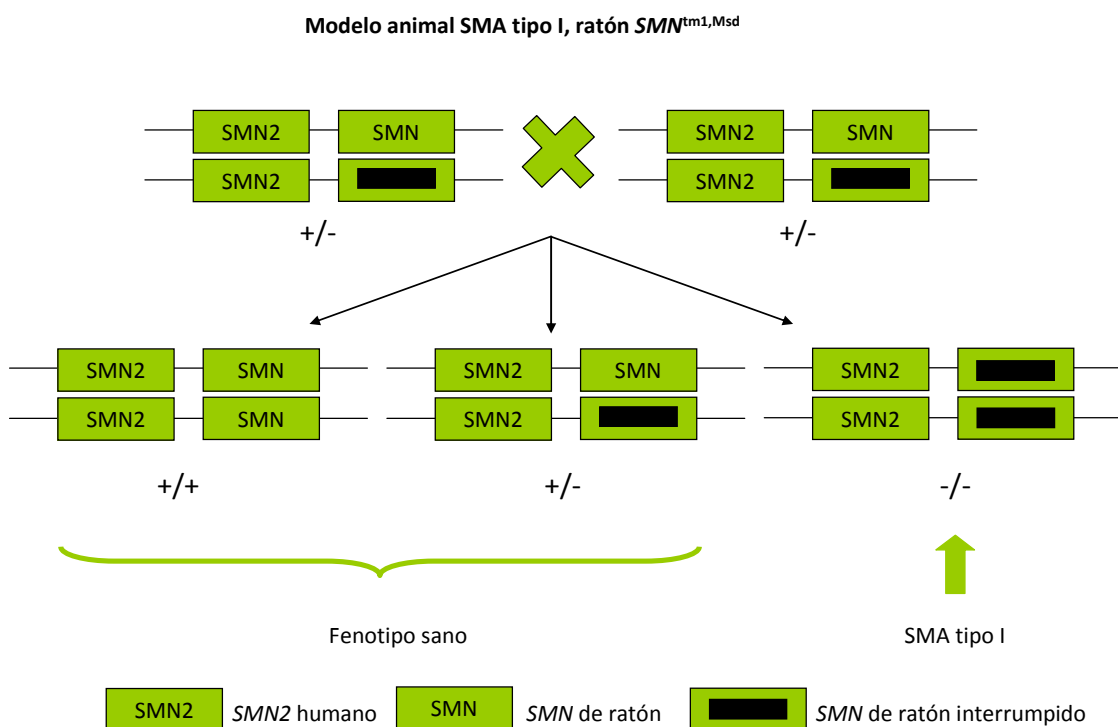


Figura 50. Genotipo de los ratones *SMN^{tm1/Msd}*, modelo animal de SMA.

Los rectángulos negros indican la inserción de un casete de resistencia a neomicina que interrumpe el gen *SMN*. Así, estos animales son transgénicos para *SMN2* humano y mutantes para *SMN*.

Aquellos animales *knockout* (-/-) para el gen *SMN* de ratón desarrollan un fenotipo muy parecido a la Atrofia Muscular Espinal tipo I y mueren entre los días postnatales 4 y 6. Para el mantenimiento de la colonia cruzamos ratones heterocigotos (que no muestran síntomas de la enfermedad).

Para la extracción de la médula, purificación y cultivo de las MNs seguimos el protocolo descrito para los ratones CD-1 con pequeñas modificaciones, reducimos los pasos de disociación mecánica. El cultivo de MNs de los ratones *SMN*^{tm1/Msd}, requiere un paso previo: genotipar los embriones para separar los mutantes (-/-), los heterocigotos (+/-) y los *wild type* (+/+) para el gen *SMN* de ratón que tienen integrado en su genoma el gen *SMN2* humano, antes de empezar la disección. Para ello extraemos los embriones y cortamos parte de cola o un tejido mayor para procesarlo. Mientras realizamos el genotipado (aproximadamente 4 horas) mantenemos a los embriones en una placa en medio GHEBS sobre hielo.

1.3.3.1 Genotipado de ratones *SMN*^{tm1/Msd}

Para la obtención de DNA genómico de los ratones jóvenes y embriones y su posterior amplificación se ha usado el kit comercial: REExtract-N-AmpTM Tissue PCR Kit (Sigma).

1.3.3.1.1 Extracción de DNA

Se ha extraído el DNA de una porción de tejido del extremo de la cola o de un trozo de tejido mayor en el caso de los embriones. Para la extracción se han seguido los pasos que indica el kit. Es un proceso extremadamente rápido, en una hora se obtiene el DNA.

- I. Poner un trozo de tejido de cada ratón en un eppendorf. (Embriones: cabeza, adultos: cola).
- II. Preparar la solución de extracción manteniendo la proporción:
- III. 3 Volúmenes de *extraction buffer* + 1 Volumen de *Tissue Prep*.
- IV. Añadir 50µl de la solución de extracción a cada muestra. Dejar 10 minutos a temperatura ambiente.
- V. Poner las muestras 3 minutos a 95°C.
- VI. Añadimos 50 µl de *neutralisation buffer* a cada muestra y centrifugamos 10 minutos a 13000 rpm.
- VII. Recogemos el sobrenadante a un eppendorf limpio y ya podemos proceder a analizar las muestras por PCR. Se pueden guardar los sobrenadantes a 4°C siendo estables hasta 6 meses.

1.3.3.1.2 Amplificación de DNA por PCR:

La mezcla de la reacción para PCR incluida en el kit contiene el anticuerpo JumpStart Taq para amplificación específica a altas temperaturas. Es por ello, que las reacciones de PCR se pueden ensamblar a temperatura ambiente sin actividad prematura de la DNA Taq polimerasa.

Mezcla	Volumen (μl)
Buffer extraction-N-Amp-PCR	4,65
H ₂ O MQ	1,55
Primer 20 μM forward (compartido)	0,6
Primer 20 μM reverse SMN	0,6
Primer 20 μM reverse SMN interrumpido por el casete de resistencia a neomicina	0,6
DNA	2

*Se usan de 5-20ng de DNA por reacción.

Los cebadores (*primers*) usados diseñados por *The Jackson Laboratory*:

Forward (común para SMN de ratón del gen *wild type* y el interrumpido):

5'CTCCGGGATATTGGGATTG3'

Reverse1 (para SMN de ratón):

5'GGTAACGCCAGGGTTTTCC3'

Reverse2 (para SMN interrumpido por el casete de resistencia a neomicina):

5'TTTCTTCTGGCTGTGCCTTT3'

Programa de PCR:

94°C 4' // 94°C 1' // 62°C 1'30" // 72°C 1'30" // 72°C 7' // 4°C ∞

35 ciclos

1.3.3.1.3 Comprobación y análisis del genotipo:

Una vez terminada la amplificación se retiran los tubos de la placa del termociclador y se analiza el DNA amplificado mediante electroforesis de DNA en un gel de agarosa al 1.2%.

En el caso de los animales *wild type* (+/+) se espera observar como producto de amplificación fragmentos de DNA de 800Kb correspondientes a SMN de ratón, en los ratones mutantes (-/-) únicamente fragmentos de 500Kb correspondientes al casete de resistencia a Neomicina y en los heterocigotos ambos fragmentos.

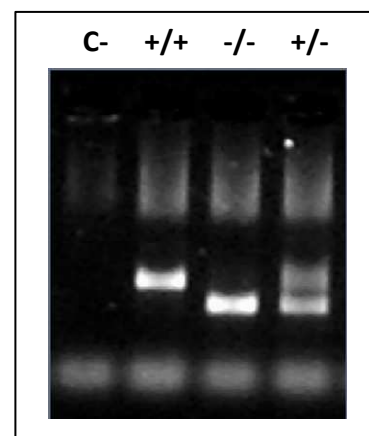


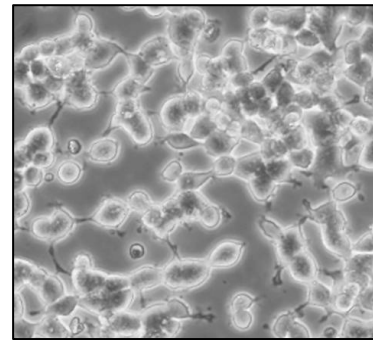
Figura 51. Gel de agarosa.

1.4 LÍNEAS CELULARES

1.4.1 Línea celular PC12

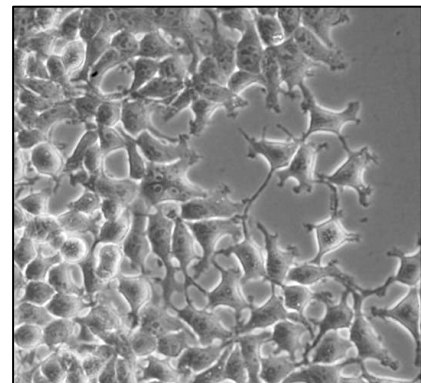
La línea celular PC12 deriva de un feocromocitoma de glándula adrenal de rata. Fue generada por Greene y Tischler en 1976 (Greene and Tischler, 1976). Estas células en presencia del factor de crecimiento nervioso (NGF) en el medio de cultivo adquieren un fenotipo neuronal.

El mantenimiento de esta línea celular se realiza despegando las células mecánicamente (no requieren tripsinización), centrifugándolas a 130 g durante 5 min y dividiéndolas cuando los niveles de confluencia en placa sean aproximadamente del 80-90% entre 1:3 y 1:5 en placas de cultivo de 100 mm de diámetro (p100) (Falcon Discovery Labware, BD Biosciences) en el medio de cultivo adecuado. Las células se incuban a 37° C, en atmósfera saturada (95% de aire y 5% de CO₂) en una estufa de incubación. El medio de cultivo debe cambiarse cada 2-3 días. Para los experimentos de diferenciación neuronal las placas se tratan con poli-D-lisina.



1.4.2 HEK 293T Cell Line (Human Embryonic Kidney)

La línea celular humana de riñón embrionario HEK 293T es un buen modelo para sobre-expresar y obtener proteínas celulares, extracelulares secretadas o de membrana. Es una variante de la línea celular humana del epitelio renal 293, transformada con el gen E1A de adenovirus tipo5, que expresa el antígeno T de SV40. El mantenimiento de esta línea celular se realiza despegando las células mecánicamente (no requieren tripsinización), centrifugándolas aprox. a 130 g durante 5 min y dividiéndolas cuándo alcancen el 80-90% de confluencia entre 1:10 y 1:20 en placas de cultivo de 100 mm de diámetro (p100) (Falcon Discovery Labware, BD Biosciences) en el medio de cultivo adecuado. Las células se incuban a 37° C, en atmósfera controlada (de 5% de CO₂) en una estufa de incubación. El medio de cultivo debe cambiarse cada 2-3 días. Para producir lentivirus, las células HEK 293T se cultivan en placas de cultivo tratadas previamente con colágeno.



1.4.3 Descongelación-congelación de líneas celulares

Para descongelar las líneas celulares, se sacan los viales del contenedor de N₂ líquido y se ponen a 37 °C. Una vez descongelados, se recogen las células en un tubo de centrifuga de fondo cónico, se añade medio basal o PBS para alcanzar un volumen final de 10ml y se centrifuga 5 min a 130 g. Se resuspenden en su medio adecuado y se cultivan en placas de cultivo en estufas de incubación con atmósfera de CO₂ controlada.

Para congelar las líneas celulares, se despegan las células usando 1-2 ml de medio de cultivo y se recogen en un vial de fondo cónico para centrifugar. Se añade PBS o medio de cultivo hasta un volumen final de 10 ml, se centrifugan a 130 g durante 5 min. Se aspira el medio y se resuspende el pellet de células en medio de congelación a una relación de 2x10⁶ células/ml. Se distribuye 1 ml de células en cada vial criogénico, se mantiene dentro de un termo a -80 °C durante 24 h para conseguir un proceso de congelación lento y seguidamente se conservan las células congeladas en N₂ líquido.

2. TÉCNICAS PARA EVALUAR LA VIABILIDAD NEURONAL

2.1 MUERTE NEURONAL:

2.1.1 Tinción con bis-benzimida Hoechst

El Hoechst 33258 es un colorante fluorescente que penetra en la membrana plasmática de las células y se une a las regiones ricas de AT (Adenosina-Timidina) de la cadena doble de DNA. Una vez unido, se excita cerca del ultravioleta (UV) (350 nm) y emite en la región de luz azul (450 nm), permitiendo así la detección del DNA y siendo no tóxico para la célula.

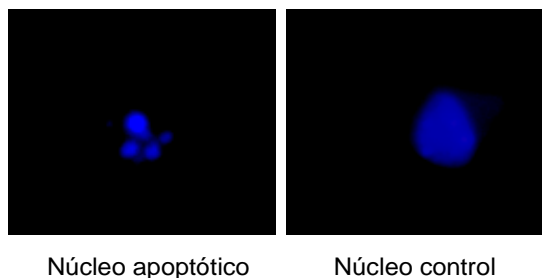


Figura 52. Morfología de un núcleo apoptótico teñido con Hoechst.

La bis-benzimida Hoechst nos permite valorar el estado de la célula según la morfología nuclear que presenta. Con este tipo de tinción conseguimos cuantificar aquellos núcleos que tienen una morfología apoptótica por condensación o fragmentación nuclear. Para estos experimentos, las MNs se tratan con las diferentes

condiciones de experimentación y tras el período de tratamiento deseado para el estudio se fijan con paraformaldehído al 4% (Fluka, Neu Ulm) durante 20 minutos, se lavan con PBS 1X y se tiñen con bis-benzimida a una concentración de 2 µg/ml, durante 30 minutos. Por último, las células se lavan con PBS 1X. El porcentaje de muerte se evalúa contando aquellas células que presentan un núcleo con morfología apoptótica (Hoechst tiñe los cuerpos apoptóticos, se observan como una fragmentación nuclear), respecto a aquellas con un núcleo con morfología sana (el núcleo muestra una tinción homogénea).

2.1.2 Recuento de células apoptóticas por Blebbing

Otro parámetro utilizado para evaluar la muerte neuronal es lo que se denomina *Blebbing*, término que procede del inglés para definir la aparición de protuberancias en la membrana plasmática de las células apoptóticas.

Para observar este fenómeno después de sembrar las MNs se co-transfectan con los diferentes plásmidos a estudiar y un plásmido que contenga la secuencia de transcripción de la proteína *Yellow Fluorescent Protein* (YFP) o la de *Green Fluorescent Protein* (GFP) a una relación (3:1 respectivamente), utilizando Lipofectamine™2000 (LPF), ver más adelante. 12h después de la transfección las células se lavan con L15H para eliminar los restos de LPF, y se tratan con las diferentes condiciones a estudiar. Se procede a cuantificar el porcentaje de muerte 48 o 72 horas después del tratamiento considerando las MNs GFP positivas. Valoramos como neuronas muertas aquellas que presentan una morfología de *blebbing* (presentan lobulaciones en la membrana) y como vivas, las MNs que tienen neuritas de una longitud dos veces igual o superior al tamaño del soma.

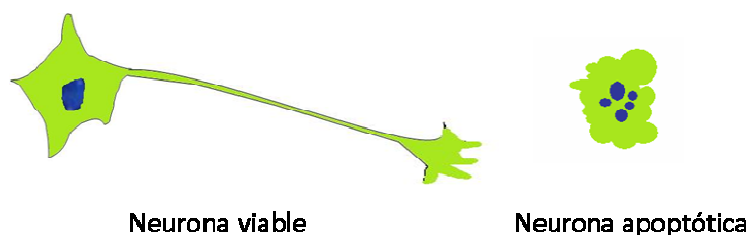


Figura 53. Morfología de una célula apoptótica, *blebbing*.

2.2 SUPERVIVENCIA NEURONAL

Para los experimentos de supervivencia realizamos siempre tres repeticiones de cada condición en cada experimento y realizamos un mínimo de tres experimentos independientes de cada tratamiento.

2.2.1 Análisis de la supervivencia en cultivos primarios de MNs de pollo

La evaluación de la supervivencia se realizó en dos tipos de experimentos:

- I. Las MNs se cultivaron en presencia de factores neurotróficos, a la concentración de 10 ng/ml, durante 48 h a 37 °C y 5% de CO₂. Pasado este tiempo las células se lavaron con L15H y se añadieron los diferentes tratamientos (especificados en los resultados). 24 o 48 h después del tratamiento se evaluó la supervivencia. Se utilizó el microscopio invertido de contraste de fase, y se contaron aquellas células que tenían neuritas de tamaño igual o superior a dos veces el tamaño del soma.
- II. Otro tipo de experimentos fueron aquellos en los que se transfectaron las células con diferentes plásmidos. Las MNs se mantenían 2 días en cultivo para que se expresaran las proteínas transfectadas, y tras este tiempo, se trataban los cultivos con las diferentes condiciones de experimentación. Inmediatamente después del tratamiento se realizaba un primer recuento, utilizando el microscopio de fluorescencia, se contaban únicamente aquellas células que expresaban la proteína GFP, e igual que en el caso anterior, se consideraba como célula viva, aquella MN que tenía un tamaño de neurita dos veces superior al tamaño del soma o mayor. El valor obtenido a este tiempo se consideraba el 100% de la supervivencia. Transcurridas 24-48 h después del tratamiento, se realizaba un segundo conteo de los mismos pocillos. El porcentaje de supervivencia se obtenía como la relación entre las células contadas al final del tratamiento, respecto a las contadas al inicio.

2.2.2 Análisis de la supervivencia en cultivos primarios de MNs de ratón

- I. Sembramos las MNs de ratón en medio NBMc a muy baja densidad: 500 células/cm² y dos horas después se añaden los diferentes tratamientos (especificados en resultados). Se evalúa la supervivencia 48h o 72h después del tratamiento, para ello utilizamos el microscopio invertido de contraste de fase, y contamos aquellas células que tienen neuritas de tamaño igual o superior a dos veces el tamaño del soma en todo el pocillo.
- II. Se ha evaluado la supervivencia en cultivos primarios de MNs transducidas con lentivirus con la finalidad de analizar si la simple interferencia o la sobre-expresión de determinadas proteínas afectan a la viabilidad neuronal. Para ello plantamos 5.000 células/cm² y seguimos el protocolo de transducción habitual y cuándo cambiamos el medio que contiene partículas lentivirales y añadimos NBMc+NTFs. Los mismos campos son fotografiados los días sucesivos y comparamos el número de MNs respecto el día 0, para ello nos ayudamos con el programa informático imageJ.

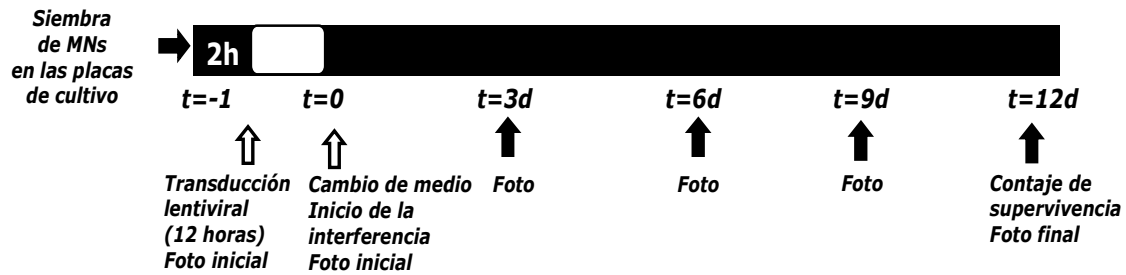


Figura 54. Esquema temporal del conteo de supervivencia II.

III. Para aquellos experimentos en los que se ha evaluado la supervivencia de cultivos primarios de MNs transducidas con lentivirus con la finalidad de observar si la interferencia o sobre-expresión de determinadas proteínas confieren protección o inducen mayor sensibilidad a diferentes tratamientos, hemos dejado que el cultivo se establezca durante días necesarios para observar una interferencia o sobre-expresión significativa de la proteína (en el caso de μ -Calpaína necesitamos 6 días de interferencia para reducir los niveles a un 10-20%). En este punto (tiempo 0) lavamos las células con PBS1x, realizamos un cambio de medio con los distintos tratamientos y tomamos imágenes de cada pocillo. 48 y 72 h después del inicio del tratamiento realizamos fotos de los mismos campos y valoramos el porcentaje de supervivencia de cada pocillo respecto la foto inicial.



Figura 55. Esquema temporal del conteo de supervivencia III.

3. TRANSFECCIÓN CELULAR

Para transfectar hemos usado Lipofectamine™2000 (Gibco), reactivo basado en lípidos catiónicos, de composición protegida y registrada, optimizado para la transfección de ácidos nucleicos en una gran variedad de células eucariotas. Se añaden los complejos DNA-LPF directamente al cultivo de células y en ausencia de suero. Hemos usado este protocolo para transfectar tanto la línea celular PC12 como cultivos primarios de MNs de pollo con los plásmidos: pcDNA3-FLAG, pcDNA3-FLAG-CaMKIV_{CA},

o pcDNA3-FLAG-CaMKIV_{CA}-KD, co-transfectados con el plásmido pEGFP (*enhanced green fluorescent protein*) a una relación de 3:1. La efectividad de transfección en líneas celulares es de aproximadamente 60-75%, mientras que para cultivos primarios ronda al 30%.

Se plaquean las células en medio completo un día antes de la transfección para que estén entre un 80-90% de confluencia en el caso de líneas celulares y para cultivos primarios se siembra el número de células deseado y se esperan 24h, para que las células se estabilicen, para realizar la transfección.

Los experimentos en los que hemos usado Lipofectamine™2000 se han realizado en placas de 4 pocillos (2 cm² de superficie).

Protocolo:

- Se prepara en un eppendorf la LPF: por cada pocillo 60 µl Optimem más 0,8 µl de LPF (4°C).
- Se prepara en otro eppendorf el DNA plasmídico: por cada pocillo 60 µl Optimem más 1 µg de DNA (plásmido de interés).
- Se añade la LPF al eppendorf que contiene el DNA y se mezcla.
- Se deja a oscuras durante 20 minutos para que se formen las micelas con el DNA (no más de 25 minutos).
- Justo antes que terminen los 20 minutos se realizan dos lavados a las placas con Optimem para eliminar el suero.
- Luego se añaden a cada pocillo 120 µl de la mezcla DNA + LPF y se esperan cinco-diez minutos con las células en el incubador.
- Finalmente, se añaden 300 µl de medio completo a cada pocillo y se espera 24-48h para evaluar la transfección.

4. TRANSDUCCIÓN LENTIVIRAL

Los vectores lentivirales permiten la integración del DNA plasmídico al genoma de las células que infectan, por ello tienen la ventaja de conseguir una expresión a largo plazo y en el caso de infectar una línea celular se transmite a la descendencia.

En nuestro laboratorio usamos un sistema de producción lentiviral de segunda generación. Estos sistemas con el fin de disminuir riesgos de infección durante los procesos de manipulación y producción contemplan: la eliminación de cinco de los 9 genes HIV-1, dejando las secuencias gag y pol, que codifican respectivamente para componentes estructurales y enzimáticos de los viriones y los genes tat y rev, que realizan funciones transcripcionales y post-transcripcionales y dividen la carga lentiviral en tres vectores diferentes:

- I. Vector que incorpora la secuencia de DNA de interés: este vector contiene la secuencia de DNA a transferir a la célula diana. Hemos usado FCIV (cedido por el Dr. Mario Encimas) y pLVTHM (Tronolabs, www.tronolab.com).

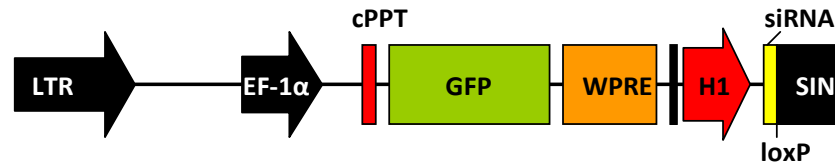


Figura 56. Vector pLVTHM.

EF-1alfa promotor: promotor del Factor de Elongación 1

cPPT ('central Polypurine Tract'): secuencia de 118 bp que deriva del gen pol del HIV-1 que incrementa la eficiencia de la transducción de vectores lentivirales.

WPRE ('woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element'): elemento regulador posttranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota que se incorpora para aumentar la expresión del transgén.

SIN ('self-inactiving'): región del 3' LTR del virus modificada para que los vectores lentivirales se auto-inactiven una vez integrados en el genoma del huésped, ya que esta región deletada se copia en el 5'LTR una vez integrado, reduciendo la movilización del genoma del vector y la influencia del LTR sobre promotores celulares endógenos cercanos al sitio de integración

H1: promotor del gen del componente ribonucleico (RNA) de la RNasa P, H1.

- II. Construcción para el empaquetamiento: Es el vector que contiene todas las proteínas necesarias para el empaquetamiento del virus, hemos usado psPAX2 (Tronolab).

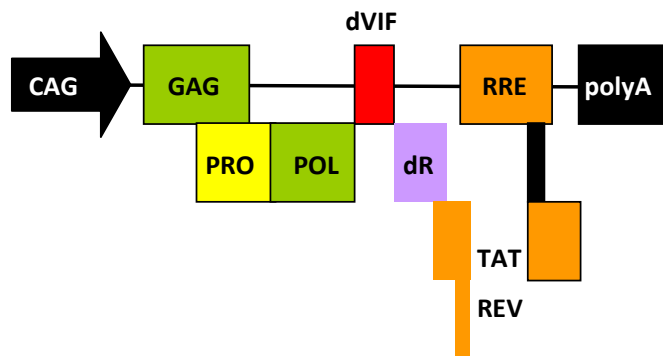


Figura 57. Vector psPAX2.

Gag: gen que codifica para diferentes proteínas de la nucleocápside y de la matriz.

Pol: gen que codifica para la transcriptasa inversa, para una proteasa y para la integrasa.

Tat: gen que codifica para una proteína necesaria para la transactivación.

Rev: gen que codifica para una proteína necesaria para la regulación del transporte y el procesamiento del RNA.

RRE ('Rev-responsive element'): necesario para la acción de Rev.

- III. Construcción para la cápside: Es el vector que codifica para la cápside del virus. La proteína vírica es del virus estomatitis vesicular (VSV),

permitiendo la infección de una amplia variedad de tejidos y líneas celulares. El vector que hemos empleado es pM2 (Tronolab).

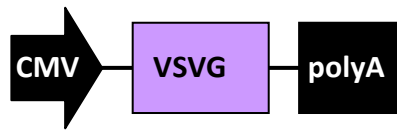


Figura 58. Vector pM2.

VSVG: gen heterólogo de la proteína G del VSV. Está flanqueado por un promotor de citomegalovirus (CMV) y por una cola de polyA.

4.1 PRODUCCIÓN DE LENTIVIRUS

Para producir las partículas lentivirales que incorporen las secuencias shRNA o la sobre-expresión de proteínas de interés, usamos la línea celular HEK 293T. Transfectamos las células HEK 293T con los plásmidos necesarios para la producción de lentivirus (como usamos el sistema de segunda generación transfectamos a la vez 3 plásmidos), usando polietilenimina (PEI) (Sigma).

La polietilenimina se obtiene por polimerización de la aziridina (etilenimina) formándose una red altamente ramificada con un alto potencial catiónico que puede unir el DNA. Desde 1995, la PEI se ha utilizado comúnmente por ser un agente polimérico que condensa firmemente el DNA plasmídico y promueve la llegada del DNA al núcleo de las células de mamífero. Se ha demostrado que los complejos catiónicos lípido-DNA pueden unirse y interactuar con los proteoglicanos expresados en la superficie de las células de mamífero, promoviendo su incorporación intracelular. La presencia de PEI en el núcleo celular puede interferir con procesos de transcripción y traducción hasta llegar a inducir muerte celular, debido a su alta densidad catiónica. Por consiguiente, se debe llegar empíricamente a un compromiso que promueva la incorporación del DNA plasmídico reduciendo al mínimo los efectos nocivos de PEI en la viabilidad celular.

Preparación del PEI: Se prepara una solución concentrada de 20% de PEI en agua MiliQ (equivale a 8 mM de PEI y a 4.5 M en equivalentes de Nitrógeno) que sirve para preparar una intermedia de 200 μ M a pH 5,6. Finalmente, la concentración de la solución que usaremos para transfectar es de 10 μ M. El reactivo PEI se guarda a -20°C.

Protocolo de Transfección:

- **Día 1:** Preparamos placas con colágeno, usamos placas de 10 cm de diámetro.
- **Día 2:** Sembramos 10^6 células (HEK 293T) en cada placa (por la tarde).
- **Día 3:** Realizamos los lavados con medio de cultivo Optimem sin suero ni antibiótico, usamos el mínimo volumen requerido de medio para cubrir la placa de cultivo.

- Por una parte en un tubo se diluye el DNA experimental con Optimem (Gibco). Las concentraciones de plásmidos usadas para una placa p100 son:
 - 20 µg del vector lentiviral que contiene la secuencia shRNA o la sobre-expresión de la proteína de interés (pLVTHM o FCIV)
 - 13 µg del plásmido empaquetador pSPAX2 (Trono lab)
 - 7 µg pM2 del plásmido de envoltura (Trono Lab)
 - en 1500 µl de Optimem
- En otro tubo se diluye el PEI con Optimem. Por cada placa usamos:
 - 240 µl de la solución PEI 10 µM
 - en 1260 µl Optimem
- Se añade el PEI diluido sobre la solución de DNA gota a gota, en este orden, y se agita rápidamente con vórtex durante 4 segundos para evitar la formación de grandes agregados, que pueden ser tóxicos.
- Se deja la mezcla 10 min a temperatura ambiente en reposo.
- Durante los 10 min se realiza un lavado a las placas con 5 ml de Optimem para eliminar el suero.
- Se vuelve a agitar la mezcla, se aspira el medio de la placa y se añade la mezcla.
- Añadimos 4 ml de medio Optimem a cada placa y se dejan las placas al incubador a 37°C y 5% CO₂ durante 1 hora.
- Terminada la incubación se descarta el medio, se reemplaza por 10 ml de medio DMEM + 10% FBS y se mantienen las placas al incubador durante la producción de los lentivirus. La expresión del DNA ectópico se puede monitorizar entre las 24-48 h siguientes.
- Pasadas 48 y 72 horas se recoge el medio, se centrifuga a 140g durante 5 minutos y se filtra el sobrenadante con un filtro de 0.45 µm de diámetro de poro (para evitar recoger células HEK293T).
- Finalmente aliquotamos el medio que contiene las partículas virales en viales criogénicos de 1 ml y se almacenan a -80°C. (Una vez descongelado 1 vial no se vuelve a congelar porque se reduce de 2 a 3 veces la titulación).
- Posteriormente se descongela un vial de cada construcción lentiviral y se procede a realizar la titulación.

4.2 TITULACIÓN LENTIVIRAL

Existen distintos métodos para la titulación de lentivirus. La mayoría de construcciones lentivirales que hemos usado expresan la proteína fluorescente verde (GFP), por ello nuestro método de titulación se basa en la determinación del número de células transducidas por una cantidad determinada de medio, valorando como células transducidas aquellas que sean GFP positivas.

Protocolo:

- Sembramos tres pocillos con 20.000 células HEK 293T por pocillo para cada uno de los medios de virus a titular, en una placa de 24 pocillos (2cm²/pocillo).
- Esperamos 2 horas para que las células se adhieran a la superficie de la placa y añadimos 3 volúmenes distintos de medio de virus a cada uno de los pocillos (200, 100 y 50 µl).
- 72 horas después analizamos, mediante contaje, en fotos de microscopia con el programa informático ImageJ, el porcentaje de células GFP positivas respecto el total de células.
- De este valor deducimos las partículas virales presentes en el volumen inicial, calculando de las 20000 células iniciales el porcentaje GFP positivas.

Para aquellos lentivirus que no sobre-expresen GFP hemos usado el inmunoensayo enzimático desarrollado para la detección y cuantificación de la proteína que forma parte del envoltorio interno del lentivirus HIV-1 p24, *QuikTiter Lentivirus Quantification Kit (HIV p24 ELISA, Cell Biolabs)*. Este kit cuenta con una placa de 96 pocillos que contienen el anticuerpo monoclonal contra HIV-1 p24 y lo hemos utilizado según las instrucciones de la casa comercial.

4.3 TRANSDUCCIÓN LENTIVIRAL

Sembramos el número de células de interés en el medio apropiado en placas de cultivo. Dejamos establecer el cultivo en el incubador durante 2-4h y seguidamente añadimos el medio de virus necesario para conseguir una relación **nº de células en cultivo/ nº de partículas lentivirales** de 1/3 (en el caso de cultivos primarios de MNs) y 1/10 en el caso de querer transducir una línea celular. Dejamos las placas de cultivo O/N en el incubador, tiempo suficiente para que se realice la infección viral. Retiramos el medio que contiene las partículas infectivas y lo cambiamos por el medio adecuado para las células. 48 o 72 h tras la infección se puede realizar una estimación de la

eficiencia de la infección visualizando el porcentaje de células GFP positivas, conjuntamente con un análisis por *Western Blot*.

5. TÉCNICAS DE ANALISIS DE IMAGEN

5.1 MICROSCOPIOS

5.1.1 *Microscopio de fluorescencia invertido*

Los microscopios invertidos han sido diseñados primariamente para aplicaciones con cultivos celulares y son capaces de producir fluorescencia a través de vías episcópicas y ópticas. En la parte posterior del aparato encontramos los epiluminadores que consisten en lámparas de mercurio o xenón de las que sale el arco de fluorescencia, este pasa a través de un colector de lentes y de un conjunto de filtros de interferencia para ser proyectada sobre la muestra. La fluorescencia emitida por la muestra pasa a través del objetivo, del espejo dicroico y por los filtros antes de ser dirigida a la óptica del microscopio. La luz de transmisión la proporciona una lámpara de tungsteno situada en la parte superior del aparato pasando a través de un colector de lentes, una serie de filtros y por el diafragma antes de entrar en el condensador, se focaliza el haz de luz y se proyecta sobre la muestra. La luz difractada, refractada y no absorbida por la muestra continúa por el objetivo hasta llegar a la óptica del microscopio. Finalmente, tanto la luz de transmisión como la de fluorescencia se dirigen al binocular o bien a una cámara digital conectada a un ordenador (hemos usado los programas DP Controller y DP Manager, Olympus Optical).

5.1.2 *Microscopio confocal*

Para aquellos experimentos que requerían cuantificación de fluorescencia o determinar la localización específica de una proteína a nivel intracelular hemos usado un microscopio confocal invertido de escaneado láser Olympus equipado con el programa Fluoview 500. Las imágenes se han adquirido con un objetivo de aceite de inmersión de 60x (1.4 apertura numérica) por una cámara acoplada al microscopio.

5.2 INMUNOFLUORESCENCIA

Para la detección de antígenos específicos en las células en cultivo se procede de la siguiente forma. Los cultivos son fijados en los días a estudiar con paraformaldehído al 4% durante 15 min. Para una fijación mejor añadimos un volumen de paraformaldehído al 8% igual al volumen de medio que contiene el pocillo que contiene las células a fijar, de esta forma evitamos el estrés de un cambio de medio. Seguidamente se procede a realizar 3 lavados con PBS 1x. Llegados a este punto hemos

seguido dos estrategias distintas para localizar proteínas citosólicas o proteínas presentes en compartimentos subcelulares como el núcleo.

Las imágenes de inmunofluorescencias que mostramos en este trabajo se han realizado con un control de anticuerpo secundario para asegurar que la señal es específica del primario (muestras incubadas únicamente con anticuerpo secundario).

Protocolo para proteínas de localización citosólica: se realiza una incubación de 30 min con la solución de bloqueo (PBS + Tritón X-100 (0.2%) + BSA (5%)), a continuación las células son incubadas toda la noche a 4°C o 2 horas a temperatura ambiente con los anticuerpos primarios adecuados disueltos en solución de bloqueo. Pasado este período de incubación se realizan tres lavados con PBS 1x y se incuban las muestras con el anticuerpo secundario apropiado durante 1 hora a temperatura ambiente. Para la inmunodetección por fluorescencia se ha usado el anticuerpo contra-conejo conjugado a Fluoresceína (1:400;), o bien el anticuerpo contra-ratón conjugado con Texas-Red (1:400; *Jackson Immunoresearch Laboratories*). Finalmente se realizan 4 lavados de 5 minutos cada uno con PBS 1x y se procede a la observación o a realizar una tinción nuclear con bis-benzimida Hoechst.

Protocolo para proteínas de localización nuclear: en caso de realizar inmunofluorescencia para poner de manifiesto proteínas de localización nuclear hemos realizado una segunda fijación con metanol frío. Las muestras una vez fijadas con paraformaldehído y lavadas tres veces con PBS 1x se fijaban con metanol frío a -20°C durante 10 minutos, el proceso sigue con tres lavados con PBS 1x, y a continuación realizamos el mismo protocolo descrito anteriormente usando la solución de bloqueo sin tritón (puesto que el metanol ya permeabiliza las células). Finalmente para conservar las preparaciones una vez realizada la inmunodetección utilizamos como medio de montaje Mowiol + 0.5% DABCO.

Tabla 9. Listado de anticuerpos usados para inmunofluorescencia.

Anticuerpos primarios	Fijación	Anticuerpo secundario	Dilución	proveedor
Anti-FLAG M2	PFA 4%	anti-Mouse	1/400	Sigma
CaMK-IV	PFA 4% + MetOH	anti-Mouse	1/200	BD transduction laboratories
Cleaved Caspase-3	PFA 4% + MetOH	anti-Rabbit	1/300	Cell Signaling
SMN	PFA 4% o (PFA 4% + MetOH)	anti-Mouse	1/100	BD transduction laboratories
SMI-32	PFA 4%	anti-Mouse	1/200	Abcam

Anticuerpos secundarios	Dilución	proveedor
Alexa Fluor 488	1/400	Invitrogen
Alexa Fluor 555	1/400	Invitrogen
Rhodamine Red	1/400	Jackson ImmunoResearch

5.3 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE Ca^{2+} INTRACELULAR

Para determinar cambios de los niveles de Ca^{2+} intracelular hemos usado Fluo-4. Es una molécula que tiene unida una secuencia acetoximetil ester (AM) que le permite fusionarse a la membrana celular y entrar en el interior de la célula. Una vez dentro de la célula al unirse a Ca^{2+} emite fluorescencia, por ello los incrementos de fluorescencia se miden como incrementos de Ca^{2+} intracelular.

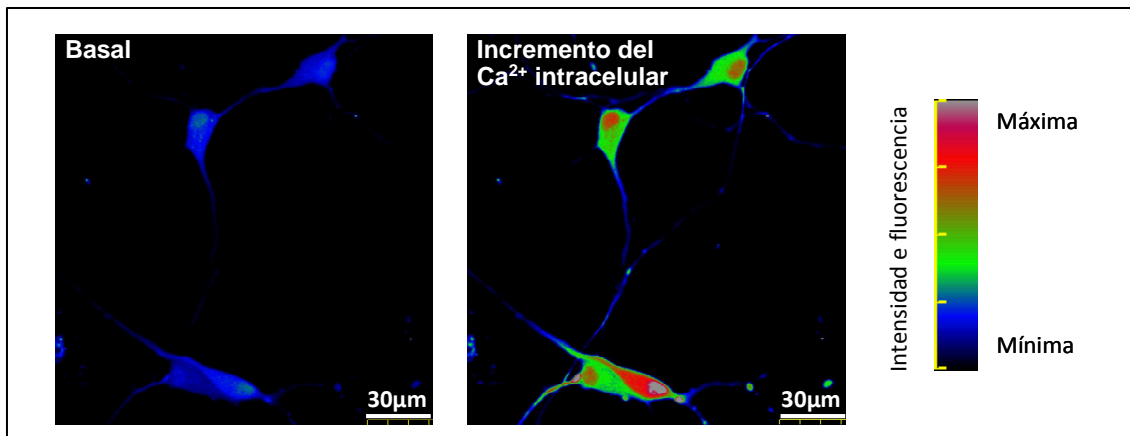


Figura 59. Incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en MNs en cultivo tratadas detectado por cambios de intensidad de fluorescencia .

Para los registros de calcio sembramos 25.000 MNs en cubreobjetos redondos de 24mm de diámetro previamente tratados con poli-DL-ornitina y laminina, los cubreobjetos los disponemos en placas de cultivo de 35 mm de diámetro. Cultivamos las células 72h en medio NBMc suplementado con NTFs. Una vez bien establecido el cultivo realizamos un lavado con medio Krebs (145 mM NaCl, 5 mM KCl, 2mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES y 11 mM Glucosa a pH=7.4) e incubamos las células con Fluo-4 AM (5 μM) y ácido plurónico al 0.02% (Molecular Probes) en medio krebs durante 20 minutos. Seguidamente realizamos dos lavados de 5 min a 37°C para permitir la hidrólisis del éster. Y procedemos a montar el cubre en un adaptador específico para el microscopio confocal Olympus y se procede a realizar los registros. Los niveles intracelulares de Ca^{2+} se miden en el soma de cada célula individualmente, con una emisión de excitación de láser de 488 nm, y un rango de detección de la emisión a 535 nm, y se procesan usando el programa informático Fluoview500.

Para los experimentos de despolarización, se toman imágenes cada 5 segundos en un periodo total de 20 min el K^+ se añade a los 120 segundos a una concentración final de 30 mM.

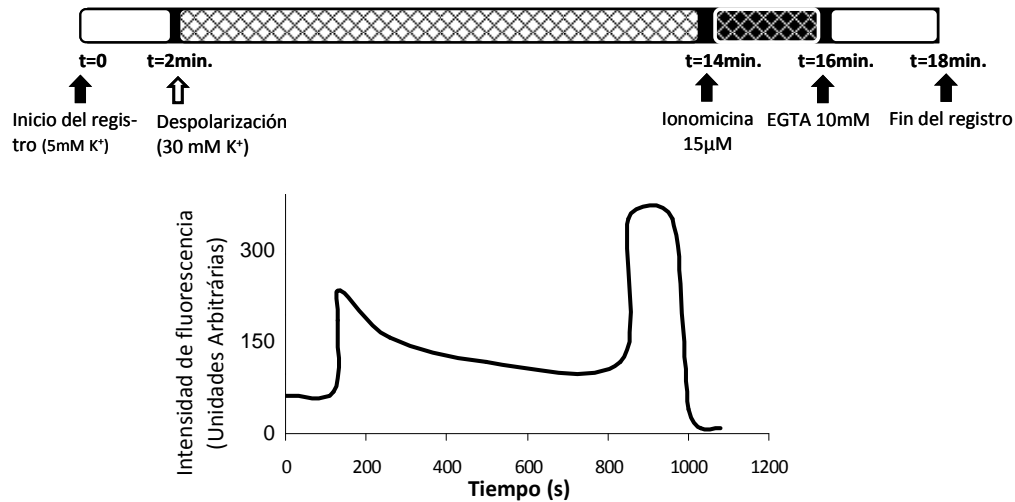


Figura 60. Representación gráfica esquemática de un registro de los cambios de fluorescencia de MNs.

Los cambios de la concentración de Ca^{2+} intracelular se expresan como cambios en los niveles de fluorescencia según la fórmula:

$$\left[\frac{(F - F_{\min})}{(F_{\max} - F)} \times 100 \right] = \text{AFU (Arbitrary Fluorescence Units)}$$

Para calcular la intensidad del incremento de Ca^{2+} necesitamos los valores de fluorescencia máximos y mínimos (F_{\max} y F_{\min} respectivamente). Los valores de F_{\max} se obtienen en presencia de una alta concentración de ionomicina ($50 \mu\text{M}$, para saturar la sonda Fluo-4 que todavía no se ha unido a Ca^{2+} , que queda dentro de la célula) y los valores de F_{\min} después de la adición de EGTA (10 mM), un agente quelante de Ca^{2+} .

En el caso de los experimentos con antagonistas de VGCCs se empiezan los tratamientos 10 min antes y se mantiene la concentración del fármaco durante todo el registro.

5.4 DETERMINACIÓN DE LA LONGITUD NEURÍTICA

Para determinar la longitud neurítica de las MNs en cultivo, hemos usado NeuriteTracer, de NeuronJ, una herramienta gratuita que se usa con el programa de procesamiento de imagen ImageJ y que detecta las neuritas de las imágenes y calcula su longitud.

Las MNs son células que forman un axón particularmente largo, es por ello que nos ha requerido tomar fotos consecutivas desde el soma siguiendo todas las ramificaciones, hasta el final de las neuritas. Las imágenes se han tomado con un

microscopio Olympus a 20x, en cultivos neuronales sembrados a baja densidad, para poder tener cada neurona aislada y que no se entrecrucen sus neuritas.

Cuándo tenemos la secuencia de imágenes de cada MN, con el programa Adobe Photoshop unimos las imágenes para generar una imagen de toda la célula. A esta imagen completa le añadimos una imagen de la cámara de Burker (tomada en las mismas condiciones 20x) para poder determinar la longitud en sistema métrico.

Guardamos la imagen fusionada en formato jpg. Seguidamente abrimos la imagen con el programa ImageJ (NIH) i la guardamos en formato 8bit.

Llegado este punto podemos abrir NeuronJ (NIH). A través de NeuronJ escogemos la imagen en formato 8bit y usamos la herramienta NeuriteTracer para reseguir todas las neuritas de la célula, una vez marcadas todas las neuritas el programa nos dará un valor de longitud. También trazamos la cámara de Burker, así podemos extrapolar el valor del programa al sistema métrico.

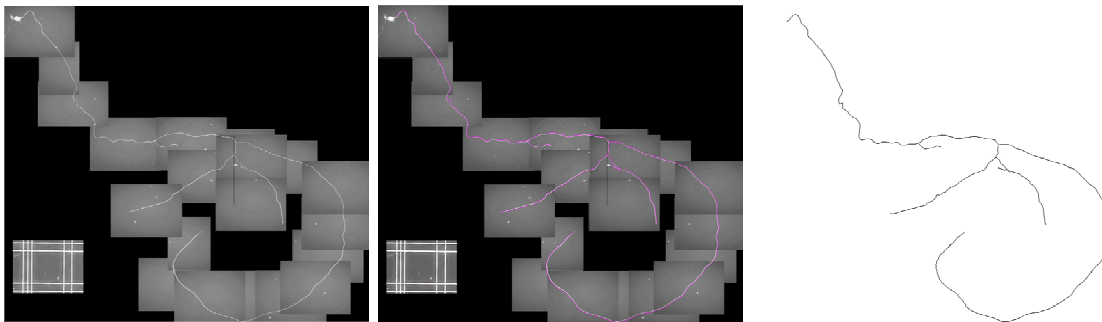


Figura 61. Evaluación de la longitud neurítica con ImageJ, NeuronJ.

5.5 ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DE LA DEGENERACIÓN NEURÍTICA

Hemos determinado los niveles de degeneración neurítica en los cultivos primarios de MNs. Para ello sembramos las células a una densidad de 4.000 células/cm² en las placas de cultivo para conseguir una red neurítica de densidad suficiente pero no excesiva, que nos permita observar eficientemente la morfología de las neuritas. En los tiempos de interés obtenemos imágenes de contraste de fase en el microscopio invertido con el objetivo de 40X.

Para analizar las imágenes hemos usado el programa imageJ (NIH). Generamos una cuadrícula (línea de área= 4298) y con el contador determinamos el número total de neuritas individualmente y cuántas de ellas muestran morfología degenerante en cada campo (se han considerado degenerantes aquellas neuritas que mostraban hinchamientos descritos como *swelling* o *blebbing*, que reflejan interrupciones del citoesqueleto y acúmulos de proteínas y organelas).

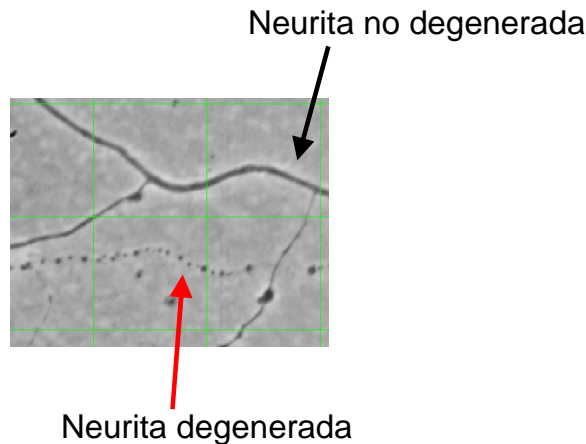


Figura 62. Detalle de una neurita con morfología sana y una degenerante.

Analizamos un mínimo de 10 campos por imagen (30-50 neuritas) de 6 imágenes de cada pocillo. Se han contado 3 pocillos por cada condición experimental y los experimentos se han repetido un mínimo de 3 veces diferentes.

6. TÉCNICAS BIOQUÍMICAS PARA EL ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

6.1 EXTRACCIÓN PROTEICA DE LISADOS CELULARES TOTALES EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES

Hemos obtenido lisados celulares totales tras los distintos tratamientos, o en los tiempos de cultivo deseados, para analizar las proteínas por *western blot* en condiciones desnaturalizantes.

Para ello recogemos las muestras con tampón de lisis que contiene el detergente desnaturalizante dodecilsulfato sódico, (SDS).

Protocolo:

- Aspirar el medio de cultivo de la placa.
- Realizar cuatro lavados con PBS frío, para detener las reacciones intracelulares y eliminar las proteínas del medio de cultivo.
- Agregar el tampón de lisis (Tris-HCl 125 mM pH=6.8 + 2% SDS).
- Raspar la placa con la ayuda de la punta de la pipeta para pocillos pequeños o con la ayuda de una espátula para placas de mayor tamaño, para despegar y lisar todas las células.
- Colocar el lisado en un eppendorff y calentar 5 min a 95°C.
- Guardar a -20°C, opcional.
- En el caso de líneas celulares además se sonicán las muestras para romper bien las estructuras intracelulares.

- Cuantificamos la proteína. Para ello hemos usado indistintamente dos métodos: el espectrofotómetro NanoDrop que requiere únicamente 2 µl de muestra para su lectura, analizando la absorbancia a 280 nm como medida de cuantificación de proteína, o el método fluorimétrico Qubit™ (Invitrogen). En alguna ocasión también hemos usado el kit *micro DC* de Bio-Rad basado en el método de Lowry, pero requiere más cantidad de muestra.

6.2 ELECTROFORESIS EN GELES DE SDS-POLIACRILAMIDA

Para detectar y caracterizar proteínas realizamos electroforesis monodimensionales en geles formados por una matriz de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE, '*sodiumdodecylsulfate-polyacrilamide gel electrophoresis*'), usando el sistema *Mini-Protean 3* (Bio-Rad). El SDS desnaturaliza las proteínas (pierden su estructura tridimensional) y se une a las cadenas polipeptídicas confiriéndoles una carga neta negativa hecho que permite que se separen únicamente según su peso molecular en el sistema de electroforesis. Para mantener las condiciones desnaturalizantes se debe incluir el SDS en los tampones de los geles, el tampón de electroforesis y en las muestras.

Hemos usado un sistema de electroforesis discontinuo en el cual el gel de apilamiento era de tamaño de poro grande (3% de poliacrilamida), y el gel separador de poro pequeño. El gel de apilamiento asegura el desplazamiento de las proteínas en el mismo frente de migración, mientras que en el separador las proteínas se separan por su peso molecular (para proteínas de bajo peso molecular hemos usado geles del 10-12% y para aquellas de peso molecular medio o elevado del 8%).

Protocolo:

- Preparación de las muestras:

Agregamos tampón de carga a los extractos proteicos (igualados en cantidad de proteína. Se preparan entre 10-50 µg de proteína por condición y se añade el tampón de carga 5x a una relación 4:1 muestra/tampón respectivamente [10% (p/v) SDS, 50% (v/v) Glicerol, 25% (v/v) mM β-mercaptoetanol, 0.015% (p/v) Azul de Bromophenol (Sigma) y 62,5 mM TRIS-HCl pH=6,8]. Ajustamos el volumen de todas las muestras con tampón de carga 1x para cargar el mismo volumen de cada muestra. Seguidamente las muestras se desnaturalizan por calor 5 min a 95°C (el SDS desnaturaliza y recubre las proteínas confiriéndole carga negativa neta, y el β-mercaptoetanol destruye los puentes disulfuro) para obtener cadenas polipeptídicas aisladas. De esta forma todas las proteínas se desplazan hacia el ánodo en el sistema de electroforesis.

- Preparación del gel de poliacrilamida:

Los geles se forman por la polimerización de la acrilamida por acción del agente entrecruzador bisacrilamida en presencia de un iniciador, TEMED (N,N,N,N'-tetrametilnediamina) y un catalizador, el ión persulfato ($S_2O_8^-$), que se añade en forma de persulfato amónico. Las proporciones relativas de poliacrilamida y bisacrilamida determinan la porosidad del gel.

Tabla 10. Composición de los geles de archilamida.

GEL APILADOR	
Tris-HCl (pH= 6.8)	125mM
Acrilamida/Bisacrilamida (30:0.8) (p/p)	3% (v/v)
SDS	0.1% (w/v)
Persulfato de amonio	0.05%(w/v)
TEMED	0.025%(v/v)

GEL SEPARADOR	
Tris-HCl (pH= 8.8)	375mM
Acrilamida/Bisacrilamida (30:0.8) (p/p)	8-12% (v/v)
SDS	0.1% (w/v)
Persulfato de amonio	0.05%(w/v)
TEMED	0.025%(v/v)

- Electroforesis:

Realizamos la electroforesis en el sistema Mini-Protean 3 (Bio-Rad). En el gel cargamos las muestras y un marcador con proteínas de peso molecular conocido. La electroforesis se realiza a un amperaje constante de 15mA/gel, mientras se forma el frente de proteína en el gel apilador, y a 25 mA/gel para la separación de proteínas en el gel separador. El tampón de electroforesis es: TRIS-Glicina-SDS (TRIS-HCl 25 mM pH8.8, glicina 192 mM, SDS 0,1 % (w/v)). (Valores de amperaje para geles de 11 cm).

6.3 TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS A MEMBRANAS DE PVDF

Las proteínas previamente separadas en un sistema SDS-PAGE se pueden transferir a una membrana, nosotros hemos usado membranas de *polyvinylidene difluoride* (PVDF) de 0.45 μ m de poro (Millipore). Para transferir las proteínas se requiere la aplicación de un campo eléctrico y una vez transferidas, las proteínas se pueden detectar mediante anticuerpos específicos. En el laboratorio usamos el sistema de transferencia *Semi-dry* (Hoeffer).

Protocolo:

- Lavar la membrana de PVDF en metanol durante unos segundos.
- Sumergir la membrana en una cubeta con el volumen suficiente de tampón de transferencia (Tris-HCl 480mM, Glicina 39mM, SDS 0.0375% (v/v), metanol 10%(v/v) para que quede cubierta.
- Sumergir dos papeles Whatman por membrana poniéndolos en una cubeta con tampón de transferencia.
- Sumergir el gel a transferir en una cubeta con tampón de transferencia.
- Se procede a montar el “sándwich” en el sistema semi-dry. Sobre la superficie metálica inferior (que es el ánodo de la unidad) colocamos un papel, encima la membrana, el gel i finalmente el último papel, vigilando que no queden burbujas de aire entre membrana y gel, y se añade muy poca cantidad de tampón de transferencia. Finalmente se cubre con la tapa (cátodo).
- La transferencia de las proteínas se realiza a amperaje constante (0.8 mA/cm²) durante 1h 15min.

6.4 INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS**Protocolo:**

- Bloqueo de la membrana transferida: Una vez transferidas las proteínas a la membrana de PVDF se bloquea la membrana durante 2h a temperatura ambiente con TBST (20 mM TRIS-HCl, 150 mM NaCl y 0.1% Tween[®] 20 (Sigma) + 5% de leche libre de grasas, para prevenir uniones inespecíficas a la membrana.
- Se realizan 3 lavados de 5 min con TBST para eliminar el agente bloqueante.
- Incubación anticuerpo primario: Este anticuerpo es específico para la proteína de interés a estudiar. Se incuba durante 2h a temperatura ambiente o bien toda una noche a 4°C. La dilución del anticuerpo la realizamos con TBST y 0.02% de azida sódica (Panreac). En la tabla se muestran todos los anticuerpos primarios usados en este trabajo y las diluciones usadas.
- Se realizan 3 lavados de 5 minutos con TBST para eliminar restos de la azida sódica que inactivarían la peroxidasa unida al anticuerpo secundario y todo el anticuerpo primario no unido a la membrana.
- Incubación anticuerpo secundario: hemos usado anticuerpos que se obtienen inoculando en la especie productora las inmunoglobulinas de la especie a detectar (anticuerpos anti-especie). Van conjugados a la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) que será la inductora de la detección posterior. La dilución del anticuerpo la realizamos con TBST+5% de leche libre de grasas y se incuba 1 h a

temperatura ambiente. Se realizan cinco lavados de 5 min con TBST para eliminar el agente bloqueante y el exceso de anticuerpo secundario.

- Reacción de quimioluminiscencia: se elimina el exceso de tampón de la membrana con papel secante y se incuba 5 min con el reactivo SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Pierce) o ECL-Advanced (Healthcare). Ambos se preparan mezclando la solución de luminol con un tampón estabilizante de peróxidos. La HRP unida al anticuerpo secundario, en presencia de peróxidos cataliza la reacción de oxidación del luminol. Una vez oxidado, el luminol emite quimioluminiscencia.
- Adquisición y análisis de la imagen: se ha realizado la adquisición de imágenes con el equipo ChemiDoc XRS (Bio-Rad) y su posterior análisis se llevó a cabo con el programa informático Quantity One específico para western blot monodimensional.

Tabla 11. Listado de anticuerpos usados para western blot.

Anticuerpos primarios	KDa proteína reconocida	Anticuerpo secundario	Dilución	proveedor
Anti-FLAG M2	depende de la proteína marcada	anti-Mouse	1/2.000	Sigma
CaMK-IV	60	anti-Mouse	1/1.000	BD transduction laboratories
Cleaved Caspase-3	19-17	anti-Rabbit	1/3.000	Cell Signaling
GFP	27	anti-Mouse	1/10.000	Clontech
p-85(PI3-Kinase)	85	anti-Mouse	1/2.000	BD transduction laboratories
p-Akt(Ser473)	60	anti-Rabbit	1/1000	Cell Signaling
p-Akt(Thr308)	60	anti-Rabbit	1/1000	Cell Signaling
pan-Akt	60	anti-Goat	1/10.000	Santa Cruz
pan-Erk	42/85	anti-Mouse	1/5.000	BD biosciences Pharmingen
p-Erk	44/42	anti-Rabbit	1/15.000	Cell Signaling
SMN	40	anti-Mouse	1/10.000	BD transduction laboratories
alpha-Tubulina	50	anti-Mouse	1/50.000	Sigma

Anticuerpos secundarios	Dilución	proveedor
anti-mouse	1/40 000	Pierce
anti-rabbit	1/40 000	Pierce
anti-goat	1/20 000	Vector

6.5 STRIPPING DE MEMBRANAS DE PVDF

Si se quiere eliminar tanto los anticuerpos primario y secundario unidos a una membrana de PVDF para sucesivas y posteriores incubaciones, se puede aplicar el tratamiento llamado '*stripping*' que consiste en sumergir la membrana a reutilizar en una solución de 100 mM β - mercaptoetanol, 2% de SDS, 62.5 mM TRIS-HCl pH=6.7 a 60°C durante 20 min en agitación. Con este tratamiento se consigue que los anticuerpos que estaban unidos a la membrana se desprendan de ella. Seguidamente, se lava la membrana tres veces durante 10 min con TBST a temperatura ambiente y ya está lista para volver a bloquearla y empezar otra inmunodetección.

6.6 TINCIONES DE MEMBRANAS DE PVDF

- Tinción de membranas con Azul de Coomassie: Es una tinción menos sensible que otros métodos. El colorante *Coomassie brilliant blue* R-250 (Fluka. Sigma) se une a casi todas las proteínas, tanto en condiciones naturalizantes como desnaturalizantes. Después de la electroforesis, se pone el gel en la solución de tinción (0.1% *Coomassie brilliant blue* R-250, 25% isopropanol, 10% ácido acético) durante 30 min El gel quedará todo teñido de azul. Seguidamente, se retira la solución de tinción y se incuba el gel teñido en una solución decolorante (10% ácido acético, 10% isopropanol) hasta obtener un gel con las bandas de las proteínas en azul y un fondo transparente. Se suele poner dentro de la solución decolorante un material adsorbente del Coomassie para facilitar la decoloración.

- Tinción de membranas con nitrato de plata: Es una tinción más sensible que la anterior. Hemos usado esta técnica cuándo queríamos cuantificar la proteína total cargada en cada carril y en membranas en las cuáles habíamos transferido muy poca cantidad de proteína. Primero preparamos los reactivos según la Tabla 12.

Protocolo:

- Realizamos 3 lavados de 5 min con la solución de sensibilización (I), 50 ml cada lavado.
- Realizamos 3 lavados de 5 min con la solución de sensibilización (II), 50 ml cada lavado.
- Mezclamos Gallyas A con Gallyas B (1:1) y realizamos 2 lavados. Durante el primer lavado la membrana se tiñe de naranja y durante el segundo se tiñen las proteínas. El tiempo de los lavados dependerá de la cantidad de proteína que contenga la membrana.
- Descartamos la solución de tinción y aplicamos la de parada (5) durante un mínimo de 10 minutos.

Tabla 12. Soluciones para tinción de membranas de PVDF con plata.

SOLUCIONES		1 MEMBRANA (9x6 cm)
1- SENSIBILIZACIÓN (I)	150 ml	1.5 g Acetato de sodio en H2O Milli-Q
2- SENSIBILIZACIÓN (II)	150 ml	3 ml de tiosulfato de sodio al 5% en H2O Milli-Q
3- TINCIÓN, Gallyas A	50 ml	2.5 g de carbonato de sodio en H2O Milli-Q
4- TINCIÓN, Gallyas B	50 ml	0.1 de nitrato de amonio, 0.1 g de nitrato de plata, 0.5 g de ácido silicotungstico y 250 µl de formaldehído 37% (*) en H2O Milli-Q
5- STOP	50 ml	5 ml acido acético en H2O Milli-Q

(*) Añadir el paraformaldehído al último momento.
Hay que proteger de la luz las soluciones *Gallyas*.

7. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR:

7.1 TRANSFORMACIÓN CELULAR

Consiste en la introducción de DNA plasmídico foráneo dentro de una célula. En nuestro trabajo hemos insertado DNA plasmídico a *Escherichia coli*, y las hemos crecido para amplificar el número de plásmidos.

Se usan distintos procesos por los cuales se altera la permeabilidad de la membrana plasmática permitiendo así la entrada de largos fragmentos de DNA dentro de la célula.

- Medios de cultivo usados:

- Medio de cultivo Lb, Luria Bertani pH7.5:

NaCl	10g/l
Triptona	10g/l
Extracto de levadura	5g/l
- Medio sólido Lb agar para placas:

Medio Lb	
Agar	20g/l

Para seleccionar aquellas bacterias que hayan incorporado un plásmido que contenga resistencia a Ampicilina hemos añadido este antibiótico a una concentración de 50 µg/ml.

- Transformación en E. coli:

Se han transformado células de E. coli con la finalidad de amplificar la cantidad de plásmido de interés. Hemos usado células competentes procedentes de la cepa DH5α.

Para permitir la entrada del DNA plasmídico sometemos estas células a un choque térmico.

Protocolo para la preparación de células competentes:

- Inocular una colonia de E.coli en 20ml de LB. Dejar crecer overnight (O/N) a 37°C en agitación.
- Inocular 4 ml del cultivo en 400 ml de LB fresco en un matraz de 2 litros. Dejar crecer a 37°C hasta una densidad óptica (OD): 0.375.
- Repartir en 4 tubos de centrifuga (de 250 ml) 200ml por botella.
- Centrifugar 7 minutos a 3.000 rpm a 4°C, el programa de centrifugación debe ser sin freno.
- Se resuspende el pellet en 40 ml de solución CaCl₂ fría (CaCl₂ 60mM, 15% glicerol, Hepes 10mM).
- Centrifugar 5 minutos a 4.000 rpm a 4°C.
- Volver a resuspender el pellet en 40 ml de solución CaCl₂ fría.
- Dejar los tubos 30 minutos en hielo.
- Centrifugar 5 minutos a 4.000 rpm a 4°C.
- Se resuspende el pellet en 8 ml de solución CaCl₂ fría.
- Se deja 4 horas en hielo.
- Aliquotar en tubos de congelación y congelar rápido con nitrógeno líquido. Guardar a -80°C

Protocolo de transformación:

- Ponemos en un eppendorff 100µl de células competentes (descongelarlas en hielo lentamente).
- Agregamos 20 µl de DNA plasmídico con resistencia a ampicilina.
- Mezclar y dejar un mínimo de 10 minutos en hielo.
- Shock térmico a 42°C durante 2 minutos.
- 1 minuto en hielo.
- Añadimos 1 ml de Lb.
- Incubar una hora a 37°C (tiempo necesario para que las células expresen la resistencia al antibiótico).
- Centrifugamos 2 minutos a 5.000 rpm.
- Recogemos 600 µl del sobrenadante y lo retiramos.
- Con el resto de medio que queda en el eppendorff se resuspenden las células y sembramos 150 µl en una placa de Lb con ampicilina (50 µg/ml). (La cantidad que quede puede guardarse a 4°C unos días).
- Dejamos crecer las colonias que hayan incorporado el plásmido a 37°C.

- Al día siguiente se toma una colonia y se deja crecer en 5-10 ml de medio Lb con ampicilina durante 15-20 horas a 37°C en agitación.

a) PROCEDEMOS A GLICERINAR:

En un tubo de congelación ponemos 900 µl del medio con la colonia crecida y añadimos 600 µl de glicerol 50% (para que quede a una concentración final del 30%). Se mezcla, se congela rápido con nitrógeno líquido y se guarda a -80°C.

b) SE PROCEDE A LA EXTRACCIÓN DEL PLÁSMIDO:

En un Erlenmeyer hacemos crecer 1-2ml de medio con la colonia crecida en 250 ml de Lb con ampicilina durante otras 15-20 horas. Procedemos a la extracción del plásmido con el kit Qiagen plasmid purification (Qiagen).

La selección de las bacterias que han incorporado el plásmido se ha realizado mediante la adición de ampicilina, ya que los plásmidos de interés poseen resistencia a dicho antibiótico. Es por ello, que siempre que realicemos este proceso es importante usar un control negativo con un plásmido sin resistencia al antibiótico donde no deberían crecer colonias.

7.2 AISLAMIENTO DE DNA PLASMÍDICO

Para extraer el DNA plasmídico de *E. coli* hemos utilizado dos kits comerciales: Mini NucleoSpin Plasmid QuickPure kit (Macherey-Nagel) y Maxi Quiagen plasmid purification (Quiagen) siguiendo los protocolos indicados por las casas comerciales.

Hemos usado el primer kit *Mini NucleoSpin Plasmid QuickPure* para la obtención de pequeñas cantidades de DNA plasmídico. El proceso de extracción consiste en un primer paso donde se resuspenden las células bacterianas y se libera el DNA plasmídico mediante una lisis alcalina con SDS. Luego, el DNA plasmídico se une a una membrana de sílice, para eliminar todos los contaminantes. Finalmente se elúye el DNA.

El kit *Maxi Qiagen plasmid purification* se ha usado para la extracción de grandes cantidades de plásmido con el fin de producir lentivirus. Está basado en una lisis alcalina seguida por la unión del DNA plasmídico a una resina de intercambio iónico. Se elúye el DNA plasmídico en un tampón con alto contenido de sal. Se descarta la solución de elución y se concentra el DNA por precipitación con isopropanol. Finalmente se resuspende con H₂O milliQ.

Para cuantificar el DNA purificado mediante ambos kits usamos el espectrofotómetro NANODROP.

7.3 ANÁLISIS DE DNA EN GELES DE AGAROSA

Los geles de agarosa permiten la separación e identificación de ácidos nucleicos basándose en la migración por cargas, el DNA se desplaza hacia el polo positivo. La velocidad de migración de un fragmento de DNA en un gel conectado a un campo eléctrico viene determinada por el tamaño y la conformación del DNA. Para la separación de fragmentos de DNA de diferente tamaño hemos usado los geles de agarosa (pueden separar fragmentos de entre 0.1 y 25 Kb).

Preparamos los geles de agarosa a la concentración pertinente según los fragmentos a separar, con tampón TAE 1x (Tris-acetato-EDTA, Sigma). Para marcar el DNA usamos *SYBER Safe*, lo añadimos a la solución TAE-Agarosa antes que solidifique a una concentración 1:10000.

Para la preparación de las muestras mezclamos el DNA con tampón de carga (Sigma) para incrementar la densidad, añadir color y poder visualizar el frente y el avance de la electroforesis. Conjuntamente con las muestras añadimos un marcador de peso molecular comercial para poder determinar el peso del fragmento de DNA a estudiar.

La electroforesis se realiza en una cubeta con tampón TAE 1x. Se cargan las muestras al gel y se conecta la cubeta a una fuente eléctrica manteniendo el voltaje constante a 80-90 mV. Finalmente, para visualizar el DNA se irradia el gel con luz ultravioleta.

7.4 EXTRACCIÓN DE DNA DE GELES DE AGAROSA

Separados los fragmentos de DNA deseados en un gel de agarosa (el porcentaje de agarosa no debe ser superior a 1.5 para una buena extracción). Reconocemos y recortamos los fragmentos exponiendo el período de tiempo mínimo posible a luz ultravioleta (para dañar lo mínimo posible el DNA). Colocamos las porciones del gel de agarosa que contengan el DNA en eppendorffs y para la purificación usamos el kit comercial QIAquick Gel extraction (Quiagen).

7.5 DIGESTIONES CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Las enzimas de restricción son enzimas bacterianas que se unen al DNA y lo cortan por unas secuencias diana específicas, con la característica general de ser cortas y palindrómicas. Existen muchísimas enzimas de restricción y cada una reconoce una secuencia diferente, por lo que dan mucho juego cuando se trata de cortar los fragmentos de DNA deseados. Algunas enzimas cortan por el medio del sitio de reconocimiento y crean extremos romos o no cohesivos, pero la mayoría cortan por

sitios diferentes en cada cadena de DNA y crean extremos con unas pocas bases de cadena simple, extremos cohesivos, que a la vez pueden ser 5' o 3'.

El protocolo de las digestiones, en general, se basa en incubar O/N a 37°C el DNA a cortar, con la enzima, o con una combinación de ellas, añadiendo el tampón adecuado para cada una o para la combinación.

7.6 LIGACIONES

Para construir las nuevas moléculas de DNA, deben unirse los fragmentos preparados (amplificados o digeridos y purificados) a través de la reacción producida por una DNA ligasa. Las ligaciones se realizan con 50 ng de vector linealizado y la cantidad proporcional del inserto para que se mantenga la relación molar de 1:2 entre vector:inserto. Usamos 1µl (400U) de la enzima T4 DNA ligasa (New England Biolabs) que cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre los extremos yuxtapuestos 5'fosfato y 3'hidroxil de las diferentes moléculas generando uniones entre los dúplex de DNA. Las ligaciones se realizan a 16°C durante 14-16h. Los productos de la mezcla ligada son introducidos en bacterias competentes para su conservación y amplificación.

7.7 DISEÑO DE RNAs DE INTERFERENCIA (RNAi)

Para diseñar los RNAi para las proteínas μ -Calpaína y SMN hemos utilizado las herramientas informáticas para diseñar siRNA online, de dos compañías distintas:

- a) The siDESIGN® Center una herramienta para diseñar secuencias cortas de interferencia de RNA (siRNA) funcionales de Thermo Scientific (<http://www.dharmacon.com/designcenter/designcenterpage.aspx>).
- b) El sistema web online siDirect (<http://sidirect2.rnai.jp/>) también diseña secuencias siRNA para dianas específicas de interferencia de RNA (RNAi) que codifica para proteínas de mamíferos.

Para ambos programas introducimos el *accesión number* del gen de interés a interferir y ajustamos los parámetros de restricción:

- siRNA para el Open Reading Frame del gen en cuestión.
- % de G i C entre 30 y 52.
- Excluir patrones AAA y TTT.
- Realizar un análisis Blasta y excluir secuencias no específicas.
- Omitir secuencias que contengan C y Gs en más de 9 nucleótidos seguidos.
- Escogemos aquellos siRNAs que cumplen los requisitos con una puntuación más alta y preferiblemente aquellos que se encuentran entre los primeros 130 y 240 nucleótidos.

- Necesitaremos las secuencias de siRNA sense y antisense.

Para μ -Calpaína y SMN hemos usado los siRNA siguientes:

Calp-1:	Sense	5'-CTACGGAAGTGTGCAAA-3'
	Antisense	5'-TTTGACATCAGTTCCGTAG-3'
Calp-2:	Sense	5'-GCGCCAAGCAGGTAAGTCA-3'
	Antisense	5'-TAAGTTACCTGCTTGGCGC-3'
shSMN1:	Sense	5'-TGACAAGTGTCTGCTGTT-3'
	Antisense	5'-AACAGCAGAACAACCTTGTC-3'
shSMN3:	Sense	5'-AGTAAAGCACACAGCAAGT-3'
	Antisense	5'-ACTTGCTGTGTGCTTACT-3'

7.8 GENERACIÓN DE VECTORES LENTIVIRALES PARA LA INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN PROTEÍNAS

En el laboratorio hemos generado vectores lentivirales para bloquear la expresión de las proteínas μ -Calpaína y SMN. Hemos clonado secuencias shRNA específicas para dichas proteínas en el plásmido lentiviral pLVTH. El proceso se divide en 4 pasos que detallamos a continuación:

- Diseño del shRNA a partir de las secuencias de RNAi.
- Anillamiento de las secuencias shRNA.
- Inserción de las secuencias shRNA anilladas en el vector pSUPER.
- Clonación de los shRNA de pSUPER al vector lentiviral pLVTH.

7.8.1 Diseño del shRNA a partir de las secuencias de RNAi

Para que realmente se produzca el silenciamiento de la transcripción proteica es necesario que las secuencias de RNAi aparezcan en forma de doble cadena. Por ello las debemos introducir en las secuencias:

Forward:

5'-GATCCCC (RNAi 19 nucleótidos sense) TCAAGAGA (RNAi 19 nucleótidos antisense) TTTT-3'

Reverse:

5'-AGCTAAAA (RNAi 19 nucleótidos sense) TCTCTGAA (RNAi 19 nucleótidos antisense) GGG-3'

Encargamos y compramos estas secuencias a Invitrogen (Custom Primers Order).

7.8.2 Anillamiento de las secuencias shRNA

Reacción de anillamiento:

- 48 μ l de buffer de anillamiento (100mM NaCl, 50mM Hepes, pH 7,4)
- 3 μ g del forward (shRNA)

3 µg del reverse (shRNA)

Usamos el siguiente programa de PCR:

90°C 4', 70°C 10', 60°C 20', 50°C 30', 37°C 45', 10°C 60'

7.8.3 Inserción de las secuencias shRNA anilladas en el vector pSUPER

1. Preparamos el vector pSUPER para insertar la secuencia shRNA, digiriéndolo con las enzimas de restricción Bgl II y Hind III. En este punto tenemos pSuper digerido preparado para incorporar los primers anillados.
2. Ligación de pSUPER con los oligos del shRNA anillados:
 - 1µl of Buffer ligasa 10x
 - 1µl de vector no defosforilado (50ng)
 - 2µl de los oligos anillados
 - 1µl de Quick Ligase
 - 5µl de H₂O
 Mantenemos la mezcla 2 horas a 16°C.
3. Seguidamente transformamos *E. coli* por "thermic shock" con el plásmido que ha incorporado el inserto.
4. Seleccionamos las células transformadas de cada construcción distinta de shRNA en placas LB/Ampicilina. Aquellas colonias resistentes a ampicilina que puedan crecer en la placa habrán incorporado el plásmido. No obstante, comprobamos la presencia del plásmido con inserto del shRNA de las colonias mediante PCR y secuenciación de DNA usando los primers forward y reverse de cada shRNA.
5. Escogemos las colonias que han incorporado el inserto correctamente y extraemos el DNA plasmídico mediante el kit *Maxiprep* (Quiagen).

7.8.4 Clonación de los shRNA de pSUPER al vector lentiviral pLVTH

Para poder producir lentivirus debemos clonar las secuencias shRNA del vector pSUPER al vector lentiviral pLVTH. Seguimos los pasos indicados a continuación:

1. Digerimos los plásmidos pSUPER con los shRNA y el vector lentiviral pLVTH con las enzimas de restricción Cla I y EcoR I, con el fin de reemplazar el promotor H1 del vector pLVTH con los cassettes H1-shRNA de pSUPER.

Proceso de digestión:

DNA 15µg de DNA plasmídico H1-shRNA o pLVTH linearizado

H₂O (para ajustar el volumen final a (30µl)

BufferH 3µl

Cla I 1µl

EcoRI 1µl

Dejamos la mezcla a 37°C O/N.

2. Procedemos a realizar la ligación del plásmido pLVTH con las secuencias H1-shRNA.

Reacción de ligación:

250 ng de de secuencia H1-shRNA,

1µl de plásmido pLVTH,

1µl de 10x buffer,

1µl de T4 ligase,

La reacción se produce O/N a 16°C.

3. Transformamos el plásmido a *E. coli* DH5-α por “thermic shock” con los plásmido que han incorporado el inserto y también con el plásmido pLVTH sin inserto.
4. Escogemos las colonias que han incorporado el inserto correctamente y extraemos los plásmidos mediante *Maxiprep* (Quiagen).

8. GENERACIÓN DE VECTORES LENTIVIRALES DE SOBRE-EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS

En el laboratorio hemos generado un vector lentiviral para la sobre-expresión del gen *SMN1* humano. Para ello hemos insertado el cDNA de dicho gen en el plásmido lentiviral de sobre-expresión FCIV (cedido amablemente por el Dr. Mario Encinas).

Para generar vectores de sobre-expresión primero debemos obtener el fragmento deseado para el subclonaje, para ello tomamos como fuente un vector comercial que contiene la secuencia del gen deseado (en nuestro caso SMN) y lo amplificamos por PCR usando primers que reconozcan el inicio y el final de la ORF del gen que además diseñamos con dianas para las enzimas de restricción escogidas para realizar la posterior clonación en el vector de sobre-expresión FCIV. El fragmento amplificado será la base del inserto. Sobre él se aplicaran, posteriormente, las técnicas requeridas por la estrategia de clonaje.

Protocolo:

- Amplificamos el cDNA de *SMN1* humano (NM000344) insertado en el vector pDNR-LIB (Invitrogen) por PCR usando los siguientes primers:

Forward: 5'-CACAGGATCCATGGCGATGAGCAGCGGCGGC-3'

Reverse: 5'-TGTGGGATCCTTAATTTAAGGAATGTGAGCA-3'

*Los nucleótidos subrayados indican las dianas de restricción BamHI.

El proceso de amplificación se ha realizado con la Taq polimerasa pf platinum (Invitrogen) según el protocolo indicado por la casa comercial.

- Se digiere el cDNA amplificado y el vector FCIV con la enzima de restricción BamHI.
- Ligación de la secuencia del cDNA de SMN1 humano al vector FCIV linearizado.

9. PLÁSMIDOS USADOS

Vector pSUPERretro-puro, mapa de restricción, se marcan específicamente los sitios de clonaje que hemos usado, HindIII y BglIII. Fuente www.oligoengine.com.

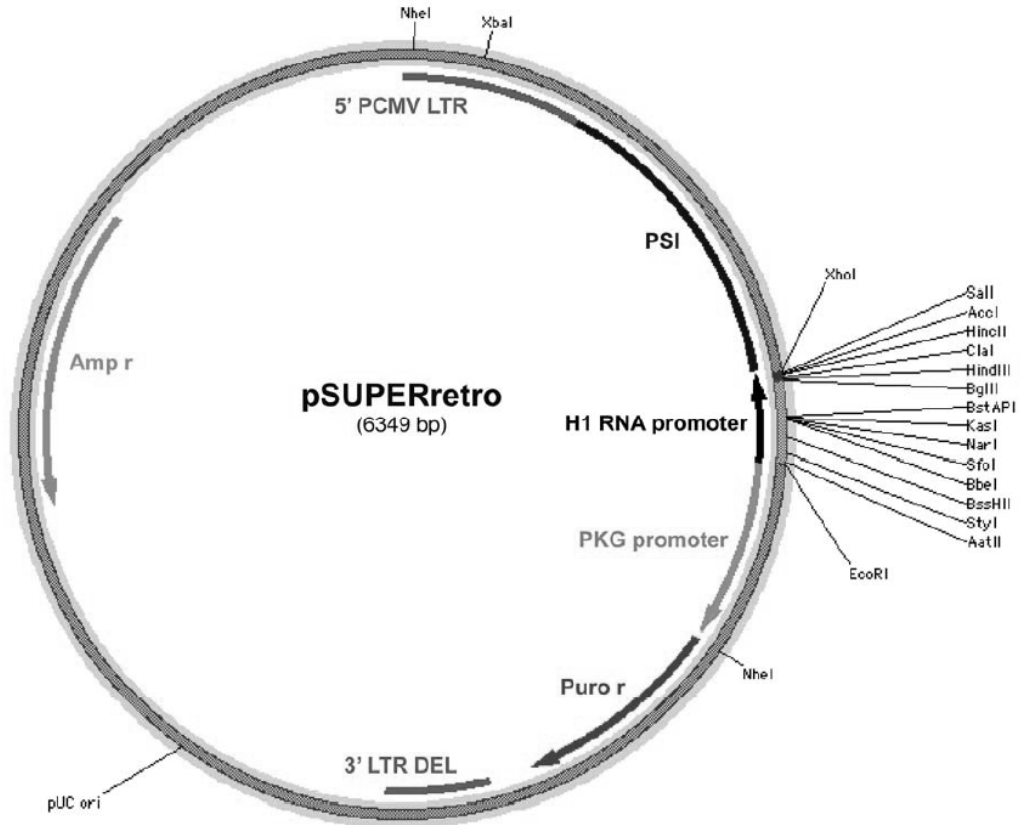


Figura 63. Vector pSUPERretro-puro.

Vector pEGFP, mapa de restricción. Fuente: www.clontech.com.

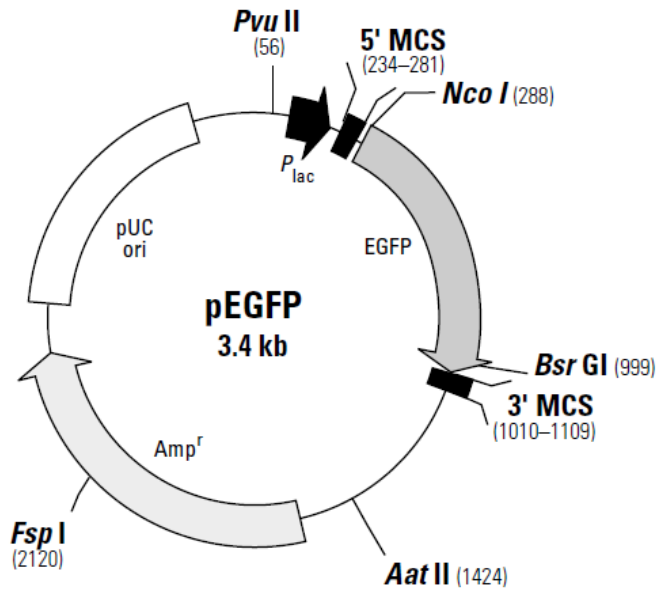


Figura 64. Vector pEGFP.

Vector pcDNA3.1, mapa de restricción y sitio de clonaje ('Multiple Cloning Site', MCS).

Fuente: www.clontech.com.

Los vectores pcDNA3-FLAG y pcDNA3-FLAG-gCaMKIVCA derivados de este vector fueron generados por la Dra. M^a José Pérez García.

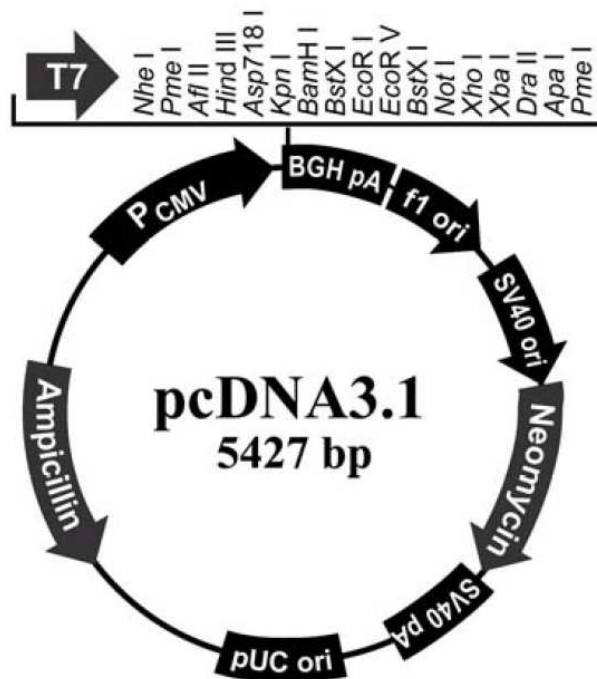


Figura 65. Vector pcDNA3.1

Vector pLVTHM, esquema del vector lentiviral de inserción de los shRNAs, donde se muestran los sitios de clonaje usados: EcoRI/ClaI. Fuente: www.tronolab.com.

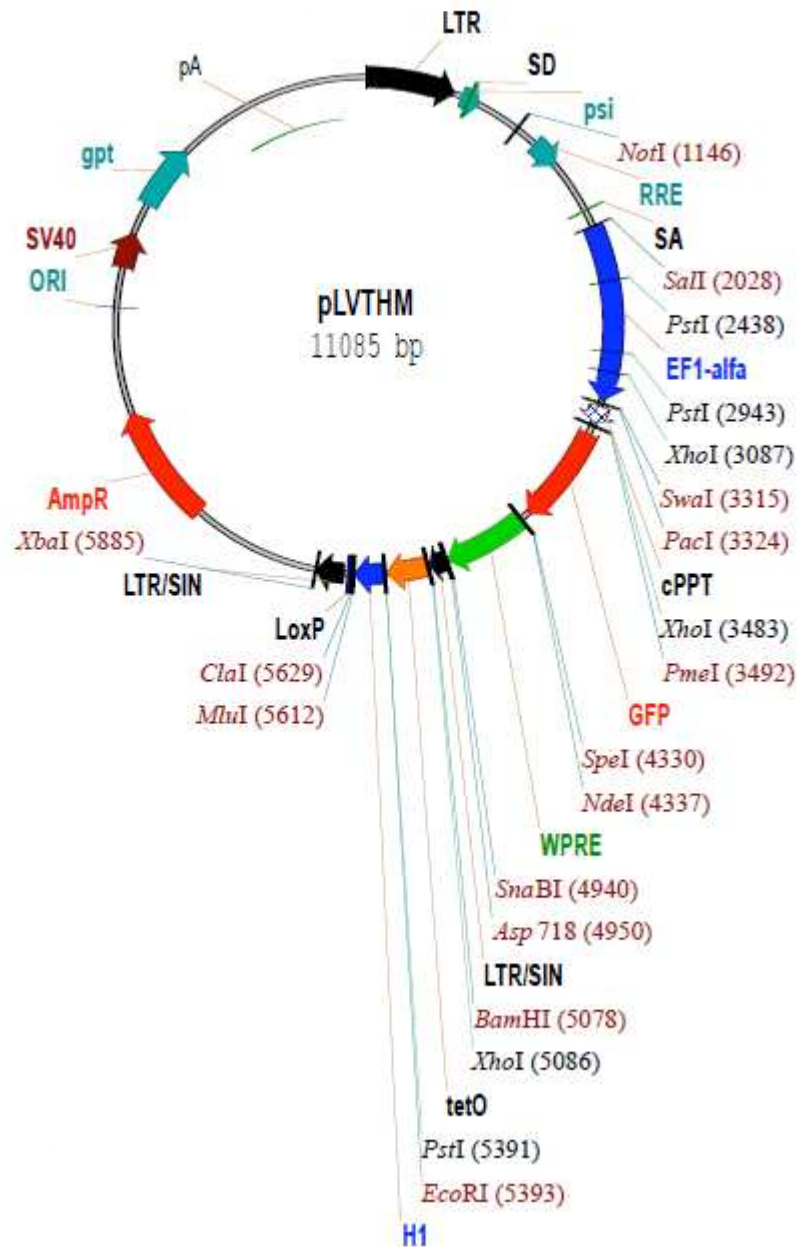


Figura 66. Vector pLVTHM.

Vector psPAX2, esquema del vector lentiviral de segunda generación de empaquetamiento. Fuente: www.tronolab.com.

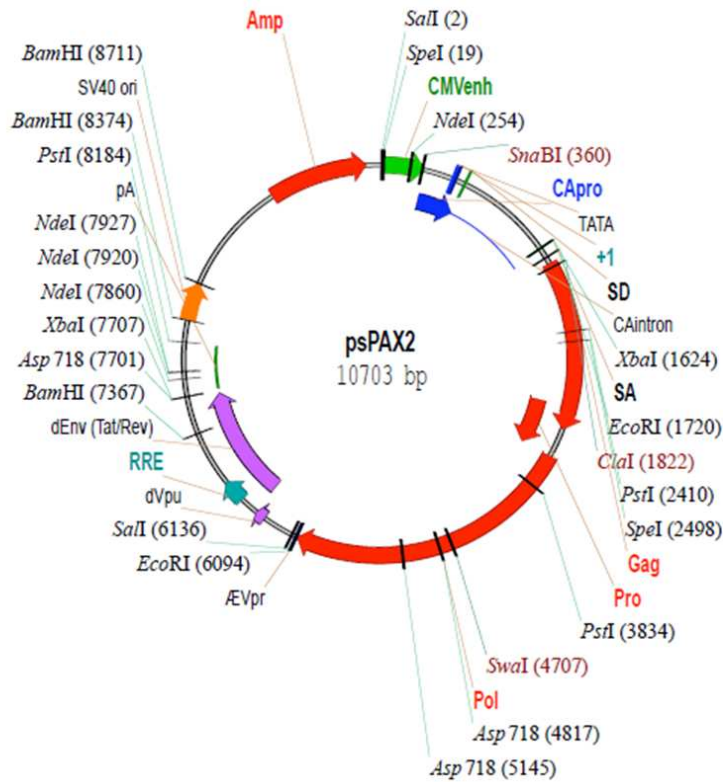


Figura 67. Vector psPAX2.

Vector pMD2.G, esquema del vector lentiviral de la envuelta pMD2.G. Fuente: www.tronolab.com.

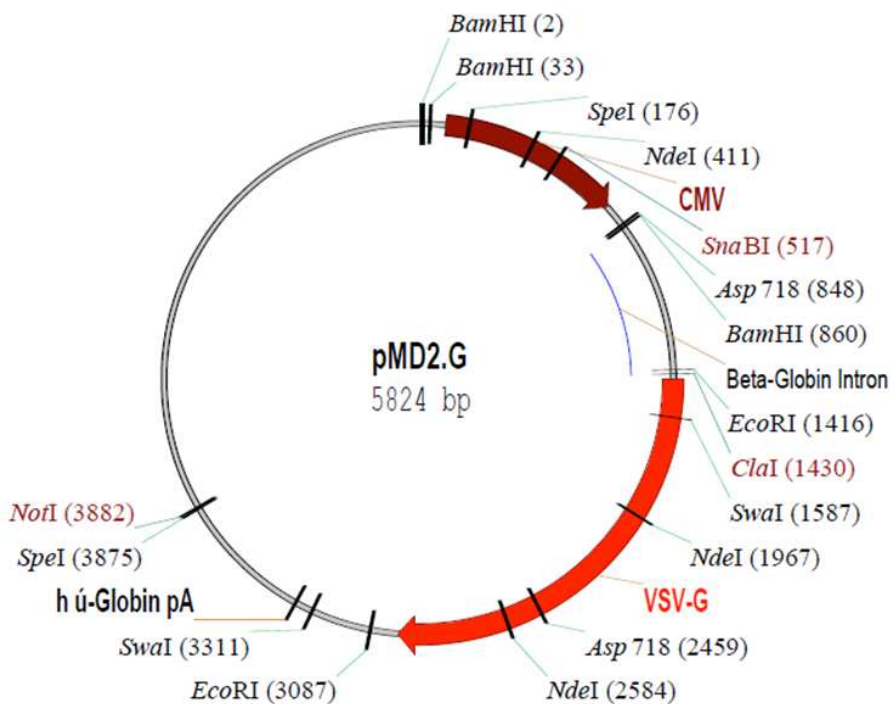


Figura 68. Vector pMD2.G.

Vector FCIV, mapa de restricción y dianas de restricción. Este plásmido usado para sobre-expresar ha sido cedido amablemente por el Dr. Mario Encinas.

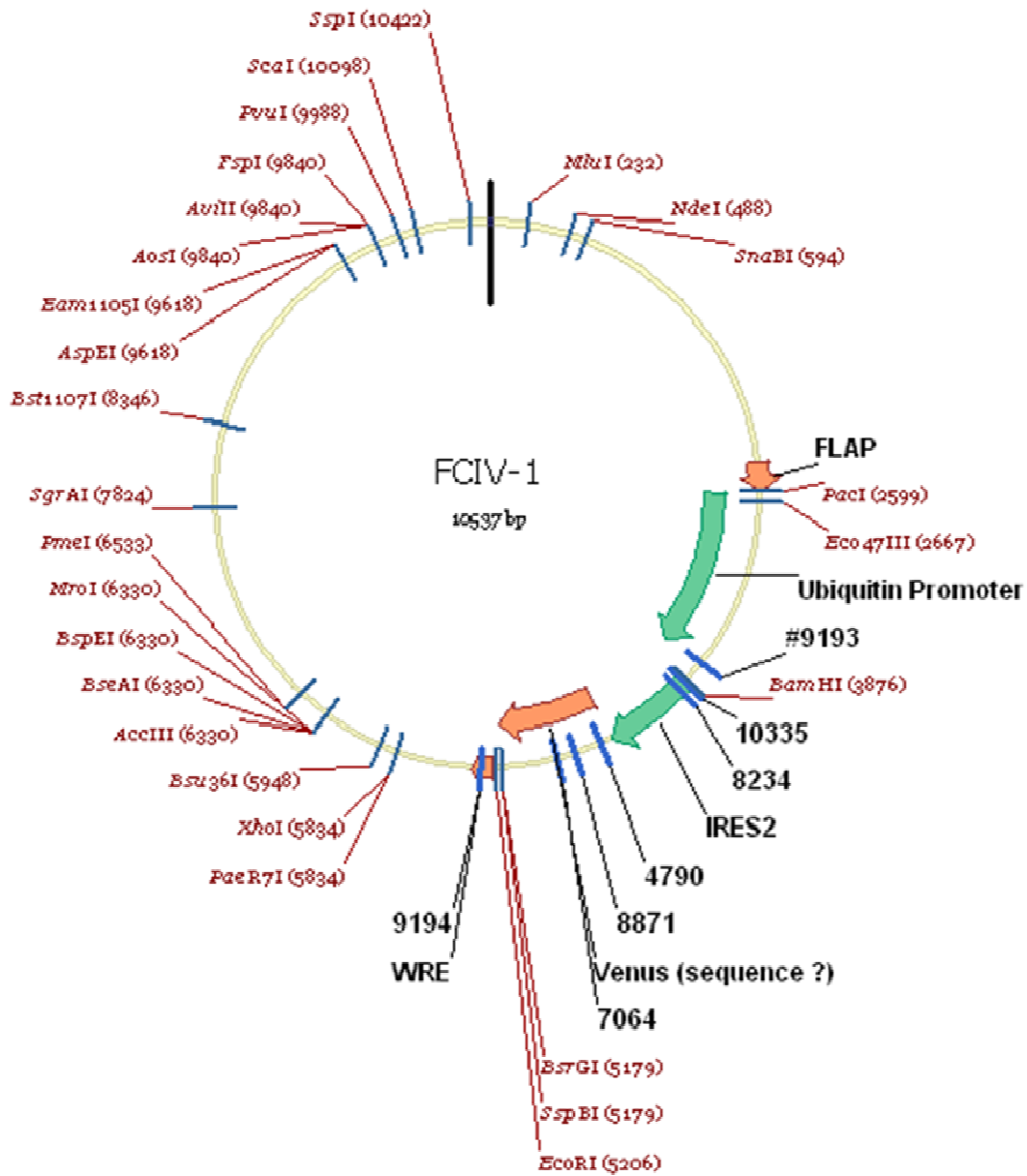


Figura 69. Vector FCIV.

10. ESTADÍSTICA

Todos los experimentos han sido realizados un mínimo de tres veces.

Los datos se han procesado con el programa MiniTab 15 y se han expresado como la media \pm SEM, a no ser que se indique de otra forma. Para determinar las diferencias significativas hemos usado distintos análisis estadísticos:

a) Cuando hemos considerado los datos de un experimento representativo con $n \geq 3$ para cada condición:

- **Test de t-Student** los datos se han expresado como la media \pm SEM de un experimento representativo con $n \geq 3$ para cada condición (los diferenciales entre valores con $p < 0.05$ se consideraron significativamente relevantes).

b) En la mayoría de los experimentos hemos considerado todos los datos de 3 o más experimentos independientes con $n \geq 3$ para cada condición de cada experimento, en este caso los análisis estadísticos han sido:

- **ANOVA de un único factor** para determinar diferencias de supervivencia o degeneración neurítica entre grupos para la variable construcción de transducción lentiviral a cada punto temporal. Cuando el test ANOVA era significativo (valores p inferiores a 0.05), hemos realizado comparaciones múltiples usando el **test de Bonferroni**.
- **ANOVA de dos factores** usando como variables dependientes supervivencia o intensidad de fluorescencia y la condición tratamiento como factores (fármaco, construcción de transducción lentiviral, etc.). Se ha incluido el termino de interacción en el modelo y si era estadísticamente significativa (valores inferiores a 0.05) concluimos que hay diferencias entre los efectos de un factor respecto el otro factor.

RESULTS

CHAPTER 1:

Neuroprotection by neurotrophic factors and membrane depolarization is regulated by calmodulin kinase IV

*Pérez-García, M., M. Gou-Fabregas, Y. de Pablo, M. Llovera, J. Comella & R. Soler
J Biol Chem, 2008.*

1. NEUROPROTECTION BY NEUROTROPHIC FACTORS AND MEMBRANE DEPOLARIZATION IS REGULATED BY CaMKIV

1.1 INTRODUCTION

NTFs and membrane depolarization promote neuronal survival through the activation of intracellular molecular pathways. Both mechanisms induce a moderate increase of intracellular Ca^{2+} concentration:

a) NTFs through intracellular Ca^{2+} mobilization (De Bernardi et al. 1996, Perez-Garcia et al. 2004).

b) Membrane depolarization through Ca^{2+} influx from the extracellular space (Franklin and Johnson 1992, Soler et al. 1998).

In some neuronal models this Ca^{2+} increase is detected by the most ubiquitous calcium-sensing protein, CaM. CaM becomes activated and mediates some intracellular events related with survival pathways, such as the activation of the PI3K/Akt signalling pathway (Perez-Garcia et al. 2004, Egea et al. 2001) or directly activating Akt through CaMKK (Yano, Tokumitsu and Soderling 1998). The PI3K/Akt pathway is one of the well-established mechanisms that mediate neuronal survival. The Ca^{2+} /CaM complex interacts with and modulates the functionality of a large number of proteins, including several Serine/Threonine protein kinases (Ca^{2+} /CaM-dependent protein kinases, CaMKs). The CaMK cascade consists of CaMKK and its downstream substrates CaMKI and CaMKIV (Soderling 1999). While CaMKI is broadly expressed in different tissues, CaMKIV is highly expressed in neurons.

Previous work in our laboratory indicated that the constitutively active form of CaMKIV, but not the constitutively active forms of CaMKK or CaMKI or CaMKII, protects MNs from the cell death induced by NTF deprivation, which further suggests that CaMKIV is involved in the survival signalling pathways of spinal cord MNs (truncated forms of CaMKK, CaMKI, CaMKII and CaMKIV that lack the autoinhibitory-regulatory region result in constitutively active protein kinases which no longer require Ca^{2+} and CaM).

In the present work, we investigated the role of CaMKIV in the survival process induced by NTFs or membrane depolarization in a primary culture of embryonic chicken spinal cord MNs. To this aim our group previously demonstrated its expression in purified MNs by means of RT-PCR and western blot, and we analysed its cellular distribution by immunofluorescence analysis.

To analyze CaMKIV function on chicken MNs our group used two different approaches. We have analyzed survival rates and analysis of the activation/inactivation of intracellular pathways involved in neuronal survival of chicken MNs that had been transfected with the constitutively active form of CaMKIV, and parallel work carried on in the laboratory by Dr. Pérez-García analyzed the same parameters on chicken MNs knocked down for CaMKIV (using RNAi constructs for the wild type protein).

The evaluation on the survival effect of the over-expression of a **constitutively active form of chicken CaMKIV** resulted in MN survival in the absence of any trophic support or membrane depolarization. The survival effect due to the presence of this constitutively active form was induced through Akt phosphorylation. Moreover, the RNAi approach also demonstrated that CaMKIV is necessary for MN survival. Results showed that RNAi, but not RNAi control, reduced the survival effect induced by BDNF or by 30K medium. Endogenous CaMKIV is necessary for chicken MN survival in culture.

Finally, to further characterise the link between PI3K pathway and CaMKIV we studied if Akt was phosphorylated by the kinase domain of CaMKIV. To this end we analysed the survival effect of the over-expression of a **Kinase dead form of the constitutively active chicken CaMKIV**, which resulted to rescue chicken MNs from deprivation of neurotrophic support or neuronal electric activity in the same way as the constitutively active form did. Results suggested that CaMKIV survival effect is independent of CaMKIV kinase activity. Parallel experiments showed that CaMKIV activates Akt through its association with PI3K in a Ca^{2+} - dependent manner through immunoprecipitation approach.

These results together implicate CaMKIV in the survival process and PI3K/Akt activation of spinal cord MNs during chicken embryonic development.

1.2 RESULTS

1.2.1 CaMKIV expression and cellular distribution in chicken embryonic MNs

Previous experiments performed in the laboratory demonstrated that CaMKIV is expressed in chicken spinal cord MNs. RT-PCR assay and western blot were used to analyze the presence of mRNA and protein in freshly isolated and cultured embryonic chicken spinal cord MNs. Semiquantitative RT-PCR analysis with the specific primers showed the presence of CaMKIV transcript, and the sequencing of the PCR product confirmed the nucleotide sequence for CaMKIV. Western blot results demonstrate that the protein CaMKIV is expressed in chicken spinal cord MNs (Figure 70).

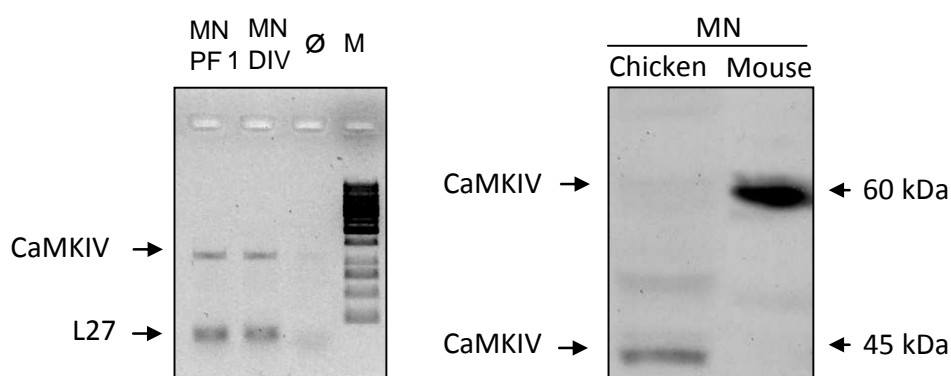


Figure 70. CaMKIV is expressed in chicken spinal cord MNs.

A) Agarose gel showing the reverse transcription-PCR products using primers for chicken CaMKIV in E5.5-purified chicken spinal cord MNs (PF) or 24-h cultured MNs (1 day in vitro (1DIV)). Co-amplification of the L27 mRNA (bottom band in each line) serves as an internal control. Ø, control reactions performed without reverse transcriptase. M, 1-kilobase DNA ladder marker. B) Western blot analysis of protein extracts from freshly purified chicken or mouse spinal cord MNs. The membrane was probed with an anti-CaMKIV antibody. (Pérez-García et al. 2008).

Both results showed that chicken CaMKIV is shorter compared to other species but even though contains all the domains that characterize this family of proteins.

In order to analyze its cellular distribution we have performed immunofluorescence for CaMKIV (Figure 71). Using confocal images analysis we concluded that all the cells that we observed had the same distribution of the fluorescence: intense in the cytoplasm (745.2 ± 62 average fluorescent intensity, AFI) and lower in the nucleus (366.6 ± 38.6 AFI; control no-primary antibody 2.48 ± 2.6 AFI).

The protein at nuclear localization is the responsible for Ca^{2+} -dependent gene transcription through the phosphorylation of several transcription factors, including CREB (Soderling and Stull 2001). However, the protein is present in the cytoplasm as well as the nucleus, indicating that CaMKIV may have also a physiological function different than phosphorylation of transcription factors.

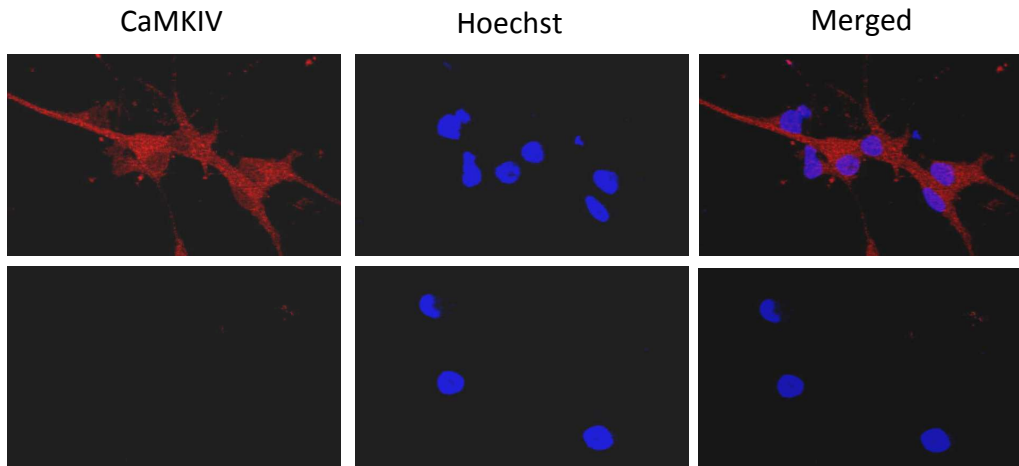


Figure 71. CaMKIV cellular distribution in cultured primary chicken MNs.

Representative confocal images of CaMKIV expression in MNs using an anti-CaMKIV antibody (red) and Hoescht 33258 (blue) nuclear staining. We can clearly appreciate CaMKIV cytoplasmic and nuclear distribution and the additional control, an immunofluorescence omitting the primary antibody and no fluorescence signal was detected in this condition. Barr: 25 μ m.

1.2.2 Effect of the constitutively active form of CaMKIV on cell survival

We have transfected chicken MNs with a constitutively active form of CaMKIV (chicken CaMKIV has Ca^{2+} /CaM-dependent kinase activity and the truncated form in Leu³¹³ generates a constitutively active protein) and analysed whether chicken CaMKIV_{CA} induces MN survival in the absence of neurotrophic support.

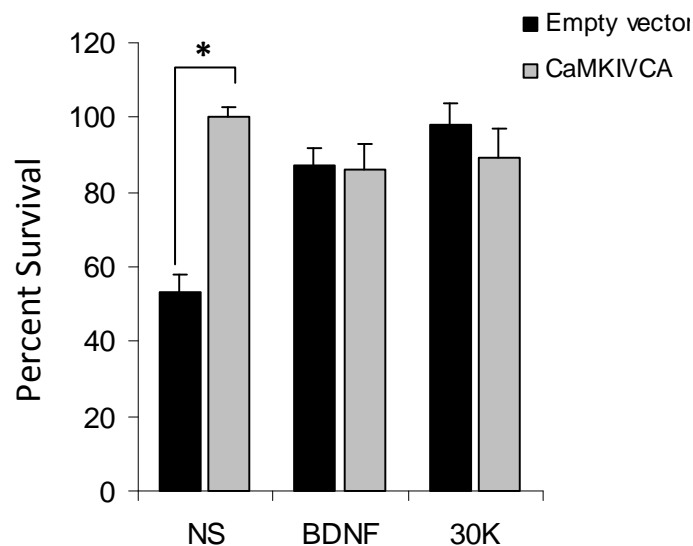


Figure 72. CaMKIV_{CA} induces MN survival.

Thirty minutes after plating MNs were transiently cotransfected with pEGFP and pcDNA3-FLAG-CaMKIVCA or the empty vector. Twenty-four h later, cells were washed and treated with 10 ng/ml BDNF or 30mM KCl medium (30K) or NS as indicated. A, survival was expressed as the percentage of EGFP-positive cells after 24 h of treatment with respect to the EGFP-positive cells present in the culture surface at the beginning of the treatment. Values are the mean \pm SEM of three wells from a representative experiment that was repeated at least two more times. Asterisks indicate significant differences between pcDNA3-FLAG-CaMKIV_{CA} and the empty vector cultures in NS medium using Student's t test (*, $p \leq 0.001$).

To this aim we co-transfected MN cultures with pEGFP and CaMKIV_{CA} or the empty vector in order to analyze cell survival. After 24 h cells were washed and treated with 10 ng/ml BDNF or 30 mM KCl (30K, to induce membrane depolarization) or left untreated (non-supplemented, NS). Cell survival was evaluated 24 h later as the percentage of fluorescent cells remaining in the culture well with respect to the fluorescent cells at treatment initiation. Results show that after 24 hours of deprivation, CaMKIV_{CA}-transfected MN showed ~100% of surviving cells with respect to the EGFP-positive cells present at the beginning of the treatment, whereas empty vector-transfected cells in the same culture conditions showed ~50% of surviving cells (Figure 72).

It has been described that 24 h after neurotrophic factor withdrawal, apoptotic dying neurons show a marked blebbing of the plasma membrane, whereas healthy neurons are smooth and have long neurites (Edwards and Tolkovsky 1994). To evaluate cell death we have analysed blebbing morphology in CaMKIV transduced MN and compared with empty vector. Results show that CaMKIV_{CA} protects MNs from the cell death induced after NTF or high potassium withdrawal (Figure 73). The percentage of blebbing cells in CaMKIV_{CA}-transfected MNs was reduced (~17%) when compared to the empty vector-transfected cultures (~35%) in the absence of any trophic support (Figure 73-A).

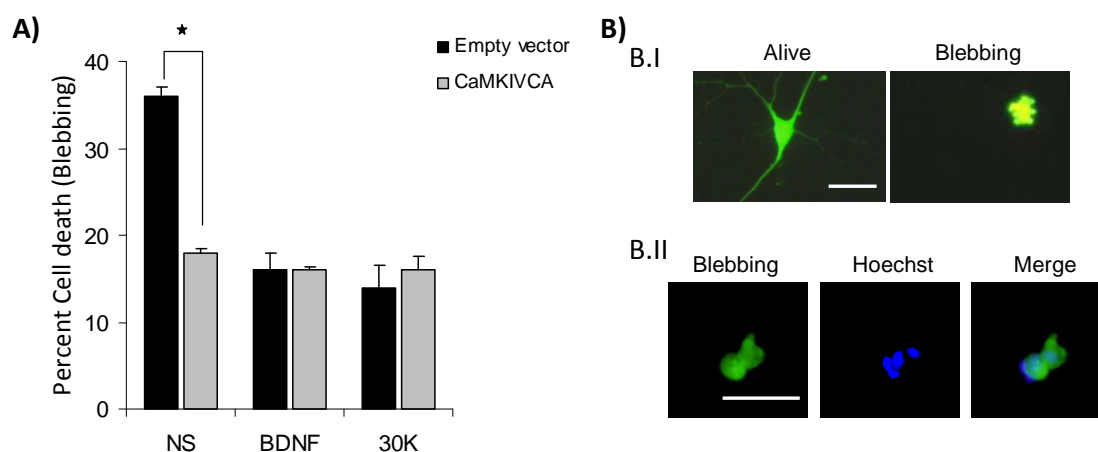


Figure 73. Effect of CaMKIV constitutively active form transfection on MN cell death.

A) MNs were transiently co-transfected with pEGFP and CaMKIV_{CA} or the empty vector. Twenty-four hours later cells were washed, and different experimental conditions were established; that is, 30mM K⁺, BDNF (10 ng/ml) or NS. Cell death was expressed as the percentage of cells showing blebbing morphology with respect to the total GFP-positive MNs present in the culture dish after 24 h of treatment. Values are the mean±SEM of three wells from a representative experiment that was repeated at least two more times. Asterisks indicate significant differences between CaMKIV_{CA} and the empty vector cultures in BDNF medium using Student's t test (*, p≤0.001). Representative images of healthy (Alive) and 24-h deprived (Blebbing) cultured MNs. Bars: 25 μm. B) Microscopic images showing: B.I) alive and blebbing morphology and B.II) blebbing morphology matches with apoptotic nucleus stained by Hoechst.

To further corroborate that the neurons that showing blebbing morphology were apoptotic dying neurons we have analysed if they had nuclear apoptotic morphology when stained with Hoechst. We also evaluated the percentage of apoptotic nuclei 24h after NTF withdrawal in neurons transfected with CaMKIV_{CA} compared to the empty vector. In CaMKIV_{CA}-transfected MNs cell death was reduced (~27%) when compared to the empty vector-transfected cultures (~55%) after 24h in the absence of any trophic support (Figure 74).

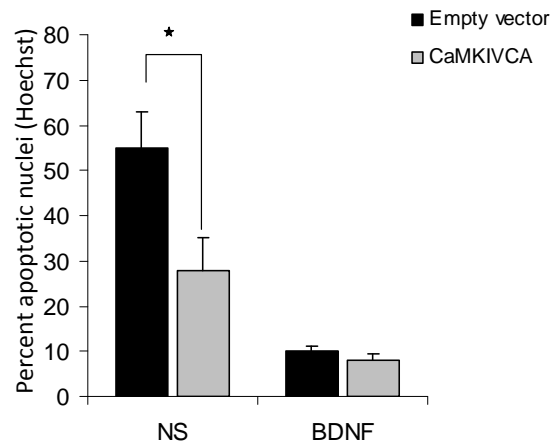


Figure 74. Constitutively active form of CaMKIV reduces cell death in NTF-deprived MNs.

MNs were transiently co-transfected with pEGFP and pc-CaMKIV_{CA} or the empty vector. Twenty-four h later, cells were washed and neurotrophic factors starved. The graph shows percent apoptotic nucleus in MN cultures 24 h after NTFs withdrawal. Values are the mean±SEM of three wells from a representative experiment that was repeated at least two more times.

In both -blebbing and Hoechst analysis- CaMKIV_{CA} rescues half of the dying population. Together, these results indicate that chicken CaMKIV_{CA} form protects MNs from the cell death caused by NTF- or high potassium- deprivation, suggesting an important role of CaMKIV in MN survival.

1.2.3 Intracellular molecular pathways activated in the presence of the constitutively active form of CaMKIV

It is well known that the activation of the PI3K/Akt pathway induces neuronal survival on different neuronal populations (Crowder and Freeman 1998); including spinal cord MNs (Dolcet et al. 1999, Soler et al. 1999). Previous work performed by the group described that Ca²⁺/CaM has a role in both the activation of the intracellular pathway PI3K and MN survival induced by GDNF (Perez-Garcia et al. 2004). GDNF stimulation induces a moderate increase of intracellular Ca²⁺ concentration, and this increase is involved in MN survival through CaM activation and association to PI3K and the subsequent Akt activation. In this context, we wanted to analyze whether the

survival promoting effect of CaMKIV was also mediated by the activation of PI3K/Akt pathway.

Knowing that in PC12 cells, NTFs and high potassium medium exert their biological effects activating both the PI3K and the ERK mitogen-activated protein kinase pathways (as occurs in MNs), and that PC12 cells do not express endogenous CaMKIV (Llovera et al. 2004), we chose PC12 as cell model to elucidate specific CaMKIV_{CA} effects.

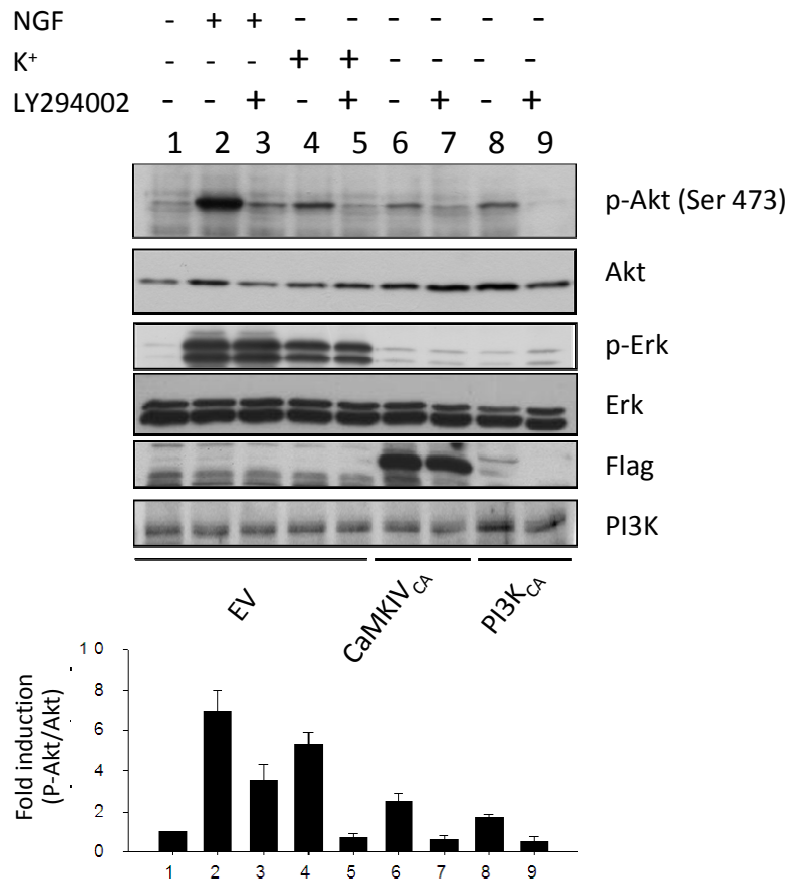


Figure 75. CaMKIV_{CA} induces Akt phosphorylation.

PC12 cells were transiently co-transfected with pEGFP and PI3K_{CA} or CaMKIV_{CA} or the empty vector (EV), 48h after transfection cells were washed and cultured in minimal medium for 12h, stimulated for 5 min with different culture conditions: 100 ng/ml NGF or 70mM KCl (K) with or without 50 μM LY294002 (LY) or non-stimulated. Total cell lysates were analyzed by Western blot using anti-phospho-Akt antibody (p-Akt (S473)) or an anti-phospho-ERK antibody (p-Erk). Membranes were stripped and re-probed with an anti-pan-Akt (Akt), anti-pan-ERK (Erk), anti-FLAG (Flag), or anti-PI 3-kinase (PI3K) antibodies. The graph represents measures of phospho-Akt versus total Akt from three independent experiments. Asterisks indicate significant differences when compared CaMKIV_{CA}-transfected cells with non-stimulated empty vector-transfected cells using Student's t test (*, p ≤ 0.05).

PC12 cells were transiently co-transfected with pEGFP and the CaMKIV_{CA} or a constitutively active form of PI3K (PI3K_{CA}) or the empty vector. After 48 h, cells were washed and then stimulated 5 min with different culture conditions: non-supplemented or 100 ng/ml NGF or 70 mM KCl (K⁺), with or without the PI3K inhibitor

LY294002 (50 μ M). Cell lysates were analyzed by Western blot using specific antibodies against phospho-Akt (Ser 473) or phospho-ERK (Thr 202 and Tyr 204) to check the phosphorylation of both proteins as representative steps of activated PI3K/Akt and ERK MAP kinase pathways, respectively. Cells transfected with CaMKIV_{CA} or PI3K_{CA} constructs showed an increased level of Akt phosphorylation in Ser 473 (Figure 75, lanes 6 and 8, respectively) and Thr 308 (data not shown) compared to the cultures transfected with the empty vector (Figure 75, lane 1). In both conditions Akt phosphorylation was inhibited by the presence of the PI3K inhibitor LY294002 indicating that PI3K activation is mediating this process (Figure 75). However, ERK phosphorylation was not increased in the same extracts, suggesting that neither CaMKIV_{CA} nor PI3K_{CA} were able to activate the ERK MAP kinase pathway in these experimental conditions. Control cultures treated with NGF or high potassium medium induced an increase of Akt phosphorylation (lanes 2 and 4) that was blocked by LY294002 (lanes 3 and 5).

In both cases, the same treatment induced ERK phosphorylation that was not inhibited by LY294002, as expected. All these results demonstrate that in PC12 cells, NTFs and high potassium medium exert their biological effects activating both the PI3K and ERK MAP kinase pathway. Nevertheless, CaMKIV_{CA} induces Akt phosphorylation, but not ERK phosphorylation, indicating the involvement of the PI3K pathway, but not the ERK MAP kinase pathway, in its survival promoting effect.

1.2.4 Effect of kinase dead form of the *Gallus gallus* constitutively active CaMKIV on neurotrophic deprivation induced cell death

To determine whether the kinase activity of CaMKIV is responsible for cell survival induction Dr. Pérez García cloned a CaMKIV_{CA} kinase dead form (CaMKIV_{CA}-KD), which has an amino acid mutation in the ATP binding domain (K60E). Kinase activity experiments analysing CREB phosphorylation were performed and results indicated that kinase activity was blocked in the mutated form (data not shown).

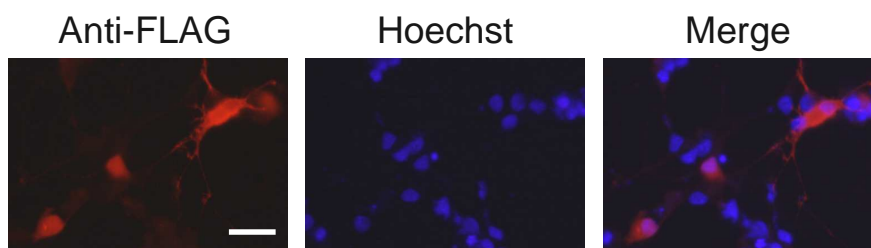


Figure 76. Anti-FLAG immunofluorescence showing distribution form CaMKIV_{CA}-KD of the transfected cells.

White scale bar, 50 μ m.

First of all we evaluated CaMKIV_{CA}-KD cellular expression. To this aim we transfected MNs with CaMKIV_{CA}-KD and after 48 hours we did an immunofluorescence using an anti-FLAG antibody (anti-FLAG M2 monoclonal antibody, Sigma). Microscope images confirmed that the kinase dead form was expressed (Figure 76). CaMKIV_{CA}-KD cellular expression was also demonstrated by western blot analysis using anti-FLAG antibody (see Figure 78).

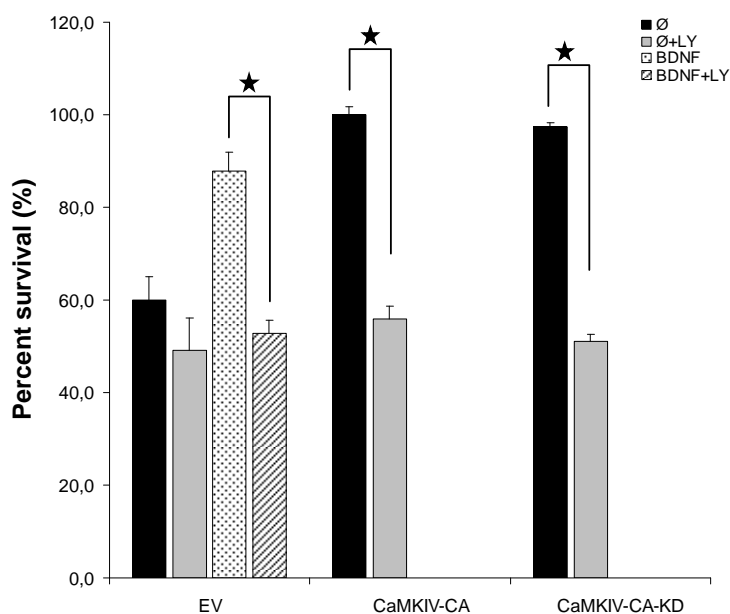


Figure 77. Effect of PI 3-kinase inhibitors on CaMKIV_{CA}-induced MN survival.

MNs were co-transfected with pEGFP and pcDNA3-FLAG-CaMKIV_{CA}, pcDNA3-FLAG-CaMKIV_{CA}-KD, or the empty vector (EV). Twenty-four hours after transfection, cultures were washed, and medium was changed with the different conditions, NS or BDNF (10 ng/ml) in the presence or absence of 50 μM LY294002. Cell survival was evaluated 48 h later and is expressed as the percentage of the fluorescent cells remaining in the culture well with respect to the fluorescent cells at treatment initiation. Values are the mean ± SEM of three wells from a representative experiment that was repeated at least two more times. Asterisks indicate significant differences in cell survival between cultures treated with or without LY294002 using Student's t test (*, p ≤ 0.005).

We analyzed the effect of this kinase dead form on MN survival. To this aim we co-transfected MN with pEGFP and either CaMKIV_{CA}-KD or CaMKIV_{CA} or the empty vector; 24 h later cultures were washed and treated with the different conditions (NS or 10 ng/ml BDNF or 30K). Survival was analyzed 24 h after treatment. Cultures transfected with CaMKIV_{CA}-KD showed a percentage of survival similar to those transfected with the CaMKIV_{CA}, indicating that the MN survival-promoting effect mediated by CaMKIV is independent of its kinase activity Figure 77. To establish the role of PI3K in MN survival mediated by CaMKIV, cells were co-transfected with the same plasmids as described above. Twenty-four hours later cells were washed and treated with NS or 10 ng/ml BDNF in the presence or absence of the PI3K inhibitor LY294002 (50 μM). Forty-eight

hours later cell survival was evaluated as the percentage of the fluorescent cells remaining in the culture well with respect to the fluorescent cells at treatment initiation. As shown in **Figure 77**, the presence of LY294002 prevents the survival effect induced by CaMKIV_{CA} or CaMKIV_{CA}-KD, indicating that PI3K activation mediates MN survival induced by CaMKIV.

1.2.5 Effect of the kinase dead form of CaMKIV_{CA} on PI3K activation pathway

To analyse whether the kinase activity of CaMKIV induces Akt phosphorylation, PC12 cells were transfected either with CaMKIV_{CA} or CaMKIV_{CA}-KD or the empty vector, and Akt phosphorylation was analyzed. **Figure 78** shows that CaMKIV_{CA} or CaMKIV_{CA}-KD transfection promoted Akt phosphorylation. This result indicates that the kinase activity of CaMKIV is not responsible for the Akt phosphorylation observed.

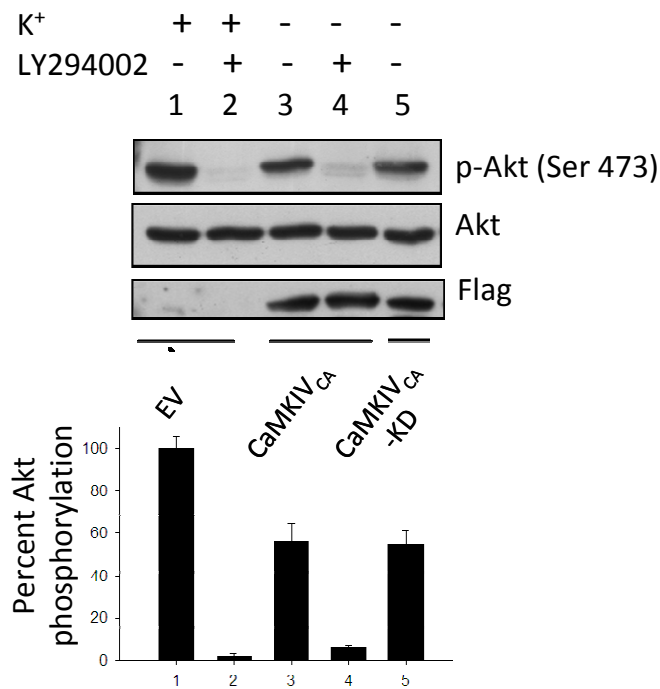


Figure 78. CaMKIV_{CA}-KD induces Akt phosphorylation.

PC12 cells were transfected and then stimulated with 70 mM KCl with or without LY294002 or non-stimulated. Total cell lysates were analyzed by Western blot using anti-phospho-PKB antibody (p-Akt (S473)). The graph represents the percentage of Akt phosphorylation measured in the different conditions with respect to empty vector-transfected cells (EV) treated with KCl. Values are the mean ± SEM of three independent biological replicates.

CHAPTER 2:

Specific vulnerability of mouse spinal cord motoneurons to membrane depolarization

*Gou-Fabregas, M., A. Garcera, S. Mincheva, M. Perez-Garcia, J. Comella & R. Soler
J Neurochem, 2009.*

The group has been working with chicken primary MN culture for many years and has contributed to a better understanding of the behaviour of these neurons during development. But this model has some technical limitations that difficult to carry out some experiments (there are few antibodies that are specific for chicken; there are no mutant disease models, etc.). For this reason and in order to move one step forward in 2005, Dr. Rosa M^a Soler i Tatché started to establish a primary mouse MNs culture from embryonic stage E12.5.

2. SPECIFIC VULNERABILITY OF EMBRYONIC MOUSE MNS TO MEMBRANE DEPOLARIZATION

2.1 INTRODUCTION

The group started to establish a primary mouse MN culture from embryonic stage E12.5 and our first objective was to characterize the MN model and the requirements of those neurons to survive in culture.

It is well known that moderate increases of intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), induced by either: a) neurotrophic factors or by b) neuronal activity, regulate different intracellular pathways and neuronal survival.

a) MN survival regulation by NTFs:

Each subpopulation of spinal cord MNs expresses different NTF specific receptors and they require different NTFs or different NTF-combinations to survive. In order to characterize which MN subpopulations are present in our developmental mouse MN culture and their neurotrophic dependences we performed survival experiments in the presence or absence of trophic support in the culture media (NTFs survival effect was analysed individually and in different combinations).

b) MN survival regulation by neuronal activity:

The 'Ca²⁺ set-point hypothesis' proposes that an optimal intracellular Ca²⁺ concentration drives neurons to become independent of NTFs to survive, and that concentrations of Ca²⁺ significantly higher than this optimal value may be toxic (Johnson et al. 1992). Thus, membrane depolarization results in a moderate intracellular Ca²⁺ increase through VGCCs which in many neuronal population's results in cell survival even in the absence of neurotrophic support.

Even in the absence of NTFs chronically depolarized chicken MNs by maintaining them in a medium containing elevated potassium (30 mM) enhance survival in a dose-dependent manner. This protective effect is mediated by a moderate Ca²⁺ influx through L-type VGCCs, which was responsible for the activation of intracellular pathways involved in cell survival (Soler et al. 1998; Perez-Garcia et al. 2008). However, the same depolarizing stimulus (high K⁺ medium, 30K) in our mouse MN primary culture induces a toxic effect, similar observations have been described on motoneuron like NSC34 mouse cell line (Kaiser et al. 2006) and rat MNs (Arakawa et al. 2002), demonstrating apparent discrepancies in the results obtained from MNs of different species and suggesting an intrinsic vulnerability of mammalian MNs.

In the present work, to elucidate the differences observed between chicken and mouse MNs, we compared under the same experimental conditions the survival response and the intracellular Ca^{2+} changes after membrane depolarization. Results show that the Ca^{2+} levels reached after high K^+ exposure play a key role in the different response of MNs of both species. We observed that depolarization-induced mouse MNs toxicity and intracellular Ca^{2+} rise was reduced by treatment with some of the well-known VGCCs antagonists, indicating that Ca^{2+} influx through these channels contributed to the toxic effect of membrane depolarization. We also investigated the functional implication of a Ca^{2+} dependent cysteine protease, μ -Calpain, using two different approaches: blocking Calpain activity with Calpeptin (a commercial Calpain inhibitor) and by Calpain gene silencing, both resulted to have the same protective effect. Our results indicate that endogenous Calpain mediates the cell death caused by excessive Ca^{2+} influx after membrane depolarization.

2.2 RESULTS

2.2.1 Characterization of spinal cord MNs primary culture

In order to characterize E12.5 mouse spinal cord MNs primary culture we evaluated the MN specific transcription factors islet-1/2 performing immunofluorescence analysis (see Figure 79-A); approximately 80% of the cultured cells were positive for this MN specific marker. Then, we analysed cell survival in the absence or presence of a cocktail of NTFs (1 ng/mL brain-derived neurotrophic factor, 10 ng/mL glial cell line derived neurotrophic factor, 10 ng/mL ciliary neurotrophic factor, 10 ng/ml cardiotrophin 1, and 10 ng/mL hepatocyte growth factor in the culture medium (NBMc). For these experiments cells were plated at low density to avoid cell contact-mediated effects (600 cells/cm²) in NBMc medium, and two hours after plating we changed the culture medium to NBMc with or without the NTFs-cocktail.

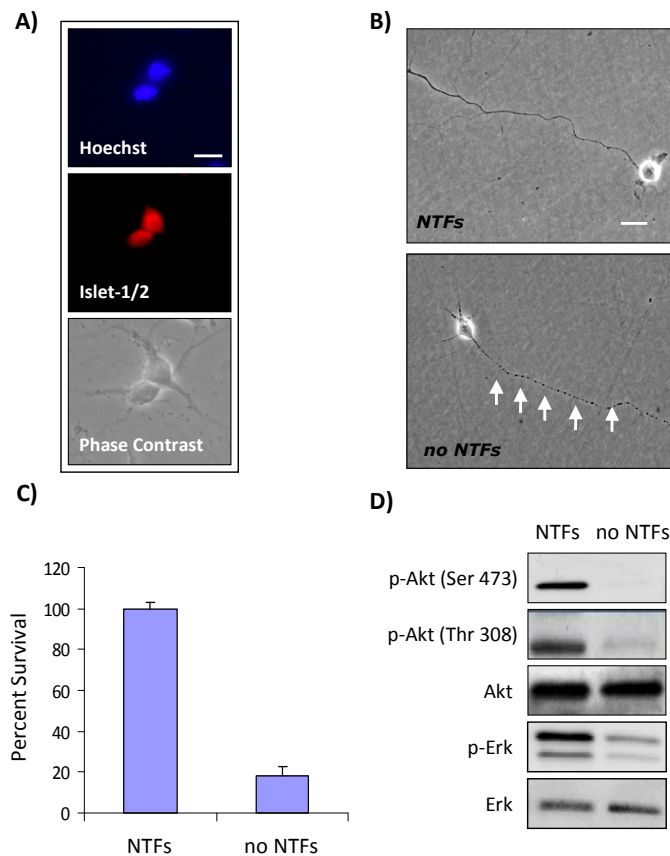


Figure 79. Primary Mouse MNs culture characterisation.

A) Representative microscopy images from a primary mouse MN culture: phase contrast; immunofluorescence with Islet-1/2 antibodies (red) and Hoechst 33258 (blue). B) Representative images of MNs treated 24 hr in the presence or absence of NTFs in the culture media. Arrows indicate axonal degeneration. C) Percent survival of mouse MN cultures cultured with or without NTFs cocktail. Cell survival was evaluated after 72 hr of treatment, as the percentage of MNs present in the culture well respect to MNs number present in NTFs control condition. Values are the mean of three different wells for each condition \pm SEM (error bars) from a representative experiment that was repeated at least twice with comparable results. There are significant differences when comparing NTFs to no NTFs treated cultures (using Student's *t* test

($p < 0.05$)). D) 12 h after plating cells were washed and cultured in minimal medium for 12h, after they were stimulated for 5 min with Neurobasal medium with or without NTFs. Total cell lysates were analyzed by Western blot using anti-phospho-Akt antibody (p-Akt (Ser 473)), anti-phospho-Akt antibody (p-Akt (Thr 308)) or an anti-phospho-ERK antibody (p-ERK). Membranes were stripped and re-probed with an anti-pan-Akt (Akt) and an anti-pan-ERK (Erk). Scale bars in A and C 20 μ m.

After three days *in vitro*, we evaluated the number of cells present in the culture dish. Those MNs cultured in the presence of NTFs showed a survival rate that we

established as 100%. Cultured cells in the absence of trophic support (no NTFs) only showed a survival rate of 18% compared to MNs cultured with NTFs (Figure 79-B). Thus, the presence of NTFs in the culture medium promotes 5 times more cell survival than without NTFs.

It has been described that when NTFs bind to their specific receptors on MNs membrane activate molecular pathways, such as PI3K/Akt and MAPK, that induce cell survival, differentiation, etc; (Soler et al. 1999). We analysed by western blot if those intracellular pathways were activated in mouse MNs cultured in the presence of NTFs. Cells were seeded at 25 000 cells / cm² in 4 multi-well plates (Nunc) with NBMc with and NTFs. Six hours after, the culture medium was washed with NBM three times (to eliminate all factors and serum components that may interfere) and we left the cells in basic NBM medium O/N. The next morning cells were stimulated for 5 min using basic NBM with or without NTFs-cocktail, collected and analysed by western blot. Figure 79-D shows a huge increase of Akt and Erk MAPK phosphorylation in those samples stimulated with NTFs suggesting the activation of these pathways.

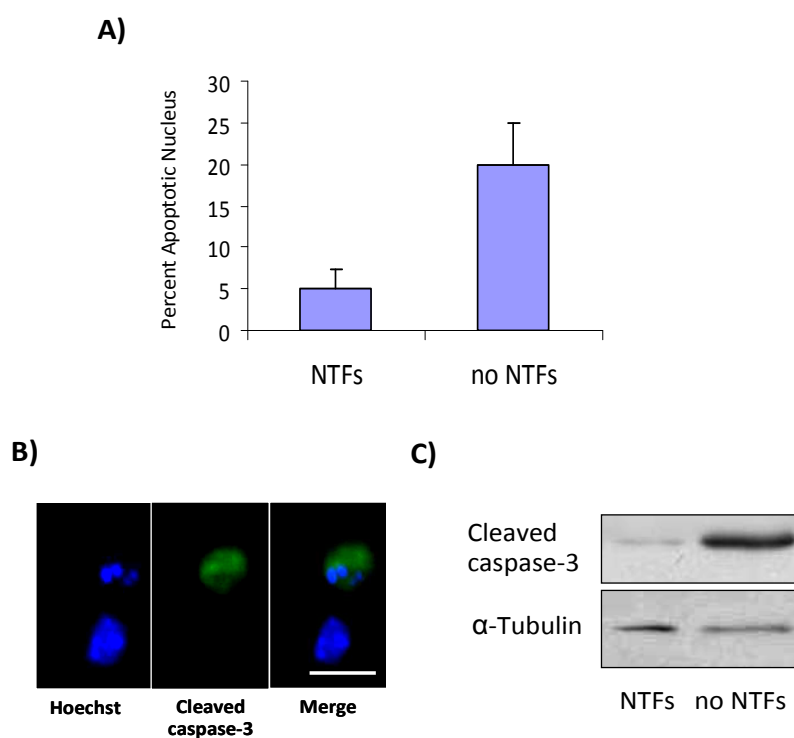


Figure 80. NTFs deprivation induces apoptotic cell death to primary cultured mouse MNs.

Mouse MNs were cultured in the presence or absence of NTFs and 24 h later we analysed different death parameters. A) The graph shows percent apoptotic nucleus in MN cultures 24 h after NTFs withdrawal. Values are the mean \pm SEM of three wells from a representative experiment that was repeated at least two more times. B) Microscope images from cleaved Caspase-3 immunofluorescence (green) and nuclear staining (Hoechst), notice that only the nucleus with apoptotic morphology is active Caspase-3 positive. Scale bar: 15 μ m C) Protein extracts from MN cultures were probed with an anti-cleaved Caspase-3 antibody by western blot analysis; as loading control the membranes were re-probed with an antibody against α -Tubulin.

We analysed if cell death due to NTFs starvation was apoptotic as described in other neuronal models (Milligan, Oppenheim and Schwartz 1994, Soler et al. 1998). Nuclear morphology (analyzed by Hoechst staining) and caspase-3 activation (demonstrated by both western blot and immunofluorescence approaches) showed clear apoptotic features (Figure 80).

Thus MNs require the presence of NTFs in the culture medium to activate molecular pathways which induce cell survival and differentiation such as PI3K/Akt and Erk MAPK; and when there is no trophic support on the culture medium mouse MNs die in an apoptotic way.

2.2.2 Analysis of the specific effect of different NTFs on MN survival

From our previous experiments we knew that embryonic MNs require the presence of NTFs-cocktail to induce PI3K/Akt and Erk/MAPK pathways activation to survive in culture. It is described that the different subpopulations of spinal cord MNs respond to different NTFs requirements. To analyze the effect of each factor used in the NTFs-cocktail we cultured MNs at very low density (500 cells/cm²) in NBMc supplemented with single NTFs and in different combinations (Figure 81).

Results show a moderate survival effect for HGF (10 ng/ml) and BDNF (1 ng/ml) treatment, the survival levels are $28 \pm 3,4$ and $33 \pm 3,1$ % respectively, but when used together they have an additive effect and survival levels increase up to $40 \pm 2,5$ %. CT-1 and CNTF (10 ng/ml) show similar survival rates, 53 ± 4 % and $49 \pm 3,3$ %, and when they are used in combination they do not show any additive effect, suggesting that both neurotrophins rescue the same MN subpopulations. GDNF (10 ng/ml) induced MNs survival levels after 72 hours are 56 ± 6 %. When we use GDNF and CNTF in combination the survival levels raise up to 82 ± 3.1 %, indicating that GDNF and CNTF are both major survival effectors, but there still remain some MN populations that need BDNF and HGF to survive.

We analyzed the role of PI3K/Akt pathway on MN survival, to this aim we added single NTFs and in different combinations to the culture medium in the presence or absence of LY294002. In all the conditions except for no NTFs supplemented media and HGF alone, the inhibitor reduced survival induced by NTFs. Interestingly in NTFs-cocktail cultured MNs and in GDNF + CNTF combination the inhibitor reduced cell survival but not until no NTFs levels. This result suggests the implication of other intracellular pathways in MN survival in culture.

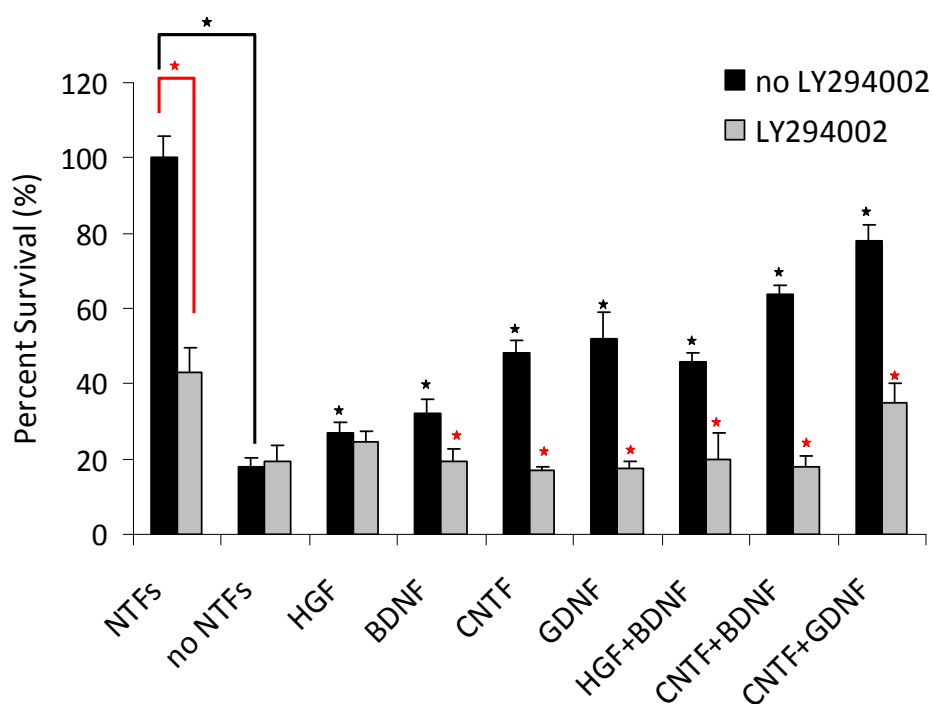


Figure 81. NTF induced mouse MNs survival.

Percent MN survival in primary MN cultures with NTFs individually, in different combinations or without NTFs in the presence or absence of the Akt inhibitor (LY294002). MNs were plated at low density in NBMc medium. Two h after plating medium was changed with the different conditions, NTFs (BDNF (1ng/ml) and HGF, CNTF and GDNF (10ng/ml)), no NTFs, and the indicated factors alone and in different combinations at the same concentration than in the NTFs cocktail, in the presence or absence of 50 μ M LY294002. Cell survival was evaluated 72 h later and all the values are referred to NTFs survival rate. Values are the mean \pm SEM of three wells from a representative experiment that was repeated at least two more times. Black asterisks indicate significant statistical differences from (no NTFs) condition, and red asterisks indicate differences from the same culture media with and without Akt inhibitor, using Student's t test (*, $p < 0.005$).

Parallel research in our group pointed out that NF-kappaB pathway is also an important molecular pathway involved in MN survival.

Considering these results as MNs respond to different NTFs stimulation we culture them in the presence of NTFs-cocktail in the culture media to reach maximal survival levels. Nevertheless, using mediums supplemented with only one NTF or different combinations may allow us to study the effect of different treatments on different MNs subsets.

2.2.3 Effect of high K^+ medium on mouse cultured MNs

Addition of KCl to culture medium induces chronic depolarization of the neuronal plasma membrane, which results in Ca^{2+} influx through VGCCs and intracellular Ca^{2+} concentration increase (Lipscombe et al. 1988). In some neuronal populations, reaching the appropriate intracellular Ca^{2+} level induces cell survival in the absence of NTFs (Koike et al. 1989); including chicken spinal cord MNs (Soler et al. 1998).

To elucidate whether membrane depolarization induces cell survival in cultured spinal cord MNs, we performed survival experiments in our E12.5 mouse spinal cord MNs primary culture. Cells were plated at low density to avoid cell contact-mediated effects (600 cells/cm²) and were cultured under several conditions: in NBMc in the absence (no-NTFs) or the presence of a cocktail of NTFs, and NBMc in the presence of high-K⁺ medium: 30 mM KCl (30K). After 2 days, cell survival was evaluated. The total number of cells present in the culture well was counted in at least three wells for each condition and survival was estimated as the percentage of cells with respect to NTFs-treated cultures, which were considered 100% survival. In the absence of NTFs, the percentage of surviving cells was significantly lower (33.8 ± 4.8%; *p* < 0.0001) with respect to NTFs treated cultures. In the presence of 30K, cell survival was also significantly lower (15.6 ± 1.9%) with respect to NTFs, see Figure 82. Moreover, the survival of 30K-treated cultures was also significantly lower (*p* < 0.001) compared with no-NTFs cultures. These 30K-treated MNs showed morphological differences compared with the NTFs cultures. After 48 h of 30K treatment mouse MNs were largely degenerated. Thus, contrary to expectations, a high-K⁺ medium did not induce mouse MN survival. Furthermore, the present results suggested that 30K medium induced MN cell death.

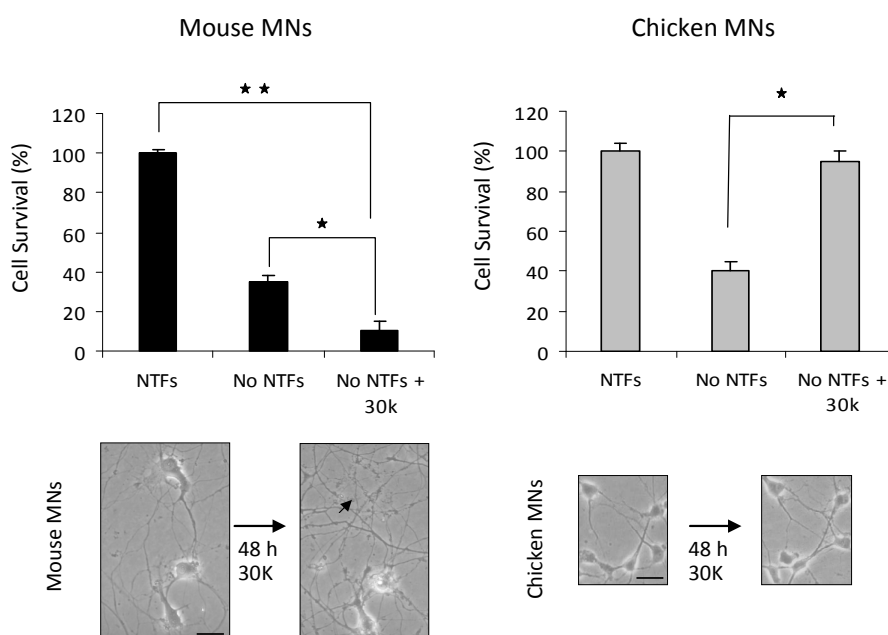


Figure 82. Effect of high K⁺ medium on mouse and chicken MN survival.

Mouse and chicken MN cultures were treated with a cocktail of NTFs (BDNF 1 ng/mL, GDNF, CNTF, CT-1, and HGF at 10 ng/mL), without NTFs or with 30 mM KCl medium (30K). Cell survival was evaluated after 48 h treatment in both mouse and chicken cultures, and expressed as the percentage of MNs present in the culture well with respect to the number of MNs present in NTFs control condition (see Material and methods). Values are the mean of three different wells for each condition ± SEM (error bars) from a representative experiment that was repeated at least twice with comparable results. Asterisk indicates significant differences when comparing the data from the three independent experiments using one-way ANOVA test (***p* < 0.0001; **p* < 0.001).

To rule out the possibility that the 30K medium death effect was not a result of a different culture method we also established primary cultures of E5.5 chicken spinal cord isolated MNs using the same culture medium (no-NTFs, NTFs or 30K) and conditions that we were using for mouse MNs. The results strongly suggested that the cell death effect of 30K on mouse MNs was not because of the culture method or to the medium used for the experiments, since chicken MNs in the presence of 30K raised survival levels similar to NTFs treatment and in any case showed evidence of a toxic effect. Thus, membrane depolarization did not induce *in vitro* cell survival of mouse MNs as it occurs in chicken MNs and other neuronal populations (D'Mello et al. 1997; Soler et al. 1998; Crowder and Freeman 1999).

2.2.4 High potassium medium induces cell death in the presence of neurotrophic factors

The survival of mouse MNs treated with 30K is reduced significantly with respect to the no NTF cultures. This result strongly suggests that 30K treatment induces cell death on these cells. To further analyze this hypothesis, we studied the effect of adding 30K in the culture medium of cells treated with NTFs. Thus MNs were cultured in the presence of four different media: noNTFs, NTFs, 30K or NTFs plus 30K and survival was evaluated after 2, 3 and 4 days *in vitro* (Figure 83). When cells were grown in the presence of NTFs plus 30K the percentage of surviving cells was significantly lower than those grown with NTFs alone ($p < 0.005$). However, cultures treated with noNTFs or 30K alone showed a survival lower than 30%.

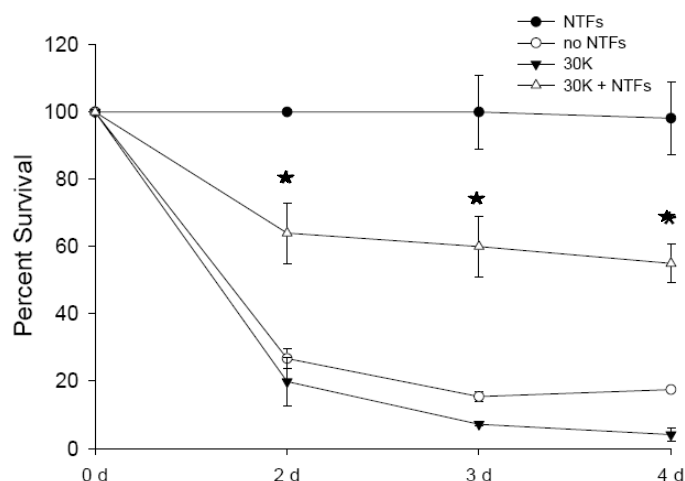


Figure 83. Membrane depolarization induces cell death on mouse MNs in the presence of NTFs.

MN cultures were treated with NTFs or without NTFs in the presence or the absence of 30K. MN survival was evaluated after 2, 3, and 4 days after treatment. Values are the mean \pm SEM of three wells from a representative experiment that was repeated at least two more times. Asterisks indicate significant differences when 30K + NTFs is compared with NTFs condition using one-way ANOVA test ($p < 0.0001$).

The effect was dose-dependent (Figure 84), lower doses of KCl had not effect on MN survival, but higher doses of KCl increased the cell death rate. These results suggest that even in the presence of NTFs, membrane depolarization induces MN cell death.

In order to know whether the cell death effect observed was an early or late event after MN exposure to 30K, cells were plated and 3 hr later the medium was washed and cultures were incubated for 5, 15, 30 min, 1 hr or 2 hr in a medium containing 30K plus NTFs. After the treatment cultures were washed and medium was replaced by NTFs control medium. Two days later cell survival was evaluated. Figure 85 shows that 30 min exposure to 30K medium significantly reduces ($p < 0.005$) cell survival respect to NTFs-supplemented cultures. Moreover, when compared the survival level of 30 min-treated with 2 days-treated cultures, no differences were observed ($61.1 \pm 3.8\%$, $64.6 \pm 4.5\%$, respectively). Thus, short term exposures to 30K medium induce cell death on NTFs supplemented cultures. This result indicates that an early phenomenon associated to membrane depolarization could be the mechanism involved in this cell death process.

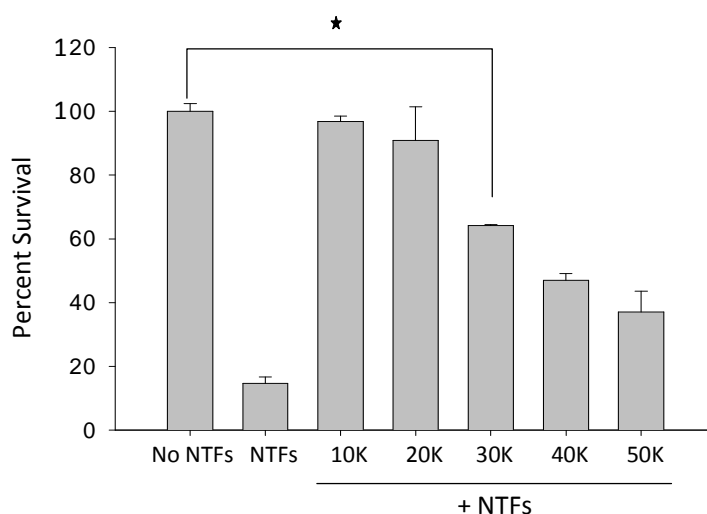


Figure 84. Percentage of MN survival with different K⁺ concentrations in the culture media.

Percentage of MN survival after 2 days in cultures supplemented with 10, 20, 30, 40, or 50 mM KCl in the presence of NTFs. Values are the mean \pm SEM of three wells from a representative experiment that was repeated at least two more times. Asterisks indicate significant differences when comparing the different conditions indicated in the graph from three independent experiments using one-way ANOVA test ($p < 0.0001$).

We analyzed the cell death process induced by 30K performing Hoechst staining and counting apoptotic nuclei, and by western blot analysis of cleaved Caspase-3 at different time points (15, 24 and 72 h). We did not see significant differences among number of apoptotic nuclei and western blot analysis did not show any induction of cleaved Caspase-3 in cultures in the presence of 30 mM K⁺.

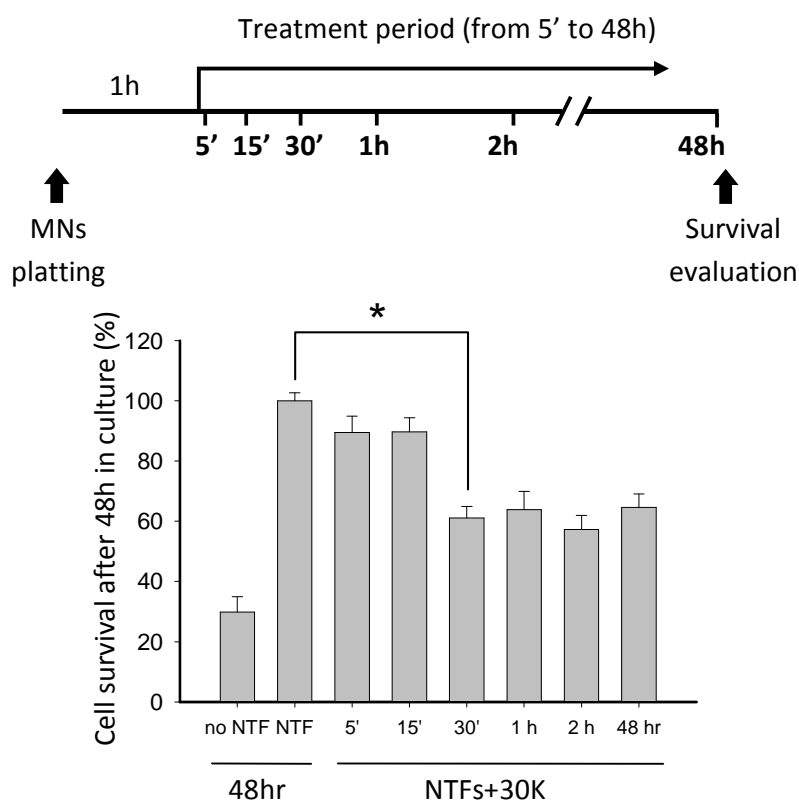


Figure 85. MN survival evaluation on cultured mouse MNs exposed to 30K + NTFs for different time periods.

MN cultures were exposed to 30K + NTFs medium for different time periods (5 s, 15 s, and 30 s, 1 h, 2 h, and 48 h) and 2 days later survival was evaluated. Values are the mean \pm SEM of three wells from a representative experiment that was repeated at least two more times. K^+ exposure of 30 min is the minimal time period needed to observe significant survival differences comparing to NTFs treated MNs, using one-way ANOVA test (Asterisk indicates $p < 0.0001$).

2.2.5 Effect of VGCC antagonists on death effect of high potassium medium

Neuronal membrane depolarization induces intracellular Ca^{2+} increase and contributes to cell survival because of the Ca^{2+} influx from the extracellular space through some of the well-known VGCCs. When VGCCs are blocked by specific antagonists, the survival effect of membrane depolarization is abolished (Koike et al. 1989; Soler et al. 1998). In this context, we wanted to elucidate whether VGCCs are involved in the death effect of membrane depolarization in our mouse MN model. We analyzed the survival effect of various VGCC antagonists on 30K + NTFs-treated MN cultures: Nifedipine and Nimodipine for L-type VGCCs; Amiloride for T-type VGCCs; Conotoxin GVIA for N-type VGCCs; and Agatoxin for P/Q type VGCCs.

Adding the Ca^{2+} channel antagonists Nimodipine (data not shown) and Nifedipine prevented the cell death effect induced by 30K. Low doses of Nifedipine (1 μ M) did not have any effect on survival; however, higher doses of the antagonist (10 and 30 μ M) were able to block the 30K effect. This fact can be explained because high doses of L-

type VGCC antagonists can also block other types of VGCC. The T-type VGCC antagonist, Amiloride, was toxic at 1 mM, a concentration used to block T-type Ca^{2+} currents in electrophysiological studies (data not shown); however, at lower concentrations it did not affect the cell death process induced by 30K. Agatoxin (0.1 μM) and Conotoxin GVIA (0.5 μM) did prevent the cell death effect of 30K on MNs. The percentage of MN survival in the presence of these antagonists was not significantly different than the NTFs control cultures (Figure 86).

The results obtained indicated that the L-type, N-type, and P/Q-type but not the T-type VGCCs were involved in the cell death process induced by membrane depolarization in mouse MNs.

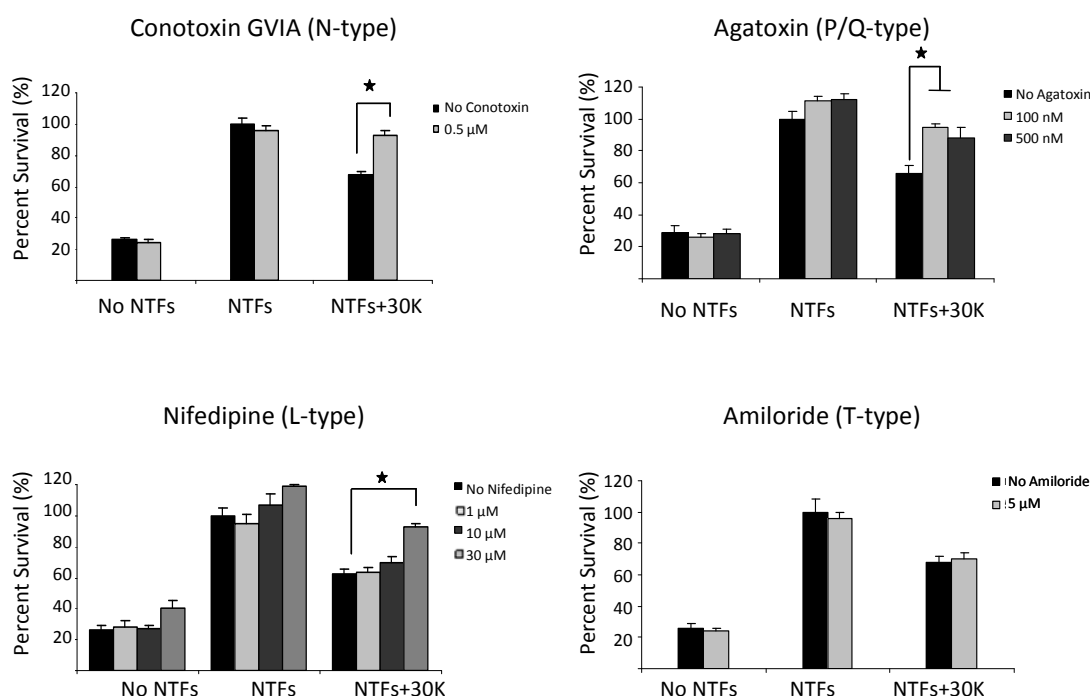


Figure 86. Effect of VGCC antagonists on membrane depolarization-induced mouse MNs cell death.

Percentage of MN survival in cultures treated with no-NTFs, NTFs, or NTFs plus 30K in the absence or the presence of Ca^{2+} VGCC antagonists: Nifedipine (1, 10, and 30 μM), Agatoxin (100 and 500 nM), Conotoxin GVIA (0.5 μM), or Amiloride (5 μM). Cell survival was evaluated 2 days after treatment. Values are the mean \pm SEM of three wells from a representative experiment that is repeated at least two more times. Asterisk indicates significant differences when comparing the different conditions showed in the graph, using two factor ANOVA test (Nifedipine $p < 0.05$; Agatoxin $p < 0.005$ and Conotoxin GVIA; $p < 0.001$).

2.2.6 Glutamate receptors antagonists and JNK pathway inhibition did not prevent membrane depolarization cell death effect

In order to clarify if 30K induced membrane depolarization led to an excessive glutamate release, we analyzed the ability of NMDA receptor antagonist MK801 (10 μ M) and AMPA/kainate receptor antagonist, 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX, 10 μ M), to block the cell death induced by depolarization. Non of the tested antagonists abolished 30K-induced MN cell death (Figure 87). These experiments suggested that glutamate excitotoxicity was not mediating the cell death induced by membrane depolarization.

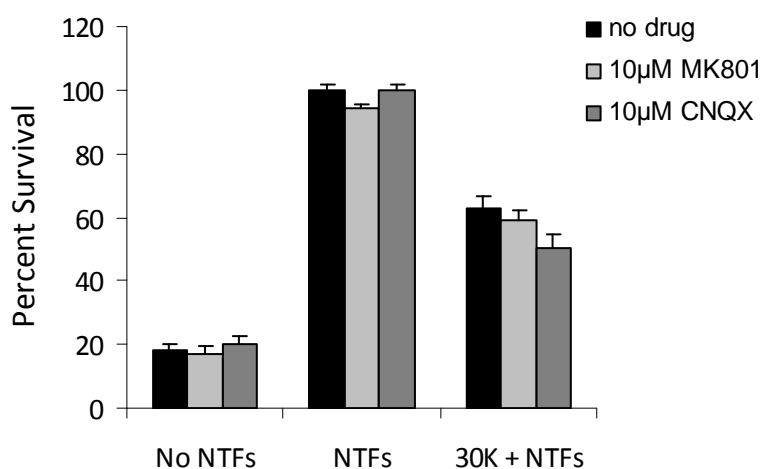


Figure 87. Effect of glutamate receptor antagonists on mouse MN cell death induced by membrane depolarization.

MN cultures were treated with no-NTFs, NTFs, or 30K + NTFs, with the presence or the absence of the glutamate receptor antagonists MK801 (10 μ M) or CNQX (10 μ M). Survival quantification was performed 2 days after treatment. Values are the mean \pm SEM of three wells from a representative experiment that is repeated at least two more times.

We also analyzed the involvement of c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway in this process. The JNK pathway had been previously related in excitotoxic cell death triggered by Ca^{2+} entry mediated by glutamate (Yang et al. 1997; Borsello et al. 2003a,b). We used two different approaches to study the role of this pathway: JNK activity was blocked selectively by the anthrapyrazolone JNK inhibitor, SP600125 (Besirli and Johnson 2003); and Jnk3 knockout mice isolated MNs were cultured in the presence of 30K to determine whether the absence of Jnk3 reduced the toxic effect of membrane depolarization. Results demonstrate that neither JNK inhibitor nor the absence of Jnk3 prevented the high K^+ medium effect (Figure 88). Together, all these experiments suggested that glutamate and the JNK pathway were not mediating the cell death effect induced by membrane depolarization.

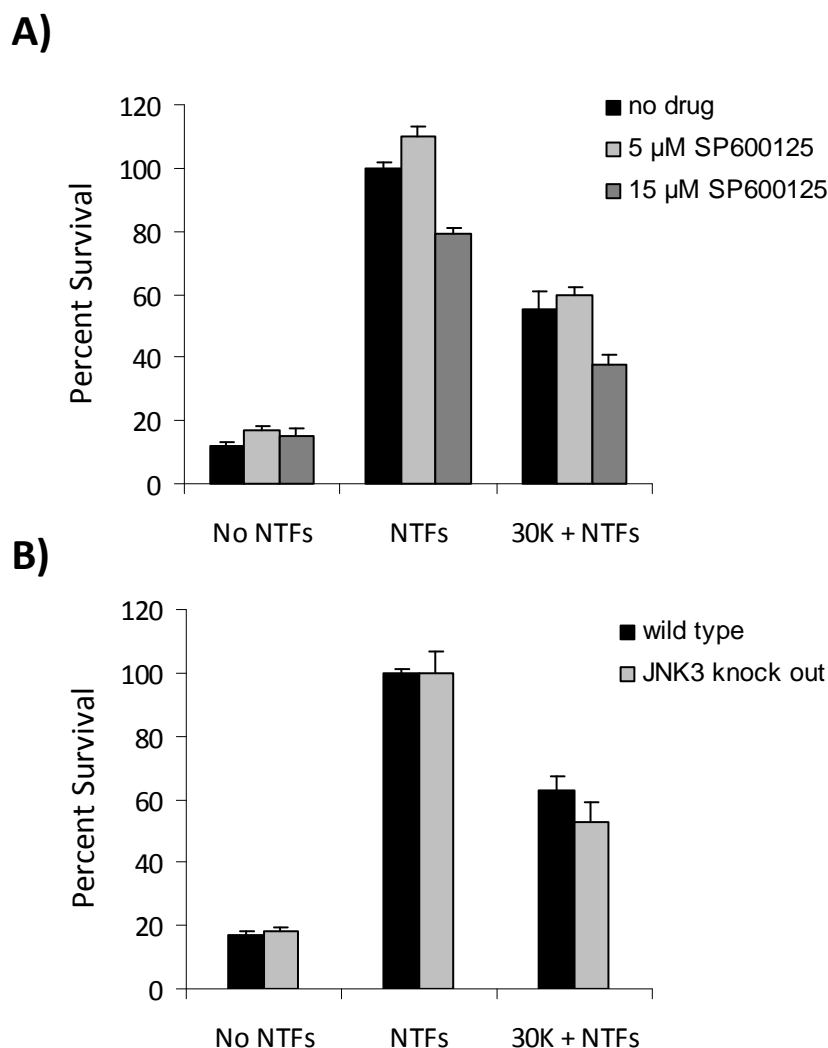


Figure 88. Effect of JNK pathway inhibition on MN cell death induced by membrane depolarization.

A) MN cultures were treated with no-NTFs, NTFs, or 30K + NTFs in the presence or the absence of JNK inhibitor, SP600125 (5 and 15 μ M). Survival quantification was performed 2 days after treatment. B) Spinal cord MNs were isolated from E12.5 wild type and JNK knockout mice and plated in the same conditions. Cultures were treated with no-NTFs, NTFs, or 30K + NTFs and survival quantification was performed 2 days after the treatment. Values are the mean \pm SEM of three wells from a representative experiment that is repeated at least two more times.

2.2.7 Effect of high K^+ medium on intracellular Ca^{2+} concentration

As the “calcium set-point hypothesis” establishes, high intracellular Ca^{2+} levels can cause cell death even in the presence of neurotrophic support (Johnson, Koike and Franklin 1992). For example, in the excitotoxicity models, glutamate accumulation in the perineuronal space induces Ca^{2+} influx through glutamate receptors and the intracellular Ca^{2+} increases to levels that lead to neuronal death (Frandsen and Schousboe 1993, Dessi, Charriaut-Marlangue and Ben-Ari 1994). To analyze the extend of intracellular Ca^{2+} changes induced by membrane depolarization in our cell model, MNs were loaded with Fluo-4 and the resultant intracellular Ca^{2+} concentration was

measured in individual cell bodies. When cells were treated with 30K, intracellular Ca^{2+} increased (251.6 ± 27.8 AFU; mean \pm SEM) with respect to the basal level (5K: 21.5 ± 2.6 nM) (Figure 89). The Ca^{2+} response is a rapid phenomenon, reaching maximum levels within the first minute of 30K application. Thereafter intracellular Ca^{2+} remains significantly elevated (53.8 ± 18.6 AFU) above the basal levels (22.75 ± 1 AFU) for the next 24 hr (Figure 89, $p < 0.05$).

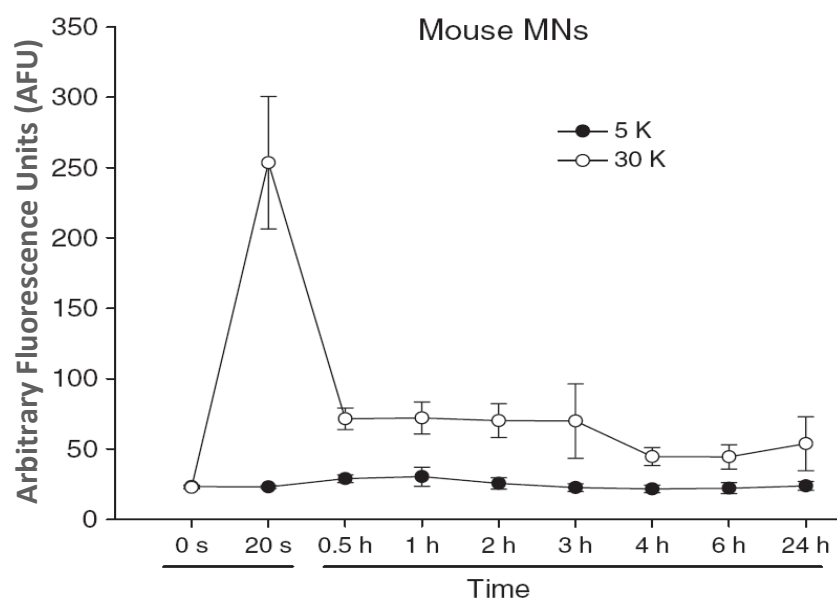


Figure 89. Changes of intracellular fluorescence induced by membrane depolarization.

Mouse MNs were loaded with Fluo-4 for 20 min and changes of intracellular fluorescence levels were measured microscopically in individual cell bodies treated with 5mM K^+ (5K) or 30 mM K^+ (30K) Krebs medium. Values are the mean \pm SEM of fluorescence measures from three independent experiments ($n = 30$ MNs).

The survival differences described above between mouse and chicken MNs (Figure 82), lead us to measure the changes of intracellular Ca^{2+} concentration in chicken MNs cultured under the same experimental conditions. When we compared Ca^{2+} levels after 30K stimulation in mouse MNs with respect to chicken MNs we found that during the first minute the Ca^{2+} increase in chicken MNs is significantly lower (5K: 26.6 ± 3.8 AFU; 30K: 20 sec, 169.3 ± 27.5 AFU; $p < 0.001$) (Figure 90).

This result shows that in mouse MNs the maximum level of Ca^{2+} reached after 30K stimulation was around 10-fold above the basal level. However, in chicken MNs the maximum Ca^{2+} concentration reached after 30K stimulation was around 6-fold increase above the basal level. When fluorescence was measured after 30 min (mouse 60.5 ± 18.6 AFU; chicken: 51.1 ± 12.2 AFU) or longer (data not shown) no differences were observed, indicating that intracellular Ca^{2+} decreased to the same values in MNs from both species.

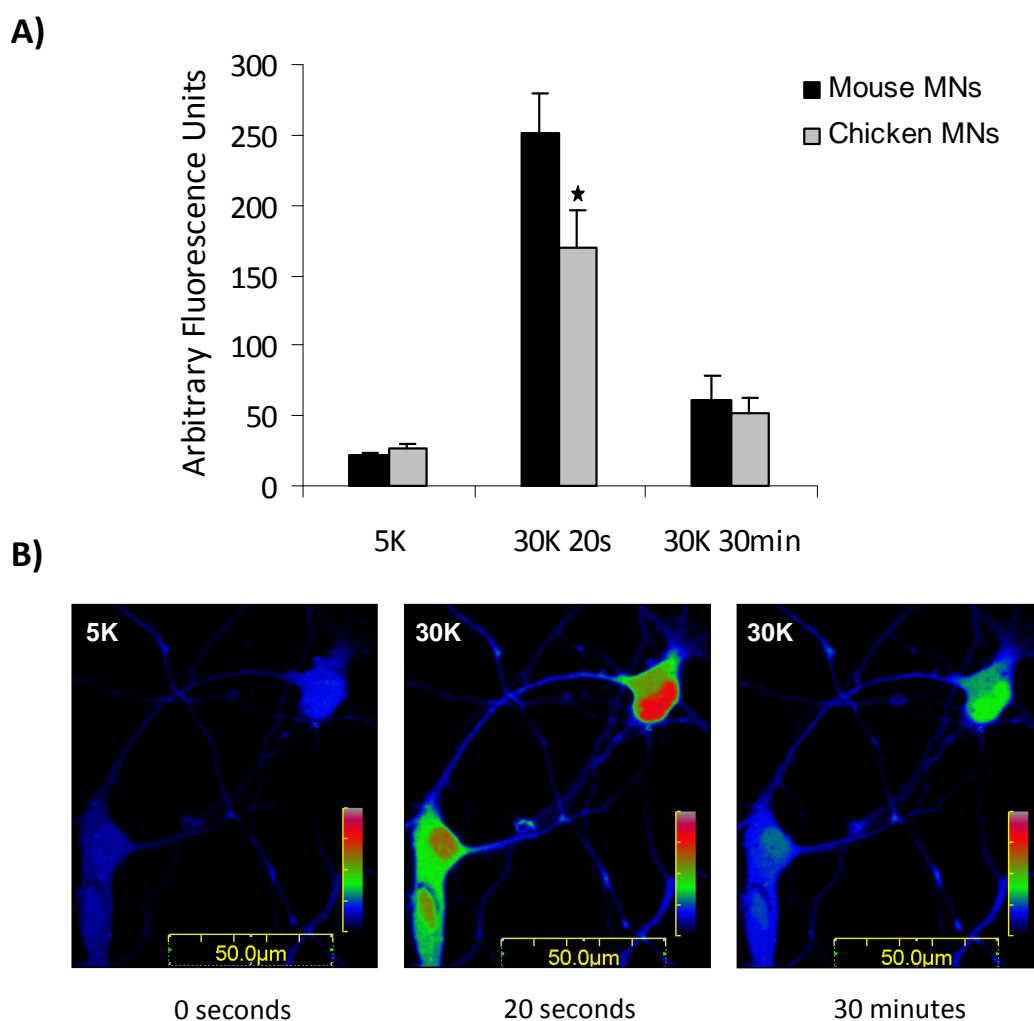


Figure 90. Changes of intracellular fluorescence induced by membrane depolarization in mouse or chicken MNs loaded with Fluo-4.

Intracellular fluorescence changes were measured microscopically in individual cell bodies treated with the different conditions. A) Effect of 5K or 30K treatment on intracellular fluorescence in isolated mouse or chicken MNs. Fluorescence increase was measured as indicated in Materials and Methods. Values are the mean \pm SEM of fluorescence measures from four independent experiments ($n = 75$ MNs). B) Confocal microscopy images showing the increase in intracellular fluorescence in three mouse MNs: before 30K treatment (0 s); 20 s, and 30 min after 30K treatment. Asterisk indicates significant differences using two-factor ANOVA test ($p < 0.001$).

To determine whether the treatment with the VGCCs antagonists modifies the Ca^{2+} rise after 30K stimulation, we loaded MNs with Fluo-4 and we measured Ca^{2+} levels in individual cell bodies of 30K plus VGCCs antagonists-treated cultures. MNs were pre-incubated with the different drugs for 30 min and the same dose was added to the 30K stimulating buffer. Table 1 shows the fluorescence increase after 20 s of 30K treatment in the absence or the presence of VGCC antagonists. Amiloride ($5 \mu\text{M}$) or Nifedipine ($1 \mu\text{M}$) treatment induced intracellular fluorescence increase as the same level as 30K alone. However, Nifedipine ($30 \mu\text{M}$) or Conotoxin 6GVIA ($0.5 \mu\text{M}$) or Agatoxin ($0.1 \mu\text{M}$) treatment induced lower fluorescence increases (Table 13). Together with the survival

experiments, these results suggested that in mouse MNs, membrane depolarization induced Ca^{2+} influx through the VGCCs. The L-type, N-type, and P/Q-type VGCCs were the main contributors to intracellular Ca^{2+} increases that reached levels that were toxic to these cells.

Table 13. Intracellular fluorescence measures of cultures treated with 30K medium in the presence of VGCC antagonists.

	5K basal	30K (20s)
No drug	21.7 ± 2.9	240.5 ± 17.9
Amiloride, 5 μM	25.1 ± 7.5	232.3 ± 35.8
Nifedipine, 1 μM	23.9 ± 4.8	224.8 ± 30.8
Nifedipine, 30 μM	29.5 ± 8.0	131.8 ± 37.5*
Conotoxin, 6GIVA, 0.5 μM	22.9 ± 4.1	143.9 ± 32.8*
Agatoxin, 100 nM	20.2 ± 3.6	128.1 ± 34.8*

MNs were loaded with Fluo-4 and intracellular fluorescence changes were measured in individual cell bodies in the presence of VGCCs antagonists plus 30 K medium. Values are the mean ± SEM of fluorescence measures from three independent experiments (n = 20MNs). *p < 0.0001 when compared with no drug 30K 20 s (one-way ANOVA test). MN, motoneurons; VGCC, voltage-gated calcium channels.

2.2.8 Effect of Calpain inhibition on the high potassium-induced MN cell death

Because high potassium treatment and membrane depolarization causes Ca^{2+} influx, the activation of Ca^{2+} -dependent proteases may be one of the mechanisms involved in MN cell death. μ -Calpain, which requires intracellular free Ca^{2+} for its activation, degrades various key cytoskeleton proteins and had been related in neuronal death process (Ray, Hogan and Banik 2003). The degradation of 270 kDa α -fodrin (also called α II-spectrin) to the 145 kDa specific fodrin breakdown product has been attributed to the activation of Calpain (Nath et al. 1996). We determined Calpain activation by analyzing Calpain-specific 150/145 kDa product by western blot using an anti- α -fodrin antibody. To this end MNs were plated and cultured with NTFs or 30K+NTFs during 3 hr, then we obtained cell lysates that were submitted to Western blot. The levels of 150/145 kDa product in cells treated with 30K+NTFs were 2-fold higher compared to control NTFs-treated cells (Figure 91). This result suggests that Calpain is activated after membrane depolarization in mouse MNs.

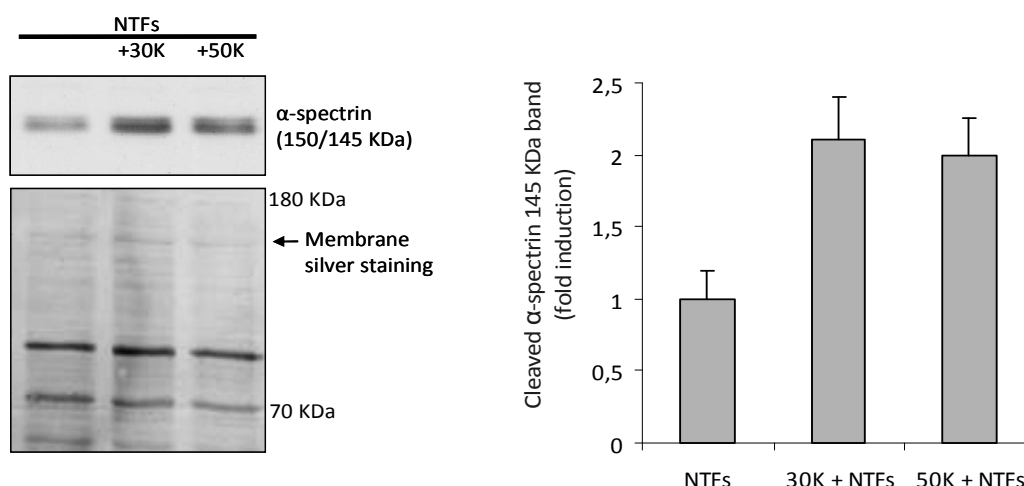


Figure 91. Effect of membrane depolarization on μ -Calpain activity.

α -Spectrin 145 kDa band, that results from the specific cleavage by μ -Calpain, increases after K^+ induced membrane depolarization. Mouse MN cultures were treated with NTFs, 30K + NTFs or 50K + NTFs for 3 h. Total cell lysates were analyzed by western blot using anti- α -spectrin antibody. The graph represents the quantification of the 150/145 kDa band, and the fold induction when comparing 30K + NTFs or 50K + NTFs to NTFs-treated cultures from three independent experiments.

However, we wanted to elucidate whether Calpain activation could be one of the molecular mechanisms involved in the cell death process. Thus we used the Calpain inhibitor, Calpeptin (Adamec, Beermann and Nixon 1998). MN cultures were treated with the following conditions: no NTFs, NTFs or 30K+NTFs in the absence or presence of 25 μ M of Calpeptin. The survival of control cultures was not affected by the presence of the inhibitor, however, in 30K+NTFs-treated cells (survival 64.7 ± 6.8) the presence of Calpeptin (survival $97.3 \pm 1.6\%$) was able to block the cell death effect of membrane depolarization (Figure 92). This result strongly suggests that Calpain activation could be one of the intracellular events related to MN cell death under depolarizing conditions.

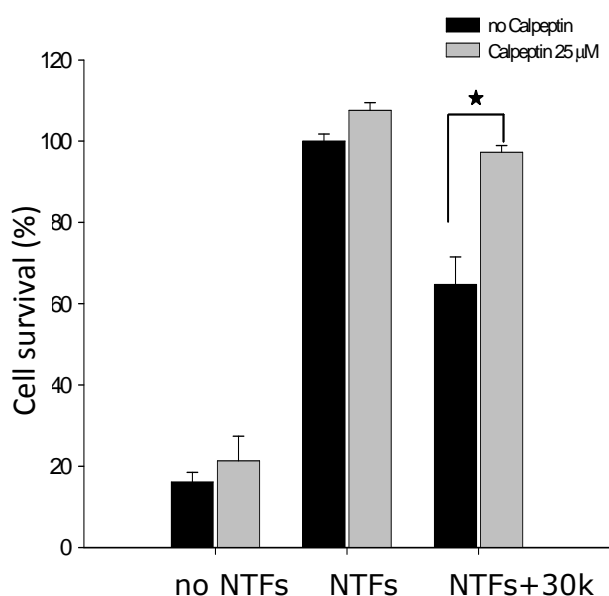


Figure 92. Effect of μ -Calpain inhibition on mouse MN cell death induced by membrane depolarization, pharmacological approach.

Mouse MN cultures were treated with no NTFs, NTFs or 30K + NTFs in the presence or the absence of Calpain inhibitor, Calpeptin (25 μ M). Cell survival was quantified 2 days after treatment. Values are the mean \pm SEM of three wells from a representative experiment that is repeated at least two more times. Asterisk indicates significant differences using two-factor ANOVA test ($p < 0.001$).

To further assess the relevance of this hypothesis we carried out lentiviral-based knock-down of Calpain. We generated two short hairpin RNA (shRNA) sequences (Calp-1 and Calp-2) targeting two different specific sites of mouse μ -Calpain sequence. As shown in Figure 93 the frequency of transduction (GFP-positive cells) rose to $\sim 90\%$ of the cells present in the culture dish. After 7 days, cultures transduced with lentivirus carrying shRNA Calp-1 or shRNA Calp-2 exhibited a strong reduction in Calpain protein level compared to the control cultures transduced with the empty vector (EV).

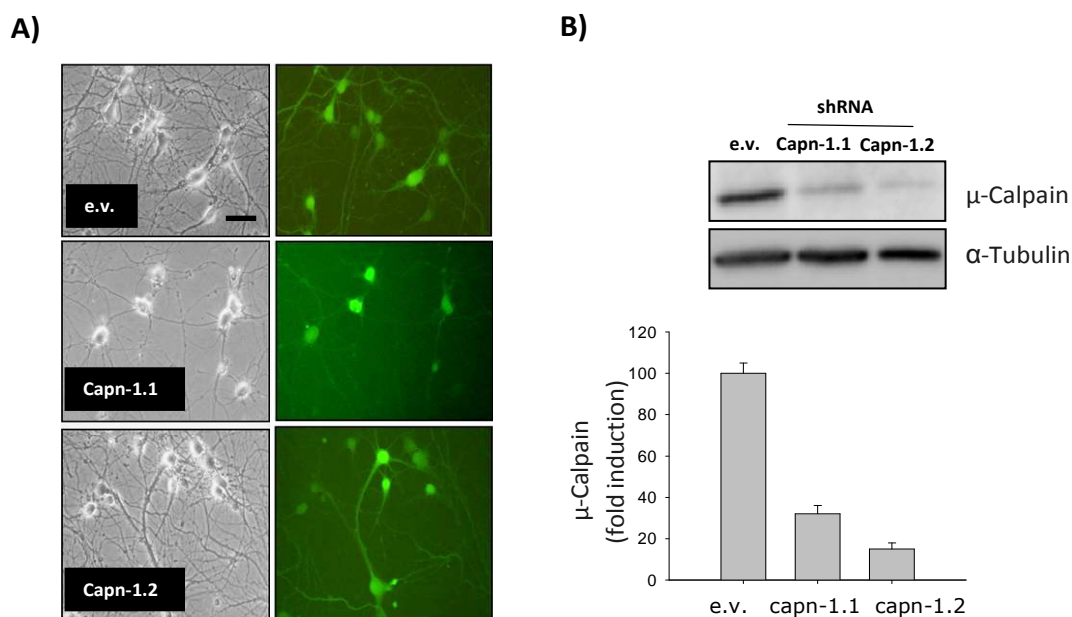


Figure 93. MNs lentiviral transduction efficiency and decrease of μ -Calpain protein levels.

Mouse MNs were transduced with lentivirus containing the shCalp-1 construct, shCalp-2 construct, or empty vector (EV) construct. Cells were cultured for 7 days in the presence of NTFs in the medium. A) Representative microscopy images of transduced cultures (GFP, green fluorescent protein). B) protein extracts of transduced cultures were probed with an anti- μ -Calpain antibody by western blot analysis. The graph represents the expression of Calpain versus Tubulin and corresponds to the quantification of three independent experiments. Bar indicates 20 μ m.

MNs transduced with the different lentivirus were then used for survival experiments to analyze the effect of endogenous Calpain knock down on cell death effect of membrane depolarization. To this end, the medium of 7 days transduced cultures was washed and cells were treated with the following different conditions: NTFs or 30K+NTFs. Two days later (day 9) survival was evaluated as the percentage of cells present in the culture dish of each condition with respect to survival from the same dish at day 7. Results shown in Figure 94 show that shRNAs were able to rescue MNs from the cell death caused by the presence of 30K in the medium, suggesting the involvement of Calpain in the intracellular mechanisms related to the cell death induced by membrane depolarization in mouse MNs.

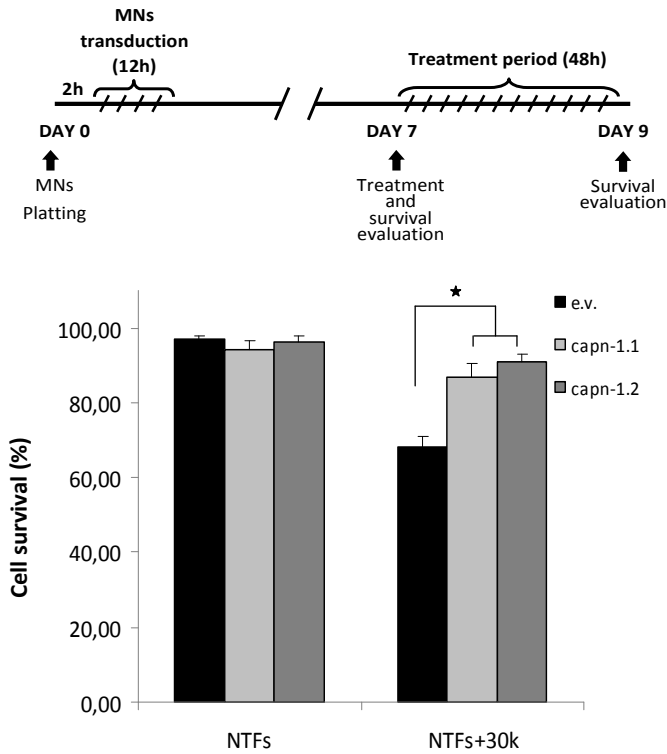


Figure 94. Effect of μ -Calpain inhibition on mouse MN cell death induced by membrane depolarization, lentiviral approach.

After 7 days, cultures were washed and treated with NTFs or 30K + NTFs for 2 days. Graph represents the quantification of MN survival after this period. Values are the mean \pm SEM of three wells from a representative experiment that is repeated at least two more times. Asterisk indicates significant differences when comparing 30K + NTF-treated cultures from EV with 30K + NTF-treated cultures from shCalp-1 and shCalp-2 transduced MNs, using two-factor ANOVA test ($p < 0.001$).

2.2.9 Effect of high K⁺ medium on CaMKIV protein levels

Tremper-Wells and Vallano have demonstrated in dissociated cultures of cerebellar granule cells that depolarization induced Calpain activation mediated CaMKIV proteolysis (Tremper-Wells and Vallano 2005). As in the first chapter we describe CaMKIV role in MN survival and we observe Calpain activation when mouse MNs are cultured under depolarizing conditions we analysed CaMKIV levels in mouse MNs cultured in NTFs or in 30K+NTFs medium. Protein extracts were collected from 3 DIV MN cultures and CaMKIV protein levels were analysed by western blot.

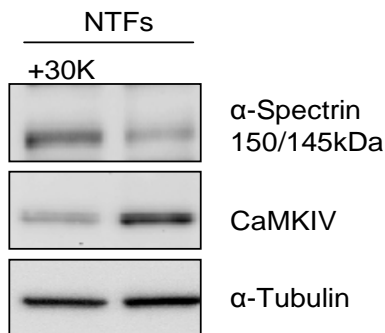


Figure 95. CaMKIV is reduced in MN cultures treated with 30K.

Protein extracts from mouse MNs cultured in medium supplemented with NTFs, with and without 30mM K⁺, after 3 DIV, probed with α -Spectrin and CaMKIV antibodies by western blot analysis. As loading control the membranes were re-probed with an antibody against α -Tubulin.

CHAPTER 3:

Parts of the results presented in this chapter are submitted to Journal of Neuroscience:
Bcl-XI Over-expression Prevents Motoneuron Axonal Degeneration And Cell Death In An In Vitro Model Of Spinal Muscular Atrophy.

3. ESTABLISHMENT OF IN VITRO MODELS FOR SPINAL MUSCULAR ATROPHY

3.1 INTRODUCTION

How a reduction in levels of the essential SMN protein in all tissues selectively affects MNs is a key unanswered question in SMA research. Two schools of thought have emerged about the role of SMN protein in specific MN degeneration and muscle atrophy. One hypothesis postulates that SMA MN degeneration is a consequence of pre-mRNA splicing and snRNP's housekeeping functions of SMN protein; the other hypothesis emerged from the observation that SMN protein is present in axons and growth cones of neuron cells *in vitro* (Sharma et al. 2005, Carrel et al. 2006, Fallini et al. 2010) and *in vivo* (Tizzano, Cabot and Baiget 1998). This second school of thought proposes that the specific MN vulnerability responds to the alteration of an SMN axonal function. The relatively high incidence of the disease makes urgent to find effective therapies. Nowadays the genetic cause of the disease is clear (SMN1 mutations or deletions), nevertheless little is known about the basic molecular mechanisms that imply selective MN vulnerability.

In this chapter we report the establishment of cellular SMA models of primary MN cultures which will be useful to study SMN protein function and morphological and intracellular MN specific alterations induced by low SMN levels which may be indicative of SMA pathological events. To this aim we decided to establish an *in vitro* model of SMA in a mouse MN primary culture using SMN shRNA lentiviral approach to knockdown gene expression at post-transcriptional level. Finally we also established primary mouse MN culture of the SMN^{tm1/Msd} SMA mutant mice.

In future perspectives our SMA MN primary culture can be a useful tool to study effectiveness of therapeutic targets. As an example, it can be used to test pharmacological compounds designed to increase *SMN2* full-length transcripts in MNs.

3.2 RESULTS

3.2.1 ESTABLISHMENT OF AN SMA MNS PRIMARY CULTURE MODEL

3.2.1.1 Endogenous SMN levels and distribution in cultured spinal cord MNs

SMN is a protein which has been implicated in many different functions in the nucleus, cytoplasm and axons. We performed western blot analysis for SMN protein expression in cultured MNs at different time periods. Results shown in Figure 96-A, demonstrate that SMN protein is expressed along the time of culture, from day 3 until the last days we performed experiments (12 DIV). By immunofluorescence assays we show SMN localization in MNs. SMN in the nucleus appears to be in gem-like structures (Cajal Bodies) and is also present in the cytoplasm and along the neurites in a characteristic granular distribution, see Figure 96-B and C.

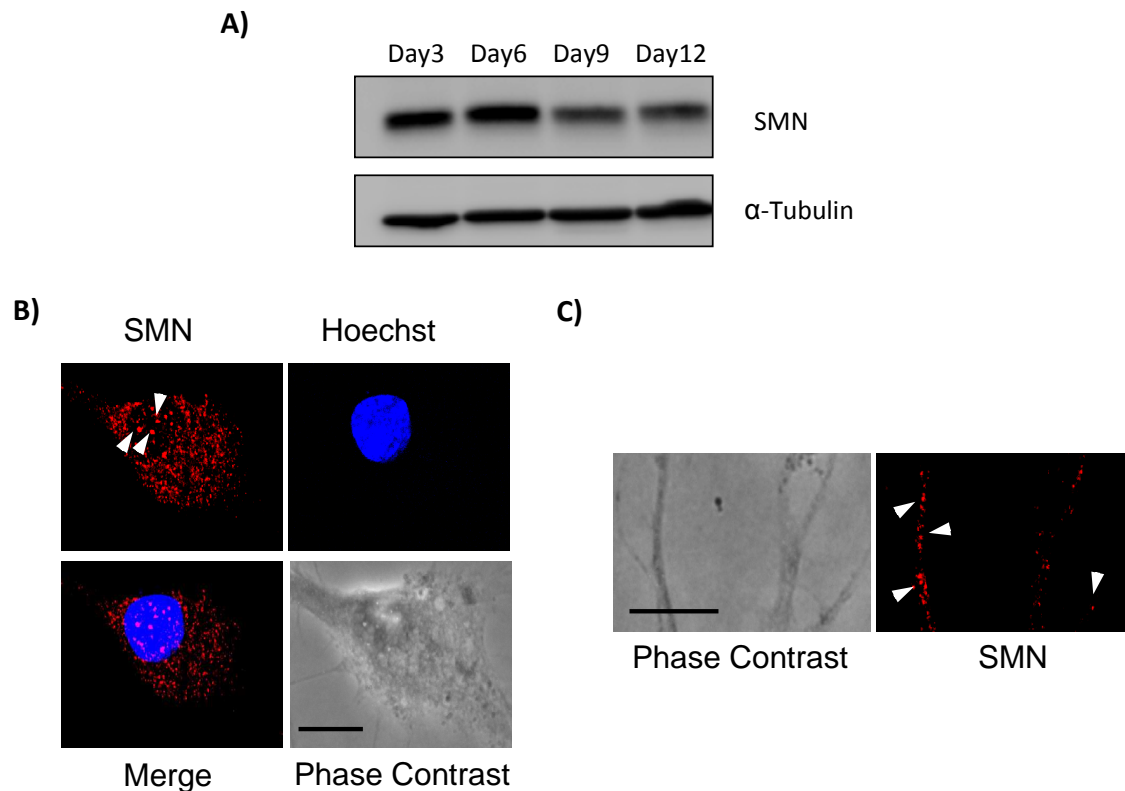


Figure 96. SMN localization in cultured mouse MN.

A) Protein extracts from 3, 6, 9 and 12 days cultured MNs were probed with an anti-SMN antibody by western blot analysis, as loading control the membranes were re-probed with an antibody against α -Tubulin. B and C) Confocal microscope images of mouse MNs after 5 days in culture, we used an anti-SMN antibody (red) to evaluate SMN localization and Hoechst (blue) for nucleus staining. B) Detail of a MN soma showing the granular distribution of SMN. Arrow heads point Cajal Bodies. C) Detail of neurites, arrow heads point to SMN granules that are present along the neurites. Scale bar, 10 μ m.

3.2.1.2 Lentiviral transduction of SMN shRNA decreases endogenous SMN levels in MNs

We generated several shRNA sequences (shSMN1, shSMN2 and shSMN3) targeting specific sites of mouse (shSMN1) or mouse and rat SMN sequence (shSMN2 and shSMN3). MNs were isolated from 12.5 mouse embryos (E12.5) and maintained in NBMc + NTFs (Arce et al. 1999). Two or three hours after plating culture medium was changed and medium containing NTFs and lentivirus of shSMN1 or shSMN2 or shSMN3 or shRNA empty vector (EV) was added. Twenty-four hours after the medium was washed and substituted by fresh medium supplemented with NTFs. After 3 days most of the cells present in the culture dishes were GFP positive (as monitored by fluorescence microscopy), showing a frequency of transduction near to 99% (Figure 97-A).

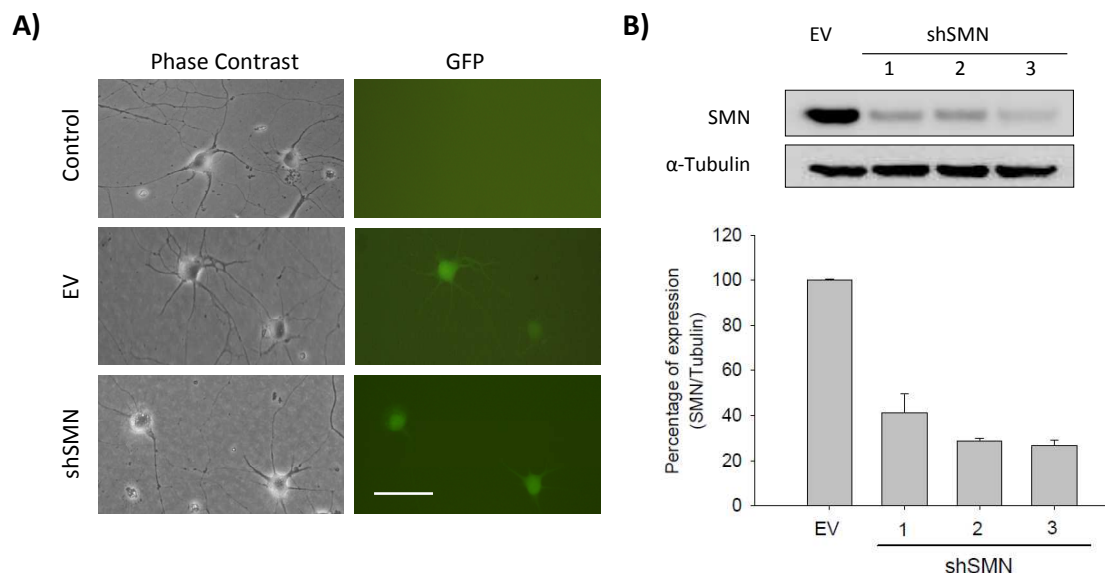


Figure 97. Effect of shSMN lentiviral transduction in SMN protein level.

Primary mouse MNs were transduced with lentivirus containing empty vector (EV) or with the vector containing different shRNA (shSMN1, shSMN2 or shSMN3). A) We monitored transduction efficiency following GFP positive cells. Representative microscopy images of 3 DIV MN cultures showing transduction efficiency, almost all cells are GFP positive (99%). Scale bar: 20 μm. B) Protein extracts from 3 days transduced MNs were probed with an anti-SMN antibody by western blot analysis. As loading control the membranes were re-probed with an antibody against α-Tubulin.

Efficiency of shRNA was monitored checking SMN protein level by western blot analysis and by immunofluorescence. After 3 days of transduction, western blot analysis of SMN knockdown showed that all the shRNAs used were able to reduce SMN protein level compared to the EV control (SMN1 ~60% reduction; SMN2 ~70% reduction; and SMN3 ~70% reduction) (Figure 97).

We wanted to know whether SMN protein reduction was maintained or even more reduced throughout the next days in transduced cultures. Thus, we collected

samples at different time points after lentivirus treatment: 3, 6, 9 and 12 days. As we show in Figure, the levels of SMN protein dropped compared to the EV control cultures after 3 days of interference, and remained low during all the time in culture (see days 9 and 12). Immunofluorescence microscope images demonstrated that SMN protein was reduced in neuronal soma and neurites (Figure 98).

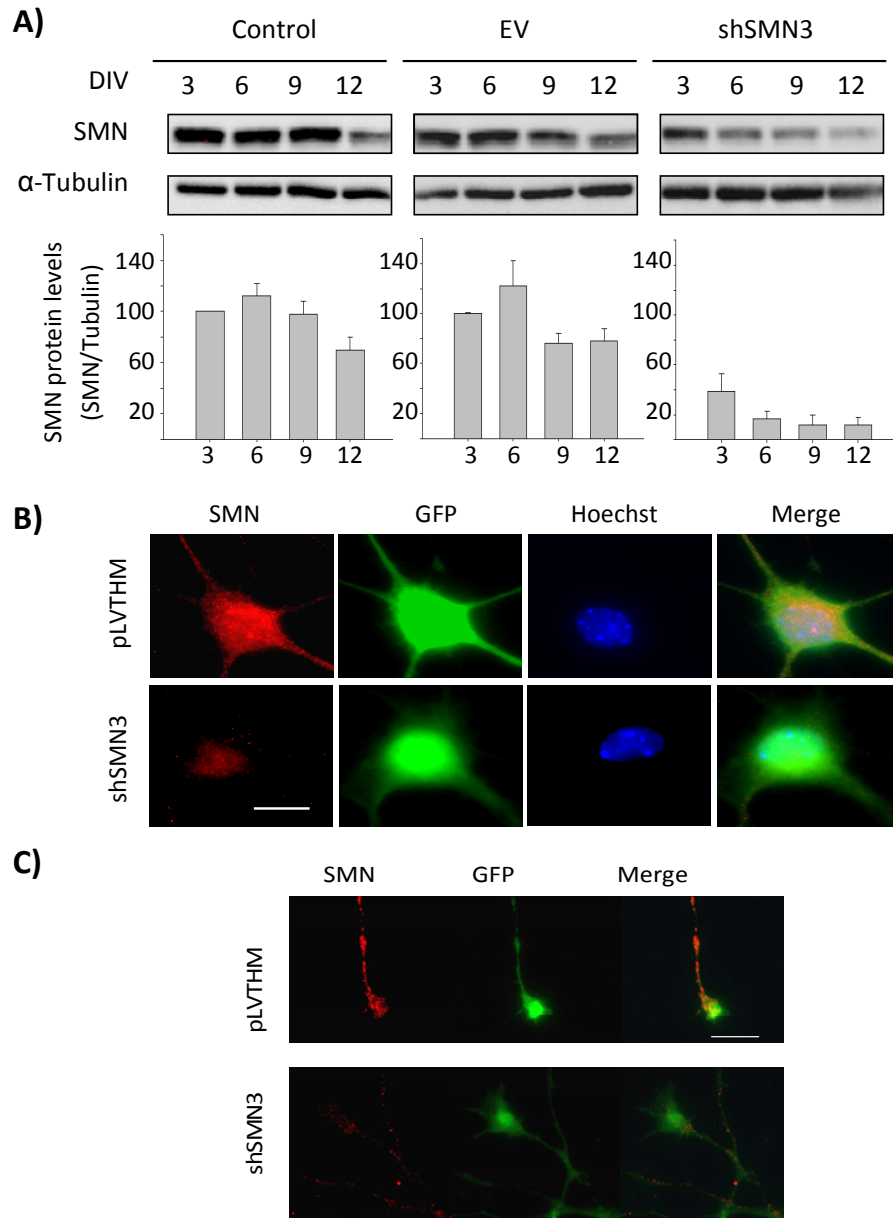


Figure 98. SMN protein levels in cultured MNs during the culture period.

A) Protein extracts from 3, 6, 9 and 12 DIV of non transduced control cultures or EV or shSMN transduced cell cultures. Protein extracts were probed with an anti-SMN antibody by western blot, as loading control the membranes were re-probed with an antibody against α -Tubulin. The graph represents the percentage of SMN protein measured in the different conditions with respect to SMN protein level from control cells at day 3. Values are the mean \pm SEM of three independent biological replicates. B) and C) SMN immunofluorescence microscopic images from EV or shRNA transduced cultured MNs at 5 DIV. In B) detail of SMN levels in MNs soma, and in C) detail of growth cone like structures. (Scale bars, 10 μ m).

3.2.1.3 SMN reduction in MNs, effects in neurite degeneration

There have been reported signs of axonal degeneration in SMA mice models (McGovern et al. 2008) and in other peripheral neuropathies (Tarrade et al. 2006). In dissociated SMN knockdown MN cultures we observed increased neurite degeneration and cell death over the time in culture. To determine whether axonal degeneration preceded cell death in SMN knockdown MNs, we performed a time course experiment in which we monitored cell survival in conjunction with microscopic analysis of axonal degeneration. We assessed neurite degeneration in these cultures by analyzing percentage of degenerating (if they showed evidence of swelling or blebbing) versus healthy neurites from phase-contrast microscopic neurite images from different time points (Press and Milbrandt 2008).

A)

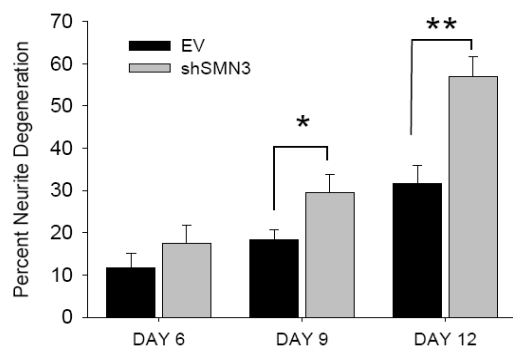
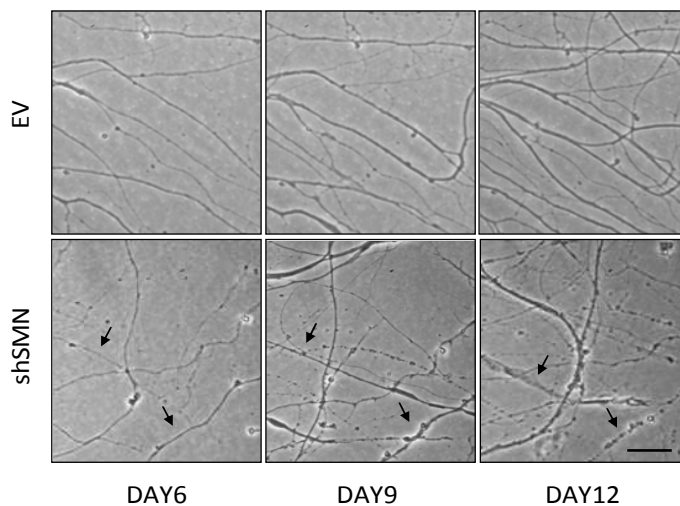


Figure 99. Effect of SMN knockdown on MN neurites.

Mouse MNs were transduced with lentivirus containing the shSMN3 construct or the empty vector (EV) construct and cultured in the presence of NTFs for several days. The percentage of degenerating neurites. Graph values are the mean of the percentage of degenerating neurites per microscopic area for each condition of twelve wells from four independent experiments \pm SEM (error bars). Representative images of degenerating neurites 12 days after transduction with shSMN3 or EV constructs. Arrows, indicate swellings and blebblings which are indicative of neurite degeneration. Scale bar 15 μ m. Asterisks indicate significant differences when comparing the data from the experiments using one-way ANOVA test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

B)



Neurite morphometric analysis of cultures transduced with the lentivirus carrying shSMN1 (data not shown) or shSMN3 or EV, show no significant differences after 6 days in culture (Figure 99). However, when analyzed 9 DIV transduced cultures, we observed significant differences on degenerative neurite morphology when compared with the EV control cultures ($p < 0.05$). After 12 days, the signs of degeneration increased to more than 55% of the neurites present in shSMN cultures, whereas EV

control cultures showed 30% of degeneration. Thus, although we observed neurite degeneration in EV control cultures, the degeneration process is magnified in SMN knockdown cells.

Cell survival was also evaluated in shSMN and EV control cultures. After 3 DIV, we counted the cells present in different microscopic areas of the tissue culture dishes and were considered our 100% initial survival. Counts were performed every 3 days (6, 9 and 12 days after transduction) in precisely the same microscopic field throughout the duration of the experiment, and survival was expressed as a percentage of cell counts with respect to the 100% initial value (as indicated in Materials and Methods). At 6 days, no differences were observed, but at 9 days survival was significantly reduced in shSMN cultures when compared to the EV-controls ($p < 0.05$). Furthermore the cell death rate increased at 12 days, the percentage of surviving cells was only 20% in shRNA transduced cultures ($p < 0.001$), whereas in the EV control cultures the percentage was around 80% (Figure 100).

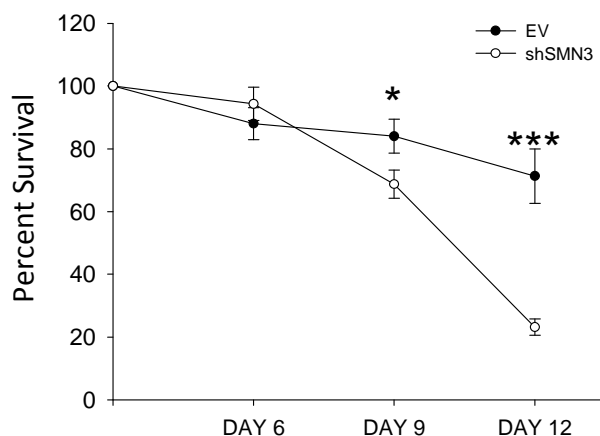


Figure 100. Effect of SMN knockdown on MN survival.

Mouse MNs transduced with lentivirus containing the shSMN3 construct or the empty vector (EV) construct and cultured in the presence of NTFs for several days. Graph values are the mean of the percentage of cell survival for each condition of nine wells from three independent experiments \pm SEM (error bars). Asterisks indicate significant differences when comparing the data from the experiments using one-way ANOVA test at each time points (* $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$).

3.2.1.4 SMN over-expression in primary MN cultures

To confirm that endogenous SMN knockdown was the origin of neurite degeneration and cell death, we generate a lentivirus carrying an expression construct containing the human SMN gene (hSMN) in order to see if we can rescue the knockdown phenotype with the over-expression.

We first transduced MN cultures with the over-expression construct in order to observe the intracellular distribution of hSMN protein. Confocal microscopy images showed that hSMN was present in a punctuate pattern throughout the cytosol and in gem-like structures in the nucleus that are implicative of functional SMN (Figure 101), (Passini et al. 2010).

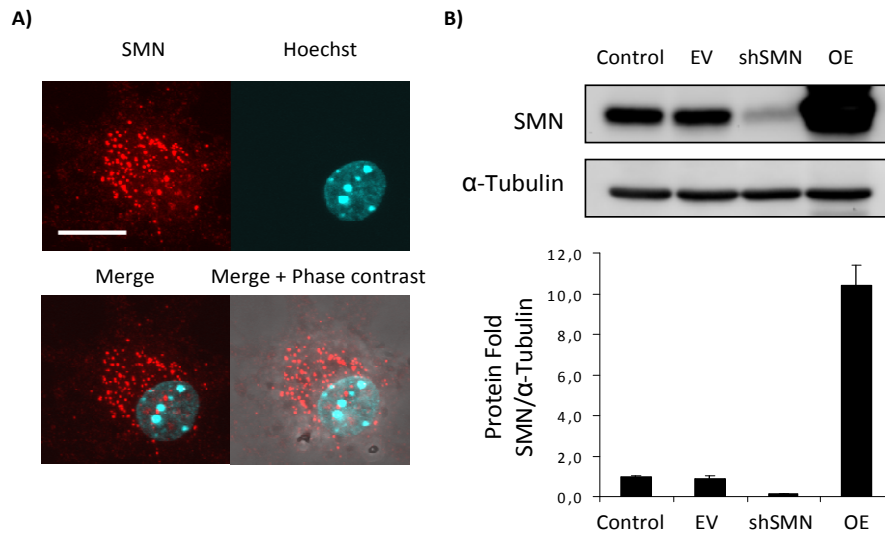


Figure 101. Human SMN over expression on cultured MNs.

A) Mouse MNs were transduced with lentivirus containing the human SMN over-expression construct (OE) and were cultured in the presence of NTFs for 5 days. Cultures were fixed and immunofluorescence with an anti-SMN antibody (SMN) was performed. Representative confocal images of Hoechst (blue) and SMN (red) of hSMN over-expression transduced cells. Scale bar 15 μ m. B) Protein extracts from 5 days transduced neurons were probed with an anti-SMN antibody by western blot analysis, as loading control the membranes were re-probed with an antibody against α -Tubulin.

To determine the SMN protein increase and its distribution in MNs transduced with the over-expression construct we performed western blot (Figure 101-B) and immunofluorescence (Figure 102 and Figure 103) analysis. Western blot analysis showed a 10 fold increase compared to non transduced and EV transduced cultures, while immunofluorescence evidenced SMN increase in MN somas and neurites.

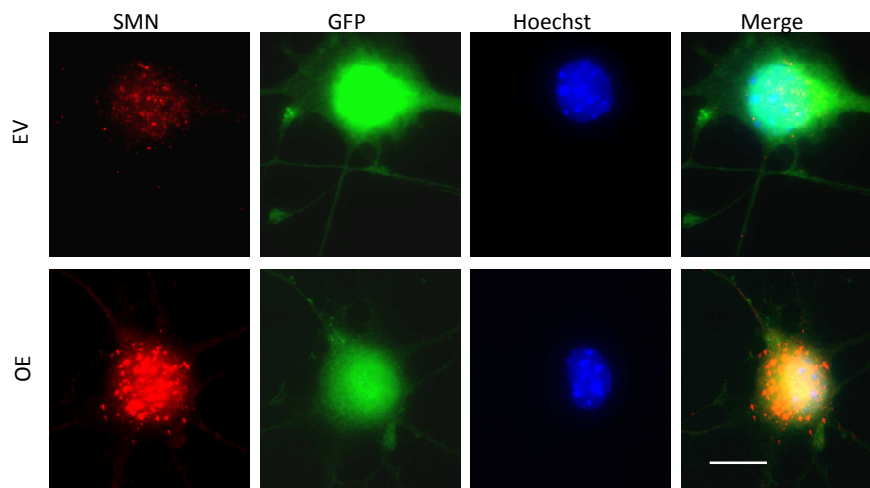


Figure 102. SMN immunofluorescence microscope images of MN somas.

Images from SMN over-expression in primary cultured MNs soma after lentiviral transduction with the human SMN over-expression vector (OE) or with the empty vector (EV). Transduced primary MNs were cultured for 6 days. Cultures were fixed and immunofluorescence was performed. Anti-SMN antibody staining (red) was used to evaluate SMN distribution. Transfected cells were identified by EGFP expression (green) and nuclear localisation by Hoechst staining (blue). Scale bar, 15 μ m.

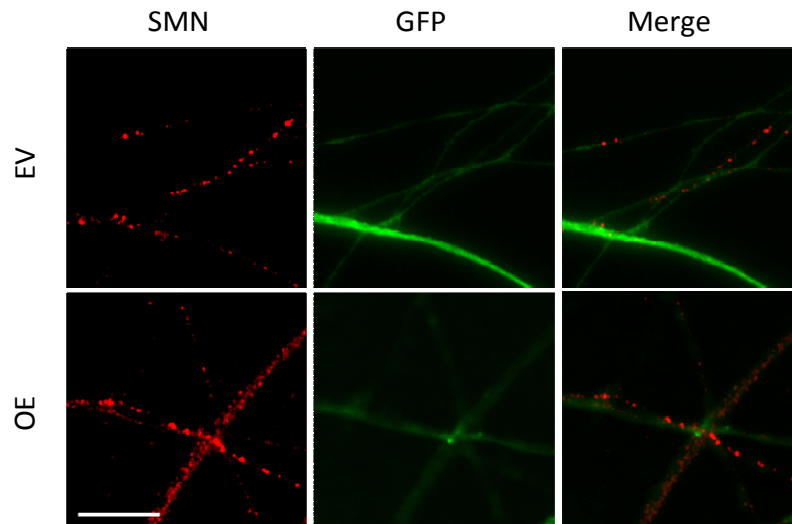


Figure 103. SMN immunofluorescence microscope images of neurites.

Images of SMN distribution MN neurites after lentiviral transduction with the over-expression vector (OE) or with the empty vector (EV). After 6 DIV MN cultures were fixed and immunofluorescence was performed. Anti-SMN antibody staining (red) was used to evaluate SMN localisation. SMN protein expression was increased in MN neurites from those cultures transduced with hSMN over-expression compared to empty vector. Transfected cells were identified by EGFP expression (green) and nucleus localisation by Hoechst staining (blue). Scale bar, 15 μ m.

3.2.1.5 Over-expression of human SMN prevents neurite degeneration and cell death caused by SMN knockdown

To analyze whether SMN over-expression was able to reduce the degenerative phenotype effect of endogenous SMN knockdown in MN cultures, hSMN was co-transduced together with shSMN3 or EV control lentivirus. First it was performed a western blot analysis to confirm that shSMN3 was not silencing over-expressed hSMN (Figure 104-A). Once we demonstrated induced SMN overexpression in Knockdown cultures we performed a time course experiment to monitor cell survival and neurite degeneration during 12 DIV.

Neurite degeneration and cell survival were evaluated as described in *Materiales y Métodos* analyzing the same microscopic fields over the time in culture. As it was expected, hSMN over-expression was able to reduce neurite degeneration (Figure 104-B and D) and cell death (Figure 104-C) caused by the reduction of endogenous SMN protein. Thus, confirming that the cell effects observed in our model were caused by SMN knockdown and not by other experimental effects.

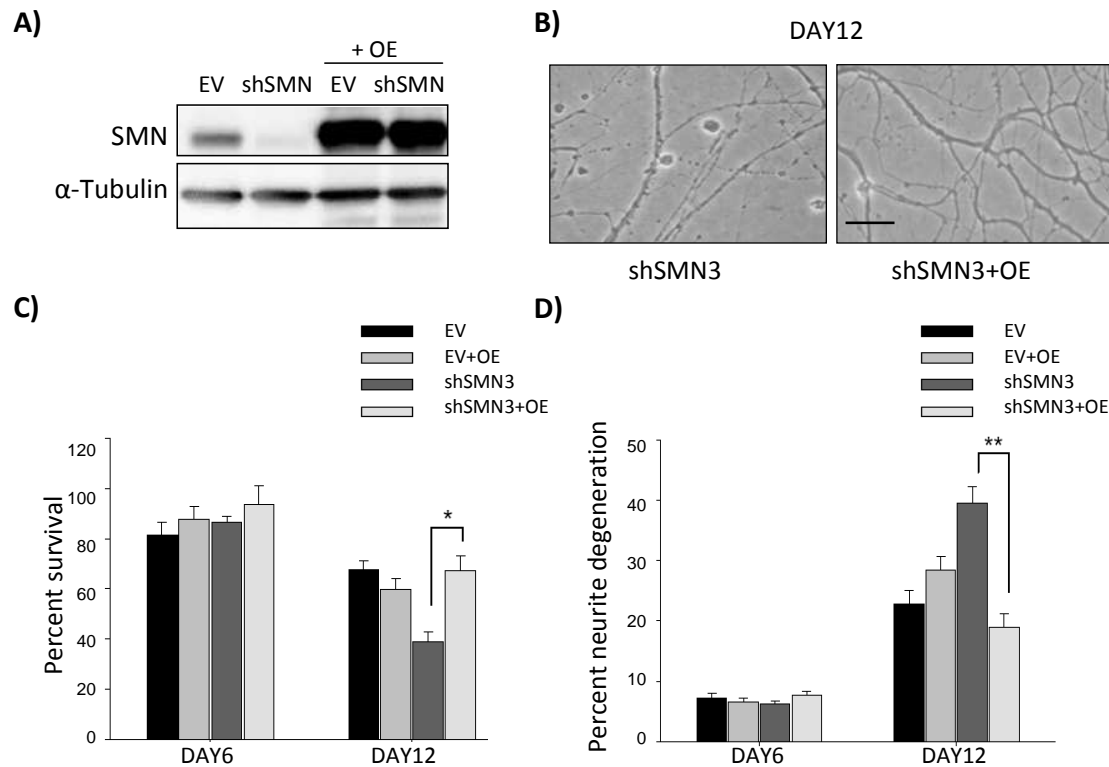


Figure 104. Over-expression of human *SMN* on *SMN* knockdown mouse MNs reduces neurite degeneration.

Mouse MNs were co-transduced with lentivirus containing the over expression hSMN construct plus shSMN3 construct or the empty vector (EV); or transduced with EV or shSMN3 lentivectors. Cells were maintained in culture in the presence of NTFs. A) Protein extracts of the different transduced cultures were probed with an anti-SMN antibody by western blot analysis. Membranes were re-probed with an antibody against α -Tubulin, used as a loading control. B) Representative images showing the effect of human SMN over-expression on neurite degeneration in SMN knockdown cultured MNs. C) The percentage of cell survival was measured after 6 and 12 DIV, graph values are the mean of the percentage of cell survival of each condition of nine wells from three independent experiments \pm SEM (error bars). D) The percentage of degenerating neurites was measured at 6 and 12 DIV as described in Materials and Methods. Graph values are the mean of the percentage of degenerating neurites per microscopic area for each condition of fifteen wells from four independent experiments \pm SEM (error bars). Asterisks indicates significant differences when comparing the data from the experiments using one-way ANOVA test at each time point (* $p < 0.05$, and ** $p < 0.001$).

3.2.2 PRIMARY CULTURE OF SPINAL CORD MNS FROM AN SMA MOUSE MODEL

3.2.2.1 Establishment of single spinal cord primary mouse MN cultures

In order to establish the primary MN culture of the $SMN^{tm1/Msd}$ mouse embryos, we first had to establish the conditions for a single spinal cord MN isolation protocol. To purify mouse MNs usually we process 4 spinal cords for each tube. When working with mutant mouse, sometimes we only have the option to process one spinal cord per tube ($(SMN^{-/-};SMN2^{+/+})$, $(SMN^{+/-};SMN2^{+/+})$ and $(SMN^{+/-};SMN2^{+/+})$). It had been described a low efficiency on MN isolation using the Optiprep MN enrichment procedure, in consequence we had to adapt the MN enrichment protocol to reach an efficient single spinal cord MN purification. Following our habitual protocol when we purify a single spinal cord we have to reduce the number and strength of mechanical dissociation steps, to obtain proper MN purification. From a single spinal cord we obtain 20.000-30.000 cells, above 80-90% of the cultured cells are MNs. Figure 105 shows microscope images of 2 DIV cultured MNs purified from a single spinal cord.

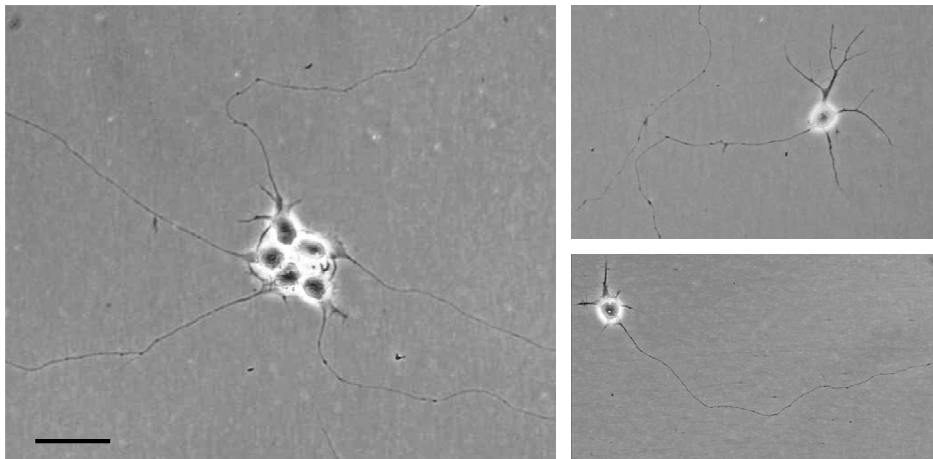


Figure 105. Mouse MNs isolated from a single spinal cord.

Representative microscopic images from cultured MNs isolated from a single spinal cord. Scale bar indicates 50 μ m.

3.2.2.2 SMN protein expression in SMA model mice MNs in culture

Once the protocol was established we analyzed SMN protein expression in SMA mice model cultured MNs. To this aim MNs were isolated from previously genotyped 12.5 $SMN^{tm1/Msd}$ mouse embryos (E12.5) and maintained in NBMc + NTFs. Once in culture each three days after plating, half of the culture medium was changed and replaced with fresh medium containing NTFs. In order to follow SMN protein levels of $(SMN^{-/-};SMN2^{+/+})$ MNs and compare them with MNs from $(SMN^{+/-};SMN2^{+/+})$ and

($SMN^{+/-};SMN2^{+/-}$) from their littermates over the time in culture, we collected samples at different time points (6, 9 and 12 days in culture) and analysed them by western blot. As we show in Figure 106, the levels of SMN protein on SMN knockout $SMN2$ mice are 30-10% lower to the wild type control cultures after 6, 9 and 12 days in culture. SMN protein levels from $SMN^{-/-};SMN2^{+/-}$ MNs remain lower than heterozygous and wild type over the time in culture, and after 12 days SMN protein levels from SMA MNs are 9 ± 0.27 times lower than wild $SMN^{+/-}$.

Moreover, heterozygous SMN MNs show also reduced SMN levels, approximately 2 times lower with respect $SMN^{+/-}$ MNs, but this protein amount is enough to do not develop disease symptoms.

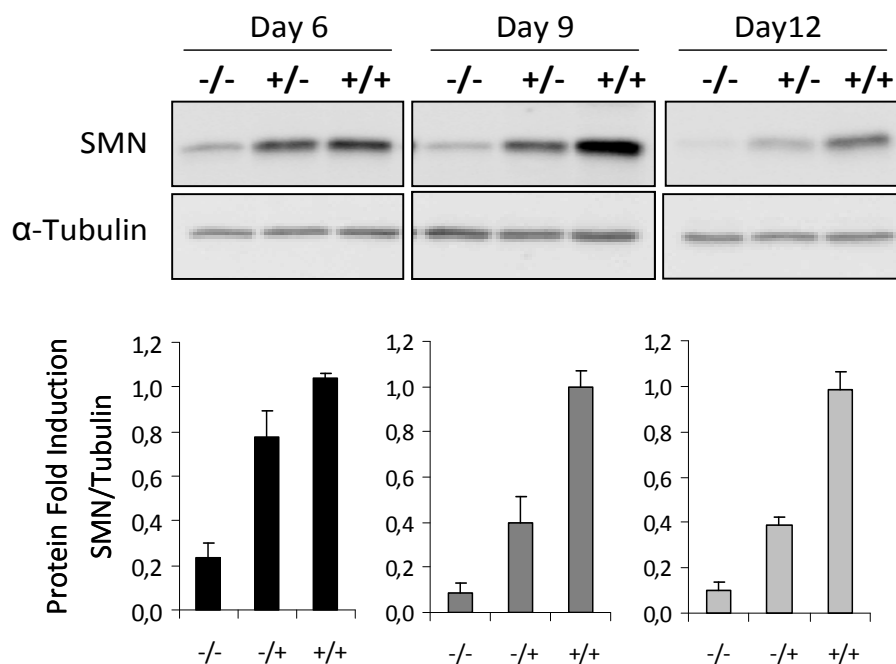


Figure 106. SMN protein levels in primary cultured MNs from $SMN^{Tm1/Msd}$ SMA mouse model. SMN protein levels of cultured $SMN^{Tm1/Msd}$ mouse MNs after 6, 9 and 12 days in culture. Tubulin is used as protein charge control. $-/-$, cultured MNs from $SMN^{-/-};SMN2^{+/-}$ mice. $+/-$, MNs from $SMN^{+/-};SMN2^{+/-}$ mice. $+/+$, MNs from $SMN^{+/-};SMN2^{+/-}$ mice.

3.2.2.3 Neurite length of SMA model mice MNs in culture

We wanted to analyze the neurite outgrowth of MNs from SMA mice model in order to confirm previous published results which describe alterations in this particular event (Rossoll et al. 2003, Jablonka et al. 2007). To this end we seeded the cells at low density (500 cells/cm^2), to avoid neurite crossings or contacts from different neurons, and we have analysed neurite elongation during 7 DIV. We have evaluated neurite length of 10 neurons for SMA and control cultured MNs ($SMN^{-/-};SMN2^{+/-}$ and $SMN^{+/-};SMN2^{+/-}$ respectively) at 2, 4 and 7 days in culture. Preliminary results show no

significant differences in MN neurite length of $SMN^{-/-};SMN2^{+/+}$ cultured MNs respect to $SMN^{+/+}/SMN2^{+/+}$ at two days ($2.27\pm 0.6\text{mm}$ and $2.65\pm 0.3\text{mm}$ respectively), four days ($3\pm 0.4\text{mm}$ and $3.32\pm 0.6\text{mm}$, respectively) or seven days in culture ($6.6\pm 0.9\text{mm}$ and $6.2\pm 0.7\text{mm}$, respectively).

We do not observe significant neurite outgrowth deficiencies in SMN MNs from severe SMA mutant mice compared with control MNs in our culture conditions.

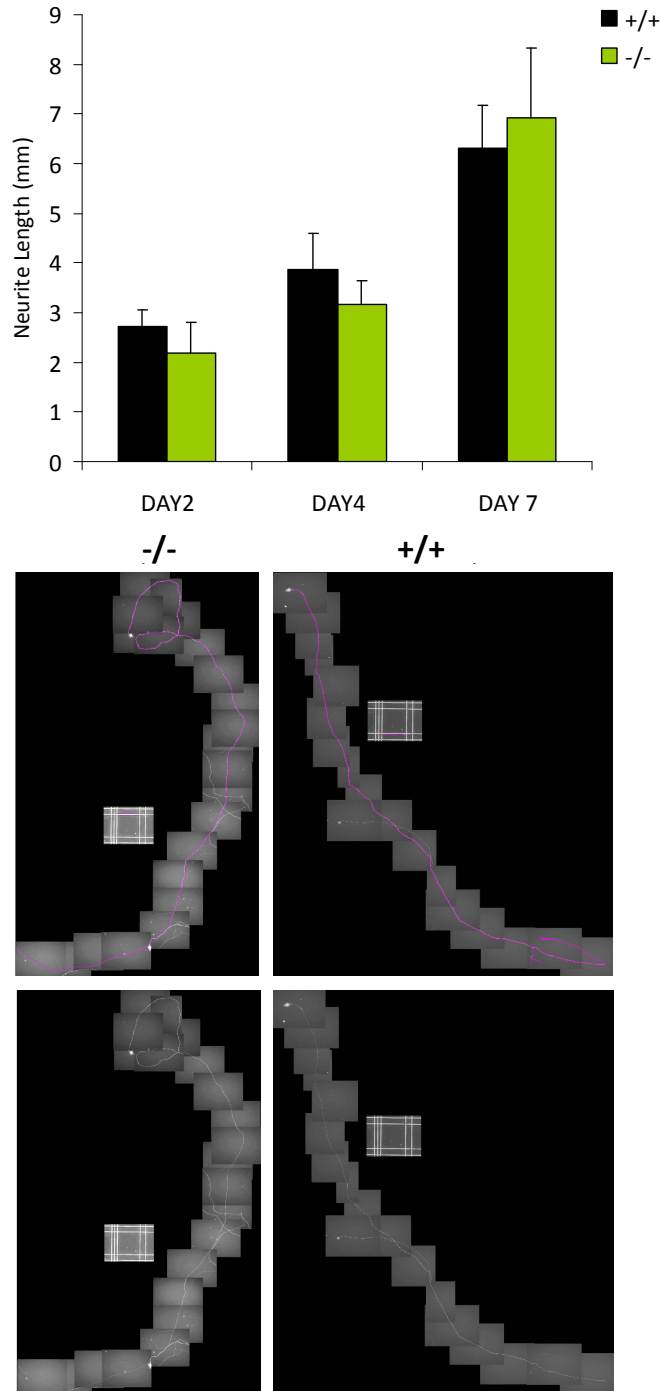


Figure 107. SMN knockout Mouse MNs neurite length.
 $-/-$, cultured MNs from $SMN^{-/-};SMN2^{+/+}$ mice. $+/+$, MNs from $SMN^{+/+};SMN2^{+/+}$ mice.

DISCUSSION

Primary cultured MNs have made important contributions to our understanding of neurobiology, such as identification of NTFs that regulate their survival, regeneration and plasticity, and have also been a useful tool for studying basic mechanisms underlying neuronal degeneration during development or under pathological conditions in neurodegenerative disorders (Sendtner et al. 2000, Beck et al. 2001). Nevertheless, it is still necessary further research to reach a better understanding on intracellular molecular events that direct MN survival or degeneration, and to define molecular mechanisms that trigger axonal dyingback and cell death in MN diseases.

During embryonic development of higher vertebrates MNs are generated in excess and a percentage of them will undergo PCD. For example, at embryonic day 12 in the lumbar spinal cord of the developing mouse, MNs grow out axons which make contact with their target tissue, the skeletal muscle (Pettmann and Henderson 1998). From those MNs about 50% will degenerate during this critical embryonic period. This process has been the focus of research aiming at the identification of the regulators of MN survival (NTFs) and the molecular mechanisms that control cell death. These physiological processes can also be observed and studied *in vitro* when the MNs are isolated from embryonic avian or rodent spinal cords. In this context, MN primary cultures represent a powerful tool that has been adopted in the present work to study and analyse the intracellular mechanisms that modulate MN survival and degeneration. In the developing spinal cord, MNs constitute a small population of neurons, in order to study MN intrinsic intracellular mechanisms these cells need to be enriched and isolated from neuronal and non-neuronal cells of the spinal cord. This fact facilitates the analysis of MN specific mechanisms that are activated or repressed in front of different culture conditions, mimicking physiological or pathological conditions. Nevertheless, results interpretation has to consider the lack of possible environment influences when extrapolated to *in vivo* situations.

In the present work we purify avian and rodent MNs from embryonic spinal cords; to this end, we submit the ventral part of dissected spinal cords to a mechanical and a chemical dissociation, and we use a density gradient to separate MNs from the rest of the cells of the spinal cord. This method allows MN isolation from the specific embryonic stage where MNs have a higher size and density than the rest of the cells from the spinal cord (Dohrmann et al. 1986).

In this context, primary MN cultures are also a valuable tool to elucidate mechanisms that confer selective MN vulnerability or resistance and represent promising models to analyze the intracellular mechanisms occurring in MN degenerative diseases.

1. NTFs AND MN SURVIVAL

Skeletal muscle innervating lower MNs of the spinal cord comprise one neuronal population of CNS in which PCD during development has been actively investigated, as much for available technical approach as for its clinical relevance. Survival and neurite growth of these cells are promoted by NTFs that mediate their effects through specific receptors (Gould and Oppenheim 2004). NTFs are a pleiotropic group of secreted growth factors that regulate multiple aspects of neuronal development, including the regressive event of cell death, neurite growth and survival (reviewed in (Gould and Enomoto 2009)). Nevertheless, their specific role on MN maintenance remains still not fully understood.

As extracellular environment derived molecules, NTFs rescue neurons from developmental PCD by activating pro-survival intracellular pathways and inhibiting the activation and transcription of proteins and genes, that orchestrate this cell death program. The NTFs that counteract PCD may vary according to MN subtype. Early studies clearly defined the timing and morphological aspects of MN death, reporting MN loss or gain across the entire spinal cord. Nevertheless, the precise identity of MNs dependent on each NTF has remained unclear.

The trophic survival requirements of MNs during development have been intensively studied, but exactly how these requirements map onto MN diversity remains unclear. Certain factors are well established by multiple studies (Kanning et al. 2010):

- More than 15 polypeptide factors from different gene families expressed in MN environment are known to enhance MN survival *in vivo* and *in vitro*, and this number continues to grow (Henderson 1996, Oppenheim 1996).
- Receptors for NTFs are expressed differentially in subsets of MNs throughout the spinal cord, and individual motor pools express multiple receptors (Garcès et al. 2000, Gould and Oppenheim 2004).
- Knockout mice for several NTFs or their receptors affect different MN subpopulations and show reduction in MN numbers at the end of embryogenesis, which suggests that the analysed factors do regulate developmental cell death (reviewed by (Gould and Enomoto 2009)).
- In postnatal period, MNs continue to rely on surrounding tissues for trophic support, although the specific molecular dependencies shift (Holtmann et al. 2005, Strelau et al. 2009).

In spite of this wealth of data, we do not clearly understand how most of the NTFs act, which subsets of MNs are dependent on them, and over what timeframe. The

intracellular mechanisms activated or repressed by NTFs are still poorly understood. It is important to develop strategies to elucidate them, because the most significant benefits reported in MN degenerative mice models involve administration of NTFs or inhibition of cell death pathways –apart from inactivation of disease trigger- (reviewed in (Kanning et al. 2010)). In this context primary MN cultures represent a valuable tool to elucidate specific NTF induced molecular mechanisms in these neurons.

In the present work we have characterised a primary mouse MN culture. We analysed the MN enrichment obtained by Islet-1/2 immunostaining. Once we reached the conditions to obtain efficient MN purification enrichment (70-90% of cultured cells are MNs), we analysed the dependence of MNs to 5 different NTFs: HGF, BDNF, CT-1, CNTF and GDNF.

Our results demonstrated that:

- Primary mouse MN cultures degenerate and die in an apoptotic way when cultured in the absence of neurotrophic support. We can observe caspase-3 activation and increases in apoptotic nuclei number.
- Different NTFs are able to induce MN survival. GDNF, CT-1 and CNTF are the NTFs that promote higher MN survival. While HGF and BDNF induce lower survival rates.
- Using all the NTFs in combination we obtain the maximal survival rate.
- CNTF and CT-1 rescue the same MN subsets. Used alone or combined they are responsible for the survival of the same percentage of MNs. They do not have summatory effects as other combinations of NTFs do.
- NTF-dependent MN survival induces the activation of PI3K/Akt pathway. MN survival in the presence of NTFs in the culture medium responds to PI3K /Akt pathway activation.

The results obtained are in agreement with the idea that different factors may act on different subpopulations of MNs, as each NTF promotes different survival rates and when used in combination MN survival increases (except CNTF and CT-1). The studies performed in NTFs or NTF receptors knockout mice also support this hypothesis. In GDNF knockout mice apparently only fusimotor MNs (γ -MNs) degenerate, while the α -MNs are not affected (Gould et al. 2008). Moreover, it has been reported that HGF promote survival from only a small lumbar MN subpopulations (Novak et al. 2000). Future experiments designed to compare protein or gene expression patterns of MNs rescued from cell death adding single trophic factors in primary MN cultures, may point out specific developmental biomarkers of NTF-dependent MN subsets.

We also analyzed the effect of different NTF combinations on MN survival. When the combination of all the NTFs is used, we obtain the maximal survival rate. This fact can be explained because MN subpopulations express different NTF receptors (Henderson et al. 1998, Arce et al. 1998), reviewed in (Gould and Enomoto 2009)). The functional diversity of MNs, and the cellular complexity of their environment, may be reflected in the mechanisms that have evolved to keep them alive. In our experiments after analysing the survival contribution of each NTF we used all NTFs in cocktail to maintain MNs in culture in order to represent the majority of MN subpopulations. Nevertheless, this primary culture model may allow us -in future studies- to study the behaviour of **different MN subpopulations** in front of different agents culturing MNs in the presence of single NTF or using them in different combinations. For example, MNs cultured in the presence of only GDNF may probably represent γ -MNs, as recent evidence points out GDNF dependence almost exclusive to this MN subtype (Gould and Enomoto 2009).

1.1 NTFs and anti-PCD molecules as therapeutic approach

One major reason for studying mechanisms of MN degeneration and survival is to find rational strategies for preventing MN diseases progression. The robust effect of NTFs on the survival of MNs during development, led to the idea that they might ameliorate MN recovery after axotomy processes or neurodegenerative disorders, and thereby aid in the treatment of patients suffering from those diseases (Appel 1981, Henderson 1995). More recent data indicate that trophic deprivation may at least partially contribute to MN pathology and have further strengthened the NTF therapeutic approach (reviewed in (Gould and Enomoto 2009)). First, NTFs can enhance neuronal maturation; second, nearly all NTFs are effective in preventing the death of axotomized MNs; third, the inactivation of CNTF, NT-3, or VEGF causes a MN loss at postnatal stages; and fourth, in cell culture and in MN degenerative mouse models, NTFs such as CNTF and VEGF can improve MN survival, maintenance and function of neuromuscular endplates (Storkebaum, Lambrechts and Carmeliet 2004, Lunn et al. 2009, Simon et al. 2010). Nevertheless, previous clinical trials with NTFs failed, or/and their efficacy has not been proven yet (reviewed in (Thoenen and Sendtner 2002)). Two main barriers to translate the effects observed in mouse models to human effective therapies became apparent (Sendtner 2010):

- Poor pharmacokinetics and bioavailability, these factors did not reach MNs at enough quantities or they need to be administrated in combination.

- Unwanted side effects, systemically administrated NTFs could bound to receptors from different cell types other than MNs (when excess of CNTF acts on liver cells causes fever and cachexia (Espat et al. 1996)).

The difficulty to find appropriate delivery mechanisms of these proteins as drugs and the lack of success with the first clinical trials has diminished enthusiasm for this therapeutic approach. However, recently Turner and Talbot compiled experiments testing over 150 potential therapeutic anti-oxidant, anti-aggregation, anti-glutamatergic, anti-inflammatory, anti-apoptotic and neurotrophic pharmacological agents on transgenic mutant SOD1 rodents (Turner and Talbot 2008) and obtained results show that apart from SOD1 modifiers only 6 treatments prolonged survival by more than 30%; four of them were NTFs. Moreover, also in SMA mutant mice the over-expression of NTFs exerts protective effects and prolongs survival (Lesbordes et al. 2003, Simon et al. 2010). There has been considerable progress in developing adenoviral vectors for delivery of recombinant proteins, although scale up from mouse to human still represents a challenge (Manabe et al. 2002, Lunn et al. 2009). From another point of view, a better understanding on which are the key protective intracellular pathways activated by these factors under pathological conditions may provide us a “NTF-like” pharmacological approach which may have an easier translation to human therapies. To this end more profound analysis on primary MN cultures can be of real importance.

The MN cultures also allow us to study intrinsic cell death processes and implicated proteins. NTFs-induced survival effect responds to the activation of pro-survival pathways, but also to the inactivation of pro-apoptotic proteins and/or autophagy processes. The analysis of these pathways may highlight new possible pharmacological targets.

Overall, although therapeutic strategies focused on death and survival mechanisms do not prevent MN disease origin, they represent one of the most successful options currently available because their administration delays MN degeneration (reviewed in (Kanning et al. 2010)). A better understanding of the MN subtypes affected by diseases and those targeted by each strategy may provide a potential explanation for the partial effects observed using single NTF approaches and constitute the basis for NTFs combination therapies.

2. Ca²⁺ AND MN SURVIVAL

Neurons are excitable cells that receive chemical and electrical stimulations which rapidly transfer in a highly controlled manner to their target cells. Ca²⁺ is a major intracellular messenger that mediates many physiological responses of neurons to chemical and electrical stimulation. The cytoplasmic Ca²⁺ increase due to influx of extracellular Ca²⁺ through VGCC and ligand-gated channels are critical signals for the release of neurotransmitters from presynaptic terminals and for responses of the postsynaptic neuron (Hartmann and Konnerth 2005). When Ca²⁺ fluxes across the plasma membrane and between intracellular compartments properly controlled, Ca²⁺ plays critical roles in fundamental functions of neurons, including the regulation of neurite outgrowth and synaptogenesis, synaptic transmission and plasticity, and cell survival. During normal physiological activity, the neuronal intracellular Ca²⁺ concentration increases to a level that has no adverse effects.

It is well known that both NTFs (De Bernardi et al. 1996, Perez-Garcia et al. 2004) and membrane depolarization (Franklin and Johnson 1992, Soler et al. 1998) treatments induce intracellular Ca²⁺ increases. NTFs induce Ca²⁺ increase activating Ca²⁺ release from the intracellular stores (Pérez-García et al. 2004), and depolarization causes extracellular Ca²⁺ influx through VGCC (Soler et al. 1998). It has been described that both, **NTFs-** and **membrane depolarization-induced MN survival, require intracellular Ca²⁺ increase** that activates the Ca²⁺-dependent protein CaM (Egea et al. 2001, Soler et al. 1998). Moreover, in most neuronal populations a **moderate intracellular Ca²⁺ increase induces cell survival *in vitro***, indicating that Ca²⁺ can substitute NTFs in promoting cell survival as the “Ca²⁺ set point-hypothesis” establishes (Johnson et al. 1992). This effect can be mediated by the activation of intracellular pathways related to cell survival such PI3K and/or Ca²⁺/CaM (Soler et al. 1998, Johnson and D'Mello 2005). On the other side, **excessive** extracellular exposure to glutamate (excitatory neurotransmitter that induces intracellular Ca²⁺ increase through the direct activation of NMDA and AMPA/Kainate receptors) and/or excessive VGCCs activation, are harmful to neurons and contribute to cause **intracellular Ca²⁺ overload which triggers excitotoxic neurodegeneration and cell death** (Frandsen and Schousboe 1993, Dessi et al. 1994).

When intracellular free Ca²⁺ increases, several mechanisms are responsible for Ca²⁺ removing from the cytoplasm and restore the normal basal levels (Mattson, Guthrie and Kater 1989, Hof et al. 1999). Nevertheless, during aging and particularly in neurodegenerative diseases, cellular Ca²⁺ regulating systems are compromised resulting in synaptic dysfunction, impaired plasticity and neuronal degeneration.

Analyses of CNS tissues from patients with ALS suggest a role of Ca^{2+} overload in the death of vulnerable MNs (reviewed in (Grosskreutz, Van Den Bosch and Keller 2010)). Moreover, MNs are characterized physiologically by a low Ca^{2+} buffering capacity (Vanselow and Keller 2000). A better understanding of the cellular and molecular mechanisms that promote or prevent disturbances in cellular Ca^{2+} homeostasis during aging, adverse environments and disease models may provide novel approaches for therapeutics in neurological disorders such as ALS.

2.1 Ca^{2+} -dependent MN survival

2.1.1 *CaMKIV protects MNs from apoptotic cell death induced by NTF or high potassium withdrawal*

Appropriate levels of NTFs (Soler et al. 1999, Dolcet et al. 2001, Perez-Garcia et al. 2004, Brunet et al. 2007) and neuronal activity (Soler et al. 1998) are two essential requirements for chicken developing MNs to survive and differentiate *in vivo* and *in vitro*. These requirements can be reconstructed *in vitro* by adding NTFs or depolarizing concentrations of potassium in the culture medium (Gallo et al. 1987). Both treatments induced intracellular Ca^{2+} increases and activation of survival pathways in chicken MNs (Becker et al. 1998, Soler et al. 1999, Perez-Garcia et al. 2004), however it is not clear which intracellular signalling mechanisms are shared by both stimuli. In the nervous system many intracellular responses to elevated Ca^{2+} are mediated by CaM kinases, a family of protein kinases whose activities are initially modulated by binding Ca^{2+} /Calmodulin and protein phosphorylation. The fact that Ca^{2+} /CaM activation has been implicated in NTF and depolarization induced MN survival regulation, suggested that the Ca^{2+} /CaM dependent proteins such as CaM Kinase family could be implicated in MN survival modulation.

Previous non published studies demonstrated that chicken MN transfection with the constitutively active form of mouse CaMKIV protected MNs from NTF-deprivation induced cell death. This protective effect was not achieved by using constitutively active forms of CaMKI, CaMKII or CaMKK. Suggesting that CaMKIV is involved in MN survival, in this context we decided to analyse CaMKIV intracellular role. To this end Dr. Pérez-García cloned and characterized *Gallus gallus* CaMKIV, which has a shorter C-terminal region, but still shows a 77% homology in its primary sequences, when compared with CaMKIV from mouse, rat and human sequences. Although gCaMKIV has a shorter sequence, contains the Autoinhibitory and the Ca^{2+} -binding domains (AID and CBD, respectively) that characterize CaMK protein family. Results from Chapter 1 are focused on the analysis of CaMKIV implication on chicken MN survival.

To develop this study using a chicken MN primary culture we had to overcome some technical difficulties. First, MN numbers obtained from each chicken embryo was very low, which complicates biochemical experiments (we needed many embryos for each experiment). Moreover, MN primary culture transfection is complicated, as many transfection techniques are aggressive and cause cell death (such as electroporation). To overcome these limitations experiments in which high amounts of protein were required have been performed using cell lines (PC12, HEK 293T), where protein amount is not a limitation and also transfection efficiency is higher. But once obtained indicative results, those experiments were validated in primary MNs. To perform chicken MN transfection we have used LipofectamineTM2000, this transfection method shows discrete efficacy (only 30% of cultured MNs incorporate the construct of interest), but was sufficient to evaluate MN survival or death (Chapter 1).

CaMKIV is a multifunctional, Serine/Threonine protein kinase best known for regulation of events that occur in the nucleus. The biochemistry of CaMKIV has been well studied: upon a transient increase of intracellular Ca^{2+} , Ca^{2+}/CaM binds to its AID domain, which relieves intersteric inhibition and allows intramolecular phosphorylation of multiple serine residues (Sun et al. 1994). Phosphorylation of CaMKIV on Thr196 in the activation loop (Tokumitsu et al. 1999) is required to fully activate CaMKIV and render the enzyme capable of phosphorylating nuclear proteins involved in transcription such as the cAMP response element-binding protein (CREB) and the CREB-binding protein (reviewed in (Wayman et al. 2008)). After full activation by the three step mechanism mentioned above, the activity of CaMKIV becomes autonomous and no longer requires bound to Ca^{2+}/CaM (Chatila et al. 1996). CaMKIV has been described to be predominantly localized in the nucleus, where is responsible for Ca^{2+} -dependent gene transcription. However, previous results have shown that CaMKIV is also present in the cytoplasm and has the potential to shuttle between the nucleus and cytoplasm (Kotera et al. 2005, Takemura et al. 2009). In fact, different publications suggest that CaMKIV may have cytoplasmic functions. For example, it has been described that CaMKIV phosphorylates the oncoprotein 18 and regulates microtubule dynamics in response to external signals that involve Ca^{2+} (Melander Gradin et al. 1997). Our results are in accordance with this possible role of CaMKIV in regulating cytoplasmic events associated with cell differentiation and survival.

To study CaMKIV function we used a constitutively active form of gCaMKIV and its kinase dead form. CaMKIV_{CA} and CaMKIV_{CA}-KD forms were generated by Dr. Pérez-García, both are truncated forms of gCaMKIV that don't have the amino acids that conform the AID and CBD domains (Sun et al. 1994). The kinase dead form of gCaMKIV was generated from CaMKIV_{CA} form by introducing the mutation K60E, which renders

it kinase dead. Previous work performed in the laboratory had demonstrated that CaMKIV_{CA} construction was effectively active by analysing its kinase activity performing *in vitro* assays in HEK293T cells, where CREB phosphorylation levels were analysed in the presence and absence of Ca²⁺. Results confirmed that while the **endogenous gCaMKIV requires Ca²⁺-binding** to be active and induce CREB phosphorylation, the constitutively active form does not, and that pCREB levels induced by CaMKIV_{CA} in the presence or absence of Ca²⁺ were similar than those observed after stimulation of endogenous CaMKIV. CaMKIV_{CA}-KD transfection did not induce CREB phosphorylation even in the presence of Ca²⁺.

In the present work we demonstrate that CaMKIV mediates MN survival, as has been previously described for other neuronal populations. For example, CaMKIV has a pro-survival role in multiple cell types including: CGCs (See et al. 2001, Hansen et al. 2003), rat spiral ganglion neurons (Bok et al. 2007, Hansen et al. 2003), hematopoietic stem cells (Kitsos et al. 2005), and dendritic cells (Illario et al. 2008). In MNs, NTFs and membrane depolarization induced moderate intracellular Ca²⁺ increases that activate CaM, our results suggest that Ca²⁺/CaM induces CaMKIV activation, which once activated promotes MN survival. To demonstrate that CaMKIV induced MN survival, we first transfected MNs with CaMKIV_{CA} and CaMKIV_{CA}-KD, and we analysed MN survival and apoptotic death. Results showed that transfection with CaMKIV_{CA} and CaMKIV_{CA}-KD forms protected cultured MNs from NTFs or high potassium depolarizing medium withdrawal. Otherwise, in parallel experiments performed in our laboratory by Dr. Pérez-García CaMKIV expression was reduced in cultured MNs using RNAi approach. CaMKIV knockdown impaired neuronal survival in the presence of both, NTFs or high potassium in the culture media (Pérez-García et al. 2008), suggesting the CaMKIV protein implication in MN survival under these conditions. These experiments strongly reinforce CaMKIV involvement in NTFs and membrane depolarization induced intracellular survival stimulus.

Our results show that endogenous CaMKIV localization is nuclear and cytoplasmic in chicken MNs. It is well known that CaMKIV nuclear localization is responsible for Ca²⁺-dependent gene transcription through the phosphorylation of several transcription factors (mainly CREB) (Soderling and Stull 2001). However, our results support an endogenous cytoplasmic role of CaMKIV, indicating that CaMKIV can have a physiological function other than phosphorylation of nuclear transcription factors. Other publications also support a possible role of this kinase in regulating cytoplasmic events associated with cell differentiation and survival. Some examples of it are CaMKIV induced phosphorylation of oncoprotein 18 (Melander Gradin et al. 1997) or phosphorylation of Cofilin or implication in neurite outgrowth (Takemura et al. 2009).

Lemrow and collaborators also suggest that CaMKK phosphorylation of CaMKIV may occur in the cytoplasm as CaMKK has only been detected in the cytoplasm (Lemrow et al. 2004).

PI3K/Akt is a highly studied pathway implicated in MN survival (Frebel and Wiese 2006). NTFs induce PI3K pathway activation, and the use of inhibitors of the members of this pathway abolishes NTFs induced survival (Dolcet et al. 1999). Moreover, when intracellular Ca^{2+} is chelated or CaM activation is antagonized, Akt phosphorylation and cell survival induced by NTFs are abolished (Egea et al. 2001, Perez-Garcia et al. 2004). We demonstrate $\text{CaMKIV}_{\text{CA}}$ and $\text{CaMKIV}_{\text{CA-KD}}$ MN transfection induced Akt phosphorylation even in the absence of NTFs. Survival induced by CaMKIV is independent from its kinase activity because the kinase dead form of CaMKIV transfection did not abolish Akt phosphorylation and MN survival. However, survival is dependent on intracellular Ca^{2+} levels, because Ca^{2+} chelators blocked Akt phosphorylation and cell survival. Thus, our results point to the possibility that CaMKIV could be acting as a scaffold protein, providing a protein structure conformation that may recruit other Ca^{2+} -dependent proteins which mediate Akt pathway activation. Parallel experiments performed in our laboratory showed that CaMKIV associates to p85 in a Ca^{2+} -dependent manner through CaMKIV immunoprecipitation analysis, suggesting that intracellular Ca^{2+} regulates this association and affects neuronal survival.

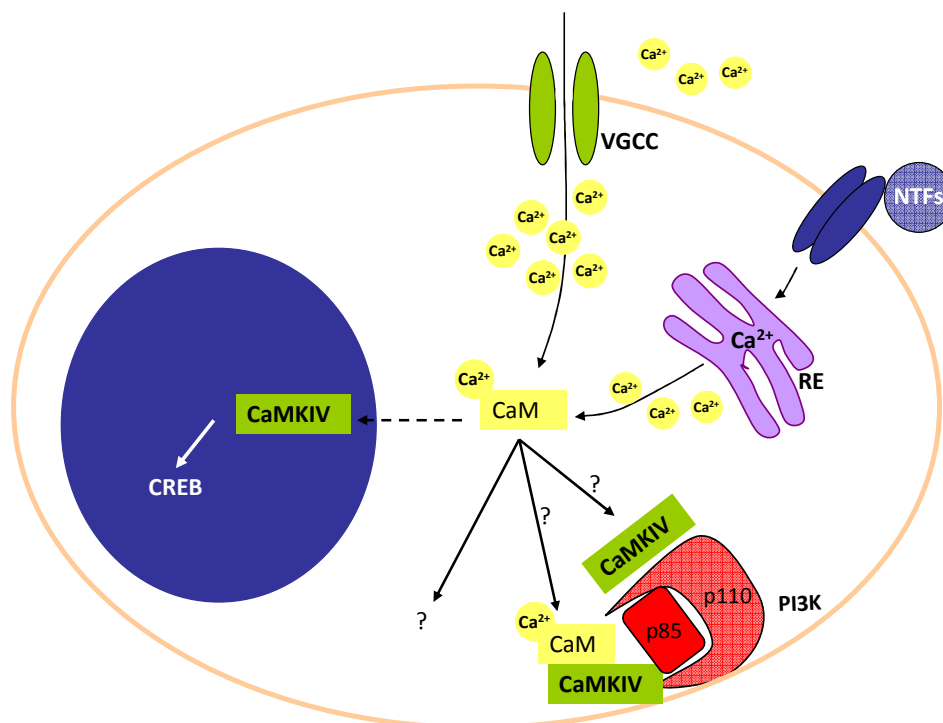


Figure 108. Intracellular mechanisms proposed for CaMKIV induced MN survival.

Although the activation of the PI3K/Akt pathway is well known as a mediator of NTF-induced survival (Crowder and Freeman 1998, Dolcet et al. 1999), the involvement of this pathway in mediating high potassium survival effect is not clear. Previous results from our group showed that, in chicken spinal cord MNs CaM, but not PI3-kinase activation (Becker et al. 1998), regulates membrane depolarization survival effect, suggesting the involvement of other protein/s.

From our present and previous results (Soler et al. 1998), we can conclude that in the NTF model CaMKIV regulates survival in MNs through PI3K activation. However, in the membrane-depolarization paradigm, CaMKIV may be involved in cell survival through the regulation of other proteins that could be located in the same and/or distinct cellular compartments that we still have not identified. One candidate to be activated by membrane depolarization can be Akt.

Since we describe an important role of CaMKIV in mediating MN survival, we would expect a deficiency in the motor system in CaMKIV *knockout* animals. However, CaMKIV *knockout* mice have no significant defects on locomotor activity or motor coordination (Takao et al. 2010). It would be interesting to explore the possibility that other protein/s could have a redundant role to compensate the lack of CaMKIV in these mice. As we demonstrate that CaMKIV role mediating MN survival does not depend on its kinase activity, proteins with a structural homology instead of a kinase activity equivalent to CaMKIV must be candidates to supply CaMKIV on these mice. On the other hand, mRNA expression during mouse nervous system development is chronologically consistent with periods of extensive cellular differentiation, proliferation, and neuronal survival (Vaillant et al. 1999, Wang, Ribar and Means 2001). The results from these studies suggest an important role of CaMKIV during embryonic nervous system development and provide a basis for further investigation of its involvement in other neuronal population development. From another point of view, CaMKIV loss may not impair completely MN survival *in vivo* but, as we also demonstrate that CaMKIV blocks apoptosis induced by either NTFs or potassium deprivation, it could be of interest to test CaMKIV neuroprotective effects under neurodegenerative conditions.

In the present thesis and complementary data published in (Pérez-García et al. 2008) we describe that Ca^{2+} /CaM dependent CaMKIV activation induces MN survival even in the absence of NTFs and membrane depolarization culture conditions, and that CaMKIV-induced survival effect responds to Akt signalling pathway activation.

2.2 Ca²⁺-dependent MN degeneration

2.2.1 Membrane depolarization, Calpain and MN death

In the present manuscript (results, Chapter 2) we also analysed the effect of membrane depolarization in mouse MN survival. Membrane depolarization causes intracellular Ca²⁺ increase, which represents a neuron survival modulator. Previous results demonstrated that membrane electrical activity induced by depolarization contributes to cell survival in primary chicken MNs (Soler et al. 1998). High potassium treatment-induced chicken MN survival was mediated by moderate Ca²⁺ influx through L-Type VGCC, and the pro-survival effect was blocked using the L-Type VGCC antagonist, Nifedipine (Soler et al. 1998). However, we have observed that depolarization induces cell death in embryonic mouse spinal cord MNs under the same culture conditions than chicken MNs. Other reports also support that increase of extracellular K⁺ induced cell death in rat MNs (Arakawa et al. 2002) and NSC34 (MN-like cell line) (Kaiser et al. 2006b), in a dose dependent manner and at concentrations that can be reached under physiological conditions.

Membrane depolarization induces completely opposite effects in both types of MNs, cell survival in chicken and cell death in mouse. As membrane depolarization induced neuronal survival requires Ca²⁺ influx, we hypothesized that high potassium induced intracellular Ca²⁺ increase in mouse MNs could reach toxic levels. Thus, either mouse MNs Ca²⁺ basal level is excessively high and depolarization induced influx reaches toxicity, or mouse MNs respond differentially to high extracellular potassium concentration leading to excessive Ca²⁺ influx. We measured intracellular Ca²⁺ levels in basal conditions from mouse individual MN bodies and compared with Ca²⁺ measures from chicken spinal cord MNs, the basal level of intracellular Ca²⁺ was not significantly different in both types of MNs. However, when we analysed Ca²⁺ influx after high potassium treatment mouse MNs showed higher intracellular Ca²⁺ increases compared to chicken MNs, suggesting that an excessive intracellular Ca²⁺ influx could be mediating the induced cell death. Thus, we postulate that the intracellular Ca²⁺ level reached in mouse MNs is the main responsible of the cell death effect. Moreover, it is known that mouse spinal MNs express low amounts of Ca²⁺ buffering proteins and are particularly vulnerable to Ca²⁺ overload (Vanselow and Keller 2000). We analysed if depolarization induced Ca²⁺ influx induced was mediated by **glutamate receptors** and/or by **VGCCs activation** (Figure 109).

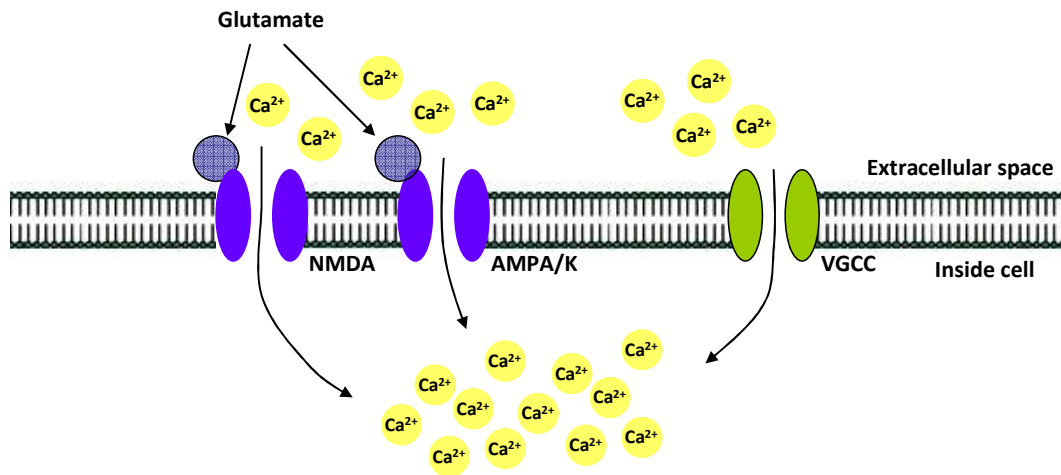


Figure 109. Proposed mechanisms to induce Ca^{2+} excessive influx after membrane depolarization, Glutamate receptors and VGCC.

To elucidate if high potassium could be causing neuronal death via the release of intracellular glutamate (Doble 1999, Babot, Cristofol and Sunol 2005), we analysed the effect of glutamate receptors antagonists. Results showed that glutamate receptors are not involved in cell death induced by depolarization. Moreover, blocking the main intracellular pathway related to excitotoxic cell death triggered by glutamate, JNK pathway (Yang et al. 1997, Borsello et al. 2003a, Borsello et al. 2003b), we did not find any effect on cell survival.

In this context, we analysed VGCC involvement in high potassium-induced mouse MN cell death. To this end several VGCC antagonists were used. It is well known that L-type VGCCs antagonists completely abolish the pro-survival effect of depolarization in different neuronal populations including chicken MNs (Soler et al. 1998, Miller et al. 2003) indicating that Ca^{2+} influx through these channels is mainly mediating cell survival after membrane depolarization. However, the blockade of N- or P/Q-type VGCCs had been related to neuronal protection after brain injury (Lee et al. 2004) or to rescue neurite growth from inhibition induced by membrane depolarization in spiral ganglion neurons (Roehm et al. 2008). These results indicate that Ca^{2+} influx through N- and P/Q-types of channels is mainly involved in cell death or in neurite growth inhibition, while Ca^{2+} influx through L-type VGCCs is mainly related to neuronal survival effect mediated by membrane depolarization. In our mouse MN model, antagonists of N-, P/Q- or L-type VGCCs were able to reduce Ca^{2+} influx and block the cell death effect caused by membrane depolarization, indicating that Ca^{2+} influx through these channels was the responsible of this effect. The extracellular Ca^{2+} influx through different types of VGCC is the responsible for the cell death observed in our cultures. One possible explanation to the opposite effect of membrane depolarization induced MN survival among both species could be that mouse MNs were not expressing, or expressing L-

type VGCC at low levels when compared to developmental chicken MNs, but this is little probable as it has been described the opposite, that at embryonic stages mouse MNs already express high levels of L-type VGCC Ca^{2+} current, while chicken embryonic MNs express low levels of L-type calcium current (Perrier and Hounsgaard 2000). Moreover, L-type Nifedipine antagonist blocked high potassium medium induced mouse MN cell death, but only when used at high doses, which had been described that do not imply exclusive L-type channel blockage; so even if we cannot exclude L-type channels involvement in mouse MN depolarization induced cell death we have to be careful on the interpretation of this result. L-type VGCC might participate on this toxic Ca^{2+} influx, but not as principal channels. Another possible explanation can be that chicken MNs express low levels of P/Q- and N-type VGCC, which protects them during development as it has been described in chicken spinal cord organotypic MN cultures (Brunet et al. 2007). In this model, authors describe that depolarization was sufficient to prevent chicken MN death but also induced degenerative-like changes in rescued MNs after long culture periods.

2.2.1.1 Calpain is activated in cultured mouse MNs in response to membrane depolarization

In the present study, we identified the Ca^{2+} -sensitive protease Calpain, as an essential downstream effector of mouse MN cell death induced by membrane depolarization. In our model, depolarization induces Calpain activation and the interference of Calpain protein rescues cell survival in depolarized MNs. It has been described that Calpains regulate cell survival in response to Ca^{2+} signals in different neuron types (Das et al. 2005, Syntichaki et al. 2002, Harbison et al. 2010, Bevers et al. 2010). Recent evidences describe Calpain inhibition as a MN protective effect in front of different insults that converge in intracellular Ca^{2+} increase. In the MN-like VSC4.1 cell line after glutamate exposure, there is a direct relationship between an increase of intracellular free Ca^{2+} and Calpain activation to cause cell death. In this model Calpain-induced death in VSC4.1 cells was mediated by apoptotic proteases (Das et al. 2005). Moreover, other authors describe membrane depolarization induced Calpain activation. For example, Roehm and collaborators described that high potassium inhibits spiral ganglion neurite growth via activation of multiple types of VGCC and Calpain (Roehm et al. 2008). Calpains can become over-activated under extreme conditions that result in sustained elevation of cytosolic Ca^{2+} levels (reviewed by (Wang 2000)). Driscoll and collaborators described the morphological and biochemical characteristics of the Ca^{2+} -mediated cell death leded by Calpain in a model of *C. elegans* (Syntichaki et al. 2002). Bredesen and collaborators include in the Cell Death

Classification proposal this Ca^{2+} /Calpain-dependent Cell death, as a new PCD type (reviewed in (Bredesen et al. 2006)).

Recently it has been reported that the overexpression of the endogenous Calpain inhibitor Calpastatin, reduces toxicity of SOD1G93A in a MN culture model of ALS (Tradewell and Durham 2010). Authors report that Calpastatin prevented the mutated SOD1 toxicity in MNs of dissociated spinal cord cultures, prolonging viability and reducing the number of SOD1 inclusions. These results support the central role of Ca^{2+} deregulation in ALS and identify a potential therapeutic pathway.

Moreover, Tremper-Wells and Vallano have demonstrated in dissociated cultures of cerebellar granule cells that depolarization induced Calpain activation mediated CaMKIV proteolysis (Tremper-Wells and Vallano 2005). As in Chapter 1 we describe CaMKIV role in MN survival and we observe Calpain activation when mouse MNs are cultured under depolarizing conditions, we analysed CaMKIV levels in cultured mouse MNs. We observed that CaMKIV protein levels were reduced in cultured mouse MNs in response to membrane depolarization. The CaMKIV decrease may respond to either downregulation of protein expression or protein cleavage or both. If reduced levels of CaMKIV in high potassium cultured mouse MNs respond to protein proteolysis, our results suggest that can be mediated by Calpain. Further research is needed to elucidate CaMKIV reduction cause and contribution to mouse MN degeneration.

2.2.1.2 From *in vitro* to *in vivo*: high intracellular Ca^{2+} increases and MN vulnerability

The accumulation of extracellular K^+ has a negative impact on normal function of surrounding neurons (Huttmann et al. 2003, Kaiser et al. 2006a). It has been proposed that elevated K^+ in perineuronal compartments of the spinal cord is a likely mechanism of MN excitotoxicity in a SOD1 transgenic mouse model of ALS (Kaiser et al. 2006a). Although it is technically difficult to directly determine the K^+ concentration in local MN compartments of the spinal cord, some information from mouse models is available. In the SOD1 transgenic model it has been demonstrated that the glial inwardly rectifying K^+ channels (Kir)4.1 are decreased in the ventral horn of the mutants (Kaiser et al. 2006a). The lost of these channels impairs perineuronal K^+ homeostasis and high extracellular K^+ levels may contribute to MN degeneration by K^+ excitotoxic mechanisms. Otherwise, Kir4.1 general *knockout* (Kofuji et al. 2000, Neusch et al. 2001) and conditional *knockout* (Djukic et al. 2007) have shown that neuronal function is affected by impairment of astrocyte K^+ uptake.

Many other general or ubiquitous alterations induced by high intracellular Ca^{2+} increases, affect preferentially MNs than other cells. Examples of that are found in ALS mutant SOD1 mouse models (Figure 110):

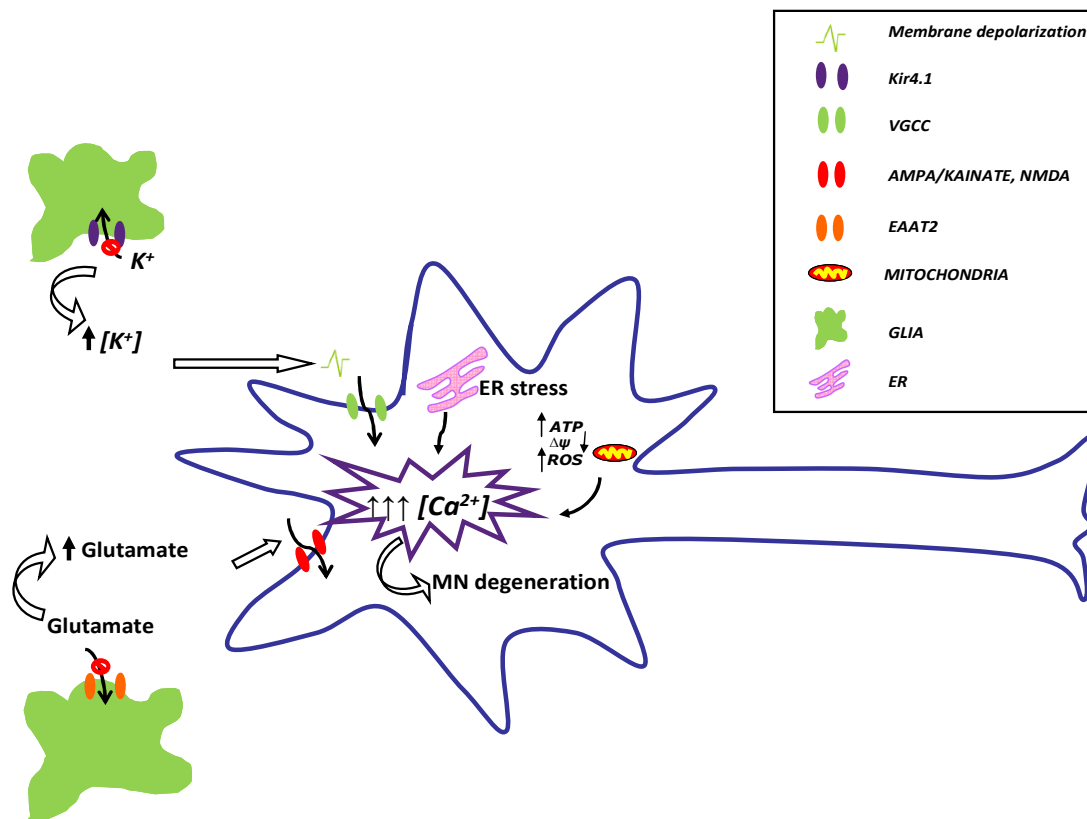


Figure 110. Proposed mechanisms to explain selective MN degeneration associated to intracellular Ca^{2+} increases.

1) Glutamate excitotoxicity. 2) Mitochondrial dysfunction. 3) ER stress. 4) Potassium toxicity.

- 1- **High extracellular K^+** , as previously mentioned, in the SOD1 transgenic mouse model the glial inwardly rectifying K^+ channels (Kir)4.1 are decreased in the ventral horn of the mutants (Kaiser et al. 2006a), which leads to $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increases.
- 2- **ER stress**, the ER is the main site of protein folding and processing, reacts to a number of Ca^{2+} -dependent stimuli and constitutes a large Ca^{2+} store. Accumulation of misfolded proteins in ER impairs its Ca^{2+} buffering capacity. For example, accumulation of misfolded aggregates from mutant protein SOD1 in ER may also contribute to reach high intracellular Ca^{2+} .
- 3- **Mitochondrial dysfunction** is an early evidence in ALS (Shi et al. 2010), misfolded mutant SOD1 damages mitochondria by its deposition onto the cytoplasmic face of the outer membrane of MN mitochondria (Vande Velde et al. 2008). Moreover mitochondrial Ca^{2+} buffering capacity was found affected in spinal cords of two different ALS mouse models (Damiano et al. 2006).

4- **High extracellular Glutamate levels**, in the SOD1 transgenic mouse model there is a dramatic reduction of the EAAT2, a glial inwardly glutamate transporter which clears glutamate excess from the extracellular medium. This transporter reduction leads to MN glutamate excitotoxicity and the corresponding Ca^{2+} influx through glutamate receptors (Ilieva 2009, Banner et al. 2002). Moreover, it has also been demonstrated that Glutamate-induced excitotoxicity activates Calpain, and its inhibition confers neuroprotection (Das et al. 2005).

Resistant MN subsets in neurodegenerative diseases express higher Ca^{2+} binding proteins such as **Calbindin and Parvalbumin** (Sasaki et al. 2006, Appel et al. 2001, von Lewinski and Keller 2005). In human autopsies, immunoreactive **Calbindin and Parvalbumin** were absent in MN populations lost early in ALS (i.e., cortical and spinal MNs, lower cranial nerve MNs), while late or infrequently damaged MNs in the disease (i.e., Onuf's nucleus motoneurons, oculomotor, trochlear, and abducens nerve neurons) express markedly higher levels of immunoreactive calbindin-D28K and/or Parvalbumin (Alexianu et al. 1994). Moreover, it has been described that Parvalbumin over-expression in the familial mutant mouse model SOD1 of ALS delays disease progression and prolongs mouse survival (Beers et al. 2001).

Ca^{2+} homeostasis alteration has also been described in other MN diseases like SMA. For example, it has been reported alterations on intracellular Ca^{2+} homeostasis in nerve terminals and defective Ca^{2+} channel clustering in axon terminals in severe SMA mice (Jablonka et al. 2007). Moreover SMN protein has been suggested to be a target for the Ca^{2+} dependent protease Calpain (Walker et al. 2008).

All these observations point to intracellular Ca^{2+} increase as a common alteration observed in MN degeneration. In the present work we suggest that pharmacological approaches to block Ca^{2+} -binding activated proteases such as Calpains may provide protective effects on MN degenerative diseases.

In summary, our data demonstrate that mouse spinal cord MNs are vulnerable to increased extracellular K^+ levels. The presence of high K^+ in the culture medium induces Ca^{2+} influx through VGCCs inducing an important increase of its intracellular concentration. High potassium treatment induced mouse MN toxicity was blocked by N-type and P/Q-type VGCCs antagonists: Conotoxin and Agatoxin, respectively. The L-type Nifedipine antagonist also blocked high potassium medium induced cell death, but only when used at high doses. Our results also demonstrate that the Ca^{2+} -dependent protease, Calpain, is mediating the cell death effect caused by membrane depolarization.

3. CULTURE MODELS TO INVESTIGATE SMA:

SMA is a neurodegenerative disease accompanied by the loss of lower MNs. Either loss of function or mutations or deletions in the *SMN1* gene are responsible for MN degeneration. The reason why low levels of the ubiquitously expressed SMN protein induce principally MN degeneration is not known yet. The main challenges toward successful therapies in patients with SMA include a better understanding of the disease pathology and SMN protein functions. In the present work we developed SMA *in vitro* model using embryonic primary MN cultures to study the effect that have low levels of SMN protein in these cells.

Although there are several SMA mice models available (Hsieh-Li et al. 2000, Monani et al. 2000), the limited number of mutants present in each litter makes very difficult to have enough number of spinal cord MNs to perform some biochemical and molecular analysis. For this reason we first developed an SMA *in vitro* model on a primary MN culture from CD-1 mice using lentivirus mediated delivery of RNA interference to down-regulate SMN protein level. Thus, establishing this model we expected to have enough quantity of cells to develop experiments that allow us to study the response of MNs to SMN knockdown when they are isolated from their environment. Changes in phenotype will be indicative of changes in intracellular proteins and pathways that will help to understand the physiopathology of SMA disease.

3.1.1 Why did we choose lentivirus as genetic material delivery vector

Nowadays it is possible to express foreign genes in either a single neuron or a large population of neurons in dissociated cultures, cultured slices, or *in vivo*. For basic research purposes the ideal transfection method should: first, be capable of transfecting postmitotic neurons with high efficiency; second, allow transfection of constructs of varying sizes, including cotransfection with multiple constructs; third, have limited cellular toxicity; and fourth, be easy and safe to perform. Despite major advances in this field in the several years, the ideal gene delivery system for all applications has yet to be developed. Thus, before starting any particular experiment we have to consider the specific advantages and disadvantages of each technique, see Table 14.

Functional studies in primary mouse MNs in culture have been hampered by the lack of reliable and efficient transfection protocols to enable protein over-expression or knockdown. Neither Lipofectamine nor electroporation are always suitable transfection methods. In cultured MNs both methods present high toxicity and low

efficiency. To overcome this technical limitation we decided to use viral vectors. We have used lentiviral transduction of embryonic primary MNs to generate the SMA *in vitro* model. To this end, we have optimized the time course, media, and viral titer to routinely achieve transduction efficiencies higher than 90%. Importantly, survival and morphology of the transduced MNs with empty vectors were not altered during all the time in culture. Lentiviral transduction allows both efficient knockdown and over-expression of the protein of interest to study the effects of both gain or loss of function on the differentiation, morphology and survival of primary MNs.

Table 14. Gene transfer methods for postmitotic neurons.

	Non viral transfection methods**		
	Lipofectamin	PEI	Electroporation
Neuronal transfection efficiency	Low (30-45%)	Low	High
Expression level	Moderate	Moderate	High
Expression beginning	1 day	1 day	1 day
Genome Integration	No	No	No
Insert length	No limit	No limit	No limit
Toxicity or neuronal damage	Variable***	Variable***	Minimal

	Methods using recombinant virus			
	Lentivirus	Adenovirus	Adeno-associated virus	HSV
Efficiency of neuronal transduction	High (95-100%)*	Moderate	Moderate (high for glia)	High
Level of expression	High	High	Low	High
Expression onset	Days (48 hours)	Weeks	Days	Hours
Integration	Yes	No	Mostly No	No
Insert size	8 Kb	<7,5 Kb	<4,5 Kb	150-40 Kb
Toxicity or neuronal damage	Minimal	High	Moderate	High

* Lower efficiency transducing cell lines (60%).

** More efficient for cell lines than primary cultures due to high toxicity.

*** 72 h after transfection MN damage is irreversible.

HSV (Herpes Virus).

3.1.2 SMN knockdown MNs

Using a lentiviral transduction of SMN shRNA we found an effective method to knockdown SMN protein in embryonic mouse isolated MNs. SMN reduction caused neurite degeneration after 9 days of interference and was even more evident at 12 days.

Our data is in agreement with results that imply a developmental defect in MNs of SMA disease, in accordance with described observations in primary MN cultures from the severe SMA animal model and SMA zebrafish model (Jablonka et al. 2006, McWhorter et al. 2003, Monani et al. 2000). In those studies authors describe alterations of axon growth but not MN survival defects. At first sight these results could seem contradictory to ours, however, in the studies performed in SMA cultured mouse MNs by Rossoll and collaborators referring survival results were measured at 5

and 7 DIV and we analysed longer culture periods. Notice that, at those previous time points, we also do not observe survival differences. We start to observe significant cell death at 12 DIV. By the other side, earlier axonal growth defects observed in SMA MNs by Rossoll and collaborators could be explained by different MN culture conditions, in their experiments MNs are cultured at lower density, supplied with only BDNF and CNTF and also they used different plate adhesion substrates (laminin-221) from ours. From those results, authors conclude that disturbances in axon growth and maintenance (defective maturation of growth cone) are the primary cellular defects that ultimately may lead to loss of MNs in SMA disease.

Our observations are partially in agreement with their conclusion as axonal MN defects in our lentiviral SMN knockdown model appears earlier than cell death, but after axon stabilisation (axon length in MN cultures does not change significantly at after 7 DIV (Wiese et al. 2010)). We describe neurite swelling and disruptions that recapitulate what had been described previously in SMA mice (McGovern et al. 2008) and patients (reviewed by (Burghes and Beattie 2009)). The significance of these neurite alterations in the pathogenesis of the disease is still unknown. Indeed, MN cell responses to SMN knockdown that we observe suggest axon maintenance defects as the primary cellular alteration in SMA affected MNs. Thus, our results, in agreement with others (King et al. 2009, Hilliard 2009), propose that elucidating the role and the mechanisms involved in axonal degeneration may be an important step in developing strategies for preventing and treating SMA disease.

Suppression or modification of the SMA phenotype can give invaluable insight into which process is crucial in SMA and the therapies that could be used. One of the goals in SMA therapeutics is to increase SMN protein level. In fact, some proteins belonging to survival signalling pathways or some chemical compounds can rescue some defects of SMA increasing intracellular SMN protein (Ting et al. 2007, Mattis et al. 2009). Moreover, recent studies demonstrated that it was possible to over-express functional SMN protein *in vivo* in mouse MNs (Fallini et al. 2010, Passini et al. 2010). The over-expressed protein was functional. Results published by Fallini and collaborators report axonal transport and nuclear localization of the over-expressed protein. Otherwise, Passini and collaborators showed that the over-expression of the protein rescued severe SMA mouse model disease phenotype. They have demonstrated that directed CNS viral delivery of human SMN gene in severe SMA mouse model was sufficient to overcome the disease manifestations in both the CNS and skeletal muscle (Passini et al. 2010). Moreover, they have demonstrated that hSMN gene increase was highly efficient in treating the pathological, functional, and survival phenotypes of a severe mouse model of SMA. The impressive increase in survival of treated animals (from 15

to 157 days) demonstrated that the more aggressive form of SMA disease (type-I) could be rescued.

In this context, we suggest that the overexpression of SMN in isolated mouse MNs can be of valuable interest to study MN specific SMN functions. We inserted hSMN sequence in the over-expression vector FCIV, and before starting to analyse over-expressed SMN protein biochemically we wanted to have evidence of its functionality. To this end we analysed if its over-expression could protect mouse SMN knockdown MNs from axonal degeneration and death. As we used an shRNA approach -and several evidences show that the overexpression of human SMN rescues SMA phenotype- we over-expressed human SMN protein on mouse knockdown MNs. The shRNA construct that we used was mouse specific, and did not block hSMN expression. Indeed, mouse MNs transduced with the human SMN construct expressed the protein and its increase avoided the appearance of characteristic neuritic degeneration morphology on cultured MNs, suggesting that the over-expressed hSMN protein was functional. Those results also reinforce that primary mouse MN cultures are valuable tools to study the effectiveness of chemical compounds to rescue SMA phenotype, as for example CNTF and Rho-kinase inactivation which have been reported to exert protective effect on SMA models without significantly changing SMN intracellular levels (Simon et al. 2010, Bowerman et al. 2010).

3.2 Primary MN culture from a severe SMA mouse model

Working with SMA mouse models has some limitations, but the establishment of a MN primary culture from a severe SMA mouse model has been of real importance for our results in order to validate that SMN protein levels that we reach in our knockdown model are representative of severe SMA phenotype. SMN protein levels from *SMN*^{-/-}; *SMN2*^{+/+} cultured MNs are similar to lentiviral SMN knockdown MNs in the same culture conditions.

To establish the MN culture from the SMA mouse model, will allow us to perform future assays of the effectiveness of pioneer therapeutic compounds that have been designed to increase *SMN2* transcription levels of full length SMN protein because they have inserted the human *SMN2* transgene. These therapeutic strategies normally based on antisense oligo-nucleotide (AON) technologies are designed to enhance exon7 inclusion on *SMN2* transcripts. This oligo-nucleotide based strategy is site specific for exon7 of the *SMN2* gene and represents a more specific target that will probably lead to lower non-desired effects than the pleiotropic therapeutic approach of up regulating *SMN2* promotor activity, which can alter several protein expression patterns (reviewed in (Sendtner 2010)).

In order to characterize MN disease-specific alterations from the mutant mouse model of severe SMA MN disease, -because it has been described that MN isolation by centrifugation enrichment procedures using Optiprep (Iodixanol) gradients had not yet been optimized for the enrichment of lumbar spinal MNs from individual mouse embryos (Wiese et al. 2010)-, we had to overcome this technical limitation and to adapt our MN purification protocol to single spinal cord MN purification, due to little number of mutant mice from each litter. Thus, MNs from severe SMA mouse models, such $SMN^{-/-};SMN2^{+/+}$ embryos could be investigated. In the present work we have modified some purification steps from our usual MN purification protocol (reduction and strength application upon mechanical dissociation) to found suitable conditions to enrich the low number of MNs from a single embryonic spinal cord. Following this process we obtain approximately 30.000 cells from each spinal cord from E12.5 SMA embryos. This protocol has the advantage of low toxicity and low unspecific loss of MNs and is, therefore, suitable for the enrichment of low numbers of neuronal cells, and in the present work has been adopted to purify MNs from a severe SMA mouse model. We measured MN neurite length from 3, 5 and 7 days in culture, and preliminary results do not show significant differences between SMA MNs and those from their healthy littermates, suggesting that severe SMA cultured MNs do not have deficiencies in axon growth despite their later degeneration in disease progress. Previous reports have described evidences that are in agreement with our results on SMA mutant mice and their cultured MNs (Zhang et al. 2010, McGovern et al. 2008). Nevertheless, there are also reports that SMA cultured mouse MNs show defects on axon growth when cultured on specific substrates. As we mentioned above, Rossoll and collaborators described shorter neurite length of SMA MNs when cultured on laminin-111. However, Jablonka and collaborators have demonstrated that SMA neurites are longer than wild type when cultured on laminin-221 (a motor end-plate specific form of laminin) (Figure 111) (Jablonka et al. 2007, Rossoll et al. 2003). Thus, suggesting that SMA tpe I cultured mouse MNs behave differentially when cultured on different adhesion substrates. Previous reports have shown that neurite growth of wild type MNs is reduced on laminin-221 substrate (Porter, Weis and Sanes 1995).

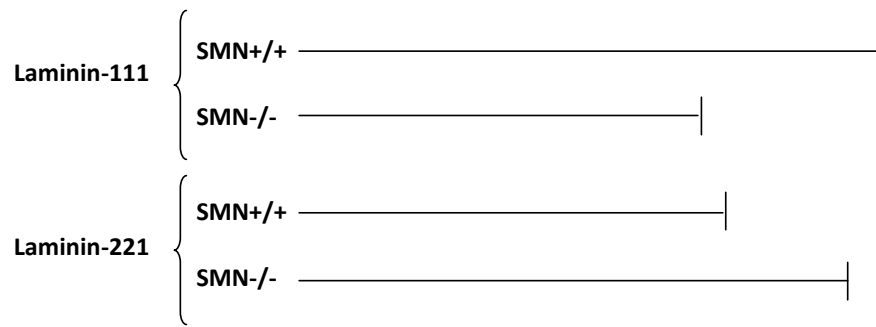


Figure 111. Schematic representation of MN neurite length when grown on different substrates.

Furthermore, it has been shown that the $\beta 2$ chain of laminin-221 interacts with the pore subunit of N- and P/Q-type VGCCs ($Ca_v2.2$) (Nishimune, Sanes and Carlson 2004). Jablonka and collaborators have demonstrated that growth cone VGCCs accumulation in wild type MNs cultured on laminin-221 is higher than in SMA MNs. They also describe that compared with healthy MNs SMN deficient neurons show reduced VGCCs accumulation in growth cones in these particular adhesion substrate. The authors conclude that these axonal length differences are due to differences in growth cone Ca^{2+} influx (SMA MNs show reduced Ca^{2+} influx and reduced electrical activity in growth cones when cultured on this substrate), because when healthy MNs are treated with VGCC antagonists, Ca^{2+} influx is reduced and their axon length is no longer shorter than SMA axons. Nevertheless, these experiments do not exclude that as laminin-221 interacts with the pore forming subunit of N- and P/Q-type VGCCs the simple interaction and not the Ca^{2+} influx may be responsible for axon growth alterations when MNs grow on this substrate, (Jablonka et al. 2007).

The evidences that neurite length differences are only observed on some adherence substrates (laminin-111) but not on others, such as poli-lysine (Zhang et al. 2010) or general laminin-1 (our results), may be indicative of altered mechanisms to stabilisation of MN contact with target tissue on SMA disease.

In summary, using lentiviral transduction of SMN RNA interference, we found an effective method to knockdown SMN protein in isolated embryonic mouse MNs. MN cell response to SMN knockdown suggests that neurite degeneration precedes cell body loss. Future experiments are needed to elucidate the role and mechanisms involved in axonal degeneration.

CONCLUSIONS

- 1- CaMKIV is present in the nucleus and the cytoplasm of chicken MNs, and is involved in MN survival.
- 2- CaMKIV mediated MN survival is calcium dependent, but independent of its kinase activity.
- 3- Active CaMKIV induces Akt phosphorylation in PC12 cells.
- 4- The presence of NTFs in the culture medium promotes MN survival *in vitro*: using NTF combinations from different NTF families we observe a summatory effect on survival, but we do not observe this summatory effect using NTF combinations from the same NTF family.
- 5- Membrane depolarization-induced calcium influx does not promote mouse MN survival and, even in the presence of NTFs, induces MN cell death.
- 6- Membrane depolarization induces mouse MNs intracellular calcium increase; some VGCC antagonists can reduce this calcium increase and protect MNs from cell death.
- 7- Calpain activation is involved in MN death induced by membrane depolarization. Blocking Calpain activity with drug inhibitors or reducing μ -Calpain protein expression, depolarization induced cell death is reduced.
- 8- Using lentiviral delivery of SMN shRNA in mouse MNs, we developed a culture model which expresses SMN protein levels comparable to those observed in cultured MNs from a severe mouse model of Spinal Muscular Atrophy.
- 9- In cultured MNs, low levels of SMN protein cause neurite degeneration and cell death.
- 10- MNs from a severe mouse model of Spinal Muscular Atrophy do not show neurite length defects after 7 days in culture.

PUBLICACIONES Y CONGRESOS

1. PUBLICACIONES

Publicaciones relacionadas con el trabajo de esta tesis:

Specific vulnerability of mouse spinal cord motoneurons to membrane depolarization.
Gou-Fabregas, M., A. Garcera, S. Mincheva, M. Perez-Garcia, J. Comella & R. Soler
(2009) *J Neurochem*, 110, 1842-54.

Pérez-García, M., M. Gou-Fabregas, Y. de Pablo, M. Llovera, J. Comella & R. Soler
(2008) Neuroprotection by neurotrophic factors and membrane depolarization is
regulated by calmodulin kinase IV. *J Biol Chem*, 283, 4133-44.

Publicaciones pendientes de aceptación:

BCL-XL OVEREXPRESSION PREVENTS MOTONEURON AXONAL DEGENERATION AND
CELL DEATH IN AN IN VITRO MODEL OF SPINAL MUSCULAR ATROPHY
Garcera, A., S. Mincheva*, M. Gou-Fabregas*, V. Caraballo-Miralles, J. Lladó, J.X.
Comella and R.M. Soler.

En revisión, *Journal of Neuroscience*. (* Both authors contributed equally).

Canonical Nuclear factor-KappaB pathway regulates cell survival in a developmental
model of spinal cord motoneurons

Mincheva, S., A. Garcera*, M. Gou-Fabregas*, M. Encinas, X. Dolcet, R.M. Soler.

En revisión, *Journal of Neuroscience*. (* Both authors contributed equally).

Publicaciones en colaboración con otros grupos de investigación:

Tumor necrosis factor alpha and interferon gamma cooperatively induce oxidative
stress and motoneuron death in rat spinal cord embryonic explants.

Mir, M., V. Asensio, L. Tolosa, M. Gou-Fabregas, R. Soler, J. Lladó & G. Olmos

(2009) *Neuroscience*, 162, 959-71.

Pyruvate protects cerebellar granular cells from 6-hydroxydopamine-induced
cytotoxicity by activating the Akt signaling pathway and increasing glutathione
peroxidase expression.

Fernandez-Gomez, F., M. Pastor, E. Garcia-Martinez, R. Melero-Fernandez de Mera, M.
Gou-Fabregas, M. Gomez-Lazaro, S. Calvo, R. Soler, M. Galindo & J. Jordán

(2006) *Neurobiol Dis*, 24, 296-307.

2. CONGRESOS

CONGRESO: XXIX CONGRESO DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster

TÍTULO: ANALISIS PROTEÓMICO COMPARATIVO DE MOTONEURONAS PURIFICADAS DE EMBRIONES DE RATÓN EN CULTIVO: DEPRIVACIÓN VS FACTORES NEUROTRÓFICOS.

AUTORES: Myriam Gou-Fàbregas, M Alba Sorolla, Joaquim Ros, Rosa M Soler.

LUGAR Y FECHA DE CELEBRACIÓN: ELCHE, 7-10 de Septiembre 2006.

CONGRESO: VI SIMPOSIO DE NEUROBIOLOGIA EXPERIMENTAL

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster

TÍTULO: ANÀLISIS PROTEÒMIC COMPARATIU DE MOTONEURONES PURIFICADES D'EMBRIONS DE RATOLÍ EN CULTIU

AUTORES: M. Gou-Fabregas, M.A. Sorolla, J. Ros, R.M. Soler.

LUGAR Y FECHA DE CELEBRACIÓN: BARCELONA, 22-23 de Noviembre 2006

CONGRESO: VI SIMPOSIO DE NEUROBIOLOGIA EXPERIMENTAL

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Comunicación oral.

TÍTULO: TNF-alpha POTENCIA LA APOPTOSIS DE MOTONEURONAS ESPINALES Y LA ACTIVACIÓN MICROGLIAL INDUCIDAS POR IFN-GAMMA

AUTORES: M. Mir, V.J. Asensio, L. Tolosa, M. Gou-Fabregas, R.M. Soler, J.Lladó, G. Olmos.

LUGAR Y FECHA DE CELEBRACIÓN: BARCELONA, 22-23 de Noviembre 2006

CONGRESO: XXX CONGRESO DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster

TÍTULO: de mecanismos excitotóxicos en la muerte de motoneuronas espinales.

AUTORES: Gou-Fàbregas, M., Mincheva Tasheva, S., Garcerá, A. and Soler, R.M.

LUGAR Y FECHA DE CELEBRACIÓN: MÁLAGA, 12-15 de Septiembre 2007

CONGRESO: XXX CONGRESO DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster

TÍTULO: Atrofia muscular espinal: Desarrollo de un modelo in vitro para el estudio de las funciones de la proteína SMN.

AUTORES: Mincheva Tasheva, S., Garcerá, A., Gou-Fàbregas, M., Comella, J.X. and Soler, R.M.

LUGAR Y FECHA DE CELEBRACIÓN: MÁLAGA, 12-15 de Septiembre 2007

CONGRESO: XII CONGRESO DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE NEUROCIENCIA

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster

TÍTULO: TNF-ALFA POTENCIA LA APOPTOSIS DE MOTONEURONAS ESPINALES Y LA ACTIVACIÓN MICROGLIAL INDUCIDA POR IFN-GAMMA

AUTORES: M. Mir, VJ Asensio, L Tolosa, V Caraballo, M Gou-Fabregas, R Soler, J Lladó, G Olmos.

LUGAR Y FECHA DE CELEBRACIÓN: VALENCIA, 5-9 Septiembre 2007

CONGRESO: VII SIMPOSIO DE NEUROBIOLOGIA EXPERIMENTAL

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Comunicación Oral.

TÍTULO: Vulnerabilitat intrínseca de les Motoneurons Espinals de mamífer a la despolarització de la membrana.

AUTORES: Gou-Fábregas M., Mincheva Tasheva S., Garcerá A., Pérez-García M. J., Comella, J.X. and Soler R.M.

LUGAR Y FECHA DE CELEBRACIÓN: Valencia, Noviembre 2008

CONGRESO: International symposium on rare diseases. Inherites neuromuscular diseases: Translation from pathomecanisms to therapies.

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster.

TÍTULO: Effect of SMN Knock down un motoneuron survival.

AUTORES: Garcerá, A., Gou-Fábregas, M., Mincheva Tasheva, S., Comella, J.X. and Soler, R.M.

LUGAR Y FECHA DE CELEBRACIÓN: Valencia, Noviembre 2008

CONGRESO: XII CONGRESO DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE NEUROCIENCIA

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster

TÍTULO: A NEW MODEL OF RAT SPINAL CORD EMBRYONIC EXPLANTS TO STUDY THE EFFECTS OF PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES ON MOTONEURONS

AUTORES: M. Mir, VJ Asensio, L Tolosa, M Gou-Fabregas, RM Soler, J Lladó, G Olmos.

LUGAR Y FECHA DE CELEBRACIÓN: TARRAGONA, Septiembre 2009

CONGRESO: ARCHITECTURE OF LIFE

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster

TÍTULO: SPECIFIC VULNERABILITY OF MOUSE SPINAL MOTONEURONS TO MEMBRANE DEPOLARIZATION

AUTORES: M. Gou-Fabregas, A. Garcera, S. Mincheva, M. Perez-Garcia, J. Comella, R. M. Soler

LUGAR Y FECHA DE CELEBRACIÓN: BARCELONA, 2010

CONGRESO: ARCHITECTURE OF LIFE

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster

TÍTULO: ROLE OF NF-kB PATHWAY ONDEVELOPMENTAL MOTONEURON SURVIVAL

AUTORES: S. Mincheva Tasheva , M. Gou-Fàbregas, A. Garcerá and R. M. Soler

LUGAR Y FECHA DE CELEBRACIÓN: Barcelona, 2010

CONGRESO: 7th FORUM OF EUROPEAN NEUROSCIENCE

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster

TÍTULO: CALCIUM INFLUX THROUGH VOLTAGE-GATED CALCIUM CHANNELS AND CALPAIN ACTIVATION LEADS TO SPINAL MOTONEURON CELL DEATH.

AUTORES: Gou-Fabregas, M., Garcera, A., Mincheva, S., Comella, J. X. and Soler R. M.

LUGAR Y FECHA DE CELEBRACIÓN: ÁMSTERDAM, 3-7 de Julio 2010

CONGRESO: 7th FORUM OF EUROPEAN NEUROSCIENCE

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster

TÍTULO: IMPLICATION OF THE CANONICAL NF-KAPPAB PATHWAY IN THE SURVIVAL OF DEVELOPMENTAL MOTONEURONS.

AUTORES: Mincheva-Tasheva, S., Gou Fábregas, M., Garcerá A. and Soler R. M.

LUGAR Y FECHA DE CELEBRACIÓN: ÁMSTERDAM, 3-7 de Julio 2010

CONGRESO: 7th FORUM OF EUROPEAN NEUROSCIENCE

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster

TÍTULO: SURVIVAL MOTONEURON PROTEIN KNOCKDOWN IN A MOTONEURON CULTURE MODEL INDUCES CHANGES IN NEURITE MORPHOLOGY.

AUTORES: Garcerá, A., Gou Fábregas, M., Mincheva-Tasheva, S., Comella, J. X. and Soler, R. M.

LUGAR Y FECHA DE CELEBRACIÓN: ÁMSTERDAM, 3-7 de Julio 2010

CONGRESO: 7th FORUM OF EUROPEAN NEUROSCIENCE

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster

TÍTULO: Survival motoneuron proteína knockdown in a motoneuron culture model induces changes in neurite morphology

AUTORES: Olmos G, Mir M, Asensio VJ, Tolosa L, Gou Fábregas M, Soler R. M., Lladó J

LUGAR Y FECHA DE CELEBRACIÓN: ÁMSTERDAM, 3-7 de Julio 2010

Asistencia a cursos y jornadas:

REACTIVE OXYGEN SPECIES AND SYSTEMS, ROSASNET, I WORKSHOP

LUGAR Y FECHA DE CELEBRACIÓN: MADRID, 2008

REACTIVE OXYGEN SPECIES AND SYSTEMS, ROSASNET, II WORKSHOP

LUGAR Y FECHA DE CELEBRACIÓN: ZARAGOZA, 17-19 Junio 2009

REACTIVE OXYGEN SPECIES AND SYSTEMS, ROSASNET, III WORKSHOP

LUGAR Y FECHA DE CELEBRACIÓN: SALAMANCA, 18-19 Mayo 2010

4th ADVANCED LIVE CELL MICROSCOPY WORKSHOP (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas)

LUGAR Y FECHA DE CELEBRACIÓN: Madrid, Noviembre 2008

APPENDIX 1

SHORT STAY, STEM CELLS INTRODUCTION

Stay to *RTK signalling: from mouse development & pathologies to new molecular therapies*. Group leader: Dr. Flavio Maina.

CNRS, Developmental Biology Institute of Marseille-Luminy (IBDML) Marseille

01.02.2009-31.05.2009

Dra. Rosanna Dono supervised and directed the work.

INTRODUCTION TO STEM CELLS

During my stay I had the opportunity to work with mouse embryonic stem cells (mESC). I learned to manipulate, to maintain and to differentiate them to neurons.

1. INTRODUCTION

1.1 Embryonic Stem Cells

Embryonic stem cells (ESC) are pluripotent cells derived from the inner mass (ICM) of the mammalian blastocyst. The isolation and culture of ESC and their ability of indefinite self-renewing expansion in culture, opened the possibility of generating unlimited numbers of many cell types (Evans and Kaufman 1981). Depending on culture conditions, ESC have the potential to differentiate to hundreds of cell types from the body, raising exciting new prospects for biomedical research and for regenerative medicine (Loebel et al. 2003, Smith 2001). ESCs constitute an accessible *in vitro* system for modeling fundamental development processes, such as cell fate choice, commitment, and differentiation in mammals. Furthermore, the pluripotency of ESCs opens up opportunities for the use of these cells as a source of material for pharmaceutical screening and cell based transplantation therapies.

Many of the diseases that place the greatest burden on society are due to cellular deficiency, for example, spinal cord neurodegenerative diseases result from the absence of MNs that the body is unable to replace. And ESCs placed in our hands the ability to generate clinically relevant numbers of defined cell populations the basic elements for tissue repair and regeneration. Additionally, the ability to derive patient-specific ESC equivalents (Park et al. 2008, Takahashi et al. 2007, Yu et al. 2007)

provides powerful new tools to evade the immune system (Jaenisch and Young 2008, Rubin 2008).

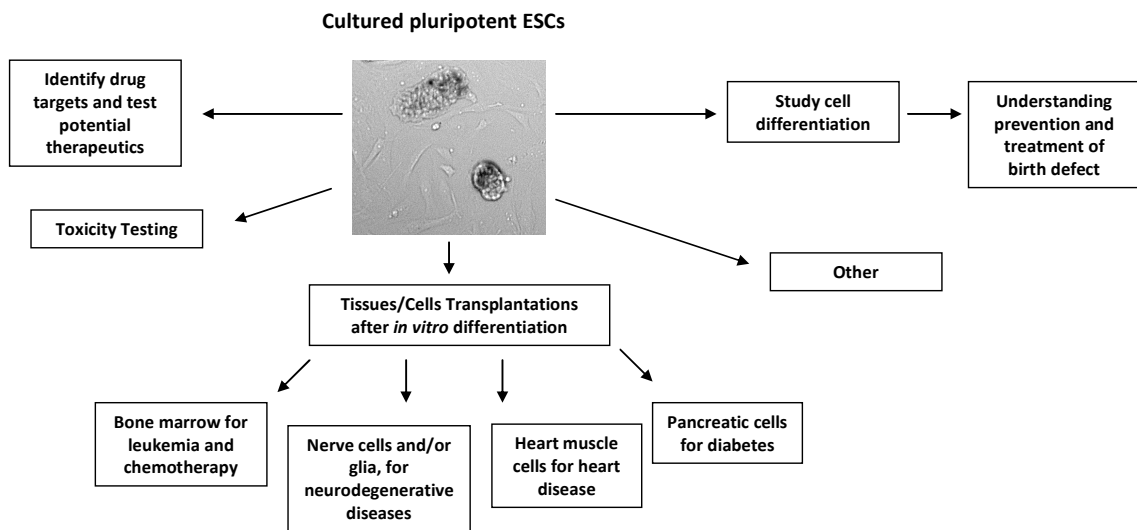


Figure 112. Potential uses of ESC.

Although most scientists agree on the potential of ESCs, it has also become clear that pluripotency is a double-edged sword: the same plasticity that allows ESCs to generate hundreds of different cell types also makes difficult to control and drive specific cell type differentiation. Three basic methods have been developed to promote differentiation of ESCs (Murry and Keller 2008):

- (1) The formation of three-dimensional aggregates known as embryoid bodies (EBs),
- (2) The culture of ESCs as monolayer on extracellular matrix proteins,
- (3) The culture of ESCs directly on supportive stromal layers.

Although there is debate as to which approach is best, each method demonstrates that ESCs can differentiate into a broad spectrum of cell types in culture, including neurons. However, despite progress in recent years, we do not have full command over these cells, and it is difficult to direct differentiation of the entire population of ESCs into neural progenitors. Widespread application of ESCs based technologies in both basic biology and medicine necessitates development of robust and reliable protocols for controlling self-renewal and differentiation in the laboratory.

1.2 ESC neuronal differentiation

ESC culture allows the generation of unlimited number of neurons, which is of particular interest to neurobiologists, as homogenous cell populations are not available in sufficient quantities to characterize neurons using some biochemical approaches. In addition, as ESC can readily be manipulated genetically or isolated from mice carrying relevant mutations, wild-type and mutant neurons may be compared and mechanisms causing loss of specific cell types in neurodegenerative diseases identified (Bibel et al. 2004).

Studying neural specification *in vitro* will help us to further improve the efficiency and predictability with which we can generate neural cells from ESCs. It could also improve our understanding of mammalian development as neural ESCs differentiation follows a sequence of differentiation steps that appear to closely recapitulate neural development *in vivo* (Billon et al. 2002, Ying et al. 2003).

A major problem that remains unsolved in using ESC to generate neurons is cellular heterogeneity (reviewed in (Lindvall and Kokaia 2006)). Typically, neuronal cultures derived from ESC contain a variety of neuronal subtypes as well as non –neural cells, including glial cells (Bibel et al. 2004). Protocols to improve ESC cultures differentiation into defined neuronal lineages are being designed using inductive differentiation signals and transcription factors to substantially enrich for subtypes of neurons, particularly dopaminergic neurons and MNs. The use of extrinsic factors such as sonic hedgehog increases the generation of MNs. In addition MNs generated from ESC have been shown to integrate into host tissue after transplantation (Lee et al. 2007). In spite of this progress, with regard to the use of ESC derived neurons for transplantation, it would be particularly desirable to obtain defined progenitor cells giving rise to known progeny, as opposed to a mixture of cells, including some that may continue dividing and form tumors (reviewed in (Bibel et al. 2004)).

During my stay I had the opportunity to learn how to maintain mouse ESCs (mESCs) in culture and how to differentiate them in monolayer adherent conditions in serum free medium to terminally differentiated neurons. The monolayer protocol facilitates visualization of the differentiation process of neural conversion.

2. OBJECTIVES.

- 1- Learn to culture and manipulate mESCs, keeping pluripotency.
- 2- Neuronal differentiation from mESC.
- 3- Immunofluorescence to characterize pluripotency, neural precursors and neural differentiation.

3. MATERIAL AND METHODS:

3.1 Culture of Murine Embryonic Stem Cells

mESC were routinely propagated on gelatin coated plates, on Mytomicine pre-treated feeder cells in DEMEM Glutamax medium supplemented with anti-differentiation agent Leukemia Inhibitory Factor (LIF), 12% FBS, 2mM L-Glutamin, Sodium Pyruvate, P/S non essential aa and 100 μ M β -mercaptoethanol. To culture mESC under pluripotent conditions we use medium supplemented with.

3.2 ESCs neural differentiation protocol

For monoculture neuronal differentiation, undifferentiated ESCs were dissociated and plated onto 0.1% gelatin-coated tissue culture plates (corning, cell bind) at a density of $2-3 \times 10^3/\text{cm}^2$ in knockout DMEM medium (Invitrogen), supplemented with 12% knockout serum, 2 mM L-Glutamin, P/S, 100 μ M β -Mercaptoethanol. Medium was renewed every 2 days.

3.3 Immunofluorescence, ESCs neuronal markers during differentiation process

For nuclear proteins cells were fixed with 4% PFA and with Ethanol/Acetic Acid (2:1), the rest of immunofluorescences have been performed on 4%PFA/15% sucrose fixed cultures. Permeabilization has been performed with 0.1% Triton.

Antibodies: Tyrosine hydroxylase (TH, Chemicon 1:100), β III-Tubulin (Tuj-1, Covance), Nanog (Abcam, 1:50), Nestin (Abcam, 1:100), Cleaved-Caspase3 (Cell signaling, 1:400), Phospho-histone 3 (Cell Signalling, 1:200).

4. RESULTS:

4.1 Neuronal differentiation process

ESCs in culture in order to do not loose pluripotency need to be cultured on feeder cells monolayer (Figure 113) and in the presence of LIF in the culture media.

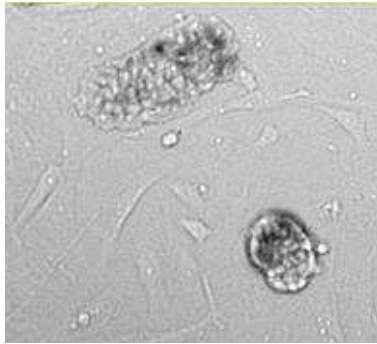


Figure 113. Stem cells growing with feeder cells.

Two ESCs clones surrounded by isolated feeder cells (Ionomycin inactivated MEFS).

There have been described different protocols to induce ESCs neuronal differentiation (Stavridis and Smith 2003). Even if no current protocol is completely efficient in converting all ESCs into neural progenitors, technical improvement is increasing the obtained differentiation rates. Of these methods, the monolayer differentiation process that we used has several key features that make it specially useful as an experimental system for investigating the mechanisms that regulate neuronal specification (Ying et al. 2003).

In the present work we use a differentiation protocol relying on preferential survival of neural cells in minimal culture media (Ying et al. 2003) and cell density (if ESCs cell density is too low, cell viability is compromised, whereas relatively small increases in cell density can reduce the efficiency of neuronal differentiation dramatically, with more cells remaining pluripotent).

The monolayer differentiation protocol is highly efficient (aproximatively 75% of the cells will become neurons), and as cells are attached to the culture dish in a two-dimensional monolayer can be observed readily throughout the differentiation process.

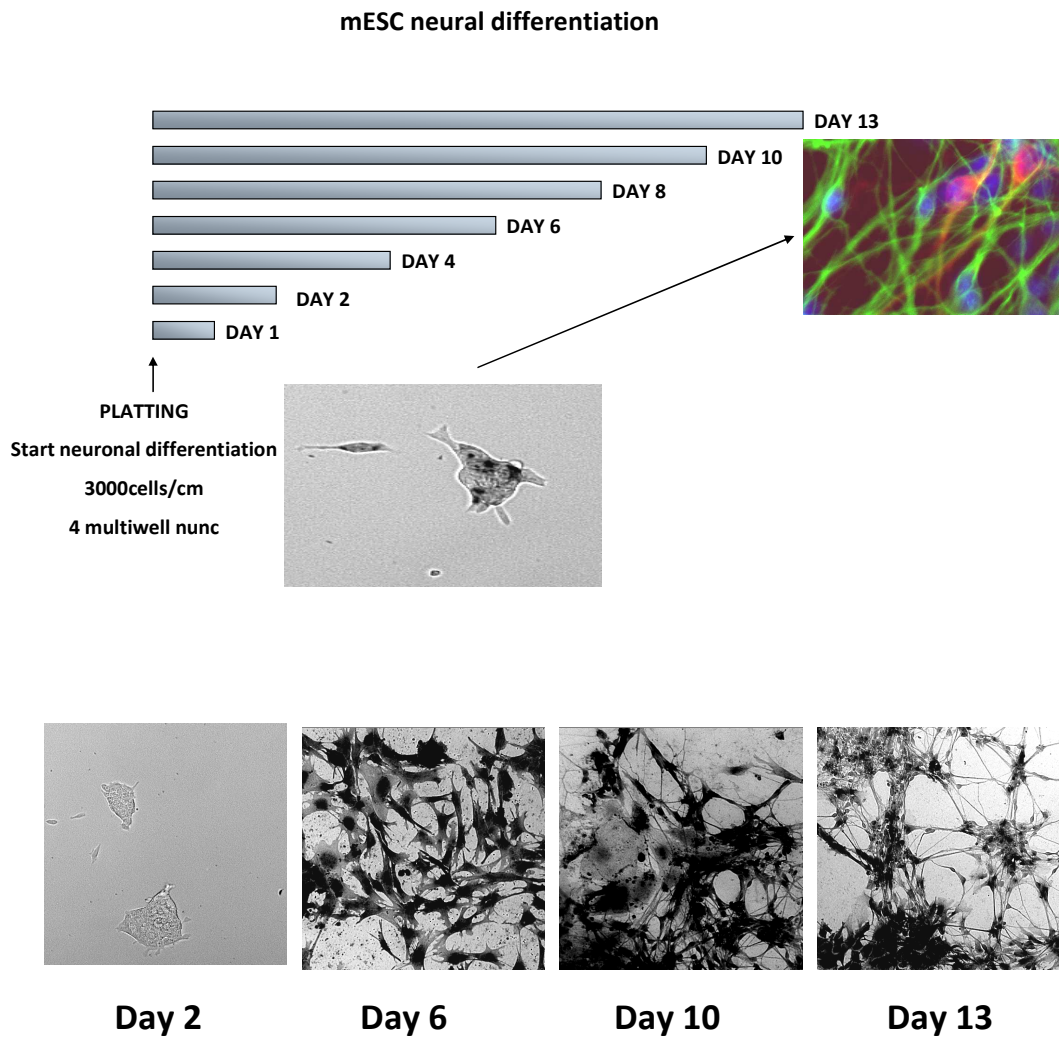


Figure 114. mESCs neuronal differentiation.

Scheme of the differentiation process period. At day 1 ESCs are plated on gelatin coated plates without feeder cells and without LIF. After 13 days cells express neuronal markers. Sequential images of cultured mESCs during the transition from undifferentiated ESCs to neurons see morphological changes.

4.2 Monitoring Neural and Neuronal differentiation

The transition from ESC to neural progenitor can be observed in live cells by distinctive change in morphology. The nucleus which is large and distinct in ESC, becomes opaque and barely visible. Cells slightly elongate and pack closely together, often into rosette structures, with more distinct cell boundaries than ESCs.

To monitor the loss of ESC marker Nanog, and acquisition of neural progenitor marker Nestin, we performed immunofluorescence analysis using commercially available antibodies.

Neural differentiation becomes detectable from around the sixth- seven days, and the number of neurons increases progressively over the subsequent days. Neurons can

be identified easily by their characteristic small cell bodies with long projections and by immunostaining for early neuronal markers, such as β III-Tubulin (Tuj-1 antibody) (Figure 115).

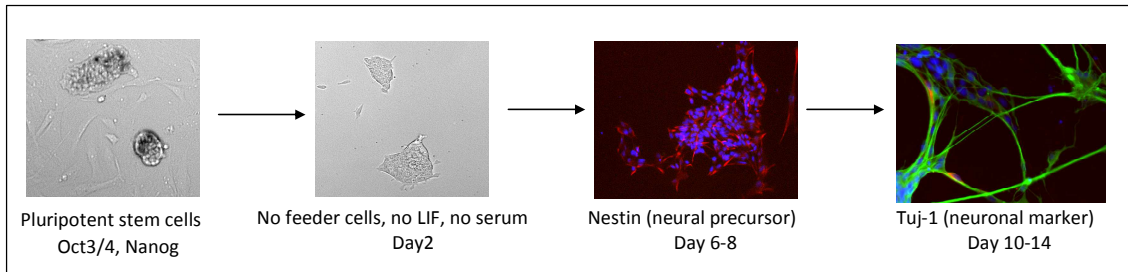


Figure 115. Stem cells neuronal differentiation.

Sequential images of cultured mESCs during the transition from undifferentiated ESCs and their characteristic molecular markers. Undifferentiated ESC are Nanog positive. At day 6 during the differentiation process we observe neural precursors (Nestin positive), and finally after 12 days in differentiation cells express neuronal markers (Tuj-1 and TH).

These cultures contain a heterogeneous mixture of cells at different stages of differentiation (some undifferentiated cells, neuron precursors and neurons at the same time) and with mosaic expression of regional identity genes (interneurons, dopaminergic neurons, etc.).

4.3 Analysis of molecular markers during neuronal differentiation process.

4.3.1 *Nanog*

Nanog is an appropriate molecular marker to recognize the undifferentiated state of stem cells in mouse and human (Figure 116). Is a homeodomain-containing protein, which was identified as a factor that can sustain pluripotency in ES cells even in the absence of leukemia inhibitory factor (LIF). Nanog function is required for the maintenance of pluripotency (is present in pluripotent stem cells and absent from differentiated cells).

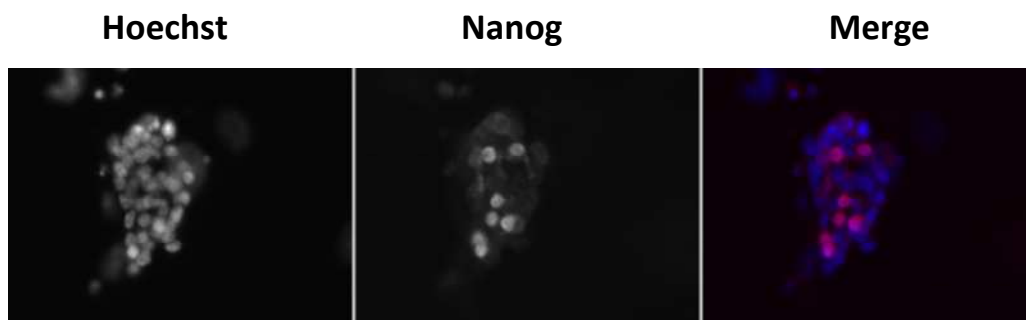


Figure 116. Nanog positive pluripotent mESC.

One likely mechanism that can explain how Nanog sustains self-renewal and undifferentiated state on ESC is through the modulation of Oct-4 and Sox2 levels. These two transcription factors in turn control the downstream regulation of important genes for maintaining pluripotency or inhibiting differentiation. In addition, Nanog also controls important molecular effectors of ESC fate, as *Foxd3* and *Setdb1*.

4.3.2 Phospho-histone 3.

Stem cells when they start the differentiation process stop dividing. We analysed the percentage of mitotic cells during the differentiation process. Each day after starting the differentiation process there are less cells undergoing cell division, so less cells positive for phospho-histone 3 (Figure 117).

**Analysis of proliferative cells during neural differentiation.
We used phospho-histone 3 immunostaining to visualise mitotic cells.**

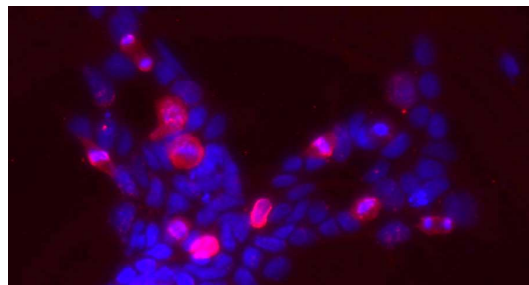
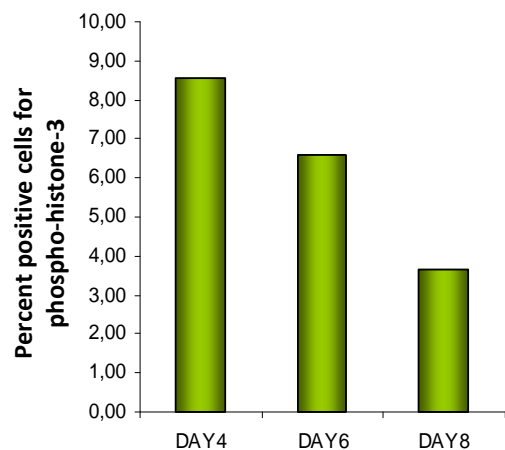


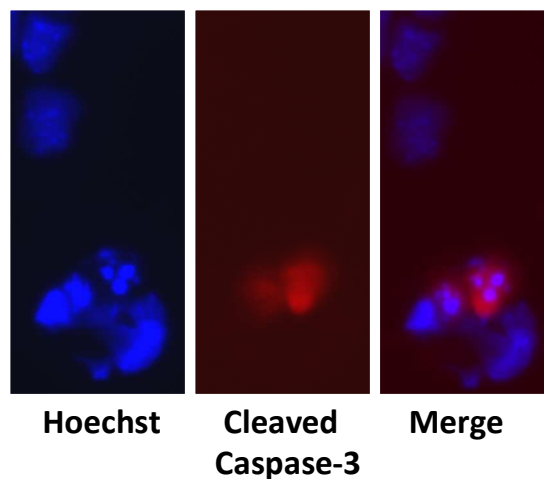
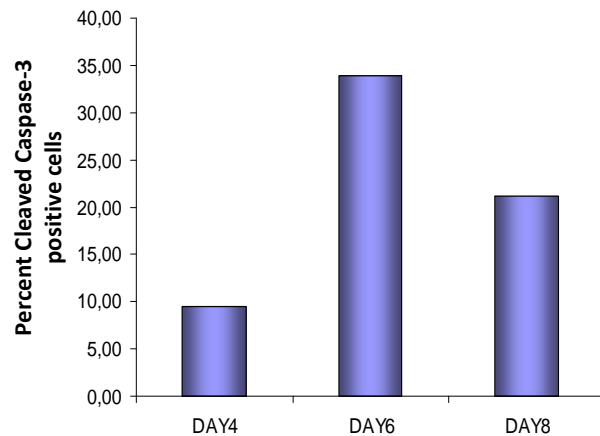
Figure 117. Analysis of phospho-histone 3 marker during neuronal differentiation. Proliferative cell number during differentiation process decreases as ESCs lose pluripotency and start cell lineage differentiation. Image from immunofluorescence ESCs.

4.3.3 Cell death period during neuronal differentiation

During stem cell neuronal differentiation, we observe a period of cell death. Some cell death is normal and necessary during this protocol to reach neuronal differentiation.

As cells are plated under differentiation conditions, probably cells that cannot differentiate die. This cell death is a requirement for the differentiation process. It may reflect natural early phase PCD during development. During the differentiation process we observe a pick of apoptotic cell death from day 4 to 8 (Figure 118).

**Cell death analysis during neural differentiation.
We used cleaved-caspase 3 immunostaining to visualise apoptotic cells.**



**Figure 118. Analysis of cleaved caspase-3 during neuronal differentiation.
During in vitro neuronal differentiation**

4.3.4 Neuronal marker β III-Tubulin

At the end of the differentiation process the majority of mESC have differentiated to neurons. These neurons express Tuj-1 neuronal marker.

This differentiation process is not neuronal type specific, so we obtain a heterogeneous neuronal population where a variety of neuron subtypes are represented (all positive for β III-Tubulin), and also few non neuronal cells (β III-Tubulin negative cells). In Figure 119 we show that only some of the Tuj-1 positive neurons are dopaminergic neurons (TH positive).

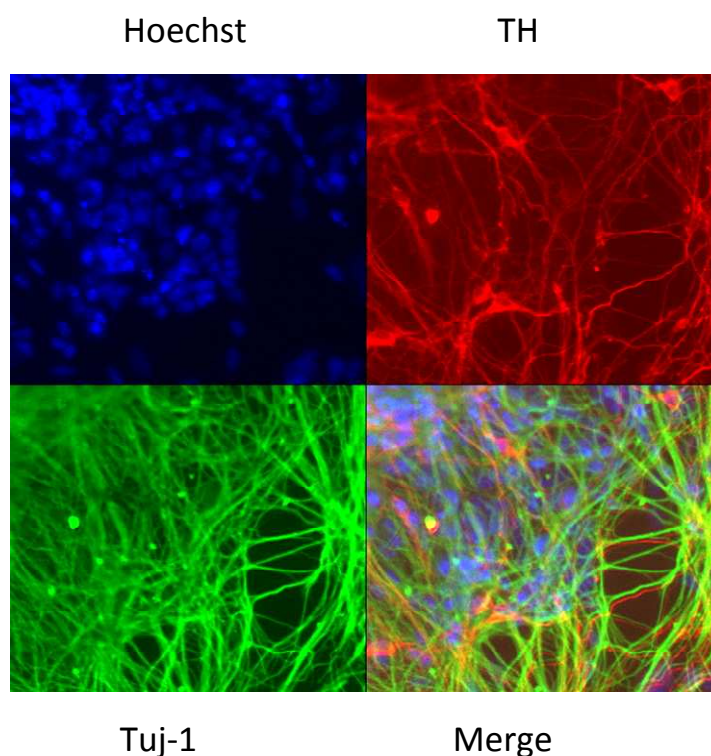


Figure 119. mESC neuronal differentiation.

5. DISCUSSION

Insights gained from developmental biology have facilitated the understanding of the control of ESC growth and lineage-specific differentiation. These insights enable the reproducible generation of highly enriched cell populations from a number of different lineages. Neuronal differentiation of mESC can be achieved with high efficiency. Such protocol provides an accessible and genetically reproducible model system with which to elucidate molecular mechanisms of self-renewal, lineage choice and differentiation process. Initial studies have revealed a close similarity between those mechanisms

responsibles for ESCs differentiation *in vitro* and those operating during embryogenesis, suggesting that studies of Stem cell mechanisms *in vitro* will be directly relevant to understanding of embryogenesis.

Further, understanding mechanisms of ESCs differentiation holds tremendous promise for the development of novel therapies for many serious diseases and injuries and they also represent an unlimited cellular resource for routine biochemical analysis, for small molecule screening, for drug screening and basic development research.

This approach to stem cell technology has been of real interest as professional training for the understanding of basic development and clinical approaches from ESC research.

APPENDIX 2

CELL LINE SMA MODELS (INTERFERENCE AND OVER-EXPRESSION)

1. INTRODUCTION

Using primary MN cultures we obtain very few MNs from each embryo (30.000 – 50.000 cells/spinal cord). This low number of cells is a limitation to perform high throughput screening experiments that will be of real interest to analyze differential protein and gene expression patterns of SMN knockdown MNs, or to analyze hSMN protein function performing protein immunoprecipitation or crystallography experiments. To overcome this challenge by one hand we started to establish SMN knockdown MN-like NSC34 stable clones. By the other hand we transduced HEK293T cell line with an over-expression vector of human SMN to obtain stable clones that over-express high amounts of SMN protein.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1.1 Culture mediums

Table 15. Cell Line Culture Mediums

<u>SOLUTIONS</u>	<u>COMPOSITION</u>
<u>NSC34 CULTURE MEDIUM:</u>	DMEM medium (Gibco, Invitrogen) supplemented with 10% HI-FBS, 2Mm L-glutamin and 20 µg/ml P/S (Gibco).
<u>HEK293T CULTURE MEDIUM:</u>	DMEM medium (Gibco, Invitrogen) supplemented with 10% HI-FBS and 20 µg/ml P/S (Gibco).

2.1.2 HEK 293T Cell Line (Human Embryonic Kidney)

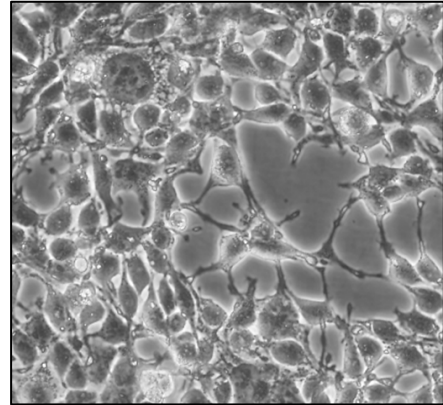
HEK 293T cells are derived from HEK 293 cells, which were generated in early 70s by transformation of cultures of normal human embryonic kidney cells with sheared adenovirus 5 DNA in Alex Van der Eb's laboratory in Leiden, Holland. They are called HEK for human embryonic kidney, while the number 293 comes from Graham's habit of numbering his experiments; the original HEK 293 cell clone was simply the

product of his 293rd experiment. HEK 293T cells contain (in addition to HEK 293, the SV40 Large T-antigen. This cell line was cultured as described in *Materiales y Métodos*.

2.1.3 MN-like NSC34 Cell Line

NSC34 is a hybrid cell line from embryonic mouse spinal cord and mouse neuroblastoma cells with characteristics of primary motoneurons (Cashman et al. 1992).

Cells were cultured on 100 mm diameter dishes (p100, Falcon Discovery Labware, BD Biosciences) and grown in temperature and CO₂ controlled incubators. When 80% confluence was reached, NSC34 cells were detached mechanically from the culture dish and divided at 1:4. Culture medium was changed every 2 days.



2.1.4 Cell line transduction and lentivirus generation

We used lentiviral transduction to generate the modified cell lines. We have used the lentiviral shRNA and overexpression constructs and followed the transduction protocol described in *Materiales y Métodos*.

3. RESULTS

3.1 SMN knockdown stable MN like cell line, NSC34

NSC34 is a mouse MN like cell line commercially available, we decided to establish a stable cell line that expresses reduced SMN protein levels using lentiviral transfection with the shRNAs for SMN shSMN1 and shSMN3. To this aim we transduced the cells with different lentiviral constructions and we performed clones selection following GFP expression as marker for transduction efficiency.

We obtained 3 different clones for empty vector, 3 clones that have integrated shSMN3 in their genome, a clone for shSMN1 and we also carried out all the experiment with non transduced cells from which we also selected 3 other clones, see Figure 120.

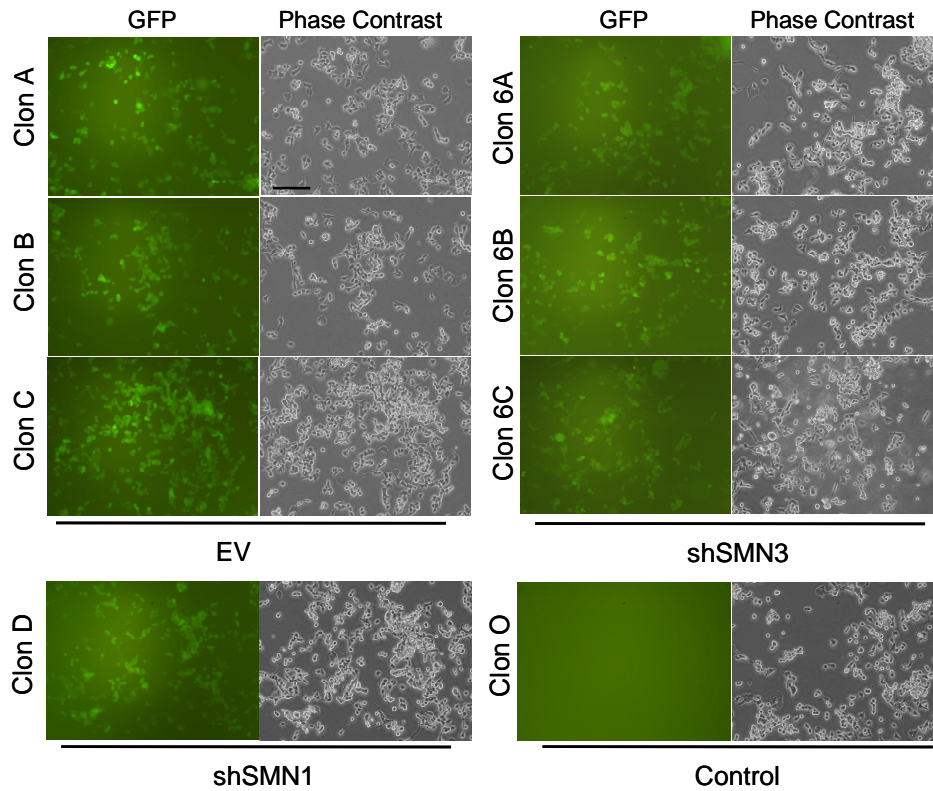


Figure 120. Microscope images from NSC34 cell clones selection transduced with EV, shSMN3 or shSMN1 constructs or not transduced (Control).

GFP is used to follow construct integration. Scale bar, 50µm.

After clone selection we performed western blot analysis to follow SMN levels of each clone (Figure 121). Once we will have pure clones we will start high throughput screening to determine specific effects of SMN down regulation in this MN like cell line, in order to follow if the same effects are occurring in our SMA primary mouse MN model. And it will also be interesting to analyze the effects in the MN differentiation process on NSC34 with low SMN protein levels.

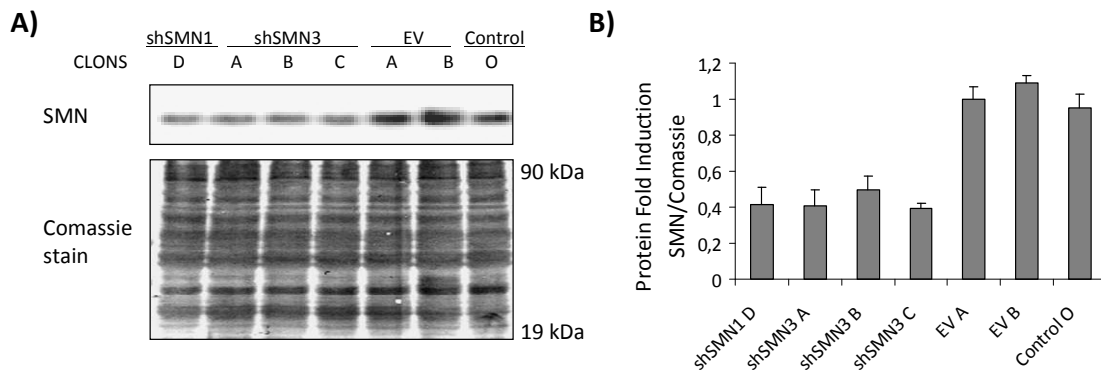


Figure 121. SMN protein levels in NSC34 clones.

Western blot analysis of SMN protein levels in NSC34 selected clones after SMN shRNA (shSMN1 D; shSMN3 A, B and C) or EV (EV, A and B) transduction, or no-transduced (Control) cells.

3.2 SMN over-expressing stable cell line, HEK 293T

SMN is a protein expressed at low quantity in cells, because of that, to purify SMN protein in large quantities; we are establishing a human cell line over-expressing human SMN. To this aim we also used the lentiviral approach. We have transduced HEK293T cell line cells with an empty vector construct (EV) which only expresses GFP and with the over-expressing vector of human SMN. All the experiments have been performed also with a non transduced control. We have selected GFP positive clones (Figure 122).

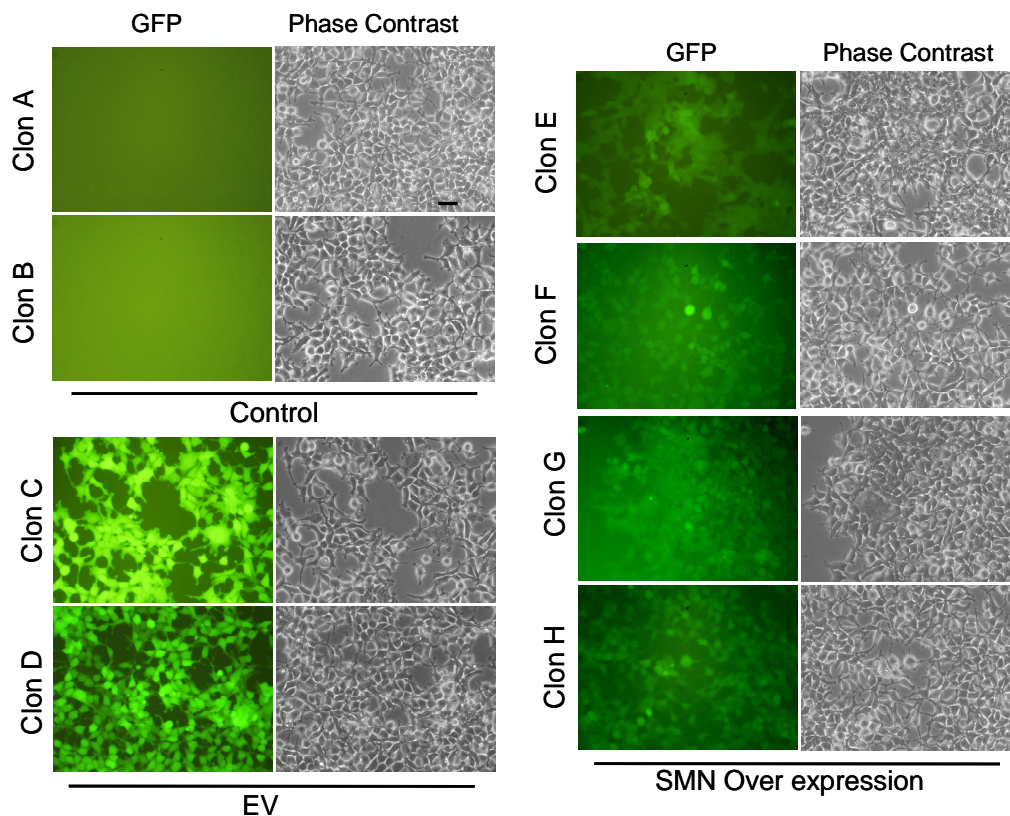


Figure 122. Microscope images from HEK 293T cell clones selection transduced with EV or SMN Over-expression constructs or not transduced (Control).

GFP is used to follow construct integration. Scale bar, 10 μ m.

From these clones we performed a second transduction and clone selection. We selected six clones (I, II, III, IV, V and X) and analysed SMN protein levels from those clones. We have chosen the clones I, IV and V which over-express the highest protein amount to perform future experiments (see Figure 123).

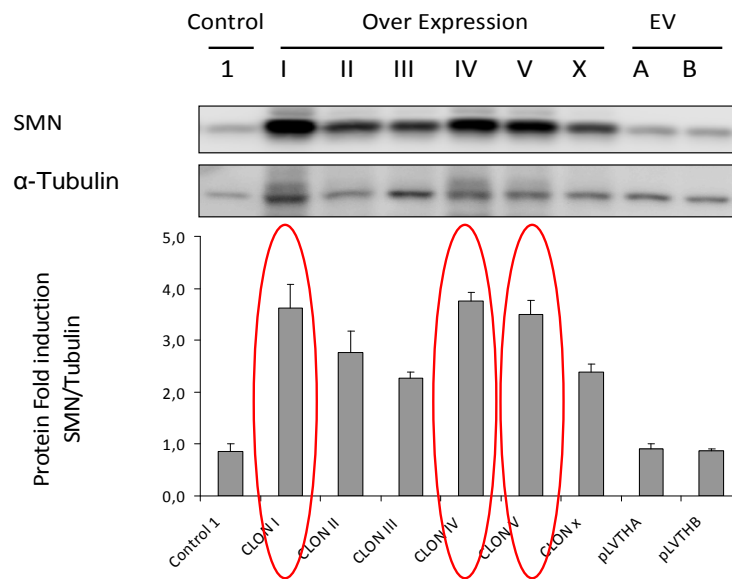


Figure 123. SMN protein levels from the different selection clones.
Western blot for SMN in HEK 293T clones.

4. DISCUSSION

Following this approach we obtained NSC34 clones that express low levels of SMN protein, that will allow us to analyze differential mechanisms on MN differentiation process and protein and gene modified patterns induced by low levels of SMN protein in future experiments. And by the other hand, as SMN protein functions are still not completely understood, we obtained HEK293T clones that over-express hSMN which we can use as a source to purify high amounts of hSMN protein to develop functional, interaction and structural assays. We used HEK293T cell line because is a human derived cell line and we over-express the human SMN protein; also because is derived from kidney cells which have been demonstrated to express high SMN protein levels.

BIBLIOGRAPHY

- Abe, K. & T. Hayashi (1997) Expression of the glial cell line-derived neurotrophic factor gene in rat brain after transient MCA occlusion. *Brain Res*, 776, 230-4.
- Acsadi, G., I. Lee, X. Li, M. Khaidakov, A. Pecinova, G. Parker & M. Hüttemann (2009) Mitochondrial dysfunction in a neural cell model of spinal muscular atrophy. *J Neurosci Res*, 87, 2748-56.
- Adamec, E., M. L. Beermann & R. A. Nixon (1998) Calpain I activation in rat hippocampal neurons in culture is NMDA receptor selective and not essential for excitotoxic cell death. *Brain Res Mol Brain Res*, 54, 35-48.
- Airaksinen, M. & M. Saarma (2002) The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci*, 3, 383-94.
- Alcántara, S., J. Frisén, J. del Río, E. Soriano, M. Barbacid & I. Silos-Santiago (1997) TrkB signaling is required for postnatal survival of CNS neurons and protects hippocampal and motor neurons from axotomy-induced cell death. *J Neurosci*, 17, 3623-33.
- Alexianu, M., B. Ho, A. Mohamed, V. La Bella, R. Smith & S. Appel (1994) The role of calcium-binding proteins in selective motoneuron vulnerability in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*, 36, 846-58.
- Andreassi, C., C. Angelozzi, F. Tiziano, T. Vitali, E. De Vincenzi, A. Boninsegna, M. Villanova, E. Bertini, A. Pini, G. Neri & C. Brahe (2004) Phenylbutyrate increases SMN expression in vitro: relevance for treatment of spinal muscular atrophy. *Eur J Hum Genet*, 12, 59-65.
- Antonellis, A., S. Lee-Lin, A. Wasterlain, P. Leo, M. Quezado, L. Goldfarb, K. Myung, S. Burgess, K. Fischbeck & E. Green (2006) Functional analyses of glycyl-tRNA synthetase mutations suggest a key role for tRNA-charging enzymes in peripheral axons. *J Neurosci*, 26, 10397-406.
- Appel, S. (1981) A unifying hypothesis for the cause of amyotrophic lateral sclerosis, parkinsonism, and Alzheimer disease. *Ann Neurol*, 10, 499-505.
- Appel, S. H., D. Beers, L. Siklos, J. I. Engelhardt & D. R. Mosier (2001) Calcium: the Darth Vader of ALS. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*, 2 Suppl 1, S47-54.
- Arakawa, Y., C. Nishijima, N. Shimizu & T. Urushidani (2002) Survival-promoting activity of nimodipine and nifedipine in rat motoneurons: implications of an intrinsic calcium toxicity in motoneurons. *J Neurochem*, 83, 150-6.
- Arakawa, Y., M. Sendtner & H. Thoenen (1990) Survival effect of ciliary neurotrophic factor (CNTF) on chick embryonic motoneurons in culture: comparison with other neurotrophic factors and cytokines. *J Neurosci*, 10, 3507-15.
- Arce, V., A. Garces, B. de Bovis, P. Filippi, C. Henderson, B. Pettmann & O. deLapeyrière (1999) Cardiotrophin-1 requires LIFRbeta to promote survival of mouse motoneurons purified by a novel technique. *J Neurosci Res*, 55, 119-26.
- Arce, V., R. Pollock, J. Philippe, D. Pennica, C. Henderson & O. deLapeyrière (1998) Synergistic effects of schwann- and muscle-derived factors on motoneuron survival involve GDNF and cardiotrophin-1 (CT-1). *J Neurosci*, 18, 1440-8.
- Arnold, A., M. Gueye, S. Guettier-Sigrist, I. Courdier-Fruh, G. Coupin, P. Poindron & J. Gies (2004) Reduced expression of nicotinic AChRs in myotubes from spinal muscular atrophy I patients. *Lab Invest*, 84, 1271-8.
- Babot, Z., R. Cristofol & C. Sunol (2005) Excitotoxic death induced by released glutamate in depolarized primary cultures of mouse cerebellar granule cells is

- dependent on GABAA receptors and niflumic acid-sensitive chloride channels. *Eur J Neurosci*, 21, 103-12.
- Baloh, R., R. Schmidt, A. Pestronk & J. Milbrandt (2007) Altered axonal mitochondrial transport in the pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth disease from mitofusin 2 mutations. *J Neurosci*, 27, 422-30.
- Banner, S., A. Fray, P. Ince, M. Steward, M. Cookson & P. Shaw (2002) The expression of the glutamate re-uptake transporter excitatory amino acid transporter 1 (EAAT1) in the normal human CNS and in motor neurone disease: an immunohistochemical study. *Neuroscience*, 109, 27-44.
- Barde, Y., D. Edgar & H. Thoenen (1982) Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J*, 1, 549-53.
- Beck, M., C. Karch, S. Wiese & M. Sendtner (2001) Motoneuron cell death and neurotrophic factors: basic models for development of new therapeutic strategies in ALS. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*, 2 Suppl 1, S55-68.
- Becker, E., R. Soler, V. Yuste, E. Giné, C. Sanz-Rodríguez, J. Egea, D. Martín-Zanca & J. Comella (1998) Development of survival responsiveness to brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin 3 and neurotrophin 4/5, but not to nerve growth factor, in cultured motoneurons from chick embryo spinal cord. *J Neurosci*, 18, 7903-11.
- Beers, D., B. Ho, L. Siklós, M. Alexianu, D. Mosier, A. Mohamed, Y. Otsuka, M. Kozovska, R. McAlhany, R. Smith & S. Appel (2001) Parvalbumin overexpression alters immune-mediated increases in intracellular calcium, and delays disease onset in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*, 79, 499-509.
- Beirowski, B., R. Adalbert, D. Wagner, D. Grumme, K. Addicks, R. Ribchester & M. Coleman (2005) The progressive nature of Wallerian degeneration in wild-type and slow Wallerian degeneration (Wlds) nerves. *BMC Neurosci*, 6, 6.
- Berger, A., J. Mayr, D. Meierhofer, U. Fötschl, R. Bittner, H. Budka, C. Grethen, M. Huemer, B. Kofler & W. Sperl (2003) Severe depletion of mitochondrial DNA in spinal muscular atrophy. *Acta Neuropathol*, 105, 245-51.
- Berridge, M. (1993) Cell signalling. A tale of two messengers. *Nature*, 365, 388-9.
- Bervers, M., L. Ingleton, D. Che, J. Cole, L. Li, T. Da, C. Kopil, A. Cohen & R. Neumar (2010) RNAi targeting micro-calpain increases neuron survival and preserves hippocampal function after global brain ischemia. *Exp Neurol*, 224, 170-7.
- Bibel, M., J. Richter, K. Schrenk, K. Tucker, V. Staiger, M. Korte, M. Goetz & Y. Barde (2004) Differentiation of mouse embryonic stem cells into a defined neuronal lineage. *Nat Neurosci*, 7, 1003-9.
- Billon, N., C. Jolicoeur, Q. Ying, A. Smith & M. Raff (2002) Normal timing of oligodendrocyte development from genetically engineered, lineage-selectable mouse ES cells. *J Cell Sci*, 115, 3657-65.
- Bissar-Tadmouri, N., E. Nelis, S. Züchner, Y. Parman, F. Deymeer, P. Serdaroglu, P. De Jonghe, V. Van Gerwen, V. Timmerman, J. Schröder & E. Battaloglu (2004) Absence of KIF1B mutation in a large Turkish CMT2A family suggests involvement of a second gene. *Neurology*, 62, 1522-5.
- Bodart, J. F. (2010) Extracellular-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase cascade: unsolved issues. *J Cell Biochem*, 109, 850-7.

- Boillée, S., C. Vande Velde & D. Cleveland (2006a) ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron*, 52, 39-59.
- Boillée, S., K. Yamanaka, C. Lobsiger, N. Copeland, N. Jenkins, G. Kassiotis, G. Kollias & D. Cleveland (2006b) Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science*, 312, 1389-92.
- Bok, J., Q. Wang, J. Huang & S. Green (2007) CaMKII and CaMKIV mediate distinct prosurvival signaling pathways in response to depolarization in neurons. *Mol Cell Neurosci*, 36, 13-26.
- Bordet, T., J. Lesbordes, S. Rouhani, L. Castelnau-Ptakhine, H. Schmalbruch, G. Haase & A. Kahn (2001) Protective effects of cardiotrophin-1 adenoviral gene transfer on neuromuscular degeneration in transgenic ALS mice. *Hum Mol Genet*, 10, 1925-33.
- Borsello, T., P. G. Clarke, L. Hirt, A. Vercelli, M. Repici, D. F. Schorderet, J. Bogousslavsky & C. Bonny (2003a) A peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase protects against excitotoxicity and cerebral ischemia. *Nat Med*, 9, 1180-6.
- Borsello, T., K. Croquelois, J. P. Hornung & P. G. Clarke (2003b) N-methyl-d-aspartate-triggered neuronal death in organotypic hippocampal cultures is endocytic, autophagic and mediated by the c-Jun N-terminal kinase pathway. *Eur J Neurosci*, 18, 473-85.
- Borthwick, G., R. Taylor, T. Walls, K. Tonska, G. Taylor, P. Shaw, P. Ince & D. Turnbull (2006) Motor neuron disease in a patient with a mitochondrial tRNAIle mutation. *Ann Neurol*, 59, 570-4.
- Bowerman, M., C. Anderson, A. Beauvais, P. Boyl, W. Witke & R. Kothary (2009) SMN, profilin IIa and plastin 3: a link between the deregulation of actin dynamics and SMA pathogenesis. *Mol Cell Neurosci*, 42, 66-74.
- Bowerman, M., A. Beauvais, C. Anderson & R. Kothary (2010) Rho-kinase inactivation prolongs survival of an intermediate SMA mouse model. *Hum Mol Genet*, 19, 1468-78.
- Brahms, H., L. Meheus, V. de Brabandere, U. Fischer & R. Lührmann (2001) Symmetrical dimethylation of arginine residues in spliceosomal Sm protein B/B' and the Sm-like protein LSm4, and their interaction with the SMN protein. *RNA*, 7, 1531-42.
- Bredesen, D., R. Rao & P. Mehlen (2006) Cell death in the nervous system. *Nature*, 443, 796-802.
- Briese, M., B. Esmaeili, S. Fraboulet, E. Burt, S. Christodoulou, P. Towers, K. Davies & D. Sattelle (2009) Deletion of *smn-1*, the *Caenorhabditis elegans* ortholog of the spinal muscular atrophy gene, results in locomotor dysfunction and reduced lifespan. *Hum Mol Genet*, 18, 97-104.
- Briscoe, J., A. Pierani, T. Jessell & J. Ericson (2000) A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell*, 101, 435-45.
- Brunet, N., O. Tarabal, M. Portero-Otín, R. Oppenheim, J. Esquerda & J. Calderó (2007) Survival and death of mature avian motoneurons in organotypic slice culture: trophic requirements for survival and different types of degeneration. *J Comp Neurol*, 501, 669-90.

- Burek, M. & R. Oppenheim (1996) Programmed cell death in the developing nervous system. *Brain Pathol*, 6, 427-46.
- Burghes, A. & C. Beattie (2009) Spinal muscular atrophy: why do low levels of survival motor neuron protein make motor neurons sick? *Nat Rev Neurosci*, 10, 597-609.
- Burke, R. (1999) Revisiting the notion of 'motor unit types'. *Prog Brain Res*, 123, 167-75.
- Burke, R., D. Levine, P. Tsairis & F. r. Zajac (1973) Physiological types and histochemical profiles in motor units of the cat gastrocnemius. *J Physiol*, 234, 723-48.
- Burnett, B., E. Muñoz, A. Tandon, D. Kwon, C. Sumner & K. Fischbeck (2009) Regulation of SMN protein stability. *Mol Cell Biol*, 29, 1107-15.
- Buss, R., W. Sun & R. Oppenheim (2006) Adaptive roles of programmed cell death during nervous system development. *Annu Rev Neurosci*, 29, 1-35.
- Bürglen, L., S. Lefebvre, O. Clermont, P. Burlet, L. Viollet, C. Cruaud, A. Munnich & J. Melki (1996) Structure and organization of the human survival motor neurone (SMN) gene. *Genomics*, 32, 479-82.
- Carrel, T., M. McWhorter, E. Workman, H. Zhang, E. Wolstencroft, C. Lorson, G. Bassell, A. Burghes & C. Beattie (2006) Survival motor neuron function in motor axons is independent of functions required for small nuclear ribonucleoprotein biogenesis. *J Neurosci*, 26, 11014-22.
- Cartegni, L. & A. Krainer (2002) Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1. *Nat Genet*, 30, 377-84.
- Carter, T., C. Bönemann, C. Wang, S. Obici, E. Parano, M. De Fatima Bonaldo, B. Ross, G. Penchaszadeh, A. Mackenzie, M. Soares, L. Kunkel & T. Gilliam (1997) A multicopy transcription-repair gene, BTF2p44, maps to the SMA region and demonstrates SMA associated deletions. *Hum Mol Genet*, 6, 229-36.
- Cashman, N., H. Durham, J. Blusztajn, K. Oda, T. Tabira, I. Shaw, S. Dahrouge & J. Antel (1992) Neuroblastoma x spinal cord (NSC) hybrid cell lines resemble developing motor neurons. *Dev Dyn*, 194, 209-21.
- Catterall, W. (2000) Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 16, 521-55.
- Cayuso, J. & E. Martí (2005) Morphogens in motion: growth control of the neural tube. *J Neurobiol*, 64, 376-87.
- Chang, H., D. Dimlich, T. Yokokura, A. Mukherjee, M. Kankel, A. Sen, V. Sridhar, T. Fulga, A. Hart, D. Van Vactor & S. Artavanis-Tsakonas (2008) Modeling spinal muscular atrophy in Drosophila. *PLoS One*, 3, e3209.
- Chang, J., H. Hsieh-Li, Y. Jong, N. Wang, C. Tsai & H. Li (2001) Treatment of spinal muscular atrophy by sodium butyrate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 9808-13.
- Chao, M. (2003) Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci*, 4, 299-309.
- Chao, M. & B. Hempstead (1995) p75 and Trk: a two-receptor system. *Trends Neurosci*, 18, 321-6.
- Chatila, T., K. Anderson, N. Ho & A. Means (1996) A unique phosphorylation-dependent mechanism for the activation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase type IV/GR. *J Biol Chem*, 271, 21542-8.

- Chen, Y., C. Bennett, H. Huynh, I. Blair, I. Puls, J. Irobi, I. Dierick, A. Abel, M. Kennerson, B. Rabin, G. Nicholson, M. Auer-Grumbach, K. Wagner, P. De Jonghe, J. Griffin, K. Fischbeck, V. Timmerman, D. Cornblath & P. Chance (2004) DNA/RNA helicase gene mutations in a form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis (ALS4). *Am J Hum Genet*, 74, 1128-35.
- Choi, C. & E. Benveniste (2004) Fas ligand/Fas system in the brain: regulator of immune and apoptotic responses. *Brain Res Brain Res Rev*, 44, 65-81.
- Cifuentes-Diaz, C., S. Nicole, M. Velasco, C. Borra-Cebrian, C. Panozzo, T. Frugier, G. Millet, N. Roblot, V. Joshi & J. Melki (2002) Neurofilament accumulation at the motor endplate and lack of axonal sprouting in a spinal muscular atrophy mouse model. *Hum Mol Genet*, 11, 1439-47.
- Clapham, D. (2007) Calcium signaling. *Cell*, 131, 1047-58.
- Clarke, P. (1990) Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol (Berl)*, 181, 195-213.
- Clarke, P., A. Posada, M. Primi & V. Castagné (1998) Neuronal death in the central nervous system during development. *Biomed Pharmacother*, 52, 356-62.
- Coleman, M. (2005) Axon degeneration mechanisms: commonality amid diversity. *Nat Rev Neurosci*, 6, 889-98.
- Comella, J., C. Sanz-Rodriguez, M. Aldea & J. Esquerda (1994) Skeletal muscle-derived trophic factors prevent motoneurons from entering an active cell death program in vitro. *J Neurosci*, 14, 2674-86.
- Coovert, D., T. Le, P. McAndrew, J. Strasswimmer, T. Crawford, J. Mendell, S. Coulson, E. Androphy, T. Prior & A. Burghes (1997) The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*, 6, 1205-14.
- Crowder, R. J. & R. S. Freeman (1998) Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt protein kinase are necessary and sufficient for the survival of nerve growth factor-dependent sympathetic neurons. *J Neurosci*, 18, 2933-43.
- Cullheim, S., J. Fleshman, L. Glenn & R. Burke (1987) Membrane area and dendritic structure in type-identified triceps surae alpha motoneurons. *J Comp Neurol*, 255, 68-81.
- Dalla Torre di Sanguinetto, S., J. Dasen & S. Arber (2008) Transcriptional mechanisms controlling motor neuron diversity and connectivity. *Curr Opin Neurobiol*, 18, 36-43.
- Damiano, M., A. A. Starkov, S. Petri, K. Kipiani, M. Kiaei, M. Mattiazzi, M. Flint Beal & G. Manfredi (2006) Neural mitochondrial Ca²⁺ capacity impairment precedes the onset of motor symptoms in G93A Cu/Zn-superoxide dismutase mutant mice. *J Neurochem*, 96, 1349-61.
- Das, A., E. A. Sribnick, J. M. Wingrave, A. M. Del Re, J. J. Woodward, S. H. Appel, N. L. Banik & S. K. Ray (2005) Calpain activation in apoptosis of ventral spinal cord 4.1 (VSC4.1) motoneurons exposed to glutamate: calpain inhibition provides functional neuroprotection. *J Neurosci Res*, 81, 551-62.
- Dasen, J. & T. Jessell (2009) Hox networks and the origins of motor neuron diversity. *Curr Top Dev Biol*, 88, 169-200.
- De Bernardi, M. A., S. J. Rabins, A. M. Colangelo, G. Brooker & I. Mocchi (1996) TrkA mediates the nerve growth factor-induced intracellular calcium accumulation. *J Biol Chem*, 271, 6092-8.

- Dekkers, J., P. Bayley, J. Dick, B. Schwaller, M. Berchtold & L. Greensmith (2004) Over-expression of parvalbumin in transgenic mice rescues motoneurons from injury-induced cell death. *Neuroscience*, 123, 459-66.
- Derouet, D., F. Rousseau, F. Alfonsi, J. Froger, J. Hermann, F. Barbier, D. Perret, C. Diveu, C. Guillet, L. Preisser, A. Dumont, M. Barbado, A. Morel, O. deLapeyrière, H. Gascan & S. Chevalier (2004) Neuropoietin, a new IL-6-related cytokine signaling through the ciliary neurotrophic factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 4827-32.
- Deshpande, D., Y. Kim, T. Martinez, J. Carmen, S. Dike, I. Shats, L. Rubin, J. Drummond, C. Krishnan, A. Hoke, N. Maragakis, J. Shefner, J. Rothstein & D. Kerr (2006) Recovery from paralysis in adult rats using embryonic stem cells. *Ann Neurol*, 60, 32-44.
- Dessi, F., C. Charriaut-Marlangue & Y. Ben-Ari (1994) Glutamate-induced neuronal death in cerebellar culture is mediated by two distinct components: a sodium-chloride component and a calcium component. *Brain Res*, 650, 49-55.
- DiDonato, C., S. Ingraham, J. Mendell, T. Prior, S. Lenard, R. r. Moxley, J. Florence & A. Burghes (1997) Deletion and conversion in spinal muscular atrophy patients: is there a relationship to severity? *Ann Neurol*, 41, 230-7.
- Dimos, J., K. Rodolfa, K. Niakan, L. Weisenthal, H. Mitsumoto, W. Chung, G. Croft, G. Saphier, R. Leibel, R. Goland, H. Wichterle, C. Henderson & K. Eggan (2008) Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science*, 321, 1218-21.
- Djukic, B., K. B. Casper, B. D. Philpot, L. S. Chin & K. D. McCarthy (2007) Conditional knock-out of Kir4.1 leads to glial membrane depolarization, inhibition of potassium and glutamate uptake, and enhanced short-term synaptic potentiation. *J Neurosci*, 27, 11354-65.
- Doble, A. (1999) The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. *Pharmacol Ther*, 81, 163-221.
- Dobrowolny, G., C. Giacinti, L. Pelosi, C. Nicoletti, N. Winn, L. Barberi, M. Molinaro, N. Rosenthal & A. Musarò (2005) Muscle expression of a local Igf-1 isoform protects motor neurons in an ALS mouse model. *J Cell Biol*, 168, 193-9.
- Dohrmann, U., D. Edgar, M. Sendtner & H. Thoenen (1986) Muscle-derived factors that support survival and promote fiber outgrowth from embryonic chick spinal motor neurons in culture. *Dev Biol*, 118, 209-21.
- Dolcet, X., J. Egea, R. Soler, D. Martin-Zanca & J. Comella (1999) Activation of phosphatidylinositol 3-kinase, but not extracellular-regulated kinases, is necessary to mediate brain-derived neurotrophic factor-induced motoneuron survival. *J Neurochem*, 73, 521-31.
- Dolcet, X., R. Soler, T. Gould, J. Egea, R. Oppenheim & J. Comella (2001) Cytokines promote motoneuron survival through the Janus kinase-dependent activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Mol Cell Neurosci*, 18, 619-31.
- Ebens, A., K. Brose, E. Leonardo, M. J. Hanson, F. Bladt, C. Birchmeier, B. Barres & M. Tessier-Lavigne (1996) Hepatocyte growth factor/scatter factor is an axonal chemoattractant and a neurotrophic factor for spinal motor neurons. *Neuron*, 17, 1157-72.

- Edwards, S. N. & A. M. Tolkovsky (1994) Characterization of apoptosis in cultured rat sympathetic neurons after nerve growth factor withdrawal. *J Cell Biol*, 124, 537-46.
- Egea, J., C. Espinet, R. Soler, S. Peiró, N. Rocamora & J. Comella (2000) Nerve growth factor activation of the extracellular signal-regulated kinase pathway is modulated by Ca(2+) and calmodulin. *Mol Cell Biol*, 20, 1931-46.
- Egea, J., C. Espinet, R. M. Soler, X. Dolcet, V. J. Yuste, M. Encinas, M. Iglesias, N. Rocamora & J. X. Comella (2001) Neuronal survival induced by neurotrophins requires calmodulin. *J Cell Biol*, 154, 585-97.
- Ellis, H. & H. Horvitz (1986) Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell*, 44, 817-29.
- Engelhardt, J., L. Siklós, L. Kömüves, R. Smith & S. Appel (1995) Antibodies to calcium channels from ALS patients passively transferred to mice selectively increase intracellular calcium and induce ultrastructural changes in motoneurons. *Synapse*, 20, 185-99.
- Errico, A., P. Claudiani, M. D'Addio & E. Rugarli (2004) Spastin interacts with the centrosomal protein NA14, and is enriched in the spindle pole, the midbody and the distal axon. *Hum Mol Genet*, 13, 2121-32.
- Espat, N., T. Auffenberg, J. Rosenberg, M. Rogy, D. Martin, C. Fang, P. Hasselgren, E. Copeland & L. Moldawer (1996) Ciliary neurotrophic factor is catabolic and shares with IL-6 the capacity to induce an acute phase response. *Am J Physiol*, 271, R185-90.
- Evans, M. & M. Kaufman (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292, 154-6.
- Fallini, C., G. Bassell & W. Rossoll (2010) High-efficiency transfection of cultured primary motor neurons to study protein localization, trafficking, and function. *Mol Neurodegener*, 5, 17.
- Ferri, A., J. Sanes, M. Coleman, J. Cunningham & A. Kato (2003) Inhibiting axon degeneration and synapse loss attenuates apoptosis and disease progression in a mouse model of motoneuron disease. *Curr Biol*, 13, 669-73.
- Forger, N., D. Prevette, O. deLapeyrière, B. de Bovis, S. Wang, P. Bartlett & R. Oppenheim (2003) Cardiotrophin-like cytokine/cytokine-like factor 1 is an essential trophic factor for lumbar and facial motoneurons in vivo. *J Neurosci*, 23, 8854-8.
- Foust, K., X. Wang, V. McGovern, L. Braun, A. Bevan, A. Haidet, T. Le, P. Morales, M. Rich, A. Burghes & B. Kaspar (2010) Rescue of the spinal muscular atrophy phenotype in a mouse model by early postnatal delivery of SMN. *Nat Biotechnol*, 28, 271-4.
- Frandsen, A. & A. Schousboe (1993) Excitatory amino acid-mediated cytotoxicity and calcium homeostasis in cultured neurons. *J Neurochem*, 60, 1202-11.
- Franklin, J. L. & E. M. Johnson, Jr. (1992) Suppression of programmed neuronal death by sustained elevation of cytoplasmic calcium. *Trends Neurosci*, 15, 501-8.
- Frebel, K. & S. Wiese (2006) Signalling molecules essential for neuronal survival and differentiation. *Biochem Soc Trans*, 34, 1287-90.
- Freund-Michel, V. & N. Frossard (2008) The nerve growth factor and its receptors in airway inflammatory diseases. *Pharmacol Ther*, 117, 52-76.

- Friese, A., J. Kaltschmidt, D. Ladle, M. Sigrist, T. Jessell & S. Arber (2009) Gamma and alpha motor neurons distinguished by expression of transcription factor Err3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 13588-93.
- Friesen, W. & G. Dreyfuss (2000) Specific sequences of the Sm and Sm-like (Lsm) proteins mediate their interaction with the spinal muscular atrophy disease gene product (SMN). *J Biol Chem*, 275, 26370-5.
- Funakoshi, H., W. Ohya, K. Kadoyama & T. Nakamura (2007) [ALS and neurotrophic factors--HGF as a novel neurotrophic and neuroregenerative factor]. *Brain Nerve*, 59, 1195-202.
- Gabanella, F., M. Butchbach, L. Saieva, C. Carissimi, A. Burghes & L. Pellizzoni (2007) Ribonucleoprotein assembly defects correlate with spinal muscular atrophy severity and preferentially affect a subset of spliceosomal snRNPs. *PLoS One*, 2, e921.
- Gallo, V., A. Kingsbury, R. Balazs & O. S. Jorgensen (1987) The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J Neurosci*, 7, 2203-13.
- Gao, J., R. Coggeshall, J. Chung, J. Wang & P. Wu (2007) Functional motoneurons develop from human neural stem cell transplants in adult rats. *Neuroreport*, 18, 565-9.
- Gao, J., R. Coggeshall, Y. Tarasenko & P. Wu (2005) Human neural stem cell-derived cholinergic neurons innervate muscle in motoneuron deficient adult rats. *Neuroscience*, 131, 257-62.
- Garcès, A., G. Haase, M. Airaksinen, J. Livet, P. Filippi & O. deLapeyrière (2000) GFRalpha 1 is required for development of distinct subpopulations of motoneuron. *J Neurosci*, 20, 4992-5000.
- Gavrulina, T., V. McGovern, E. Workman, T. Crawford, R. Gogliotti, C. DiDonato, U. Monani, G. Morris & A. Burghes (2008) Neuronal SMN expression corrects spinal muscular atrophy in severe SMA mice while muscle-specific SMN expression has no phenotypic effect. *Hum Mol Genet*, 17, 1063-75.
- Gieseemann, T., S. Rathke-Hartlieb, M. Rothkegel, J. Bartsch, S. Buchmeier, B. Jockusch & H. Jockusch (1999) A role for polyproline motifs in the spinal muscular atrophy protein SMN. Profilins bind to and colocalize with smn in nuclear gems. *J Biol Chem*, 274, 37908-14.
- Gillingwater, T., C. Ingham, K. Parry, A. Wright, J. Haley, T. Wishart, G. Arbuthnott & R. Ribchester (2006) Delayed synaptic degeneration in the CNS of Wlds mice after cortical lesion. *Brain*, 129, 1546-56.
- Gillingwater, T. & R. Ribchester (2001) Compartmental neurodegeneration and synaptic plasticity in the Wld(s) mutant mouse. *J Physiol*, 534, 627-39.
- Gillingwater, T. & R. Ribchester (2003) The relationship of neuromuscular synapse elimination to synaptic degeneration and pathology: insights from Wlds and other mutant mice. *J Neurocytol*, 32, 863-81.
- Gould, T. & H. Enomoto (2009) Neurotrophic modulation of motor neuron development. *Neuroscientist*, 15, 105-16.
- Gould, T. & R. Oppenheim (2004) The function of neurotrophic factor receptors expressed by the developing adductor motor pool in vivo. *J Neurosci*, 24, 4668-82.

- Gould, T., S. Yonemura, R. Oppenheim, S. Ohmori & H. Enomoto (2008) The neurotrophic effects of glial cell line-derived neurotrophic factor on spinal motoneurons are restricted to fusimotor subtypes. *J Neurosci*, 28, 2131-46.
- Griffith, L. & H. Schulman (1988) The multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase mediates Ca²⁺-dependent phosphorylation of tyrosine hydroxylase. *J Biol Chem*, 263, 9542-9.
- Grohmann, K., M. Schuelke, A. Diers, K. Hoffmann, B. Lucke, C. Adams, E. Bertini, H. Leonhardt-Horti, F. Muntoni, R. Ouvrier, A. Pfeufer, R. Rossi, L. Van Maldergem, J. Wilmshurst, T. Wienker, M. Sendtner, S. Rudnik-Schöneborn, K. Zerres & C. Hübner (2001) Mutations in the gene encoding immunoglobulin mu-binding protein 2 cause spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1. *Nat Genet*, 29, 75-7.
- Grosskreutz, J., L. Van Den Bosch & B. Keller (2010) Calcium dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Calcium*, 47, 165-74.
- Gurney, M., H. Pu, A. Chiu, M. Dal Canto, C. Polchow, D. Alexander, J. Caliendo, A. Hentati, Y. Kwon & H. Deng (1994) Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science*, 264, 1772-5.
- Hafezparast, M., R. Klocke, C. Ruhrberg, A. Marquardt, A. Ahmad-Annuar, S. Bowen, G. Lalli, A. Witherden, H. Hummerich, S. Nicholson, P. Morgan, R. Oozageer, J. Priestley, S. Averill, V. King, S. Ball, J. Peters, T. Toda, A. Yamamoto, Y. Hiraoka, M. Augustin, D. Korthaus, S. Wattler, P. Wabnitz, C. Dickneite, S. Lampel, F. Boehme, G. Peraus, A. Popp, M. Rudelius, J. Schlegel, H. Fuchs, M. Hrabe de Angelis, G. Schiavo, D. Shima, A. Russ, G. Stumm, J. Martin & E. Fisher (2003) Mutations in dynein link motor neuron degeneration to defects in retrograde transport. *Science*, 300, 808-12.
- HAMBURGER, V. (1958) Regression versus peripheral control of differentiation in motor hypoplasia. *Am J Anat*, 102, 365-409.
- Hamburger, V. (1975) Cell death in the development of the lateral motor column of the chick embryo. *J Comp Neurol*, 160, 535-46.
- HAMBURGER, V. & R. LEVI-MONTALCINI (1949) Proliferation, differentiation and degeneration in the spinal ganglia of the chick embryo under normal and experimental conditions. *J Exp Zool*, 111, 457-501.
- Hansen, M. R., J. Bok, A. K. Devaiah, X. M. Zha & S. H. Green (2003) Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases II and IV both promote survival but differ in their effects on axon growth in spiral ganglion neurons. *J Neurosci Res*, 72, 169-84.
- Harbison, R., K. Ryan, H. Wilkins, E. Schroeder, F. Loucks, R. Bouchard & D. Linseman (2010) Calpain Plays a Central Role in 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP(+))-Induced Neurotoxicity in Cerebellar Granule Neurons. *Neurotox Res*.
- Harper, J., C. Krishnan, J. Darman, D. Deshpande, S. Peck, I. Shats, S. Backovic, J. Rothstein & D. Kerr (2004) Axonal growth of embryonic stem cell-derived motoneurons in vitro and in motoneuron-injured adult rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 7123-8.
- Hartmann, J. & A. Konnerth (2005) Determinants of postsynaptic Ca²⁺ signaling in Purkinje neurons. *Cell Calcium*, 37, 459-66.
- Henderson, C. (1995) Neurotrophic factors as therapeutic agents in amyotrophic lateral sclerosis. Potential and pitfalls. *Adv Neurol*, 68, 235-40.

- Henderson, C. (1996) Role of neurotrophic factors in neuronal development. *Curr Opin Neurobiol*, 6, 64-70.
- Henderson, C., W. Camu, C. Mettling, A. Gouin, K. Poulsen, M. Karihaloo, J. Rullamas, T. Evans, S. McMahon & M. Armanini (1993) Neurotrophins promote motor neuron survival and are present in embryonic limb bud. *Nature*, 363, 266-70.
- Henderson, C., S. Hauser, M. Huchet, F. Dessi, F. Hentati, T. Taguchi, J. Changeux & M. Fardeau (1987) Extracts of muscle biopsies from patients with spinal muscular atrophies inhibit neurite outgrowth from spinal neurons. *Neurology*, 37, 1361-4.
- Henderson, C., H. Phillips, R. Pollock, A. Davies, C. Lemeulle, M. Armanini, L. Simmons, B. Moffet, R. Vandlen & L. Simpson LC [corrected to Simmons (1994) GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. *Science*, 266, 1062-4.
- Henderson, C., Y. Yamamoto, J. Livet, V. Arce, A. Garces & O. deLapeyrière (1998) Role of neurotrophic factors in motoneuron development. *J Physiol Paris*, 92, 279-81.
- Hendry, L. & S. John (2004) Regulation of STAT signalling by proteolytic processing. *Eur J Biochem*, 271, 4613-20.
- Herdegen, T. & J. Leah (1998) Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Res Brain Res Rev*, 28, 370-490.
- Hidaka, H., M. Asano & T. Tanaka (1981) Activity-structure relationship of calmodulin antagonists, Naphthalenesulfonamide derivatives. *Mol Pharmacol*, 20, 571-8.
- Hidaka, H. & K. Shikano (1983) [Overview on the research on calmodulin and its inhibitors]. *Nippon Rinsho*, 41, 2138-50.
- Hilliard, M. A. (2009) Axonal degeneration and regeneration: a mechanistic tug-of-war. *J Neurochem*, 108, 23-32.
- Hof, P. R., Glezer, II, F. Conde, R. A. Flagg, M. B. Rubin, E. A. Nimchinsky & D. M. Vogt Weisenhorn (1999) Cellular distribution of the calcium-binding proteins parvalbumin, calbindin, and calretinin in the neocortex of mammals: phylogenetic and developmental patterns. *J Chem Neuroanat*, 16, 77-116.
- Hofmann, Y., C. Lorson, S. Stamm, E. Androphy & B. Wirth (2000) Htra2-beta 1 stimulates an exonic splicing enhancer and can restore full-length SMN expression to survival motor neuron 2 (SMN2). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 9618-23.
- Hofmann, Y. & B. Wirth (2002) hnRNP-G promotes exon 7 inclusion of survival motor neuron (SMN) via direct interaction with Htra2-beta1. *Hum Mol Genet*, 11, 2037-49.
- Hollyday, M. & V. Hamburger (1976) Reduction of the naturally occurring motor neuron loss by enlargement of the periphery. *J Comp Neurol*, 170, 311-20.
- Holtmann, B., S. Wiese, M. Samsam, K. Grohmann, D. Pennica, R. Martini & M. Sendtner (2005) Triple knock-out of CNTF, LIF, and CT-1 defines cooperative and distinct roles of these neurotrophic factors for motoneuron maintenance and function. *J Neurosci*, 25, 1778-87.
- Hsieh-Li, H. M., J. G. Chang, Y. J. Jong, M. H. Wu, N. M. Wang, C. H. Tsai & H. Li (2000) A mouse model for spinal muscular atrophy. *Nat Genet*, 24, 66-70.

- Hughes, R., M. Sendtner & H. Thoenen (1993) Members of several gene families influence survival of rat motoneurons in vitro and in vivo. *J Neurosci Res*, 36, 663-71.
- Huttmann, K., M. Sadgrove, A. Wallraff, S. Hinterkeuser, F. Kirchhoff, C. Steinhauser & W. P. Gray (2003) Seizures preferentially stimulate proliferation of radial glia-like astrocytes in the adult dentate gyrus: functional and immunocytochemical analysis. *Eur J Neurosci*, 18, 2769-78.
- Hwang, D., H. Lee, I. Park, J. Seok, B. Kim, I. Joo & S. Kim (2009) Intrathecal transplantation of human neural stem cells overexpressing VEGF provide behavioral improvement, disease onset delay and survival extension in transgenic ALS mice. *Gene Ther*, 16, 1234-44.
- Ilieva, H., M. Polymenidou & D. W. Cleveland (2009) Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *J Cell Biol*, 187, 761-72.
- Illario, M., M. Giardino-Torchia, U. Sankar, T. Ribar, M. Galgani, L. Vitiello, A. Masci, F. Bertani, E. Ciaglia, D. Astone, G. Maulucci, A. Cavallo, M. Vitale, V. Cimini, L. Pastore, A. Means, G. Rossi & L. Racioppi (2008) Calmodulin-dependent kinase IV links Toll-like receptor 4 signaling with survival pathway of activated dendritic cells. *Blood*, 111, 723-31.
- Jablonka, S., M. Beck, B. Lechner, C. Mayer & M. Sendtner (2007) Defective Ca²⁺ channel clustering in axon terminals disturbs excitability in motoneurons in spinal muscular atrophy. *J Cell Biol*, 179, 139-49.
- Jablonka, S., K. Karle, B. Sandner, C. Andreassi, K. von Au & M. Sendtner (2006) Distinct and overlapping alterations in motor and sensory neurons in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*, 15, 511-8.
- Jablonka, S., S. Wiese & M. Sendtner (2004) Axonal defects in mouse models of motoneuron disease. *J Neurobiol*, 58, 272-86.
- Jaenisch, R. & R. Young (2008) Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell*, 132, 567-82.
- Jang, M., Y. Goo, Y. Sohn, Y. Kim, S. Lee, H. Kang, J. Cheong & J. Lee (2001) Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV stimulates nuclear factor-kappa B transactivation via phosphorylation of the p65 subunit. *J Biol Chem*, 276, 20005-10.
- Jessell, T. (2000) Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat Rev Genet*, 1, 20-9.
- Johnson, E. M., Jr., T. Koike & J. Franklin (1992) A "calcium set-point hypothesis" of neuronal dependence on neurotrophic factor. *Exp Neurol*, 115, 163-6.
- Johnson, G. & K. Nakamura (2007) The c-jun kinase/stress-activated pathway: regulation, function and role in human disease. *Biochim Biophys Acta*, 1773, 1341-8.
- Johnson, K. & S. R. D'Mello (2005) p21-Activated kinase-1 is necessary for depolarization-mediated neuronal survival. *J Neurosci Res*, 79, 809-15.
- Jones, K., K. Gorzynski, C. Hales, U. Fischer, F. Badbanchi, R. Terns & M. Terns (2001) Direct interaction of the spinal muscular atrophy disease protein SMN with the small nucleolar RNA-associated protein fibrillarin. *J Biol Chem*, 276, 38645-51.
- Jordanova, A., J. Irobi, F. Thomas, P. Van Dijck, K. Meerschaert, M. Dewil, I. Dierick, A. Jacobs, E. De Vriendt, V. Guergueltcheva, C. Rao, I. Tournev, F. Gondim, M. D'Hooghe, V. Van Gerwen, P. Callaerts, L. Van Den Bosch, J. Timmermans, W.

- Robberecht, J. Gettemans, J. Thevelein, P. De Jonghe, I. Kremensky & V. Timmerman (2006) Disrupted function and axonal distribution of mutant tyrosyl-tRNA synthetase in dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Nat Genet*, 38, 197-202.
- Joza, N., G. Kroemer & J. Penninger (2002) Genetic analysis of the mammalian cell death machinery. *Trends Genet*, 18, 142-9.
- Kaiser, M., I. Maletzki, S. Hülsmann, B. Holtmann, W. Schulz-Schaeffer, F. Kirchhoff, M. Bähr & C. Neusch (2006a) Progressive loss of a glial potassium channel (KCNJ10) in the spinal cord of the SOD1 (G93A) transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*, 99, 900-12.
- Kaiser, M., I. Maletzki, S. Hülsmann, B. Holtmann, W. Schulz-Schaeffer, F. Kirchhoff, M. Bähr & C. Neusch (2006b) Progressive loss of a glial potassium channel (KCNJ10) in the spinal cord of the SOD1 (G93A) transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*, 99, 900-12.
- Kang, H., L. Sun, C. Atkins, T. Soderling, M. Wilson & S. Tonegawa (2001) An important role of neural activity-dependent CaMKIV signaling in the consolidation of long-term memory. *Cell*, 106, 771-83.
- Kanning, K., A. Kaplan & C. Henderson (2010) Motor neuron diversity in development and disease. *Annu Rev Neurosci*, 33, 409-40.
- Kaplan, D. & F. Miller (2000) Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol*, 10, 381-91.
- Kashima, T. & J. Manley (2003) A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy. *Nat Genet*, 34, 460-3.
- Kashima, T., N. Rao, C. David & J. Manley (2007a) hnRNP A1 functions with specificity in repression of SMN2 exon 7 splicing. *Hum Mol Genet*, 16, 3149-59.
- Kashima, T., N. Rao & J. Manley (2007b) An intronic element contributes to splicing repression in spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 3426-31.
- Kerr, D., J. Nery, R. Traystman, B. Chau & J. Hardwick (2000) Survival motor neuron protein modulates neuron-specific apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 13312-7.
- Kerr, J., A. Wyllie & A. Currie (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26, 239-57.
- Kieran, D., M. Hafezparast, S. Bohnert, J. Dick, J. Martin, G. Schiavo, E. Fisher & L. Greensmith (2005) A mutation in dynein rescues axonal transport defects and extends the life span of ALS mice. *J Cell Biol*, 169, 561-7.
- Kieran, D., J. Sebastia, M. Greenway, M. King, D. Connaughton, C. Concannon, B. Fenner, O. Hardiman & J. Prehn (2008) Control of motoneuron survival by angiogenin. *J Neurosci*, 28, 14056-61.
- Kim, H., W. Im, S. Kim, S. Kim, J. Sung, M. Kim & K. Lee (2007) Calcium-influx increases SOD1 aggregates via nitric oxide in cultured motor neurons. *Exp Mol Med*, 39, 574-82.
- King, A. E., T. C. Dickson, C. A. Blizzard, A. Woodhouse, S. S. Foster, R. S. Chung & J. C. Vickers (2009) Neuron-glia interactions underlie ALS-like axonal cytoskeletal pathology. *Neurobiol Aging*.
- Kitsos, C., U. Sankar, M. Illario, J. Colomer-Font, A. Duncan, T. Ribar, T. Reya & A. Means (2005) Calmodulin-dependent protein kinase IV regulates hematopoietic stem cell maintenance. *J Biol Chem*, 280, 33101-8.

- Kofuji, P., P. Ceelen, K. R. Zahs, L. W. Surbeck, H. A. Lester & E. A. Newman (2000) Genetic inactivation of an inwardly rectifying potassium channel (Kir4.1 subunit) in mice: phenotypic impact in retina. *J Neurosci*, 20, 5733-40.
- Korsching, S. (1993) The neurotrophic factor concept: a reexamination. *J Neurosci*, 13, 2739-48.
- Kotera, I., T. Sekimoto, Y. Miyamoto, T. Saiwaki, E. Nagoshi, H. Sakagami, H. Kondo & Y. Yoneda (2005) Importin alpha transports CaMKIV to the nucleus without utilizing importin beta. *EMBO J*, 24, 942-51.
- La Bella, V., C. Cisterni, D. Salaün & B. Pettmann (1998) Survival motor neuron (SMN) protein in rat is expressed as different molecular forms and is developmentally regulated. *Eur J Neurosci*, 10, 2913-23.
- LaFerla, F. (2002) Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*, 3, 862-72.
- Lambrechts, D., W. Robberecht & P. Carmeliet (2007) Heterogeneity in motoneuron disease. *Trends Neurosci*, 30, 536-44.
- Le, T., L. Pham, M. Butchbach, H. Zhang, U. Monani, D. Covert, T. Gavriline, L. Xing, G. Bassell & A. Burghes (2005) SMNDelta7, the major product of the centromeric survival motor neuron (SMN2) gene, extends survival in mice with spinal muscular atrophy and associates with full-length SMN. *Hum Mol Genet*, 14, 845-57.
- Lee, H., G. Shamy, Y. Elkabetz, C. Schofield, N. Harrision, G. Panagiotakos, N. Socci, V. Tabar & L. Studer (2007) Directed differentiation and transplantation of human embryonic stem cell-derived motoneurons. *Stem Cells*, 25, 1931-9.
- Lee, L. L., E. Galo, B. G. Lyeth, J. P. Muizelaar & R. F. Berman (2004) Neuroprotection in the rat lateral fluid percussion model of traumatic brain injury by SNX-185, an N-type voltage-gated calcium channel blocker. *Exp Neurol*, 190, 70-8.
- Lefebvre, S., P. Burlet, Q. Liu, S. Bertrand, O. Clermont, A. Munnich, G. Dreyfuss & J. Melki (1997) Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy. *Nat Genet*, 16, 265-9.
- Lefebvre, S., P. Burlet, L. Viollet, S. Bertrand, C. Huber, C. Belser & A. Munnich (2002) A novel association of the SMN protein with two major non-ribosomal nucleolar proteins and its implication in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*, 11, 1017-27.
- Lefebvre, S., L. Bürglen, S. Reboullet, O. Clermont, P. Burlet, L. Viollet, B. Benichou, C. Cruaud, P. Millasseau & M. Zeviani (1995) Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell*, 80, 155-65.
- Lemrow, S., K. Anderson, J. Joseph, T. Ribar, P. Noeldner & A. Means (2004) Catalytic activity is required for calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV to enter the nucleus. *J Biol Chem*, 279, 11664-71.
- Lesbordes, J., C. Cifuentes-Diaz, A. Miroglio, V. Joshi, T. Bordet, A. Kahn & J. Melki (2003) Therapeutic benefits of cardiotrophin-1 gene transfer in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*, 12, 1233-9.
- LEVI-MONTALCINI, R. (1964) GROWTH CONTROL OF NERVE CELLS BY A PROTEIN FACTOR AND ITS ANTISERUM: DISCOVERY OF THIS FACTOR MAY PROVIDE NEW LEADS TO UNDERSTANDING OF SOME NEUROGENETIC PROCESSES. *Science*, 143, 105-10.

- Levine, B. & D. Klionsky (2004) Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell*, 6, 463-77.
- Levine, B. & G. Kroemer (2008) Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 132, 27-42.
- Li, J., B. Lee & A. Lee (2006) Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) and NOXA by p53. *J Biol Chem*, 281, 7260-70.
- Li, W., D. Brakefield, Y. Pan, D. Hunter, T. Myckatyn & A. Parsadanian (2007) Muscle-derived but not centrally derived transgene GDNF is neuroprotective in G93A-SOD1 mouse model of ALS. *Exp Neurol*, 203, 457-71.
- Lin, L., D. Doherty, J. Lile, S. Bektesh & F. Collins (1993) GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science*, 260, 1130-2.
- Lindvall, O. & Z. Kokaia (2006) Stem cells for the treatment of neurological disorders. *Nature*, 441, 1094-6.
- Liu, Q., U. Fischer, F. Wang & G. Dreyfuss (1997) The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN, and its associated protein SIP1 are in a complex with spliceosomal snRNP proteins. *Cell*, 90, 1013-21.
- Liu, R., J. Cai, X. Hu, M. Tan, Y. Qi, M. German, J. Rubenstein, M. Sander & M. Qiu (2003) Region-specific and stage-dependent regulation of Olig gene expression and oligodendrogenesis by Nkx6.1 homeodomain transcription factor. *Development*, 130, 6221-31.
- Liu, X., T. Van Vleet & R. Schnellmann (2004) The role of calpain in oncotic cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 44, 349-70.
- Liu, Y. & D. Storm (1990) Regulation of free calmodulin levels by neuromodulin: neuron growth and regeneration. *Trends Pharmacol Sci*, 11, 107-11.
- Llovera, M., Y. de Pablo, J. Egea, M. Encinas, S. Peiró, D. Martín-Zanca, N. Rocamora & J. Comella (2004) Trk is a calmodulin-binding protein: implications for receptor processing. *J Neurochem*, 88, 422-33.
- Loebel, D., C. Watson, R. De Young & P. Tam (2003) Lineage choice and differentiation in mouse embryos and embryonic stem cells. *Dev Biol*, 264, 1-14.
- LoPiccolo, J., G. Blumenthal, W. Bernstein & P. Dennis (2008) Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations. *Drug Resist Updat*, 11, 32-50.
- Lorson, C. & E. Androphy (2000) An exonic enhancer is required for inclusion of an essential exon in the SMA-determining gene SMN. *Hum Mol Genet*, 9, 259-65.
- Lorson, C., J. Strasswimmer, J. Yao, J. Baleja, E. Hahnen, B. Wirth, T. Le, A. Burghes & E. Androphy (1998) SMN oligomerization defect correlates with spinal muscular atrophy severity. *Nat Genet*, 19, 63-6.
- Lum, J., D. Bauer, M. Kong, M. Harris, C. Li, T. Lindsten & C. Thompson (2005) Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell*, 120, 237-48.
- Lunn, E., V. Perry, M. Brown, H. Rosen & S. Gordon (1989) Absence of Wallerian Degeneration does not Hinder Regeneration in Peripheral Nerve. *Eur J Neurosci*, 1, 27-33.
- Lunn, J., S. Sakowski, B. Kim, A. Rosenberg & E. Feldman (2009) Vascular endothelial growth factor prevents G93A-SOD1-induced motor neuron degeneration. *Dev Neurobiol*, 69, 871-84.

- Maina, F. & R. Klein (1999) Hepatocyte growth factor, a versatile signal for developing neurons. *Nat Neurosci*, 2, 213-7.
- Maina, F., G. Panté, F. Helmbacher, R. Andres, A. Porthin, A. Davies, C. Ponzetto & R. Klein (2001) Coupling Met to specific pathways results in distinct developmental outcomes. *Mol Cell*, 7, 1293-306.
- Manabe, Y., I. Nagano, M. Gazi, T. Murakami, M. Shiote, M. Shoji, H. Kitagawa, Y. Setoguchi & K. Abe (2002) Adenovirus-mediated gene transfer of glial cell line-derived neurotrophic factor prevents motor neuron loss of transgenic model mice for amyotrophic lateral sclerosis. *Apoptosis*, 7, 329-34.
- Martin, D., R. Schmidt, P. DiStefano, O. Lowry, J. Carter & E. J. Johnson (1988) Inhibitors of protein synthesis and RNA synthesis prevent neuronal death caused by nerve growth factor deprivation. *J Cell Biol*, 106, 829-44.
- Mattis, V., A. Ebert, M. Fosso, C. Chang & C. Lorson (2009) Delivery of a read-through inducing compound, TC007, lessens the severity of a spinal muscular atrophy animal model. *Hum Mol Genet*, 18, 3906-13.
- Mattson, M. P., P. B. Guthrie & S. B. Kater (1989) A role for Na⁺-dependent Ca²⁺ extrusion in protection against neuronal excitotoxicity. *Faseb J*, 3, 2519-26.
- McAndrew, P., D. Parsons, L. Simard, C. Rochette, P. Ray, J. Mendell, T. Prior & A. Burghes (1997) Identification of proximal spinal muscular atrophy carriers and patients by analysis of SMNT and SMNC gene copy number. *Am J Hum Genet*, 60, 1411-22.
- McGovern, V., T. Gavrilina, C. Beattie & A. Burghes (2008) Embryonic motor axon development in the severe SMA mouse. *Hum Mol Genet*, 17, 2900-9.
- McKay, S., A. Garner, J. Caldero, R. Tucker, T. Large & R. Oppenheim (1996) The expression of trkB and p75 and the role of BDNF in the developing neuromuscular system of the chick embryo. *Development*, 122, 715-24.
- McMahon, A. (2000) Neural patterning: the role of Nkx genes in the ventral spinal cord. *Genes Dev*, 14, 2261-4.
- McWhorter, M., U. Monani, A. Burghes & C. Beattie (2003) Knockdown of the survival motor neuron (Smn) protein in zebrafish causes defects in motor axon outgrowth and pathfinding. *J Cell Biol*, 162, 919-31.
- Meador, W., A. Means & F. Quijcho (1992) Target enzyme recognition by calmodulin: 2.4 A structure of a calmodulin-peptide complex. *Science*, 257, 1251-5.
- Meador, W., A. Means & F. Quijcho (1993) Modulation of calmodulin plasticity in molecular recognition on the basis of x-ray structures. *Science*, 262, 1718-21.
- Meier, P., A. Finch & G. Evan (2000) Apoptosis in development. *Nature*, 407, 796-801.
- Meister, G. & U. Fischer (2002) Assisted RNP assembly: SMN and PRMT5 complexes cooperate in the formation of spliceosomal UsnRNPs. *EMBO J*, 21, 5853-63.
- Melander Gradin, H., U. Marklund, N. Larsson, T. A. Chatila & M. Gullberg (1997) Regulation of microtubule dynamics by Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase IV/Gr-dependent phosphorylation of oncoprotein 18. *Mol Cell Biol*, 17, 3459-67.
- Melki, J., S. Lefebvre, L. Burglen, P. Burlet, O. Clermont, P. Millasseau, S. Reboullet, B. Bénichou, M. Zeviani & D. Le Paslier (1994) De novo and inherited deletions of the 5q13 region in spinal muscular atrophies. *Science*, 264, 1474-7.
- Melki, J., P. Sheth, S. Abdelhak, P. Burlet, M. Bachelot, M. Lathrop, J. Frezal & A. Munnich (1990) Mapping of acute (type I) spinal muscular atrophy to

- chromosome 5q12-q14. The French Spinal Muscular Atrophy Investigators. *Lancet*, 336, 271-3.
- Mi, R., W. Chen & A. Höke (2007) Pleiotrophin is a neurotrophic factor for spinal motor neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 4664-9.
- Mielke, K. & T. Herdegen (2000) JNK and p38 stresskinases--degenerative effectors of signal-transduction-cascades in the nervous system. *Prog Neurobiol*, 61, 45-60.
- Miller, A. L., D. M. Prieskorn, R. A. Altschuler & J. M. Miller (2003) Mechanism of electrical stimulation-induced neuroprotection: effects of verapamil on protection of primary auditory afferents. *Brain Res*, 966, 218-30.
- Milligan, C., R. Oppenheim & L. Schwartz (1994) Motoneurons deprived of trophic support in vitro require new gene expression to undergo programmed cell death. *J Neurobiol*, 25, 1005-16.
- Mir, M., V. Asensio, L. Tolosa, M. Gou-Fabregas, R. Soler, J. Lladó & G. Olmos (2009) Tumor necrosis factor alpha and interferon gamma cooperatively induce oxidative stress and motoneuron death in rat spinal cord embryonic explants. *Neuroscience*, 162, 959-71.
- Mizusawa, H., S. Matsumoto, S. Yen, A. Hirano, R. Rojas-Corona & H. Donnenfeld (1989) Focal accumulation of phosphorylated neurofilaments within anterior horn cell in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol*, 79, 37-43.
- Mizushima, N. (2005) The pleiotropic role of autophagy: from protein metabolism to bactericide. *Cell Death Differ*, 12 Suppl 2, 1535-41.
- Monani, U. (2005) Spinal muscular atrophy: a deficiency in a ubiquitous protein; a motor neuron-specific disease. *Neuron*, 48, 885-96.
- Monani, U., C. Lorson, D. Parsons, T. Prior, E. Androphy, A. Burghes & J. McPherson (1999) A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2. *Hum Mol Genet*, 8, 1177-83.
- Monani, U. R., M. Sendtner, D. D. Coover, D. W. Parsons, C. Andreassi, T. T. Le, S. Jablonka, B. Schrank, W. Rossoll, T. W. Prior, G. E. Morris & A. H. Burghes (2000) The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in *Smn(-/-)* mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*, 9, 333-9.
- Murray, L., L. Comley, D. Thomson, N. Parkinson, K. Talbot & T. Gillingwater (2008a) Selective vulnerability of motor neurons and dissociation of pre- and post-synaptic pathology at the neuromuscular junction in mouse models of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*, 17, 949-62.
- Murray, L., D. Thomson, A. Conklin, T. Wishart & T. Gillingwater (2008b) Loss of translation elongation factor (eEF1A2) expression in vivo differentiates between Wallerian degeneration and dying-back neuronal pathology. *J Anat*, 213, 633-45.
- Murry, C. & G. Keller (2008) Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell*, 132, 661-80.
- Nath, R., K. J. Raser, D. Stafford, I. Hajimohammadreza, A. Posner, H. Allen, R. V. Talanian, P. Yuen, R. B. Gilbertsen & K. K. Wang (1996) Non-erythroid alpha-spectrin breakdown by calpain and interleukin 1 beta-converting-enzyme-like protease(s) in apoptotic cells: contributory roles of both protease families in neuronal apoptosis. *Biochem J*, 319 (Pt 3), 683-90.

- Neff, N., D. Prevet, L. Houenou, M. Lewis, M. Glicksman, Q. Yin & R. Oppenheim (1993) Insulin-like growth factors: putative muscle-derived trophic agents that promote motoneuron survival. *J Neurobiol*, 24, 1578-88.
- Neusch, C., N. Rozengurt, R. E. Jacobs, H. A. Lester & P. Kofuji (2001) Kir4.1 potassium channel subunit is crucial for oligodendrocyte development and in vivo myelination. *J Neurosci*, 21, 5429-38.
- Nikoletopoulou, V., H. Lickert, J. Frade, C. Rencurel, P. Giallonardo, L. Zhang, M. Bibel & Y. Barde (2010) Neurotrophin receptors TrkA and TrkC cause neuronal death whereas TrkB does not. *Nature*, 467, 59-63.
- Nishimune, H., J. Sanes & S. Carlson (2004) A synaptic laminin-calcium channel interaction organizes active zones in motor nerve terminals. *Nature*, 432, 580-7.
- Nolden, M., S. Ehses, M. Koppen, A. Bernacchia, E. Rugarli & T. Langer (2005) The m-AAA protease defective in hereditary spastic paraplegia controls ribosome assembly in mitochondria. *Cell*, 123, 277-89.
- Novak, K., D. Prevet, S. Wang, T. Gould & R. Oppenheim (2000) Hepatocyte growth factor/scatter factor is a neurotrophic survival factor for lumbar but not for other somatic motoneurons in the chick embryo. *J Neurosci*, 20, 326-37.
- Obermeier, A., R. Bradshaw, K. Seedorf, A. Choidas, J. Schlessinger & A. Ullrich (1994) Neuronal differentiation signals are controlled by nerve growth factor receptor/Trk binding sites for SHC and PLC gamma. *EMBO J*, 13, 1585-90.
- Oppenheim, R. (1989) The neurotrophic theory and naturally occurring motoneuron death. *Trends Neurosci*, 12, 252-5.
- Oppenheim, R. (1991) Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci*, 14, 453-501.
- Oppenheim, R. (1996) Neurotrophic survival molecules for motoneurons: an embarrassment of riches. *Neuron*, 17, 195-7.
- Oppenheim, R., K. Blomgren, D. Ethell, M. Koike, M. Komatsu, D. Prevet, K. Roth, Y. Uchiyama, S. Vinsant & C. Zhu (2008) Developing postmitotic mammalian neurons in vivo lacking Apaf-1 undergo programmed cell death by a caspase-independent, nonapoptotic pathway involving autophagy. *J Neurosci*, 28, 1490-7.
- Oppenheim, R., R. Flavell, S. Vinsant, D. Prevet, C. Kuan & P. Rakic (2001a) Programmed cell death of developing mammalian neurons after genetic deletion of caspases. *J Neurosci*, 21, 4752-60.
- Oppenheim, R., D. Prevet, Q. Yin, F. Collins & J. MacDonald (1991) Control of embryonic motoneuron survival in vivo by ciliary neurotrophic factor. *Science*, 251, 1616-8.
- Oppenheim, R., S. Wiese, D. Prevet, M. Armanini, S. Wang, L. Houenou, B. Holtmann, R. Gotz, D. Pennica & M. Sendtner (2001b) Cardiotrophin-1, a muscle-derived cytokine, is required for the survival of subpopulations of developing motoneurons. *J Neurosci*, 21, 1283-91.
- Oprea, G., S. Kröber, M. McWhorter, W. Rossoll, S. Müller, M. Krawczak, G. Bassell, C. Beattie & B. Wirth (2008) Plastin 3 is a protective modifier of autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Science*, 320, 524-7.
- Oskoui, M. & P. Kaufmann (2008) Spinal muscular atrophy. *Neurotherapeutics*, 5, 499-506.

- Otter, S., M. Grimmeler, N. Neuenkirchen, A. Chari, A. Sickmann & U. Fischer (2007) A comprehensive interaction map of the human survival of motor neuron (SMN) complex. *J Biol Chem*, 282, 5825-33.
- Pachnis, V., B. Mankoo & F. Costantini (1993) Expression of the c-ret proto-oncogene during mouse embryogenesis. *Development*, 119, 1005-17.
- Park, G. H., Y. Maeno-Hikichi, T. Awano, L. T. Landmesser & U. R. Monani (2010) Reduced Survival of Motor Neuron (SMN) Protein in Motor Neuronal Progenitors Functions Cell Autonomously to Cause Spinal Muscular Atrophy in Model Mice Expressing the Human Centromeric (SMN2) Gene. *J Neurosci*, 30, 12005-19.
- Park, I., R. Zhao, J. West, A. Yabuuchi, H. Huo, T. Ince, P. Lerou, M. Lensch & G. Daley (2008) Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*, 451, 141-6.
- Passier, R., H. Zeng, N. Frey, F. Naya, R. Nicol, T. McKinsey, P. Overbeek, J. Richardson, S. Grant & E. Olson (2000) CaM kinase signaling induces cardiac hypertrophy and activates the MEF2 transcription factor in vivo. *J Clin Invest*, 105, 1395-406.
- Passini, M., J. Bu, E. Roskelley, A. Richards, S. Sardi, C. O'Riordan, K. Klinger, L. Shihabuddin & S. Cheng (2010) CNS-targeted gene therapy improves survival and motor function in a mouse model of spinal muscular atrophy. *J Clin Invest*, 120, 1253-64.
- Pearn, J. (1980) Classification of spinal muscular atrophies. *Lancet*, 1, 919-22.
- Pedraza, C., P. Podlesniy, N. Vidal, J. Arévalo, R. Lee, B. Hempstead, I. Ferrer, M. Iglesias & C. Espinet (2005) Pro-NGF isolated from the human brain affected by Alzheimer's disease induces neuronal apoptosis mediated by p75NTR. *Am J Pathol*, 166, 533-43.
- Pellizzoni, L. (2007) Chaperoning ribonucleoprotein biogenesis in health and disease. *EMBO Rep*, 8, 340-5.
- Pellizzoni, L., B. Charroux & G. Dreyfuss (1999) SMN mutants of spinal muscular atrophy patients are defective in binding to snRNP proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 11167-72.
- Pellizzoni, L., B. Charroux, J. Rappsilber, M. Mann & G. Dreyfuss (2001) A functional interaction between the survival motor neuron complex and RNA polymerase II. *J Cell Biol*, 152, 75-85.
- Pennetta, G., P. Hiesinger, R. Fabian-Fine, I. Meinertzhagen & H. Bellen (2002) Drosophila VAP-33A directs bouton formation at neuromuscular junctions in a dosage-dependent manner. *Neuron*, 35, 291-306.
- Pennica, D., V. Arce, T. Swanson, R. Vejsada, R. Pollock, M. Armanini, K. Dudley, H. Phillips, A. Rosenthal, A. Kato & C. Henderson (1996) Cardiotrophin-1, a cytokine present in embryonic muscle, supports long-term survival of spinal motoneurons. *Neuron*, 17, 63-74.
- Perez-Garcia, M. J., V. Cena, Y. de Pablo, M. Llovera, J. X. Comella & R. M. Soler (2004) Glial cell line-derived neurotrophic factor increases intracellular calcium concentration. Role of calcium/calmodulin in the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Biol Chem*, 279, 6132-42.
- Perrier, J. & J. Hounsgaard (2000) Development and regulation of response properties in spinal cord motoneurons. *Brain Res Bull*, 53, 529-35.

- Petersén A, K. Larsen, G. Behr, N. Romero, S. Przedborski, P. Brundin & D. Sulzer (2001) Expanded CAG repeats in exon 1 of the Huntington's disease gene stimulate dopamine-mediated striatal neuron autophagy and degeneration. *Hum Mol Genet*, 10, 1243-54.
- Pettmann, B. & C. Henderson (1998) Neuronal cell death. *Neuron*, 20, 633-47.
- Porter, B., J. Weis & J. Sanes (1995) A motoneuron-selective stop signal in the synaptic protein S-laminin. *Neuron*, 14, 549-59.
- Press, C. & J. Milbrandt (2008) Nmnat delays axonal degeneration caused by mitochondrial and oxidative stress. *J Neurosci*, 28, 4861-71.
- Puls, I., C. Jonnakuty, B. LaMonte, E. Holzbaur, M. Tokito, E. Mann, M. Floeter, K. Bidus, D. Drayna, S. Oh, R. J. Brown, C. Ludlow & K. Fischbeck (2003) Mutant dynactin in motor neuron disease. *Nat Genet*, 33, 455-6.
- Purves, D., W. Snider & J. Voyvodic (1988) Trophic regulation of nerve cell morphology and innervation in the autonomic nervous system. *Nature*, 336, 123-8.
- Pérez-García, M., V. Ceña, Y. de Pablo, M. Llovera, J. Comella & R. Soler (2004) Glial cell line-derived neurotrophic factor increases intracellular calcium concentration. Role of calcium/calmodulin in the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Biol Chem*, 279, 6132-42.
- Pérez-García, M., M. Gou-Fabregas, Y. de Pablo, M. Llovera, J. Comella & R. Soler (2008) Neuroprotection by neurotrophic factors and membrane depolarization is regulated by calmodulin kinase IV. *J Biol Chem*, 283, 4133-44.
- Raivich, G., M. Bohatschek, C. Da Costa, O. Iwata, M. Galiano, M. Hristova, A. Nateri, M. Makwana, L. Riera-Sans, D. Wolfer, H. Lipp, A. Aguzzi, E. Wagner & A. Behrens (2004) The AP-1 transcription factor c-Jun is required for efficient axonal regeneration. *Neuron*, 43, 57-67.
- Rajendra, T., G. Gonsalvez, M. Walker, K. Shpargel, H. Salz & A. Matera (2007) A *Drosophila melanogaster* model of spinal muscular atrophy reveals a function for SMN in striated muscle. *J Cell Biol*, 176, 831-41.
- Raker, V., K. Hartmuth, B. Kastner & R. Lührmann (1999) Spliceosomal U snRNP core assembly: Sm proteins assemble onto an Sm site RNA nonanucleotide in a specific and thermodynamically stable manner. *Mol Cell Biol*, 19, 6554-65.
- Ranganathan, S., G. Harmison, K. Meyertholen, M. Pennuto, B. Burnett & K. Fischbeck (2009) Mitochondrial abnormalities in spinal and bulbar muscular atrophy. *Hum Mol Genet*, 18, 27-42.
- Rauskolb, S., M. Zagrebelsky, A. Dreznjak, R. Deogracias, T. Matsumoto, S. Wiese, B. Erne, M. Sendtner, N. Schaeren-Wiemers, M. Korte & Y. Barde (2010) Global deprivation of brain-derived neurotrophic factor in the CNS reveals an area-specific requirement for dendritic growth. *J Neurosci*, 30, 1739-49.
- Ray, S. K., E. L. Hogan & N. L. Banik (2003) Calpain in the pathophysiology of spinal cord injury: neuroprotection with calpain inhibitors. *Brain Res Brain Res Rev*, 42, 169-85.
- Reid, E., M. Kloos, A. Ashley-Koch, L. Hughes, S. Bevan, I. Svenson, F. Graham, P. Gaskell, A. Dearlove, M. Pericak-Vance, D. Rubinsztein & D. Marchuk (2002) A kinesin heavy chain (KIF5A) mutation in hereditary spastic paraplegia (SPG10). *Am J Hum Genet*, 71, 1189-94.
- Reiner, A., L. Medina, G. Figueredo-Cardenas & S. Anfinson (1995) Brainstem motoneuron pools that are selectively resistant in amyotrophic lateral sclerosis

- are preferentially enriched in parvalbumin: evidence from monkey brainstem for a calcium-mediated mechanism in sporadic ALS. *Exp Neurol*, 131, 239-50.
- Ribera, J., V. Ayala & C. Casas (2007) Involvement of c-Jun-JNK pathways in the regulation of programmed cell death of developing chick embryo spinal cord motoneurons. *Dev Neurosci*, 29, 438-51.
- Roehm, P. C., N. Xu, E. A. Woodson, S. H. Green & M. R. Hansen (2008) Membrane depolarization inhibits spiral ganglion neurite growth via activation of multiple types of voltage sensitive calcium channels and calpain. *Mol Cell Neurosci*, 37, 376-87.
- Ronaghi, M., S. Erceg, V. Moreno-Manzano & M. Stojkovic (2010) Challenges of stem cell therapy for spinal cord injury: human embryonic stem cells, endogenous neural stem cells, or induced pluripotent stem cells? *Stem Cells*, 28, 93-9.
- Rose, F. J., V. Mattis, H. Rindt & C. Lorson (2009) Delivery of recombinant follistatin lessens disease severity in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*, 18, 997-1005.
- Rossoll, W., S. Jablonka, C. Andreassi, A. K. Kroning, K. Karle, U. R. Monani & M. Sendtner (2003) Smn, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of beta-actin mRNA in growth cones of motoneurons. *J Cell Biol*, 163, 801-12.
- Rossoll, W., A. Kröning, U. Ohndorf, C. Steegborn, S. Jablonka & M. Sendtner (2002) Specific interaction of Smn, the spinal muscular atrophy determining gene product, with hnRNP-R and gry-rbp/hnRNP-Q: a role for Smn in RNA processing in motor axons? *Hum Mol Genet*, 11, 93-105.
- Rothstein, J. (2009) Current hypotheses for the underlying biology of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*, 65 Suppl 1, S3-9.
- Rubin, L. (2008) Stem cells and drug discovery: the beginning of a new era? *Cell*, 132, 549-52.
- Russman, B. (2007) Spinal muscular atrophy: clinical classification and disease heterogeneity. *J Child Neurol*, 22, 946-51.
- Sarbassov, D., S. Ali & D. Sabatini (2005) Growing roles for the mTOR pathway. *Curr Opin Cell Biol*, 17, 596-603.
- Sariola, H. & M. Saarma (2003) Novel functions and signalling pathways for GDNF. *J Cell Sci*, 116, 3855-62.
- Sasaki, S., H. Warita, T. Komori, T. Murakami, K. Abe & M. Iwata (2006) Parvalbumin and calbindin D-28k immunoreactivity in transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. *Brain Res*, 1083, 196-203.
- Scharf, J., M. Endrizzi, A. Wetter, S. Huang, T. Thompson, K. Zerres, W. Dietrich, B. Wirth & L. Kunkel (1998) Identification of a candidate modifying gene for spinal muscular atrophy by comparative genomics. *Nat Genet*, 20, 83-6.
- Schmalbruch, H. & G. Haase (2001) Spinal muscular atrophy: present state. *Brain Pathol*, 11, 231-47.
- Schmitt-John, T., C. Drepper, A. Mussmann, P. Hahn, M. Kuhlmann, C. Thiel, M. Hafner, A. Lengeling, P. Heimann, J. Jones, M. Meisler & H. Jockusch (2005) Mutation of Vps54 causes motor neuron disease and defective spermiogenesis in the wobbler mouse. *Nat Genet*, 37, 1213-5.
- Schor, N. (2005) The p75 neurotrophin receptor in human development and disease. *Prog Neurobiol*, 77, 201-14.

- Schrank, B., R. Götz, J. Gunnensen, J. Ure, K. Toyka, A. Smith & M. Sendtner (1997) Inactivation of the survival motor neuron gene, a candidate gene for human spinal muscular atrophy, leads to massive cell death in early mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 9920-5.
- Schweichel, J. & H. Merker (1973) The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology*, 7, 253-66.
- See, V., A. L. Boutillier, H. Bito & J. P. Loeffler (2001) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type IV (CaMKIV) inhibits apoptosis induced by potassium deprivation in cerebellar granule neurons. *Faseb J*, 15, 134-144.
- Segal, R. (2003) Selectivity in neurotrophin signaling: theme and variations. *Annu Rev Neurosci*, 26, 299-330.
- Sendtner, M. (2010) Therapy development in spinal muscular atrophy. *Nat Neurosci*, 13, 795-9.
- Sendtner, M., G. Pei, M. Beck, U. Schweizer & S. Wiese (2000) Developmental motoneuron cell death and neurotrophic factors. *Cell Tissue Res*, 301, 71-84.
- Setola, V., M. Terao, D. Locatelli, S. Bassanini, E. Garattini & G. Battaglia (2007) Axonal-SMN (a-SMN), a protein isoform of the survival motor neuron gene, is specifically involved in axonogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 1959-64.
- Sharma, A., A. Lambrechts, I. T. Hao, T. Le, C. Sewry, C. Ampe, A. Burghes & G. Morris (2005) A role for complexes of survival of motor neurons (SMN) protein with gemins and profilin in neurite-like cytoplasmic extensions of cultured nerve cells. *Exp Cell Res*, 309, 185-97.
- Shi, P., Y. Wei, J. Zhang, J. Gal & H. Zhu (2010) Mitochondrial dysfunction is a converging point of multiple pathological pathways in amyotrophic lateral sclerosis. *J Alzheimers Dis*, 20 Suppl 2, S311-24.
- Shimizu, S., T. Kanaseki, N. Mizushima, T. Mizuta, S. Arakawa-Kobayashi, C. Thompson & Y. Tsujimoto (2004) Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol*, 6, 1221-8.
- Shneider, N., M. Brown, C. Smith, J. Pickel & F. Alvarez (2009) Gamma motor neurons express distinct genetic markers at birth and require muscle spindle-derived GDNF for postnatal survival. *Neural Dev*, 4, 42.
- Silos-Santiago, I., A. Fagan, M. Garber, B. Fritzscht & M. Barbacid (1997) Severe sensory deficits but normal CNS development in newborn mice lacking TrkB and TrkC tyrosine protein kinase receptors. *Eur J Neurosci*, 9, 2045-56.
- Siman, R., D. Bozyczko-Coyne, S. Meyer & R. Bhat (1999) Immunolocalization of caspase proteolysis in situ: evidence for widespread caspase-mediated apoptosis of neurons and glia in the postnatal rat brain. *Neuroscience*, 92, 1425-42.
- Simic, G. (2008) Pathogenesis of proximal autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Acta Neuropathol*, 116, 223-34.
- Simon, C., S. Jablonka, R. Ruiz, L. Tabares & M. Sendtner (2010) Ciliary neurotrophic factor-induced sprouting preserves motor function in a mouse model of mild spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*, 19, 973-86.
- Skibinski, G., N. Parkinson, J. Brown, L. Chakrabarti, S. Lloyd, H. Hummerich, J. Nielsen, J. Hodges, M. Spillantini, T. Thusgaard, S. Brandner, A. Brun, M. Rossor, A. Gade, P. Johannsen, S. Sørensen, S. Gydesen, E. Fisher & J. Collinge (2005)

- Mutations in the endosomal ESCRTIII-complex subunit CHMP2B in frontotemporal dementia. *Nat Genet*, 37, 806-8.
- Smith, A. (2001) Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 17, 435-62.
- Snider, W. (1994) Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us. *Cell*, 77, 627-38.
- Soderling, T. R. (1999) The Ca-calmodulin-dependent protein kinase cascade. *Trends Biochem Sci*, 24, 232-6.
- Soderling, T. R. & J. T. Stull (2001) Structure and regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinases. *Chem Rev*, 101, 2341-52.
- Soler, R., X. Dolcet, M. Encinas, J. Egea, J. Bayascas & J. Comella (1999) Receptors of the glial cell line-derived neurotrophic factor family of neurotrophic factors signal cell survival through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in spinal cord motoneurons. *J Neurosci*, 19, 9160-9.
- Soler, R. M., J. Egea, G. M. Mintenig, C. Sanz-Rodriguez, M. Iglesias & J. X. Comella (1998) Calmodulin is involved in membrane depolarization-mediated survival of motoneurons by phosphatidylinositol-3 kinase- and MAPK-independent pathways. *J Neurosci*, 18, 1230-9.
- Soler-Botija, C., I. Ferrer, J. Alvarez, M. Baiget & E. Tizzano (2003) Downregulation of Bcl-2 proteins in type I spinal muscular atrophy motor neurons during fetal development. *J Neuropathol Exp Neurol*, 62, 420-6.
- Sperandio, S., I. de Belle & D. Bredesen (2000) An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 14376-81.
- Stavridis, M. & A. Smith (2003) Neural differentiation of mouse embryonic stem cells. *Biochem Soc Trans*, 31, 45-9.
- Storkebaum, E., D. Lambrechts & P. Carmeliet (2004) VEGF: once regarded as a specific angiogenic factor, now implicated in neuroprotection. *Bioessays*, 26, 943-54.
- Strelau, J., A. Strzelczyk, P. Rusu, G. Bendner, S. Wiese, F. Diella, A. Altick, C. von Bartheld, R. Klein, M. Sendtner & K. Unsicker (2009) Progressive postnatal motoneuron loss in mice lacking GDF-15. *J Neurosci*, 29, 13640-8.
- Sun, P., H. Enslin, P. Myung & R. Maurer (1994) Differential activation of CREB by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases type II and type IV involves phosphorylation of a site that negatively regulates activity. *Genes Dev*, 8, 2527-39.
- Sun, W., T. Gould, J. Newbern, C. Milligan, S. Choi, H. Kim & R. Oppenheim (2005) Phosphorylation of c-Jun in avian and mammalian motoneurons in vivo during programmed cell death: an early reversible event in the apoptotic cascade. *J Neurosci*, 25, 5595-603.
- Sun, W. & R. Oppenheim (2003) Response of motoneurons to neonatal sciatic nerve axotomy in Bax-knockout mice. *Mol Cell Neurosci*, 24, 875-86.
- Syntichaki, P., K. Xu, M. Driscoll & N. Tavernarakis (2002) Specific aspartyl and calpain proteases are required for neurodegeneration in *C. elegans*. *Nature*, 419, 939-44.
- Tai, Y., S. Feng, R. Ge, W. Du, X. Zhang, Z. He & Y. Wang (2008) TRPC6 channels promote dendritic growth via the CaMKIV-CREB pathway. *J Cell Sci*, 121, 2301-7.

- Takahashi, K., K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda & S. Yamanaka (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131, 861-72.
- Takao, K., K. Tanda, K. Nakamura, J. Kasahara, K. Nakao, M. Katsuki, K. Nakanishi, N. Yamasaki, K. Toyama, M. Adachi, M. Umeda, T. Araki, K. Fukunaga, H. Kondo, H. Sakagami & T. Miyakawa (2010) Comprehensive behavioral analysis of calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV knockout mice. *PLoS One*, 5, e9460.
- Takeda, M., H. Kato, A. Takamiya, A. Yoshida & H. Kiyama (2000) Injury-specific expression of activating transcription factor-3 in retinal ganglion cells and its colocalized expression with phosphorylated c-Jun. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41, 2412-21.
- Takemura, M., T. Mishima, Y. Wang, J. Kasahara, K. Fukunaga, K. Ohashi & K. Mizuno (2009) Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV-mediated LIM kinase activation is critical for calcium signal-induced neurite outgrowth. *J Biol Chem*, 284, 28554-62.
- Tanaka, T., T. Ohmura & H. Hidaka (1983) Calmodulin antagonists' binding sites on calmodulin. *Pharmacology*, 26, 249-57.
- Tarrade, A., C. Fassier, S. Courageot, D. Charvin, J. Vitte, L. Peris, A. Thorel, E. Mouisel, N. Fonknechten, N. Roblot, D. Seilhean, A. Dierich, J. J. Hauw & J. Melki (2006) A mutation of spastin is responsible for swellings and impairment of transport in a region of axon characterized by changes in microtubule composition. *Hum Mol Genet*, 15, 3544-58.
- Taylor, J., N. Thomas, C. Lewis, S. Abbs, N. Rodrigues, K. Davies & C. Mathew (1998) Correlation of SMNt and SMNc gene copy number with age of onset and survival in spinal muscular atrophy. *Eur J Hum Genet*, 6, 467-74.
- Thoenen, H. & M. Sendtner (2002) Neurotrophins: from enthusiastic expectations through sobering experiences to rational therapeutic approaches. *Nat Neurosci*, 5 Suppl, 1046-50.
- Ting, C. H., C. W. Lin, S. L. Wen, H. M. Hsieh-Li & H. Li (2007) Stat5 constitutive activation rescues defects in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*, 16, 499-514.
- Tizzano, E., C. Cabot & M. Baiget (1998) Cell-specific survival motor neuron gene expression during human development of the central nervous system: implications for the pathogenesis of spinal muscular atrophy. *Am J Pathol*, 153, 355-61.
- Todd, A. G., R. Morse, D. J. Shaw, S. McGinley, H. Stebbings & P. J. Young (2010) SMN, Gemin2 and Gemin3 Associate with beta-Actin mRNA in the Cytoplasm of Neuronal Cells In Vitro. *J Mol Biol*.
- Tokumitsu, H., N. Hatano, M. Tsuchiya, S. Yurimoto, T. Fujimoto, N. Ohara, R. Kobayashi & H. Sakagami (2010) Identification and characterization of PRG-1 as a neuronal calmodulin-binding protein. *Biochem J*.
- Tokumitsu, H., N. Takahashi, K. Eto, S. Yano, T. Soderling & M. Muramatsu (1999) Substrate recognition by Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase kinase. Role of the arg-pro-rich insert domain. *J Biol Chem*, 274, 15803-10.

- Tolosa, L., M. Mir, V. Asensio, G. Olmos & J. Lladó (2008) Vascular endothelial growth factor protects spinal cord motoneurons against glutamate-induced excitotoxicity via phosphatidylinositol 3-kinase. *J Neurochem*, 105, 1080-90.
- Topp, J., N. Gray, R. Gerard & B. Horadzovsky (2004) Alsin is a Rab5 and Rac1 guanine nucleotide exchange factor. *J Biol Chem*, 279, 24612-23.
- Tradewell, M. & H. Durham (2010) Calpastatin reduces toxicity of SOD1G93A in a culture model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroreport*.
- Tremper-Wells, B. & M. Vallano (2005) Nuclear calpain regulates Ca²⁺-dependent signaling via proteolysis of nuclear Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase type IV in cultured neurons. *J Biol Chem*, 280, 2165-75.
- Trotta, N., G. Orso, M. Rossetto, A. Daga & K. Broadie (2004) The hereditary spastic paraplegia gene, spastin, regulates microtubule stability to modulate synaptic structure and function. *Curr Biol*, 14, 1135-47.
- Tsai, L., M. Tsai, C. Ting, S. Wang & H. Li (2008) Restoring Bcl-x(L) levels benefits a mouse model of spinal muscular atrophy. *Neurobiol Dis*, 31, 361-7.
- Tschopp, O., Z. Yang, D. Brodbeck, B. Dummler, M. Hemmings-Mieszczak, T. Watanabe, T. Michaelis, J. Frahm & B. Hemmings (2005) Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. *Development*, 132, 2943-54.
- Tsien, R., D. Lipscombe, D. Madison, K. Bley & A. Fox (1995) Reflections on Ca(2+)-channel diversity, 1988-1994. *Trends Neurosci*, 18, 52-4.
- Tsuchida, T., M. Ensini, S. Morton, M. Baldassare, T. Edlund, T. Jessell & S. Pfaff (1994) Topographic organization of embryonic motor neurons defined by expression of LIM homeobox genes. *Cell*, 79, 957-70.
- Turner, B. & K. Talbot (2008) Transgenics, toxicity and therapeutics in rodent models of mutant SOD1-mediated familial ALS. *Prog Neurobiol*, 85, 94-134.
- Vaillant, A. R., I. Mazzoni, C. Tudan, M. Boudreau, D. R. Kaplan & F. D. Miller (1999) Depolarization and neurotrophins converge on the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway to synergistically regulate neuronal survival. *J Cell Biol*, 146, 955-66.
- Valori, C., K. Ning, M. Wyles, R. Mead, A. Grierson, P. Shaw & M. Azzouz (2010) Systemic Delivery of scAAV9 Expressing SMN Prolongs Survival in a Model of Spinal Muscular Atrophy. *Sci Transl Med*, 2, 35ra42.
- Van Damme, P., A. Van Hoecke, D. Lambrechts, P. Vanacker, E. Bogaert, J. van Swieten, P. Carmeliet, L. Van Den Bosch & W. Robberecht (2008) Progranulin functions as a neurotrophic factor to regulate neurite outgrowth and enhance neuronal survival. *J Cell Biol*, 181, 37-41.
- Van Den Bosch, L., E. Storkebaum, V. Vleminckx, L. Moons, L. Vanopdenbosch, W. Scheveneels, P. Carmeliet & W. Robberecht (2004) Effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) on motor neuron degeneration. *Neurobiol Dis*, 17, 21-8.
- Vande Velde, C., T. M. Miller, N. R. Cashman & D. W. Cleveland (2008) Selective association of misfolded ALS-linked mutant SOD1 with the cytoplasmic face of mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 4022-7.
- Vanselow, B. K. & B. U. Keller (2000) Calcium dynamics and buffering in oculomotor neurones from mouse that are particularly resistant during amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-related motoneurone disease. *J Physiol*, 525 Pt 2, 433-45.

- Varon, S., M. Manthorpe & R. Adler (1979) Cholinergic neuronotrophic factors: I. Survival, neurite outgrowth and choline acetyltransferase activity in monolayer cultures from chick embryo ciliary ganglia. *Brain Res*, 173, 29-45.
- Vergara, C. & B. Ramirez (2004) CNTF, a pleiotropic cytokine: emphasis on its myotrophic role. *Brain Res Brain Res Rev*, 47, 161-73.
- Verhoeven, K., P. De Jonghe, K. Coen, N. Verpoorten, M. Auer-Grumbach, J. Kwon, D. FitzPatrick, E. Schmedding, E. De Vriendt, A. Jacobs, V. Van Gerwen, K. Wagner, H. Hartung & V. Timmerman (2003) Mutations in the small GTP-ase late endosomal protein RAB7 cause Charcot-Marie-Tooth type 2B neuropathy. *Am J Hum Genet*, 72, 722-7.
- von Lewinski, F. & B. Keller (2005) Ca²⁺, mitochondria and selective motoneuron vulnerability: implications for ALS. *Trends Neurosci*, 28, 494-500.
- Walker, M., T. Rajendra, L. Saieva, J. Fuentes, L. Pellizzoni & A. Matera (2008) SMN complex localizes to the sarcomeric Z-disc and is a proteolytic target of calpain. *Hum Mol Genet*, 17, 3399-410.
- Wang, C., R. Finkel, E. Bertini, M. Schroth, A. Simonds, B. Wong, A. Aloysius, L. Morrison, M. Main, T. Crawford, A. Trela & P. o. t. I. C. o. S. S. o. Care (2007) Consensus statement for standard of care in spinal muscular atrophy. *J Child Neurol*, 22, 1027-49.
- Wang, J., C. Pallen, R. Sharma, A. Adachi & K. Adachi (1985) The calmodulin regulatory system. *Curr Top Cell Regul*, 27, 419-36.
- Wang, K. K. (2000) Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci*, 23, 20-6.
- Wang, P., K. Koishi, A. McGeachie, M. Kimber, D. Maclaughlin, P. Donahoe & I. McLennan (2005) Mullerian inhibiting substance acts as a motor neuron survival factor in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 16421-5.
- Wang, S. L., T. J. Ribar & A. R. Means (2001) Expression of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase IV (caMKIV) messenger RNA during murine embryogenesis. *Cell Growth Differ*, 12, 351-61.
- Wayman, G., Y. Lee, H. Tokumitsu, A. Silva, A. Silva & T. Soderling (2008) Calmodulin-kinases: modulators of neuronal development and plasticity. *Neuron*, 59, 914-31.
- Wernig, M., J. Zhao, J. Pruszak, E. Hedlund, D. Fu, F. Soldner, V. Broccoli, M. Constantine-Paton, O. Isacson & R. Jaenisch (2008) Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 5856-61.
- White, L. & S. J. Barone (2001) Qualitative and quantitative estimates of apoptosis from birth to senescence in the rat brain. *Cell Death Differ*, 8, 345-56.
- Wichterle, H., I. Lieberam, J. Porter & T. Jessell (2002) Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell*, 110, 385-97.
- Wiese, S., T. Herrmann, C. Drepper, S. Jablonka, N. Funk, A. Klausmeyer, M. Rogers, R. Rush & M. Sendtner (2010) Isolation and enrichment of embryonic mouse motoneurons from the lumbar spinal cord of individual mouse embryos. *Nat Protoc*, 5, 31-8.
- Williamson, D., N. Kubica, S. Kimball & L. Jefferson (2006) Exercise-induced alterations in extracellular signal-regulated kinase 1/2 and mammalian target of rapamycin

- (mTOR) signalling to regulatory mechanisms of mRNA translation in mouse muscle. *J Physiol*, 573, 497-510.
- Wilson, J., I. Khabazian, D. Pow, U. Craig & C. Shaw (2003) Decrease in glial glutamate transporter variants and excitatory amino acid receptor down-regulation in a murine model of ALS-PDC. *Neuromolecular Med*, 3, 105-18.
- Wirth, B. (2000) An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA). *Hum Mutat*, 15, 228-37.
- Wong, V., D. Glass, R. Arriaga, G. Yancopoulos, R. Lindsay & G. Conn (1997) Hepatocyte growth factor promotes motor neuron survival and synergizes with ciliary neurotrophic factor. *J Biol Chem*, 272, 5187-91.
- Workman, E., L. Saieva, T. Carrel, T. Crawford, D. Liu, C. Lutz, C. Beattie, L. Pellizzoni & A. Burghes (2009) A SMN missense mutation complements SMN2 restoring snRNPs and rescuing SMA mice. *Hum Mol Genet*, 18, 2215-29.
- Wu, H., S. Kanatous, F. Thurmond, T. Gallardo, E. Isotani, R. Bassel-Duby & R. Williams (2002) Regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle by CaMK. *Science*, 296, 349-52.
- Wu, J., T. Ribar, D. Cummings, K. Burton, G. McKnight & A. Means (2000) Spermiogenesis and exchange of basic nuclear proteins are impaired in male germ cells lacking Camk4. *Nat Genet*, 25, 448-52.
- Yamamoto, Y. & C. Henderson (1999) Patterns of programmed cell death in populations of developing spinal motoneurons in chicken, mouse, and rat. *Dev Biol*, 214, 60-71.
- Yamamoto, Y., J. Livet, R. Pollock, A. Garces, V. Arce, O. deLapeyrière & C. Henderson (1997) Hepatocyte growth factor (HGF/SF) is a muscle-derived survival factor for a subpopulation of embryonic motoneurons. *Development*, 124, 2903-13.
- Yang, D. D., C. Y. Kuan, A. J. Whitmarsh, M. Rincon, T. S. Zheng, R. J. Davis, P. Rakic & R. A. Flavell (1997) Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene. *Nature*, 389, 865-70.
- Yano, S., H. Tokumitsu & T. R. Soderling (1998) Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway. *Nature*, 396, 584-7.
- Yeo, W. & J. Gautier (2004) Early neural cell death: dying to become neurons. *Dev Biol*, 274, 233-44.
- Ying, Q., M. Stavridis, D. Griffiths, M. Li & A. Smith (2003) Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nat Biotechnol*, 21, 183-6.
- Yu, F. & W. Catterall (2004) The VGL-chnome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. *Sci STKE*, 2004, re15.
- Yu, J., M. Vodyanik, K. Smuga-Otto, J. Antosiewicz-Bourget, J. Frane, S. Tian, J. Nie, G. Jonsdottir, V. Ruotti, R. Stewart, I. Slukvin & J. Thomson (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318, 1917-20.
- Yu, S., H. Wang, M. Poitras, C. Coombs, W. Bowers, H. Federoff, G. Poirier, T. Dawson & V. Dawson (2002) Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science*, 297, 259-63.

- Yu, T., S. Scully, Y. Yu, G. Fox, S. Jing & R. Zhou (1998) Expression of GDNF family receptor components during development: implications in the mechanisms of interaction. *J Neurosci*, 18, 4684-96.
- Yuan, J., M. Lipinski & A. Degterev (2003) Diversity in the mechanisms of neuronal cell death. *Neuron*, 40, 401-13.
- Yuan, J. & B. Yankner (2000) Apoptosis in the nervous system. *Nature*, 407, 802-9.
- Zhang, H., F. Pan, D. Hong, S. Shenoy, R. Singer & G. Bassell (2003) Active transport of the survival motor neuron protein and the role of exon-7 in cytoplasmic localization. *J Neurosci*, 23, 6627-37.
- Zhang, H., N. Robinson, C. Wu, W. Wang & M. Harrington (2010) Electrophysiological properties of motor neurons in a mouse model of severe spinal muscular atrophy: in vitro versus in vivo development. *PLoS One*, 5, e11696.
- Zhang, H., L. Xing, W. Rossoll, H. Wichterle, R. Singer & G. Bassell (2006) Multiprotein complexes of the survival of motor neuron protein SMN with Gemins traffic to neuronal processes and growth cones of motor neurons. *J Neurosci*, 26, 8622-32.
- Zhang, Z., F. Lotti, K. Dittmar, I. Younis, L. Wan, M. Kasim & G. Dreyfuss (2008) SMN deficiency causes tissue-specific perturbations in the repertoire of snRNAs and widespread defects in splicing. *Cell*, 133, 585-600.
- Zhao, C., J. Takita, Y. Tanaka, M. Setou, T. Nakagawa, S. Takeda, H. Yang, S. Terada, T. Nakata, Y. Takei, M. Saito, S. Tsuji, Y. Hayashi & N. Hirokawa (2001) Charcot-Marie-Tooth disease type 2A caused by mutation in a microtubule motor KIF1Bbeta. *Cell*, 105, 587-97.
- Zhou, J., W. Du, K. Zhou, Y. Tai, H. Yao, Y. Jia, Y. Ding & Y. Wang (2008) Critical role of TRPC6 channels in the formation of excitatory synapses. *Nat Neurosci*, 11, 741-3.
- Züchner, S., I. Mersiyanova, M. Muglia, N. Bissar-Tadmouri, J. Rochelle, E. Dadali, M. Zappia, E. Nelis, A. Patitucci, J. Senderek, Y. Parman, O. Evgrafov, P. Jonghe, Y. Takahashi, S. Tsuji, M. Pericak-Vance, A. Quattrone, E. Battaloglu, A. Polyakov, V. Timmerman, J. Schröder, J. Vance & E. Battaloglu (2004) Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet*, 36, 449-51.
- Züendorf, G. & G. Reiser (2010) Calcium dysregulation and homeostasis of neural calcium in the molecular mechanisms of neurodegenerative diseases provide multiple targets for neuroprotection. *Antioxid Redox Signal*.