

UCH-FC
DOC-BMCN
B 736
C-4



Un rol para calpaínas en el desarrollo de polaridad neuronal

Tesis entregada a la Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al grado de

Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular, Celular y

Neurociencias

Facultad de Ciencias

por Daniel Antonio Bórquez Macherone

Julio 2012

Director de tesis

Dr. Christian Enrique González-Billault

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que Tesis de Doctorado presentada por el candidato

DANIEL ANTONIO BÓRQUEZ MACHERONE

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 11 de Junio de 2012

Director de Tesis:

Dr. Christian Enrique González-Billault

Comisión de evaluación de la Tesis

Dr. Andrés Óscar Couve Correa

Dr. Nivaldo Manuel Inestrosa Cantín

Dr. Sergio Alejandro Lavandero González

Dr. Marco Tulio Núñez González



The image shows several handwritten signatures in blue ink, each placed over a horizontal dotted line. To the right of the signatures is a circular purple stamp. The stamp contains the text 'FACULTAD DE CIENCIAS' at the top, 'BIBLIOTECA CENTRAL' in the center, and 'U. DE CHILE' at the bottom, with small stars on either side of the bottom text.

La presente Tesis constó con el apoyo de la Beca para estudios de Doctorado en Chile N° 21070173 y la Beca de apoyo a la realización de la Tesis Doctoral N° 24090187, ambas de la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT)



Nací en Santiago de Chile un 13 de julio de 1981 durante un invierno recordado por su crudeza (nieva incluso en La Serena), en un año marcado por la crisis económica y la instauración de un feriado tristemente célebre: el Día de la Liberación Nacional (11 de septiembre).

Mis estudios básicos los cursé en un colegio municipal de Providencia, de nombre Juan Pablo Duarte, denominado en honor a un activista liberal dominicano, nombre irónico en aquel momento, en donde la directora del establecimiento, que carecía de cualquier formación pedagógica (como algunos de los profesores), era nombrada directamente por la alcaldesa-amiga de turno.

En 1994 ingresé al Instituto Nacional José Miguel Carrera en donde terminaré mis estudios secundarios y se sentaron las bases de mi desarrollo personal y académico.

Fascinado por la historia y la arqueología, ingreso a estudiar bioquímica en la Universidad de Chile, una carrera que promete satisfacer mis inquietudes de investigación.

Aquí conocí a grandes personas y a una generación que pronto (vaticinio) se convertirá en un destacadísimo grupo de científicos.

Junto a muchos de ellos, repartidos por varios programas de doctorado en la Universidad de Chile, continué el camino para convertirme en un futuro en un académico e investigador.

Aquí tuve la suerte (otro vaticinio) de conocer a Pamela, que ha sido mi compañera desde hace ya casi 5 años. Durante este tiempo hemos consolidado una pequeña familia (junto a Leela y Toto) que espero trascienda por muchos años más.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer en primer lugar a Christian, que enriqueció notablemente el desarrollo de esta tesis al contrastar puntos de vista y brindar un excelente apoyo en mi desarrollo como científico.

También dar las gracias por aportar al desarrollo de mi proyecto de investigación a través de sus múltiples enfoques, a todos los miembros de mi comisión evaluadora: Sergio, Andrés, Nivaldo, Tulio y su reemplazante en las primeras comisiones, Victoria.

Asimismo agradecer a los miembros que compartieron mi paso por el CeNeDyn: Carolina, Ismael, Cristina, Erick, David, Elías, Sebastián, Mauro, Daniel, Felipe y Pablo. A todos ellos no sólo se les valora por sus aportes en la discusión de resultados, sino también por su invaluable apoyo y compañía en momentos de divertimento.

También recordar a la mejor generación del doctorado en Ciencias (BMCyN): Cristian, Jaime Andrés, Consuelo, Mauricio Latorre y Mauricio Sandoval, que teniendo al frente la HBH preferíamos reunirnos en el Roca´ Shop.

Agradecer también a mis amigos de Olivos (hoy Sergio Livingstone 1007): Valentina, Raúl, Sebastián, Ginés, Carlos (y Beatriz), José Luis (y Karina), Francisco y Manuel.

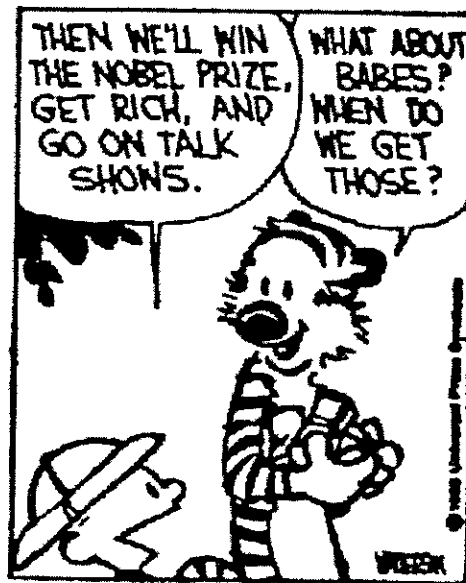
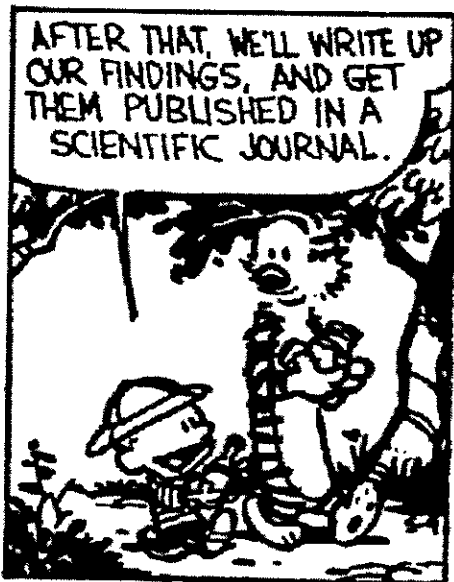
Asimismo a mi pequeña familia por todo el apoyo brindado a lo largo casi 31 años.

Y por último, dar las gracias a Pamela por todo su apoyo, compañía y por ser la persona con la cuál poder proyectarme como familia.

CALVIN AND HOBBS



LET'S GLUE THEM TOGETHER SO WE CAN SEE HOW THEY FIT. THEN YOU CAN DRAW A RECONSTRUCTION OF THE ACTUAL MOLECULE.



ÍNDICE DE MATERIAS

Introducción	1
Polaridad neuronal	1
Degradación de proteínas y polaridad neuronal	4
Calpaínas	6
Funciones fisiológicas de las calpaínas: una mirada desde los modelos transgénicos	7
Regulación de la actividad de las calpaínas en neuronas	10
Calpaínas y la regulación de la neuritogénesis, crecimiento y ramificación axonal	11
Rol de las calpaínas en el desarrollo de polaridad celular	13
Un rol para las calpaínas en el establecimiento de la polaridad neuronal	14
Hipótesis	17
Objetivo general	18
Objetivos específicos	18
Materiales y métodos	20
Reactivos	20
Anticuerpos	20
Preparación de los cubreobjetos de vidrio para cultivo neuronal	21
Cultivos de neuronas hipocampales	22
Electroforesis en geles de poliacrilamida y <i>western blot</i>	22

Inmunocitoquímica	24
Ensayo de proteólisis de α -fodrina	25
Ensayo de proteólisis de t-BOC	26
Nucleofección de neuronas hipocampales	26
Transfección de neuronas hipocampales con Lipofectamina 2000	27
Análisis de la morfología neuronal	28
Resultados	30
Caracterización de la expresión y distribución subcelular de las calpaínas en neuronas hipocampales en cultivo	30
Efecto del tratamiento de neuronas hipocampales con ALLM	38
Efecto de la sobreexpresión de calpastatina en el desarrollo de polaridad neuronal	44
Efecto del <i>knockdown</i> de las calpaínas en la especificación axonal	47
Efecto de la sobreexpresión de una mutante proteólíticamente inactiva de calpaína 2 en la polaridad neuronal	50
Efecto de otros inhibidores de calpaínas y catepsinas en la determinación de polaridad neuronal	52
Discusión	56
Expresión y localización subcelular de las calpaínas en cultivos de neuronas hipocampales	57
Efecto de la inhibición de las calpaínas en la morfología neuronal	59
Implicancias del uso del ALLM como inhibidor de las calpaínas en enfermedades	

neurológicas	62
Identidad del "inhibidor global" en la determinación de polaridad neuronal	64
Conclusiones	68
Proyecciones	68
Referencias	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Expresión de las calpaínas en neuronas hipocampales en cultivo durante la especificación axonal.	31
Figura 2. Distribución subcelular de calpaína 1 durante el desarrollo de polaridad en neuronas hipocampales en cultivo.	33
Figura 3. Distribución subcelular de calpaína 2 durante el desarrollo de polaridad en neuronas hipocampales en cultivo.	34
Figura 4. Calpaína 2 co-distribuye parcialmente con el retículo endoplásmico en neuronas en estadio 3.	36
Figura 5. Distribución subcelular de la actividad de las calpaínas durante el desarrollo de polaridad en neuronas hipocampales en cultivo.	37
Figura 6. Inhibición selectiva de las calpaínas mediada por ALLM.	39
Figura 7. El tratamiento de neuronas hipocampales con ALLM induce la generación de múltiples axones.	40
Figura 8. Los multiaxones inducidos por el ALLM elongan y ramifican correctamente y se diferencian claramente de las neuritas menores con la dendritogénesis.	42
Figura 9. Los multiaxones inducidos por el ALLM son positivos también para MAP-1B fosforilado en modo I.	43

Figura 10. Análisis de la expresión del constructo pmitoGFP IRES calpastatina FV.	45
Figura 11. La sobreexpresión de calpastatina no induce cambios morfológicos en neuronas hipocampales en cultivo.	46
Figura 12. Caracterización de la eficiencia de <i>knockdown</i> de los shRNAs para calpaína 1 y calpaína 2.	48
Figura 13. El <i>knockdown</i> de las calpaínas no produce cambios morfológicos en neuronas hipocampales en cultivo.	49
Figura 14. La expresión de una calpaína 2 catalíticamente inactiva no induce cambios en la determinación de la polaridad en neuronas hipocampales.	51
Figura 15. El tratamiento de neuronas hipocampales con los inhibidores de calpaínas, calpeptina y MDL 28170, no induce cambios en determinación del axón.	54
Figura 16. El tratamiento de neuronas hipocampales con un inhibidor de catepsinas induce un aumento en el área de los conos de crecimiento sin afectar la polaridad neuronal.	55

RESUMEN

El establecimiento de la polaridad es un proceso clave en el desarrollo neuronal, que a través de la generación de dos compartimientos, el somatodendrítico y el axonal, permite a las neuronas insertarse en circuitos y propagar direccionalmente la información en el sistema nervioso.

Los complejos re-arreglos morfológicos necesarios para el quiebre de simetría pueden integrarse en un modelo de auto-organización denominado de activación local-inhibición global. Este contempla la generación de un circuito de retroalimentación positiva por parte del activador, cuya extensión es limitada espacialmente por la acción de un inhibidor de largo alcance. En los últimos años se ha acumulado un conjunto creciente de evidencia en los mecanismos moleculares que sustentan los circuitos de retroalimentación positiva, pero poco se conoce acerca de la identidad del "inhibidor global". Recientemente la degradación proteica selectiva y espacialmente restringida ha sido propuesta como parte de este mecanismo inhibitorio que impida la aparición de axones supernumerarios, mediante la degradación por medio del sistema ubiquitina-proteasoma de algunos reguladores de la polaridad neuronal como la quinasa Akt, las GTPasas pequeñas Rap1B y RhoA, o el componente del complejo de polaridad Par6.

La participación de otros sistemas proteolíticos no puede ser descartada, en particular la isoforma 2 de la familia de cisteínproteasas calpaínas, que presenta una fuerte expresión en cerebro embrionario y que participa en generación de asimetrías en otros sistemas celulares como los neutrófilos. Por ello postulamos que la calpaína 2 podría tener un rol en la especificación del axón.

En esta tesis mostramos que la expresión de calpaína 2 se incrementa en los primeros días de maduración de cultivos de neuronas hipocampales en paralelo la generación de axones, a diferencia de la calpaína 1 que muestra un comportamiento antagónico. Adicionalmente calpaína 2 muestra una distribución somática concentrándose en la región yuxtannuclear cuando la neurona extiende su axón, donde co-distribuye con marcadores de aparato de Golgi (GM130) y retículo endoplásmico (KDEL).

La inhibición de las calpaínas utilizando un inhibidor farmacológico selectivo, el ALLM, induce la pérdida de la correcta polarización al generar neuronas con múltiples prolongaciones largas que son positivas para marcadores axonales como tau-1 o SMI-31. Sin embargo este fenotipo no es reproducido por el uso de otros inhibidores de calpaínas como calpeptina o MDL 28170 ni por el *knockdown* mediante shRNAs o la sobreexpresión ya sea de un inhibidor endógeno específico, denominado calpastatina, o de una forma proteolíticamente inactiva de la calpaína 2.

Este conjunto de evidencia nos permite concluir que el efecto del ALLM en la polaridad neuronal es independiente de la inhibición de las calpaínas y que por lo tanto estas

proteasas no estarían involucradas en la determinación de la asimetría axo-dendrítica en neuronas hipocampales.

SUMMARY

The establishment of polarity is a key event in neuronal development which generate two compartments, namely somatodendritic and the axon. This property enables neurons to be incorporated into circuits to support the directional propagation of information in the nervous system.

The complex morphological rearrangements involved in the symmetry breaking can be integrated into a model of self-organization termed local activation-global inhibition. This model includes the generation of a positive feedback loop by an activator, whose expansion is spatially limited by the action of a long-ranging inhibitor. In recent years has been accumulated a growing body of evidence on the molecular mechanisms underlying the positive feedback loops, but little is known about the identity of the "global inhibitor". Recently, the selective and spatially restricted protein degradation has been proposed as part of this inhibitory mechanism to prevent the generation of supernumerary axons, by promoting the degradation via the ubiquitin-proteasome system of some key regulators for neuronal polarity such as the protein kinase Akt, the small GTPases Rap1B and RhoA, or a member of the polarity complex, Par6. The participation of another proteolytic systems cannot be ruled out, particularly the isoform 2 of the family of cysteine proteases named calpains, which has a strong expression in embryonic brain and is involved in generation of asymmetry in other cell

systems such as neutrophils. Therefore we postulate that calpain 2 may play a role in axon specification.

In this Thesis work we showed that the expression of calpain 2 is increased during early maturation of cultured hippocampal neurons in parallel with the generation of axons. In contrast, calpain 1 showed an antagonistic behavior, with decreased expression during maturation of cell culture. Additionally calpain 2 showed a somatic distribution being concentrated onto a juxtannuclear region during axonal growing, where co-distributed with Golgi apparatus (GM130) and endoplasmic reticulum (KDEL) markers.

Inhibition of calpain 1 and 2 using a selective pharmacological inhibitor, ALLM, induces the loss of the correct polarization and generated neurons with multiple long neurites which were positive for axonal markers tau-1 and SMI-31.

However, this phenotype was not reproduced by the use of other calpains inhibitors such as calpeptin or MDL 28170 or by shRNAs knockdown or overexpression of either a specific endogenous inhibitor called calpastatin, or a proteolytically inactive form of calpain 2.

With this body of evidence we concluded that the effect of ALLM on neuronal polarity is independent of its known calpain inhibition and therefore these proteases would not be involved in determining the axo-dendritic asymmetry in hippocampal neurons.

INTRODUCCIÓN

Polaridad neuronal

La generación de asimetrías o polaridad es un proceso central en biología y correlaciona con mayores niveles de complejidad y de especialización funcional, desde una escala macromolecular tal como ocurre en la organización asimétrica de los filamentos del citoesqueleto de actina, hasta una escala tisular con la determinación de ejes de simetría (Li y Bowerman 2010). En este campo, las neuronas constituyen uno de los sistemas más estudiados, en parte debido a que los complejos re-arreglos morfológicos que les permiten integrarse en circuitos neuronales y propagar señales, ocurren al menos *in vitro* en ausencia de un estímulo externo polarizante.

Banker y Cowan establecieron a fines de los 70's el cultivo primario de neuronas piramidales de hipocampo de rata (Banker y Cowan 1977), como el modelo básico de estudio de la asimetría morfológica en neuronas (Dotti y cols. 1988). Una vez disociadas desde el tejido, las neuronas se cultivan en un sustrato bidimensional, comúnmente polilisina, donde comienzan su desarrollo asumiendo una forma esférica, adhiriéndose al sustrato y extendiendo un manto de actina en forma de lamelipodio alrededor del cuerpo celular (rápidamente después del plaqueo, estadio 1). Posteriormente desde el cuerpo celular emergen múltiples neuritas cada una de ellas decorada en su extremo por un cono

de crecimiento dinámico (12-24 hrs, estadio 2). Las neuritas en este estadio de desarrollo experimentan transiciones entre crecimiento y retracción, manteniendo una longitud equivalente entre ellas, por lo que la célula es esencialmente simétrica. El evento principal en la adquisición de polaridad neuronal ocurre cuando una de estas neuritas comienza a crecer a una tasa neta más rápida, para convertirse en el axón (24-48 hrs, estadio 3). Los cambios morfológicos continúan los siguientes días con el desarrollo de las restantes neuritas como dendritas (3-4 días, estadio 4) y la adquisición de polaridad funcional de dendritas y axones con la formación de sinapsis (> 1 semana en cultivo, estadio 5)(Barnes y Polleux 2009).

El hecho de que las neuronas puedan polarizarse espontáneamente en ausencia de señales asimétricas pre-establecidas, indica que el principio de auto-organización puede ser central en el establecimiento de la polaridad neuronal. Por otra parte no puede descartarse que las neuronas conserven la organización asimétrica de sus componentes intracelulares que constaban *in vivo* previo a su disgregación desde el tejido.

El principio de auto-organización ha sido vinculado actualmente con aspectos teóricos que predicen que una célula puede producir cambios moleculares internos que desencadenen la aparición de polaridad usando una combinación de un activador local auto-estimulante y un inhibidor global de largo alcance. El activador auto-estimulante funciona a través de circuitos de retroalimentación positiva que incrementan las variaciones estocásticas de manera no lineal y el inhibidor global de largo alcance

permite la competencia entre las distintas áreas por la activación (Meinhardt y Gierer 2000). Por ejemplo una proteína puede asociarse aleatoriamente a la membrana y una vez unida a esta, reclutar más moléculas de la misma proteína a la membrana de manera cooperativa. Esto generaría inmediatamente una asimetría en la composición molecular que podría traducirse en cambios a nivel morfológico. Sin embargo, este proceso continuaría hasta que la membrana completa estuviera unida con proteínas, si el suministro de la proteína en el citoplasma es suficiente. Por lo tanto un segundo proceso es necesario para restringir la acumulación de la proteína en un solo clúster y prevenir que esta se una a la totalidad de la superficie de la membrana. De este modo el activador local debe inducir un proceso global de inhibición de largo alcance que impida que esos clústeres se propaguen o se generen en múltiple sitios. El proceso de inhibición global puede ser activo, con la generación de una molécula inhibitoria difusible o transportable, o puede ser pasivo, si es que el activador se encuentra presente en cantidades limitantes.

Muchos trabajos se han centrado en la caracterización de los circuitos de retroalimentación positiva que permiten el quiebre de simetría en las neuronas (Fivaz y cols. 2008; Toriyama y cols. 2010; Cheng y cols. 2011b), pero notablemente pocos se han avocado a la identificación del "inhibidor global". Un reciente modelo matemático de la generación de polaridad neuronal sugirió fuertemente que el proceso subyacente al inhibidor global era la degradación selectiva de proteínas (Naoki y cols. 2011).

Degradación de proteínas y polaridad neuronal

Solamente en los últimos años la degradación selectiva de proteínas ha surgido como un mecanismo esencial en la determinación de la asimetría axo-dendrítica en neuronas. Es en el año 2006 cuando se describe por primera vez que la actividad del sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) es esencial para la correcta polarización de las neuronas. El UPS actúa como el “inhibidor global” ya que degrada selectivamente a la proteína quinasa Akt, una de las moléculas claves en la especificación axonal, en todas las neuritas excepto en la que se convertirá en el axón. La degradación se limita al *pool* inactivo de Akt, por lo que este proceso ayuda a restringir su activación al futuro axón donde participa en uno de los *loops* de retroalimentación positiva que determinan la identidad axonal junto con la GTPasa pequeña Ras y la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)(Yan y cols. 2006; Yoshimura y cols. 2006).

Un mecanismo similar ha sido descrito para restringir espacialmente la actividad de otro determinante de crecimiento axonal como la GTPasa pequeña Rap1B, cuya forma inactiva también es degradada en todo el compartimiento somatodendrítico y protegida en el futuro axón gracias a su activación (Schwamborn y cols. 2007). Este mecanismo permitiría limitar la acción de Rap1B y la de su efector río abajo, la GTPasa pequeña Cdc42 (Schwamborn y Puschel 2004). Cdc42 a través de su efector cofilina controla la dinámica del citoesqueleto de actina, componente esencial de la generación de asimetrías en neuronas (Garvalov y cols. 2007).

Recientemente se ha descrito un mecanismo más complejo en el accionar del UPS, que involucra diferentes selectividades de sustrato entre los distintos compartimientos neuronales que aseguren la degradación de un inhibidor del crecimiento axonal (la GTPasa pequeña RhoA) en el axón (y su acumulación en las demás neuritas), mientras que un determinante de identidad axonal como la proteína Par6 es degradada en las neuritas menores y protegida de la degradación en el axón (Cheng y cols. 2011a).

La GTPasa RhoA es participante esencial en los mecanismos que eviten la generación de axones supernumerarios (Conde y cols. 2010; Da Silva y cols. 2003), mientras que Par6 forma parte de una complejo multiproteico con Par3 y la proteína quinasa C atípica (aPKC) que es requerido para la especificación axonal (Yi y cols. 2010; Shi y cols. 2003).

Hasta hoy el único sistema proteolítico asociado a la determinación de la polaridad neuronal es el UPS. La mayoría de los estudios que han vinculado la acción del UPS en la determinación de polaridad consideran el uso de inhibidores farmacológicos, como el MG132 o el ALLN que son conocidos por inhibir la actividad de otras proteasas, como las calpaínas, con potencias similares a las con que actúa sobre el proteasoma (Rock y cols, 1994). Por lo tanto existe la posibilidad de la participación de otros sistemas proteolíticos como parte del proceso de inhibición global que controlaría la correcta asimetría axo-dendrítica en neuronas.

Calpaínas

Las calpaínas constituyen una familia de cisteínproteasas citosólicas activadas por calcio, compuesta por 15 isoformas en mamíferos. De ellas las calpaínas 1 y 2 han sido las estudiadas más extensivamente, ya que fueron las primeras descritas y se encuentran expresadas en la mayoría de los órganos (Sorimachi y cols. 2011), pero son particularmente abundantes en el sistema nervioso central, en donde la calpaína 2 da cuenta de casi la totalidad de la actividad de estas proteasas en el cerebro (Takano y cols. 2011).

Tanto calpaína 1 como calpaína 2 son heterodímeros compuestos por una subunidad grande que posee la actividad proteasa y una subunidad pequeña regulatoria, de la cual se conocen dos isoformas, denominadas CSS1 y CSS2 (por Calpain Small Subunit). La distribución subcelular de estas subunidades pequeñas en las neuronas presenta claras diferencias entre sí, ya que la CSS1 se encuentra principalmente en soma y dendritas y la CSS2 es eminentemente axonal (Friedrich y cols. 2004).

El sistema de regulación de la actividad proteolítica de las calpaínas cuenta con un elemento adicional, una proteína inhibidora endógena altamente específica denominada calpastatina. Cada molécula de calpastatina posee cuatro unidades inhibitorias, cada una de las cuales que pueden unir e inhibir una molécula de calpaína, ocluyendo su sitio activo (Hanna y cols. 2008; Moldoveanu y cols. 2008).

La inhibición por calpastatina constituye uno de los múltiples mecanismos que regulan la actividad de las calpaínas. Adicionalmente, se conocen otros mecanismos que contribuyen a controlar la activación de las calpaínas, como la dependencia de su actividad con la concentración intracelular de calcio (Satish y cols. 2005), su asociación a la membrana plasmática (Leloup y cols. 2010) y la presencia de fosforilaciones tanto activadoras (Glading y cols. 2001) como inhibitorias (Shiraha y cols. 2002). Un estricto sistema de control resulta esencial en la función de las calpaínas, las que a diferencia de otros sistemas de degradación intracelular como el UPS o los sistemas proteolíticos lisosomales, no degradan sus sustratos extensivamente a oligopéptidos, sino que proteolizan en una cantidad limitada de sitios que transforman o modulan las actividades y estructuras de sus proteínas blancas (Friedrich y Bozoky 2005). Esto constituye un caso particular en la transducción de señales ya que representa una modificación irreversible y por lo tanto unidireccional.

Funciones fisiológicas de las calpaínas: una mirada desde los modelos transgénicos

Uno de los principales problemas asociados al estudio de las funciones fisiológicas de las calpaínas es la completa ausencia de inhibidores específicos de bajo peso molecular, por lo que la mayoría de los estudios obtienen sus conclusiones a partir del uso de inhibidores que afectan a otras proteasas como las catepsinas o el proteasoma (Rock y cols. 1994) e incluso a enzimas no relacionadas como tirosina fosfatasas (Schoenwaelder y Burridge 1999).

En contraste la información proveniente de los modelos transgénicos generados en la última década muchas veces apoya el hecho que los componentes del sistema de las calpaínas tendrían roles extremadamente limitados en la fisiología y sólo participarían en condiciones patológicas.

De acuerdo con esto el ratón *knockout* de calpastatina, el inhibidor endógeno de las calpaínas, no presenta anormalidades en el desarrollo, fertilidad, morfología y esperanza de vida (Takano y cols. 2005), al igual que el ratón transgénico que sobrepresa la calpastatina en el cerebro anterior (Higuchi y cols. 2005). Sorprendentemente el ratón *knockout* de calpastatina no presenta un aumento en la actividad de las calpaínas, lo que ha sido sugerido por los autores como una evidencia que la calpastatina no actúa como inhibidor en condiciones fisiológicas (Takano y cols. 2005).

En el año 2000 se generó el primer modelo genético para inactivar la función de las calpaínas con el ratón *knockout* de la subunidad menor de las calpaínas, lo que elimina completamente la actividad de las calpaínas 1 y 2. Este ratón presentó letalidad embrionaria temprana al día E10.5, lo que implicaba que las calpaínas eran esenciales para el desarrollo posterior (Arthur y cols. 2000).

Sorpresivamente el ratón *knockout* de calpaína 1, la isoforma que se creía cumplía un rol relevante en la fisiología por su menor requerimiento de calcio para su actividad, no

presentó defectos en la fertilidad, desarrollo o anatomía, sino sólo un déficit en la agregación plaquetaria (Azam y cols. 2001).

Por otra parte el ratón *knockout* de calpaína 2 mostró un fenotipo mucho más severo, muriendo al día E2.5, o sea pre implantación (Dutt y cols. 2006). Esto claramente se contrapone con el fenotipo del ratón *knockout* de la CSS1 que no tiene actividad de ambas calpaínas y que muere mucho más tarde. Sin embargo un segundo ratón *knockout* para CSS1 generado por un grupo independiente presentó un fenotipo tan agresivo como el del ratón *knockout* de calpaína 2 (Zimmerman y cols. 2000), apoyando la idea que esta isoforma es la que cumple la mayoría de las funciones fisiológicas en el organismo.

Sin embargo nuevos modelos transgénicos desarrollados recientemente parecen finalmente resolver las controversias.

Un nuevo ratón *knockout* para calpaína 2 presentó letalidad embrionaria al día E15, mientras que el ratón doble *knockout* para calpaína 1 y 2 muere al día E11.5 muy similar al ratón *knockout* de la CSS1, indicando que la ausencia de la calpaína 2 es la principal responsable de que el desarrollo embrionario no prosiga normalmente. Interesantemente si la expresión de calpaína 2 es preservada en la placenta (pero ausente en el resto del feto), los ratones llegan a la adultez sin problemas evidentes en el desarrollo o anatomía, al igual que el doble *knockout* de calpaína 1 y 2 con la expresión conservada en la placenta (Takano y cols. 2011).

Estos resultados sugieren que las calpaínas tendrían roles fisiológicos limitados durante el desarrollo embrionario y la organogénesis.

Regulación de la actividad de las calpaínas en neuronas

Aunque las calpaínas, y en especial calpaína 2, se encuentran enriquecidas en el cerebro, aún queda la incógnita de cómo son activadas, tomando en cuenta que se requieren concentraciones de calcio entre 400 μM y 800 μM para activar *in vitro* a calpaína 2, muy por encima de las concentraciones máximas que se alcanzan fisiológicamente.

Interesantemente varios estudios muestran que en neuronas los mecanismos de activación de calpaína 2 serían independientes de calcio.

La calpaína 2 es sujeta a varias modificaciones postraduccionales que incluyen sumoilación y fosforilaciones mediadas por la proteína quinasa A (PKA) y por proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) como ERK-1 y p38. Cada una de estas modificaciones posee distintos efectos sobre la actividad de la calpaína 2: mientras que la sumoilación y la fosforilación por MAPKs impactan positivamente sobre su actividad, la fosforilación por PKA tiene un rol inhibitorio (Glading y cols. 2001; Shiraha y cols. 2002; Wang y cols. 2009).

El mecanismo por el cual las fosforilaciones en calpaína 2 modulan su actividad parece ser indirecto: calpaína 2 utiliza al fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato (PIP2) como un sitio de *docking* en las membranas y como un co-factor esencial en su actividad. Mientras que la fosforilación por ERK-1 en la Ser50 promueve la interacción con PIP2, la fosforilación por PKA en la Ser369 la bloquea (Leloup y cols. 2010).

Estos mecanismos alternativos de activación de la calpaína 2 son particularmente destacados en neuronas, ya que aunque un trabajo muestra que la calpaína 2 se activaría por un aumento del calcio intracelular mediado por Wnt5A (Yang y cols. 2011), otros han reportado que la modulación de la actividad ocurre principalmente por mecanismos independientes de calcio, ya sea por la inhibición mediada por la fosforilación por PKA (Mingorance-Le Meur y O'Connor 2009), la activación mediada por MAPKs (Qin y cols. 2010; Zadrán y cols. 2009) o una mezcla de ambas (Zadrán y cols. 2010).

Calpaínas y la regulación de la neuritogénesis, crecimiento y ramificación axonal

Estudios pioneros realizados hace más de 20 años, mostraron que la inhibición de las calpaínas favorecía la elongación de neuritas en una serie de modelos celulares, que incluían células PC12 tratadas con factor de crecimiento neuronal (NGF) (Pinter y cols. 1994; Saito y Kawashima 1988) y células de neuroblastoma humanas SH-SY5Y o de ratón NB2a/dl diferenciadas por privación de suero (Shea y cols. 1991; 1995). Más aún,

el tratamiento de células PC12 con NGF o dibutililAMPc disminuía la actividad de las calpaínas a través de la inducción de su inhibidor específico calpastatina (Oshima y cols. 1989). Interesantemente la inhibición de las calpaínas no induce neuritogénesis *de novo* o sea en células sin estimular, indicando que las calpaínas podrían regular la estabilidad de las proyecciones celulares pero no su iniciación.

Estudios subsecuentes realizados en neuronas hipocampales en cultivo mostraron que la inhibición de las calpaínas suprime el colapso de las dendritas inducido por la aplicación de un ionóforo de calcio, aunque sin afectar el crecimiento axonal, indicando que en neuronas ya polarizadas, la actividad de las calpaínas se concentra en las dendritas (Song y cols. 1994). De acuerdo con esto, recientemente se demostró que la elongación axonal y su consolidación va acompañada con la inhibición de las calpaínas, que permite la generación y elongación de ramificaciones (Mingorance-Le Meur y O'Connor 2009).

Por otra parte, estudios realizados en neuronas periféricas, como neuronas espinales de *Xenopus* (Robles y cols. 2003) o neuronas del ganglio de la raíz dorsal de pollo (To y cols. 2007, 2008), demostraron que la activación de las calpaínas por transientes de calcio mediaba el colapso del cono de crecimiento axonal. Esto puede reflejar una significativa diferencia en la distribución de las calpaínas entre los axones de las neuronas hipocampales, que presentan una marca tenue para calpaínas y los axones de las neuronas periféricas cuya marca es intensa según estudios de inmunohistoquímica.



A los estudios que relacionan a las calpaínas principalmente con la inhibición de la neuritogénesis y al colapso de los conos de crecimiento, se contraponen otros estudios que utilizando paradigmas experimentales distintos, muestran que la actividad de las calpaínas favorecería el crecimiento axonal. Estos estudios muestran que el influjo de calcio que se produce posterior a una axotomía en neuronas de *Aplysia* es esencial para la formación de un cono de crecimiento competente y el re-crecimiento del axón, de manera dependiente de la actividad de las calpaínas (Gitler y Spira 1998).

Estudios recientes mostraron que la activación de las calpaínas era esencial para la elongación axonal mediada por Wnt5a o para la elongación de los axones callosos *in vivo* (Yang y cols. 2011), abriendo la posibilidad de un rol dual promoviendo por una parte el colapso de los axones y por otra favoreciendo su extensión, aunque las determinantes moleculares que explicarían esa dualidad permanecen en el más completo misterio.

Rol de las calpaínas en el desarrollo de polaridad celular

Tal como lo señaló Santiago Ramón y Cajal hace más de una centuria, el desarrollo de los procesos neuríticos se asemeja a células en migración, que pueden sentir gradientes de quimioattractantes, adquirir un fenotipo polarizado y migrar de manera dirigida, en lo que se conoce como quimiotaxis.

Interesantemente la transición entre una célula simétrica y una polarizada durante la quimiotaxis ocurre aún si la concentración del quimioattractante es uniforme, lo que rememora el proceso de adquisición de polaridad de las neuronas en cultivo.

En neutrófilos, la generación de polaridad va acompañada de la distribución asimétrica de las calpaínas: mientras que la calpaína 2 se localiza en la zona rica en actina fibrilar (F-actina) presente en el frente de avance de la célula, la calpaína 1 se ubica en la parte trasera. Más aún la actividad proteolítica de la calpaína 2 resulta esencial para una correcta morfología polar, ya que las células que expresan una forma catalíticamente inactiva de la proteasa, presenta múltiples protrusiones ricas en F-actina sin un frente de avance definido cuando se exponen a un quimioattractante (Nuzzi y cols. 2007). Adicionalmente la inhibición de las calpaínas induce la polarización de neutrófilos en ausencia de un estímulo externo (Lokuta y cols. 2003). Estudios adicionales en fibroblastos embrionarios confirman el rol particular de la calpaína 2 en limitar la actividad protrusiva y la estabilidad de los lamelipodios (Franco y cols. 2004), lo que podría significar que la calpaína 2 actúe como un "inhibidor global" en la polarización quimiotaxica.

Un rol para las calpaínas en el establecimiento de la polaridad neuronal

Basado en el papel que tienen las calpaínas en la determinación de polaridad en tipos celulares no neuronales como los neutrófilos, discutidos en la sección anterior, es que

para el desarrollo de esta Tesis proponemos que su rol sería análogo en neuronas, cuyo proceso de adquisición de polaridad comparte muchos componentes moleculares con el de los neutrófilos.

Adicionalmente se pueden proponer tanto mecanismos regulatorios como sus posibles efectores.

i) *Mecanismos putativos de regulación de las calpaínas en la determinación de polaridad neuronal.*

Estudios recientes mostraron que semaforina 3A (Sema3A), una proteína secretada de la clase III de la superfamilia de las semaforinas, es capaz de suprimir la generación de axones y promover el crecimiento de dendritas tanto en neuronas hipocampales cultivadas *in vitro* como en neuronas corticales *in vivo* (Shelly y cols. 2011). Interesantemente Sema3A activa a calpaína 2 en neuronas hipocampales a través de la fosforilación de la Ser50 mediada por ERK1 y p38 (Qin y cols. 2010). Por lo tanto la activación de las calpaínas en el dominio somatodendrítico podría contribuir a la supresión de la formación de axones. Adicionalmente elucubramos que un mecanismo adicional debe existir que inhiba la actividad de las calpaínas en el axón.

Estudios recientes muestran que la activación de la PKA espacialmente restringida a una neurita inmadura sería esencial para su crecimiento y adquisición de la identidad axonal (Shelly y cols. 2007; 2010). Estudios adicionales mostraron que la fosforilación de la calpaína 2 mediada por PKA limitaba la actividad de esta proteasa en el

compartimiento axonal (Mingorance-Le Meur y O'Connor 2009), sugiriendo que este podría ser el mecanismo que inhiba la actividad de calpaína 2 en el axón. Más aún el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), que promueve la diferenciación axonal a través de la elevación de los niveles de AMPc (Cheng y cols. 2011b) es capaz de inhibir la actividad de las calpaínas (Mingorance-Le Meur y O'Connor 2009).

Ambos mecanismos actuando al unísono implicarían que la actividad de las calpaínas debe ser suprimida en el axón y favorecida en el compartimiento somatodendrítico para permitir una adecuada polarización de las neuronas.

ii) *Blancos putativos de las calpaínas en la regulación de la polaridad neuronal.*

De acuerdo a un posible rol de la calpaína 2 en la supresión de la generación de axones, dos de sus blancos descritos son determinantes claves para el establecimiento de una morfología polarizada en las neuronas. Por una parte las calpaínas son capaces de proteolizar al mediador de la respuesta a colapsina (CRMP)-2 en un sitio indeterminado localizado en el extremo C-terminal de la proteína. CRMP-2 actúa como un potente inductor de axones al unir y favorecer la polimerización de dímeros de tubulina (Inagaki y cols. 2001). El dominio responsable de esta actividad se encuentra localizado precisamente en el extremo C-terminal (Chae y cols. 2009) y concordantemente, la expresión de formas truncadas de CRMP-2 en el C-terminal actúan como dominantes negativos, generando muchas veces neuronas sin axones

(Inagaki y cols. 2001). Esto hace que CRMP-2 sea un buen candidato para ser modificado *in vivo* por la activación de las calpaínas, en la determinación del axón.

Por otra parte, las calpaínas proteolizan a otro potente determinante de polaridad neuronal: la quinasa de la glicógeno sintasa (GSK)-3 β . La actividad de esta quinasa es parte esencial de las vías de señalización que regulan negativamente la generación de axones principalmente a través de la fosforilación de la región C-terminal de CRMP-2, la que inhibe su actividad polimerizante de microtúbulos (Yoshimura y cols. 2005). Por lo tanto la actividad de GSK-3 β debe ser suprimida en el futuro axón y particularmente en su cono de crecimiento, lo que canónicamente se ha postulado que ocurre a través de la fosforilación inhibitoria en la Ser9 y Ser20 de GSK-3 β mediada por Akt (Jiang y cols. 2005). Interesantemente las calpaínas proteolizan la región N-terminal de la GSK-3 β , eliminando los sitios regulatorios y generando una variante constitutivamente activa (Goñi-Oliver y cols. 2007).

Por lo tanto se propone que la calpaína 2 suprimiría la generación de axones, mediante un mecanismo que involucraría la proteólisis en el compartimiento somatodendrítico de los determinantes de polaridad neuronal CRMP-2 y GSK-3 β .

Hipótesis

La calpaína 2 ejerce un control negativo en la especificación del axón.

Objetivo general

Determinar el papel de calpaína 2 en la determinación de polaridad en neuronas hipocampales en cultivo.

Objetivos específicos

1. Establecer los cambios espaciales y temporales en la actividad de las calpaínas durante el proceso de desarrollo de polaridad en neuronas hipocampales.

1.a. Determinar si la transición entre el estadio 2 y el 3 de los cultivos hipocampales se correlaciona con cambios en la masa de las calpaínas 1 y 2.

1.b. Establecer los cambios en la distribución subcelular de las calpaínas 1 y 2 en el proceso de desarrollo de polaridad neuronal.

1.c. Determinar los cambios en la actividad local de las calpaínas durante la especificación del axón.

2. Determinar los cambios morfológicos en neuronas hipocampales en cultivo, producto de la inhibición de la actividad de las calpaínas 1 y 2.

2.a. Establecer los cambios en la especificación del axón en neuronas hipocampales, producto de la inhibición farmacológica de las calpaínas.

2.b. Determinar los cambios en la morfología neuronal producto de la sobreexpresión del inhibidor endógeno de las calpaínas, calpastatina.

2.c. Evaluar el efecto de la disminución de la expresión (*knock-down*) específica para calpaína 1 y 2 en la especificación del axón.

2.d. Establecer el efecto de la sobreexpresión de una forma catalíticamente inactiva de calpaína 2 en la morfología neuronal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

En el presente trabajo se utilizaron los siguientes reactivos: N-acetil-L-leucil-L-leucil-L-metioninal (ALLM, Sigma-Aldrich, #A6060), calpeptina (Santa Cruz Biotechnology, #sc-202516), MDL28170 (Tocris, #1146), MG132 (Calbiochem, #474790), ionomicina (Sigma-Aldrich, #I9657) e inhibidor de catepsinas I (Calbiochem, #219415). Se prepararon soluciones *stock* estériles concentradas 1000X en dimetilsulfóxido (DMSO), por lo que la concentración del vehículo nunca superó el 0.01% en el medio de tratamiento.

Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados en este estudio fueron los siguientes: anti calpaína 1 (conejo, Cell Signaling Technology, #2556), anti calpaína 2 (conejo, Cell Signaling Technology, #2539), anti MAP-2 (conejo, Millipore, #AB5622), anti tau-1 (ratón, Millipore, #MAB3420), anti SMI-31 (ratón, Covance, #SMI31R), anti calpastatina (ratón, Calbiochem, #208903), anti GM130 (ratón, BD Biosciences, #6108823), anti α -tubulina (ratón, Sigma-Aldrich, #T6199), anti β 3-tubulina (ratón, Promega, #G7121), anti α -

fodrina (no eritroide) (ratón, Millipore, #MAB1622), anti ubiquitina (ratón, Santa Cruz Biotechnology, #sc-271289), anti KDEL (ratón, Enzo Life Sciences, #ADI-SPA-827), anti ratón Alexa Fluor 488 (burro, Molecular Probes, #A21202), anti conejo Alexa Fluor 546 (burro, Molecular Probes, #A10040), anti ratón Alexa Fluor 646 (burro, Molecular Probes, #31573), anti ratón peroxidasa (burro, Jackson Immunoresearch, #715-035-150) y anti conejo peroxidasa (burro, Jackson Immunoresearch, #711-035-152).

Preparación de los cubreobjetos de vidrio para cultivo neuronal

Cubreobjetos de vidrio de 12 mm se incubaron por 72 hrs con ácido nítrico 65% en soportes de porcelana (Thermo Scientific, # 8542E40) para remover la materia orgánica. Posteriormente se lavan tres veces por 5 minutos cada una con agua destilada y tres veces adicionales por 20 minutos cada una. Luego se secan a 100°C por 1 hora y se esterilizan por 12 horas a 220°C en una estufa.

Los cubreobjetos limpios se colocan en placas de 12 pocillos y se incuban por 12 horas con una solución 1 mg/mL de poli L-lisina (Sigma-Aldrich, #P2636) en tampón borato 0.1 M pH 8.5. Posteriormente se realizan 4 lavados de 20 minutos con agua destilada estéril, tras lo cual los cubreobjetos están preparados para la siembra de neuronas.

Cultivos de neuronas hipocampales

Las neuronas fueron aisladas desde hipocampos de embriones ratones C57BL/6 o ratas Sprague Dawley de 18 o 19 días post coito y cultivadas como se describe en (Kaech y Banker 2006). Brevemente se extraen los hipocampos y se transfieren a una solución de 0.25% de tripsina en tampón Hank's salino (HBSS) y se incuban por 20 minutos a 37°C. Inmediatamente se lavan dos veces con HBSS y el tejido se disgrega mediante 20 pasadas a través de una pipeta Pasteur con el diámetro reducido a la mitad y 20 pasadas adicionales a través de una pipeta Pasteur con el diámetro reducido a 1/4. Luego las células se cuentan en un hemocitómetro y se siembran medio mínimo esencial (MEM) con 10% de suero de caballo (Gibco, #16050-122), en placas de 12 pocillos con cubreobjetos de vidrio a una densidad de 12.500 células/cm² para inmunofluorescencia o en placas de 60 mm de diámetro a una densidad de 100.000 células/cm² para extracción de proteínas. Una hora tras el plaqueo el medio se reemplaza por Neurobasal (Gibco, #21103-049) con 2% de B27 (Gibco, #17504-044), penicilina (100 U/mL), estreptomina (100 µg/mL), 1 mM de piruvato de sodio y GlutaMAX (Gibco, #35050-061).

Electroforesis en geles de poliacrilamida y *western blot*

Para la determinación de la abundancia de proteínas, las células se lavan dos veces con tampón fosfato salino (PBS, pH 7.4) frío y las proteínas se extraen con tampón RIPA (20

mM Tris-HCl a pH7.5, 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM EGTA, 1% NP-40 y 1% deoxicolato de sodio) suplementado con 20 nM caliculina A (Cell Signaling Technology, #9902), 1 mM NaF, 1 mM PMSF y el *cocktail* de inhibidores de proteasas (Roche, #11836170) por 15 minutos a 4°C. Los extractos se clarifican mediante centrifugación a 14000xg y se almacenan a -80°C para su uso posterior.

Las muestras se cuantifican mediante el método de Bradford y se desnaturan en tampón de carga por calentamiento a 95°C por 5 minutos. 30 µg de proteínas totales se cargan en geles de poliacrilamida al 10% (para proteínas de corrimiento electroforético aparente <100 kDa) o 7.5% (para proteínas >100 kDa) y se corren inicialmente a 80V por 30 minutos y posteriormente a 110V. Luego se transfieren a membranas de PDVF por 90 minutos a 300 mA. La membrana se tiñe con rojo Ponceau para controlar la correcta transferencia y la ausencia de degradación en las muestras y posteriormente se bloquean por 1 hora con BSA 5% Tween 20 0.1% en tampón tris base salino (TBS, pH 7.4). Los anticuerpos se incuban toda la noche en tampón de bloqueo a las siguientes diluciones: anti calpaína 1 (1:1000), anti calpaína 2 (1:5000), anti tau-1 (1:10000), anti α-tubulina (1:10000), anti β3-tubulina (1:10000), anti calpastatina (1:1000), anti α-fodrina (1:1000) y anti ubiquitina (1:1000).

El anticuerpo primario se lava 4 veces por 5 minutos cada una con TBS Tween 20 0.1% y se procede a la incubación con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa apropiado disuelto en tampón de bloqueo (1:5000).

Luego se realizan 4 lavados con TBS Tween 20 0.1% de 5 minutos cada uno y la actividad peroxidasa se detecta con películas de fotografía mediante el sustrato quimioluminisciente SuperSignal West Pico (Thermo Scientific, #34080).

Inmunocitoquímica

Para la inmunocitoquímica las células fueron fijadas en una solución al 4% paraformaldehído con 4% sacarosa en PBS 0.1 M por 30 minutos a 37°C. Un tiempo de fijación mayor a 20 minutos es vital para la preservación de la distribución de algunos epitopos como tau-1. Posteriormente las células se lavan 3 veces por 5 min con PBS 0.1 M y se permeabilizan con una solución al 0.1% de Tritón X-100 en PBS 0.1 M por 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se realizan 3 lavados de 5 min con PBS 0.1M y se bloquean con una solución al 5% de albumina sérica bovina (BSA) en PBS 0.1 M por 1 hora a temperatura ambiente.

La incubación de los anticuerpos primarios se realiza toda la noche a 4°C en una cámara húmeda en una solución de BSA al 1% en PBS 0.1 M. Las diluciones utilizadas fueron las siguientes: anti-MAP2 (1:500), anti-tau-1 (1:500), anti calpaína 1 (1:50), anti calpaína 2 (1:25), anti GM130 (1:250), anti KDEL (1:100), anti α -tubulina (1:1000) y anti β 3 tubulina (1:1000).

Posteriormente se realizan tres lavados de 5 minutos con PBS 0.1M a temperatura ambiente y se incuban por 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda con la adecuada combinación de anticuerpos secundarios conjugados a fluoróforos Alexa en PBS 0.1 M con 1% BSA a una dilución de 1:400. La tinción de la F-actina con faloidina fluorescente (Cytoskeleton Inc, #PHDG1) se realiza en conjunto con los anticuerpos secundarios con una concentración de 100 nM. Finalmente se lavan 3 veces por 5 minutos con PBS 0.1 M y una vez con agua destilada y se montan en el medio de auto secado FluorSave (Calbiochem, #345789).

La adquisición de las imágenes se realizó en un microscopio confocal Zeiss LSM 510 Meta con la adecuada configuración de filtros.

Ensayo de proteólisis de α -fodrina

Células de neuroblastoma humano SH-SY5Y fueron utilizadas para evaluar la efectividad del ALLM como inhibidor de la actividad de las calpaínas, el que se incubó previo al ensayo por 30 minutos, a una concentración de 20 μ M. Para evaluar la inhibición de la actividad de las calpaínas, las células se trataron por 1 hora con 1 μ M del ionóforo de calcio ionomicina, en OptiMEM suplementado con 1 mM de CaCl_2 . Posteriormente se extraen las proteínas con buffer RIPA y se determina mediante *western blot* la inmunoreactividad del producto específico de proteólisis por calpaínas

de la α -fodrina que aparece como un doblete con un corrimiento electroforético aparente de 150 y 145 kDa.

Ensayo de proteólisis de t-BOC

7-amino-4-clorometilcumarina, t-BOC-L-leucil-L-metionina amida (t-BOC, Molecular Probes, #A6520) es un sustrato de calpaínas no fluorescente y permeable a las membranas que una vez internalizado puede ser proteolizado permitiendo la emisión fluorescente de la cumarina. Aunque el producto fluorescente es retenido intracelularmente, puede difundir libremente. Para medir la actividad de las calpaínas *in situ*, neuronas hipocampales fueron cultivadas por 24, 36 o 48 horas *in vitro* y posteriormente incubadas con 10 μ M de t-BOC por tiempos cortos (<30 minutos) para evitar la difusión del producto fluorescente, fijadas y teñidas para inmunofluorescencia con β 3-tubulina y faloidina. La adquisición de imágenes se realizó en un microscopio Olympus DSU BX61WI (gentileza del grupo del Dr. Andres Couve, Universidad de Chile) con la adecuada configuración de filtros.

Nucleofección de neuronas hipocampales

La nucleofección del vector para la sobreexpresión de calpastatina, pmito-GFP IRES calpastatina FV (gentileza de Daniele Bano, Deutsches Zentrum für Neurodegenerative

Erkrankungen, Alemania)(Munarriz y cols. 2005) o de vector para la sobreexpresión de calpaína 2 (C105S) GFP (gentileza de Anna Huttenlocher, University of Wisconsin, USA), en neuronas disgregadas de rata se realizó según el protocolo descrito en (Zeitelhofer y cols. 2007), utilizando el kit para nucleofección de neuronas primarias (Lonza, #VPI-1003) en un aparato Nucleofector II con el programa O-003. Para aumentar la eficiencia de nucleofección se utilizaron 15 µg de plasmidio por reacción (Zeitelhofer y cols. 2009).

Transfección de neuronas hipocampales con Lipofectamina 2000

Las neuronas hipocampales de ratón se co-transfectaron utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) con pmaxGFP (Lonza) y MISSION® pLKO.1-puro (Sigma-Aldrich) que expresan shRNAs contra luciferasa (#SHC007), calpaína 1 (#NM_007600) o calpaína 2 (#NM_009794).

Las secuencias blanco (5'→3') de los shRNAs utilizados en este trabajo se detallan a continuación:

calpaína 1 shRNA #64	CGGATGTGAGTCTTGCCTAAT
calpaína 1 shRNA #65	GCCGTGGACTTTGACAACCTTT
calpaína 1 shRNA #67	GCTCCATTAATATCTCCGATA
calpaína 1 shRNA #68	CCGGAATTGGAATACCACATT
calpaína 2 shRNA #69	GCGGTCAGATACCTTCATTAA

calpaína 2 shRNA #70	CCGTCCTGGAAACGCTATTCAA
calpaína 2 shRNA #71	GCCAAGATCAATGGGTGCTAT
calpaína 2 shRNA #72	CGACGAGCTAATCATCGACTT
calpaína 2 shRNA #73	CCCTCACCTTGAATGAGGAAA

Brevemente, los complejos entre 1.5 μ L de Lipofectamina 2000 y 1 μ g de DNA se incuban por 20 minutos en 250 μ L de OptiMEM a temperatura ambiente. El DNA esta constituido por una mezcla de 800 ng de pLKO.1 shRNA puro y 200 ng de pmax GFP. Tras dos horas post siembra, a las neuronas hipocampales sembradas en covers de 12 mm en placas de 12 pocillos a una densidad de 25000 células/cm², se les reemplaza el medio por 1 mL de Neurobasal sin suplementos ni antibióticos y se incuban con los complejos Lipofectamina 2000-DNA por dos horas adicionales tras lo cual el medio se reemplaza por el definitivo Neurobasal con B27. Los cambios morfológicos se evalúan a los 2 DIV. Con estas condiciones la eficiencia de co-expresión determinada experimentalmente en nuestro laboratorio de dos plásmidos es de un 95 %.

Análisis de la morfología neuronal

Para los análisis morfométricos (número de axones) de las neuronas hipocampales se utilizaron varios criterios que permitieran el estudio de una población neuronal homogénea. Sólo se analizaron las células que presentan tinción positiva para el marcador neuronal MAP-2, que permitió excluir células no neuronales presentes en los

cultivos. Aunque el cultivo se encuentra enriquecido en neuronas piramidales, existe una pequeña proporción de interneuronas GABAérgicas con características morfológicas distintivas. Mientras que las neuronas piramidales poseen cuerpos celulares de 15-20 μm , con dos a cinco neuritas no diferenciadas y un axón de largo mayor a 100 μm a los 3 DIV, las neuronas no piramidales tienen cuerpos celulares más pequeños con forma de huso de 8-10 μm de diámetro y de 2 a 3 procesos largos muy finos (Benson y cols. 1994).

Un axón se definió como una prolongación de largo $\geq 100 \mu\text{m}$ caracterizada por un gradiente proximal distal de tau-1.



RESULTADOS

Caracterización de la expresión y distribución subcelular de las calpaínas en neuronas hipocampales en cultivo

Nuestra hipótesis de trabajo plantea que la calpaína 2 participaría de los mecanismos moleculares que determinan la adquisición de polaridad neuronal en cultivos primarios de neuronas hipocampales. Nuestro primer grupo de experimentos se abocó a caracterizar nuestro modelo biológico, en cuanto a la expresión y localización subcelular de las calpaínas.

Aunque los cultivos de neuronas hipocampales no presentan una completa sincronía temporal en la adquisición de su fenotipo polarizado, se pueden obtener extractos de proteínas representativos de cada uno de los estadios de desarrollo, a las 18-24 hrs post plaqueo (estadio 2), 48 hrs (80% de las neuronas con un axón definido o estadio 3) o 72 hrs (>95% de neuronas en estadio 3). Como se muestra en la figura 1a la especificación del axón va acompañada de un incremento significativo en la expresión de tau-1, un epítipo de la proteína de unión a microtúbulos tau que corresponde al estado no fosforilado en las serinas 199 y 202 (Mandell y Banker 1996). Este epítipo es el marcador axonal más utilizado y presenta un suave gradiente próximo-distal en el

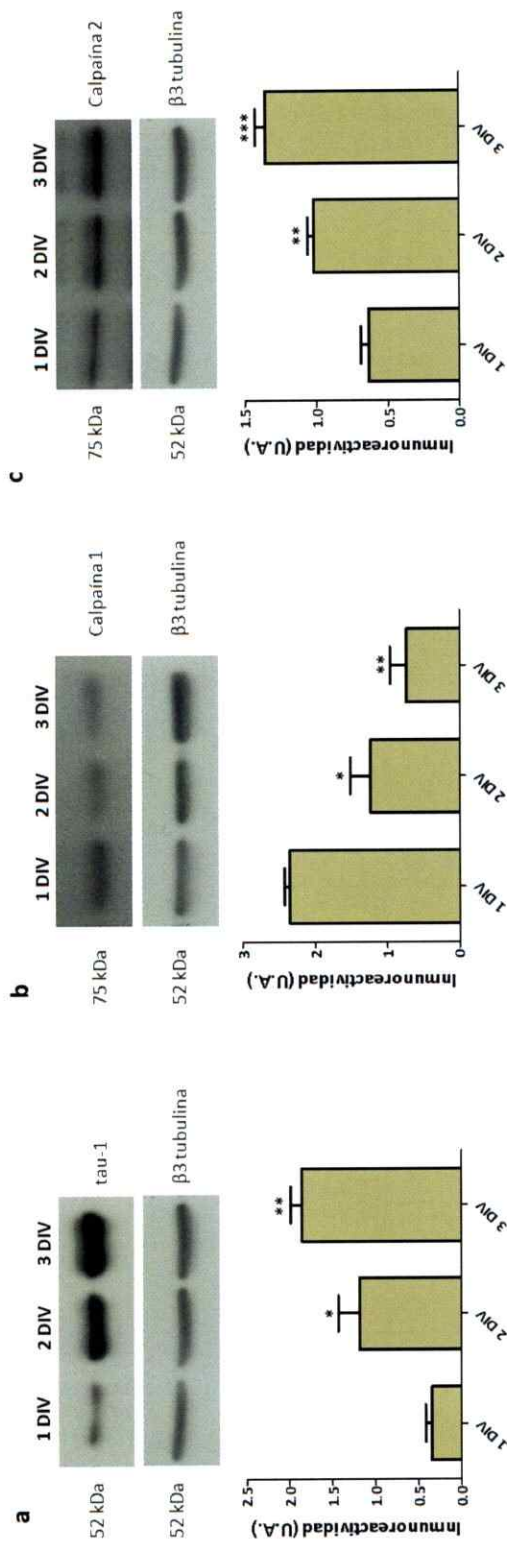


Figura 1. Expresión de las calpains en neuronas hipocámpales en cultivo durante la especificación axonal. Los cambios en los niveles de calpaina 1 (b) y calpaina 2 (c) se muestran mediante *western blot*. Como control se muestra el incremento significativo en la inmunoreactividad del marcador tau-1 que acompaña la especificación axonal (a). La inmunoreactividad de las bandas correspondientes a calpaina 1 y calpaina 2 muestran un comportamiento antagónico durante la maduración del cultivo: mientras calpaina 2 aumenta, calpaina 1 disminuye. Los valores mostrados (en unidades arbitrarias) corresponden a la media \pm SEM y fueron analizados mediante el test de Student. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$, $n = 3$.

axón en inmunofluorescencia (figura 7 y sucesivas). Mediante *western blot* es detectado como una banda de peso molecular aparente de 52 kDa (figura 1a).

La especificación axonal se correlaciona con cambios antagónicos en la expresión de calpaína 1 y calpaína 2: mientras que la primera disminuye su expresión (figura 1b), la segunda se incrementa significativamente (figura 1c). Estos cambios sugieren que el sistema de las calpaínas podría tener un rol en los profundos cambios morfológicos que presentan las neuronas en estadios tempranos de su desarrollo en cultivo.

En general la distribución subcelular es un poderoso indicativo del rol de una determinada molécula en el proceso de adquisición de polaridad en las neuronas: por una parte están las moléculas que se acumulan preferentemente en el axón y en especial en los conos de crecimiento y que en general poseen roles positivos en la especificación y crecimiento axonal; por otra parte la actividad de otras moléculas se excluye del axón y se concentra en el compartimiento somático y particularmente en las neuritas menores donde ejercen un papel negativo en su crecimiento.

Mediante inmunofluorescencia utilizando anticuerpos específicos y validados se procedió a evaluar la distribución de las calpaínas en neuronas morfológicamente simétricas (estadio 2) y neuronas que poseen un axón definido (estadio 3). Ambas calpaínas presentan en estos estadios una distribución esencialmente somática (figura 2 y 3), aunque la calpaína 2 posee una marca débil en la sección proximal de las neuritas en estadio 2 (figura 3, inserto, puntas de flecha). La marca se muestra particulada, especialmente para calpaína 2, y homogénea en el soma en neuronas en estadio 2.

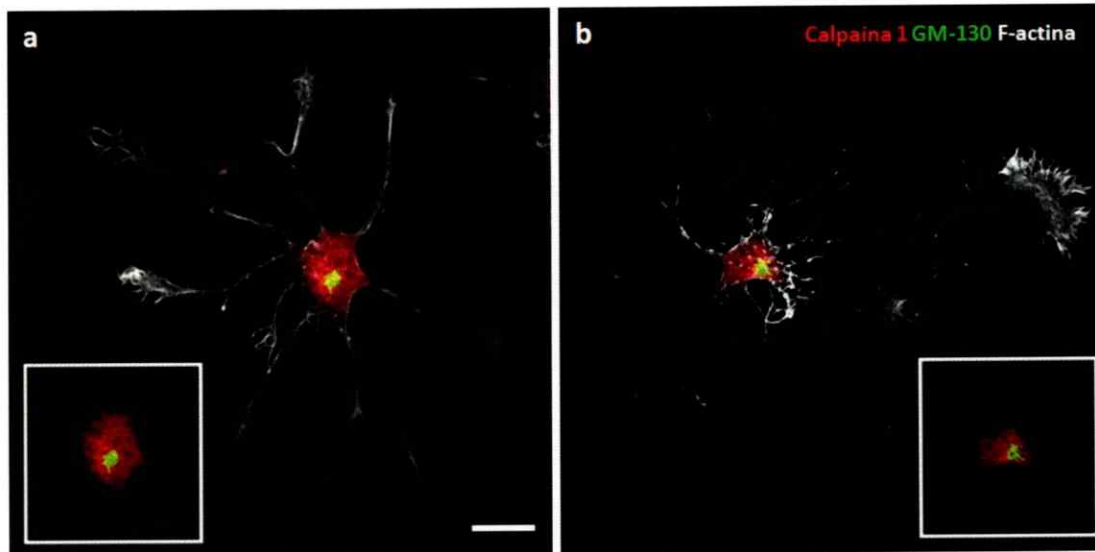


Figura 2. Distribución subcelular de calpaína 1 durante el desarrollo de polaridad en neuronas hipocámpales en cultivo. La distribución de calpaína 1 (rojo) en una neurona en estadio 2 (a) y una en la transición entre el estadio 2 y el 3 (b) se muestra por inmunocitoquímica. La distribución de calpaína 1 se muestra homogénea en el soma sin una particular concentración en el área yuxtannuclear correspondiente al aparato de Golgi (GM130, verde). Las imágenes corresponden células representativas de cultivos hechos en triplicado. Barra de tamaño, 20 µm.

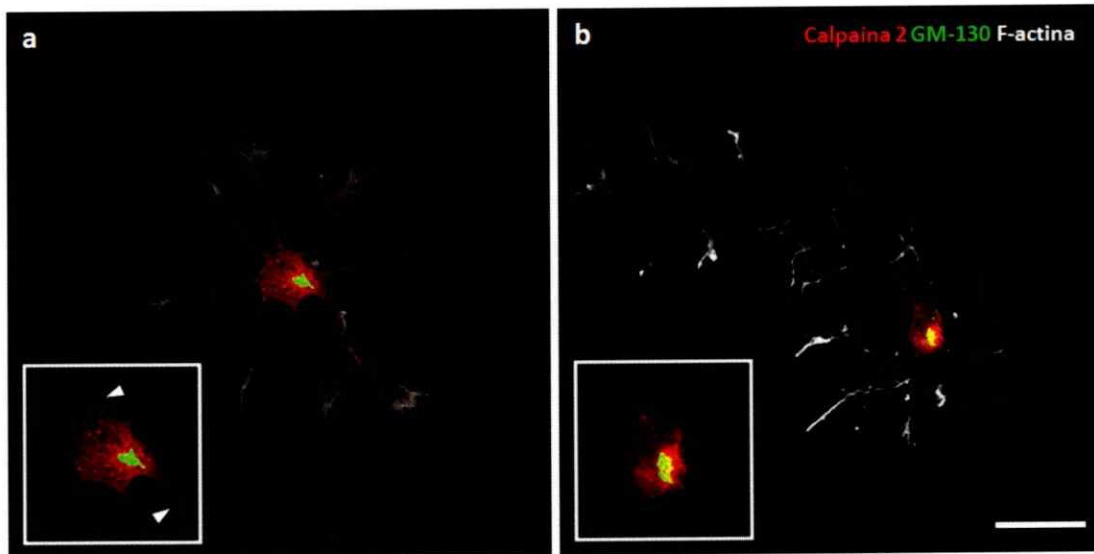


Figura 3. Distribución subcelular de calpaína 2 durante el desarrollo de polaridad en neuronas hipocámpales en cultivo. La distribución de calpaína 2 (rojo) en una neurona en estadio 2 (a) y una en la transición entre el estadio 2 y el 3 (b) se muestra por inmunocitoquímica. La distribución de calpaína 2 se muestra homogénea en el soma con una leve marca en las neuritas en (a, puntas de flecha), pero se concentra en el área yuxtannuclear correspondiente al aparato de Golgi (GM130, verde) cuando la neurona especifica el axón (b). Las imágenes corresponden células representativas de cultivos hechos en triplicado. Barra de tamaño, 20 μm .

La distribución de calpaína 1 es muy similar entre neuronas no polarizadas (figura 2a) y neuronas que han definido su axón (figura 2b), en cambio la distribución de calpaína 2 en neuronas que extienden su axón se concentra en un área yuxtannuclear, co-distribuyendo parcialmente con un marcador de cisternas *cis* del aparato de Golgi (GM130, figura 3b, inserto).

Una co-distribución similar se observa entre calpaína 2 y un marcador de retículo endoplásmico (KDEL) en neuronas de estadio 3 (figura 4), lo que permite sugerir que existiría un papel para esta proteasa en procesos de tráfico vesicular a lo largo de la ruta secretoria.

Para determinar si la distribución observada mediante inmunofluorescencia correspondía a calpaína activa se utilizó una sonda fluorescente (t-BOC), la que se acumula en las células por conjugación a cisteínas en proteínas y tras la proteólisis por calpaínas libera un grupo coumarina fluorescente que aunque no es permeable a las membranas difunde libremente. Para evaluar correctamente la localización del producto fluorescente se limitó a un máximo de 30 min la incubación con la sonda para reducir la difusión desde el sitio de proteólisis (Mingorance-Le Meur y O'Connor 2009). Como se observa en la figura 5 el producto fluorescente (en azul) se acumula en el soma tanto en neuronas en estadio 2 (figura 5a) como en estadio 3 (figura 5b). La distribución es muy similar con 20 min (figura 5a) o 30 min de incubación (figura 5b) con la sonda, lo que nos indica que los fenómenos de difusión pueden no ser significativos y sugiriendo que al menos en las

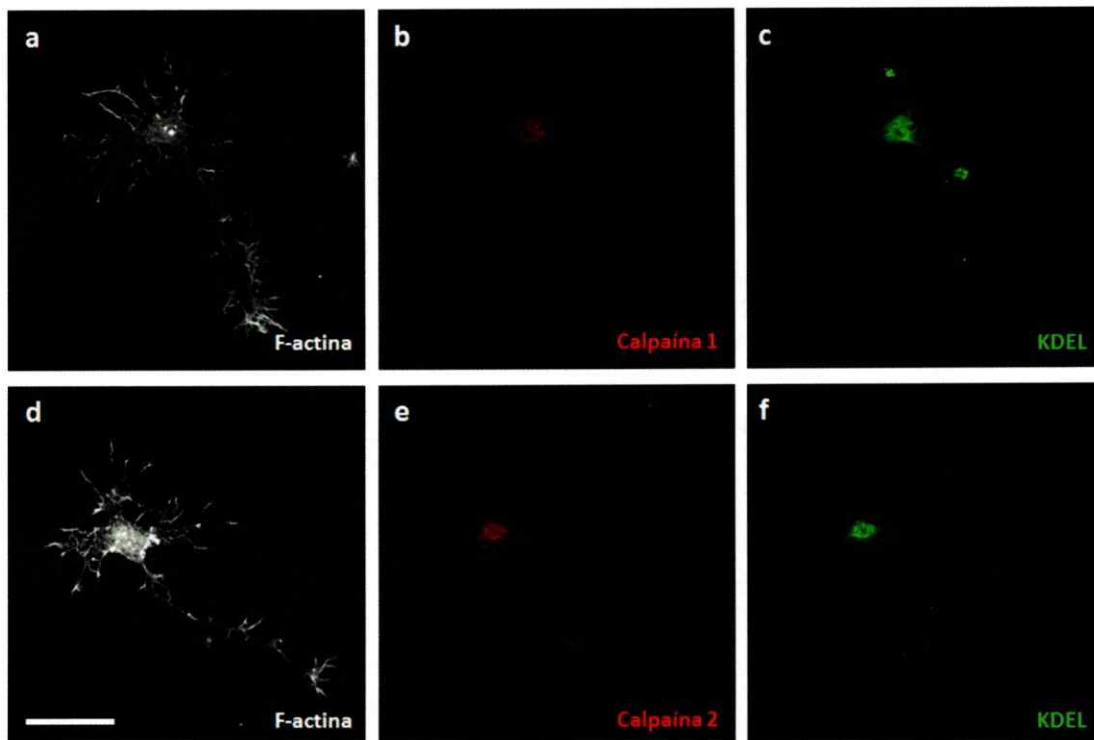


Figura 4. Calpaína 2 co-distribuye parcialmente con el retículo endoplásmico en neuronas en estadio 3. La distribución de calpaína 1 o 2 (rojo), y KDEL (verde) en neuronas en estadio 3 temprano se muestra por inmunocitoquímica. A diferencia de calpaína 1 (b), calpaína 2 (e) se concentra el área con la marca más intensa de un marcador de retículo endoplásmico (KDEL) (c,f). Las imágenes corresponden células representativas de cultivos hechos en triplicado. Barra de tamaño, 20 μm .

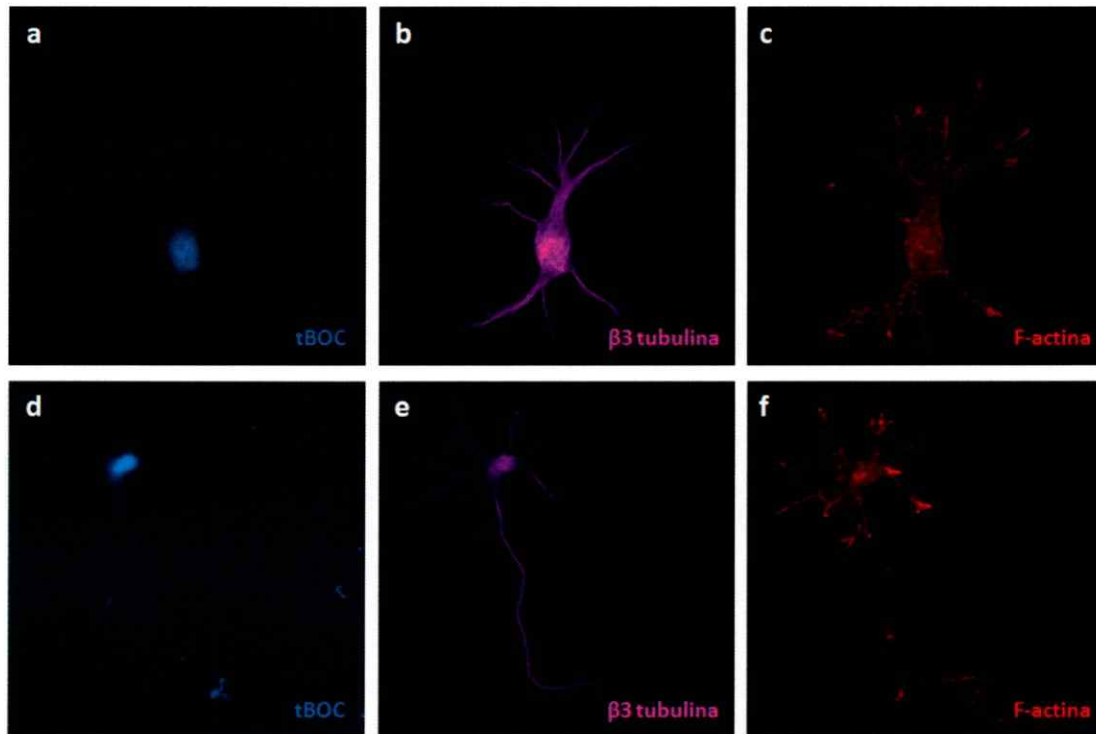


Figura 5. Distribución subcelular de la actividad de las calpaínas durante el desarrollo de polaridad en neuronas hipocámpales en cultivo. La distribución de la actividad proteolítica de las calpaínas se muestra mediante microscopía de fluorescencia de neuronas hipocámpales incubadas por 20 minutos (a,b,c) o 30 minutos (d,e,f) con t-BOC, un sustrato que una vez proteolizado produce la acumulación de cumarina fluorescente en el sitio de proteólisis (azul). La actividad proteolítica se restringe esencialmente al soma tanto en neuronas en estadio 2 (a,b,c) como en estadio 3 (d,e,f). La identidad neuronal se estableció mediante co-tinción con el marcador β 3-tubulina (rosado) y la morfología fina mediante tinción con faloidina fluorescente que marca la actina fibrilar (rojo). Note que un mayor tiempo de incubación produce una mayor acumulación del producto fluorescente sin afectar la distribución observada indicando que el fenómeno de difusión contribuye marginalmente a la fluorescencia observada. Las imágenes corresponden células representativas de ensayos hechos en triplicado.

condiciones técnicas del ensayo realizado, la distribución somática observada en las calpaínas correspondería a proteasa activa.

Efecto de tratamiento de neuronas hipocampales con ALLM

Para evaluar el efecto de la inhibición de las calpaínas en la morfología de las neuronas hipocampales, estas se trataron a las 18 hrs post plaqueo (estadio 2) con el inhibidor de calpaínas ALLM a una concentración de 20 μ M, la que inhibe completamente la actividad de las calpaínas en líneas celulares ya que un pre-tratamiento con el inhibidor a dicha concentración impide la generación de los fragmentos proteolíticos específicos de α -fodrina (un doblete de pesos moleculares aparentes 150 y 145 kDa) producto de la activación de las calpaínas por un ionóforo de calcio (figura 6a). Por otra parte el tratamiento con ALLM a 20 μ M por 4 hrs en neuronas hipocampales no induce la acumulación de proteínas poli-ubiquitinadas, evaluado mediante *western blot* con un anticuerpo específico para ubiquitina, lo que indica que no inhibe al proteasoma (figura 6b). Comparado con las neuronas tratadas con el vehículo (DMSO, figura 7a) que extienden un único axón positivo para tau-1 a los 3 DIV, las neuronas tratadas con ALLM pierden su correcta polaridad y presentan múltiples prolongaciones largas tipo axón, caracterizadas por la presencia del marcador axonal tau-1 (figura 7b). Este fenotipo representa el 60% de las neuronas en el cultivo, destacando mayoritariamente la generación de morfología bipolar (2 axones) (figura 7c). Esto puede deberse a la tendencia intrínseca de las neuronas en cultivo a producir un eje bipolar de simetría que se observa

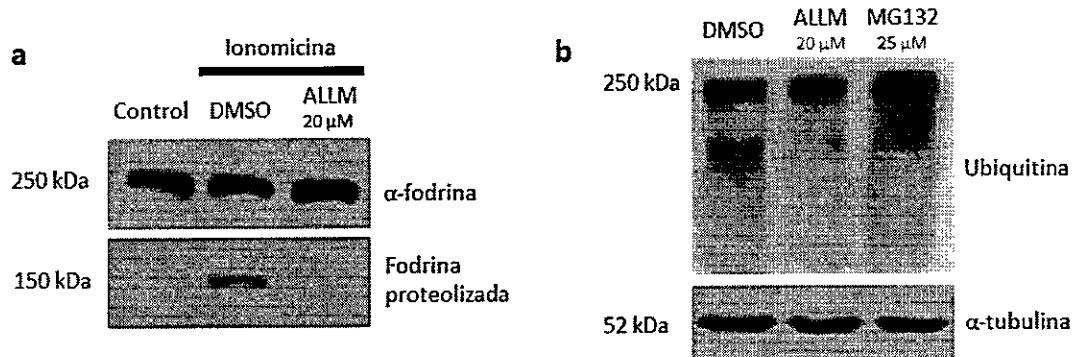


Figura 6. Inhibición selectiva de las calpaínas mediada por ALLM. El pre-tratamiento de neuroblastomas SH-SY5Y con ALLM (20 μ M) protege a la α -fodrina de la degradación por calpaínas mediada por calcio, evaluada por la aparición de su producto específico de degradación, mediante *western blot* (a). Por otra parte, el tratamiento por 4 hrs de neuronas hipocámpales de 1 DIV con ALLM (20 μ M) no induce la acumulación de proteínas poli-ubiquitinadas a diferencia del inhibidor del proteasoma MG132 (b). Las imágenes corresponden a *western blot* representativos de ensayos hechos en triplicado.

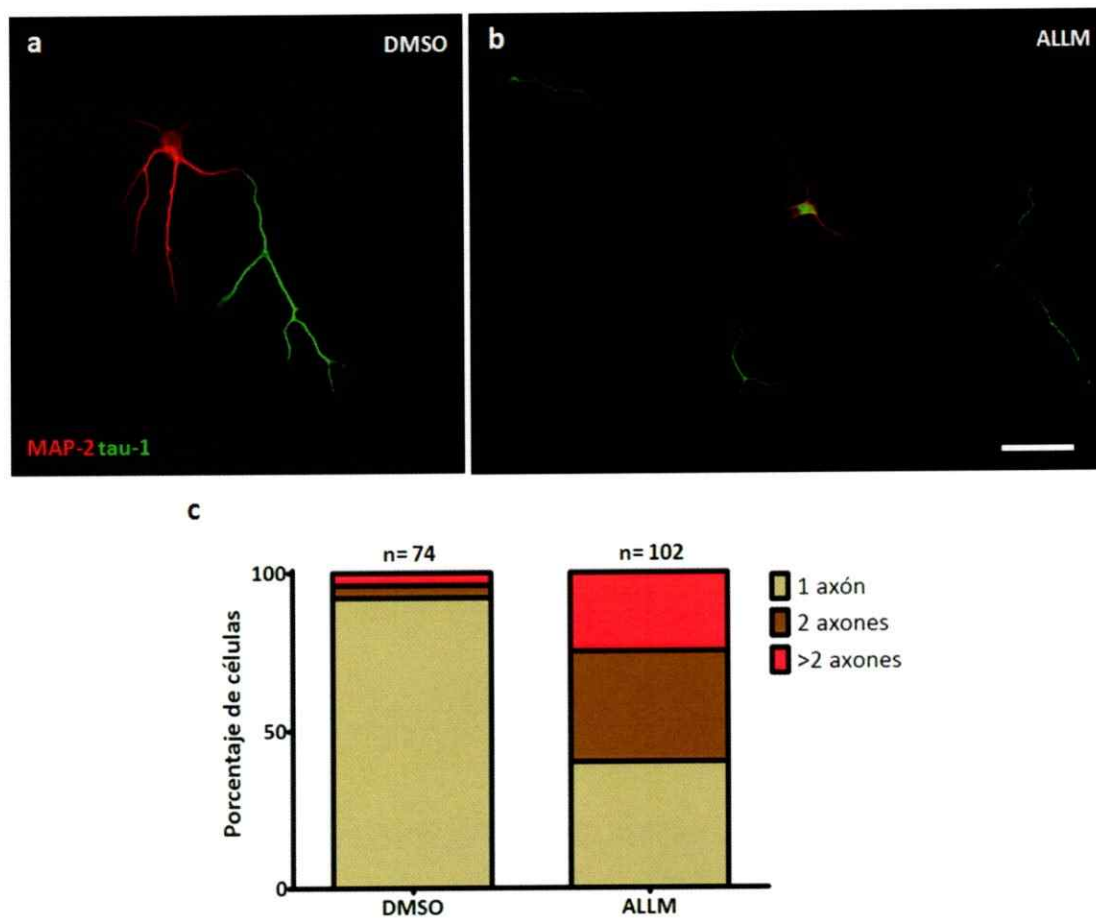


Figura 7. El tratamiento de neuronas hipocampales con ALLM induce la generación de múltiples axones. Neuronas hipocampales fueron tratadas a las 18 hrs post plaqueo con ALLM (20 μ M) (b) o el vehículo (DMSO, 0.01%) (a) y la inmunocitoquímica para MAP-2 (rojo) y tau-1 (verde) se realizó a las 72 hrs. La cuantificación del efecto del ALLM en la morfología neuronal se muestra en (c). Se consideraron axones las prolongaciones positivas para tau-1 mayores a 100 μ m. Las imágenes corresponden células representativas de cultivos hechos en quintuplicado. Barra de tamaño, 50 μ m.

tempranamente en el desarrollo del cultivo con la consolidación del primer par de neuritas (Calderon de Anda y cols. 2008).

El fenotipo de neuronas multiaxónicas se mantiene con la maduración del cultivo y a los 6 DIV, estos presentan patrones complejos de ramificación, similares a los observados en neuronas controles (figura 8).

La aparición de múltiples neuritas con tinción positiva para tau-1, sugería que las neuronas poseían más de un axón. Es por esto, que utilizamos el anticuerpo monoclonal SMI-31 que presenta inmunoreactividad con residuos fosforilados por serina-treonina quinasas dirigidas por prolina en MAP1B, neurofilamentos y tau (Johnstone y cols. 1997), aunque la marca obtenida en los cultivos de corto plazo utilizando este anticuerpo ha sido adscrita eminentemente a la presencia de las formas fosforiladas de MAP1B (González-Billault, observaciones no publicadas). El anticuerpo SMI-31 marca preferentemente el compartimiento axonal en neuronas controles (figura 9a). De esta forma, los axones múltiples generados por el tratamiento con ALLM también son positivos para el epítipo reconocido por SMI-31 (verde, figura 9b).

En su conjunto estos resultados sugieren que la inhibición farmacológica de las calpaínas indujo un aumento significativo en el número de neuronas con axones supernumerarios, que presentaban al menos dos marcadores de identidad axonal.

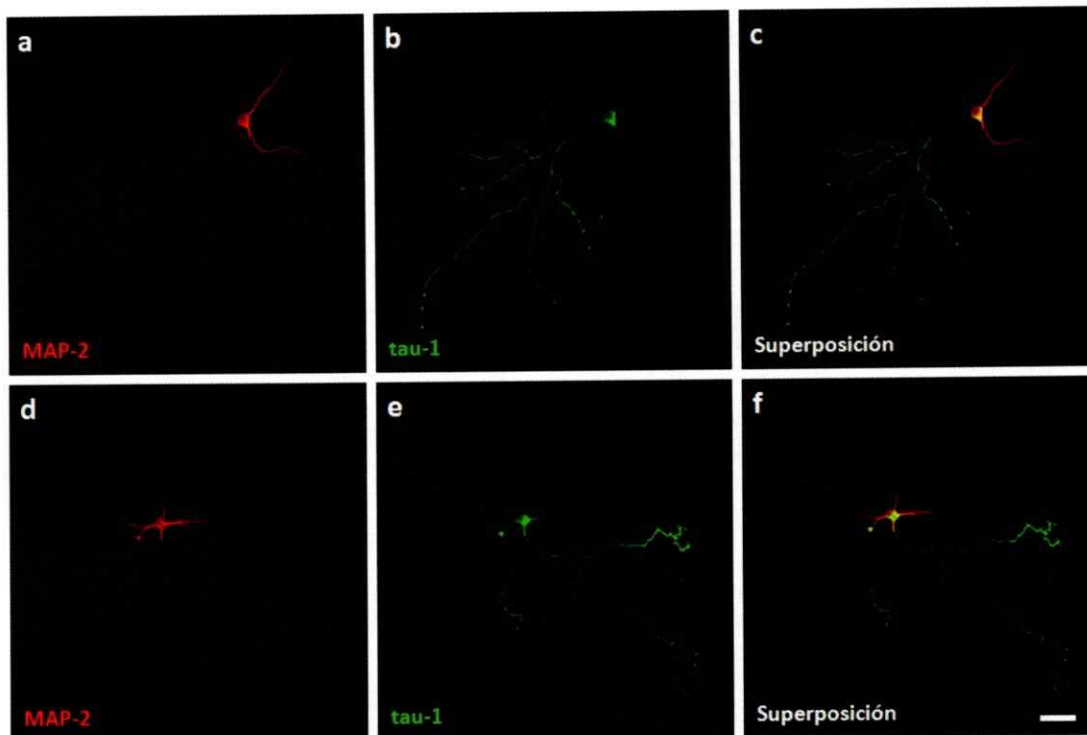


Figura 8. Los multiaxones inducidos por el ALLM elongan y ramifican correctamente y se diferencian claramente de las neuritas menores con la dendritogénesis. Neuronas hipocámpales fueron tratadas a las 18 hrs post plaqueo con ALLM (20 μ M) (c,d,f) o el vehículo (DMSO, 0.01%) (a,b,c) y la inmunocitoquímica para MAP-2 (rojo) y tau-1 (verde) se realizó a los 6 DIV. Las imágenes corresponden células representativas de cultivos hechos en duplicado. Barra de tamaño, 50 μ m.

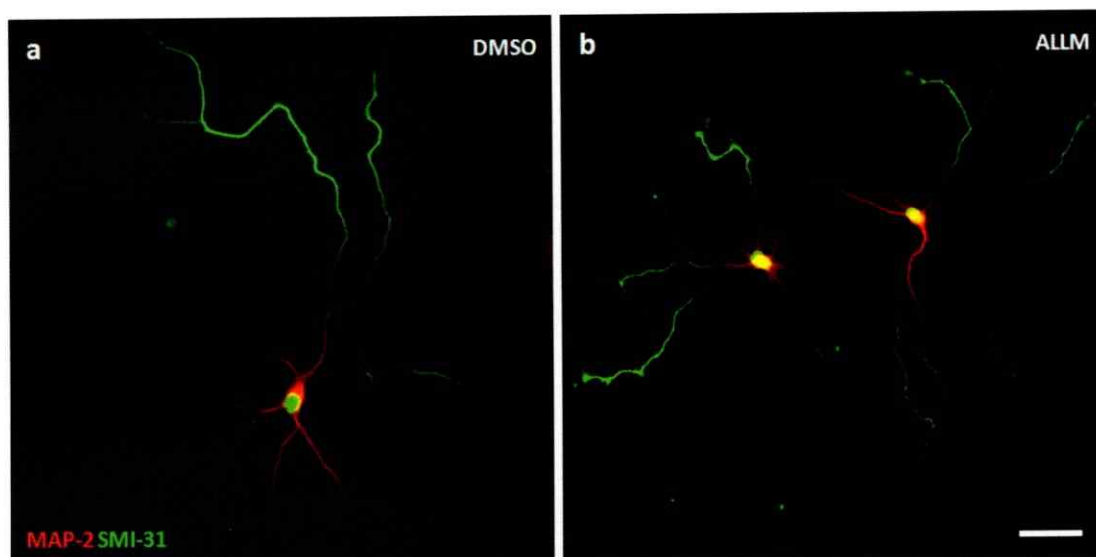


Figura 9. Los multiaxones inducidos por el ALLM son positivos también para MAP-1B fosforilado en modo I. Neuronas hipocámpales fueron tratadas a las 18 hrs post plaqueo con ALLM (20 μ M) (b) o el vehículo (DMSO, 0.01%) (a) y la inmunocitoquímica para MAP-2 (rojo) y SMI-31 (verde) se realizó a los 3 DIV. Las imágenes corresponden células representativas de cultivos hechos en duplicado. Barra de tamaño, 50 μ m.

Efecto de la sobreexpresión de calpastatina en el desarrollo de polaridad neuronal

Como se mencionó en la introducción, las calpaínas poseen un mecanismo endógeno que regula su actividad, basado en la presencia de la proteína calpastatina. Por lo tanto, en el siguiente grupo de experimentos quisimos determinar el efecto de la sobreexpresión de calpastatina, sobre la adquisición de polaridad en cultivo. Para ello, las neuronas fueron nucleofectadas previo al plaqueo con un constructo bicistrónico que expresa la calpastatina y una proteína fluorescente verde (GFP) destinada a mitocondria. Como se muestra en la figura 10, la transfección de este constructo en células de neuroblastoma N1e-115, induce una potente expresión una banda de peso molecular aparente de 110 kDa reconocida por un anticuerpo específico de calpastatina (figura 10a) además de presentar una distribución de GFP con características mitocondriales (figura 10b). Las neuronas que expresan el constructo mostraron una correcta polarización, caracterizada por la presencia de un solo axón positivo para tau-1 (figura 10). El análisis poblacional a partir de neuronas transfectadas con calpastatina en tres cultivos independientes muestra que si bien encontramos un mínimo número de casos que presentaban múltiples axones, las neuronas mayoritariamente se desarrollaron con un solo axón (figura 11).

La diferencia observada entre el efecto de la sobreexpresión de calpastatina y el tratamiento con ALLM nos sugiere por lo tanto que el efecto del inhibidor químico podría deberse a su acción sobre un blanco molecular distinto a las calpaínas, o que alternativamente que la inhibición de calpastatina sobre las calpaínas necesitara de

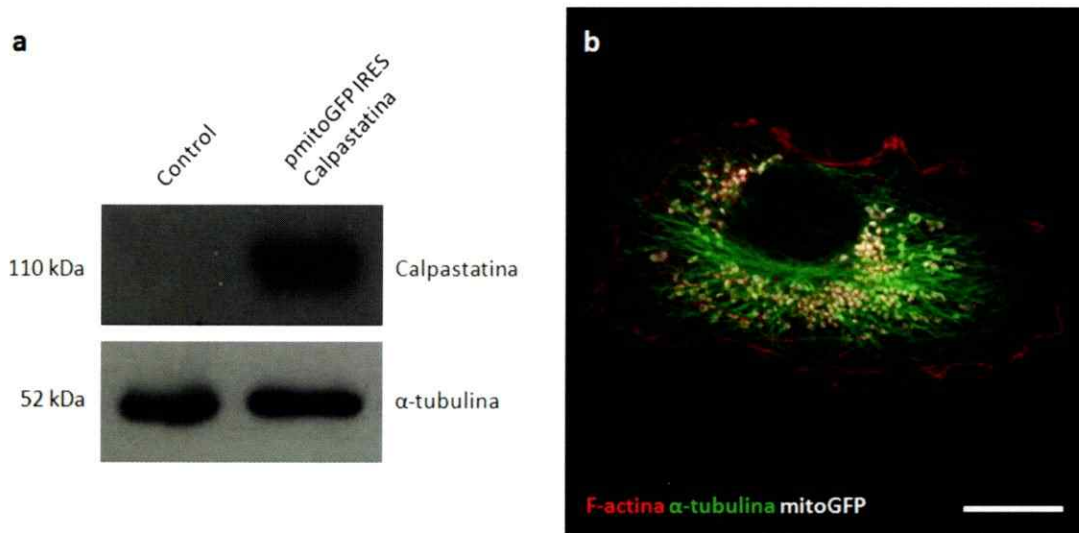


Figura 10. Análisis de la expresión del constructo pmitoGFP IRES calpastatina FV. Neuroblastomas N1e-115 fueron transfectados con el vector pmitoGFP IRES calpastatina FV y la expresión de calpastatina se analizó por *western blot* (a) y la expresión de mitoGFP por inmunocitoquímica utilizando como co-tinciones faloidina fluorescente (rojo) y α -tubulina (verde) (b). La imagen corresponde a una célula representativa de experimentos realizados en triplicado. Barra de tamaño, 20 μ m.

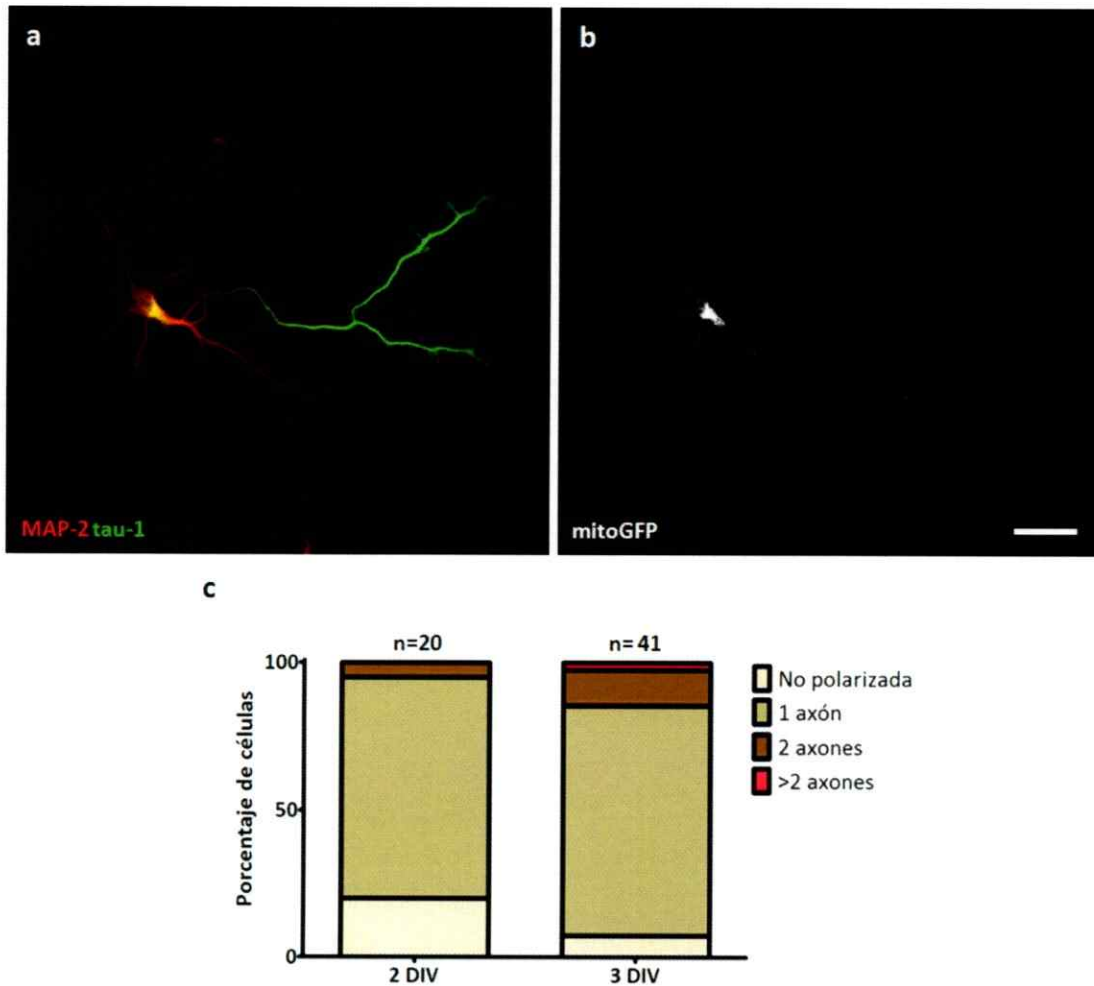


Figura 11. La sobreexpresión de calpastatina no induce cambios morfológicos en neuronas hipocámpales en cultivo. Neuronas hipocámpales fueron nucleofectadas antes del plaqueo con un constructo bicistrónico que codifica para calpastatina y una proteína fluorescente verde (GFP) destinada a mitocondria. A los 3 DIV se realizó la inmunocitoquímica para MAP-2 (rojo) y SMI-31 (verde) (a). Las células transfectadas se identificaron por la fluorescencia mitocondrial de la GFP (b). La cuantificación del efecto de la sobreexpresión de calpastatina en la polaridad neuronal se muestra en (c). La imagen corresponde a una célula representativa de experimentos hechos en triplicado. Barra de tamaño, 20 μ m.

cambios conformacionales inducidos por calcio que estarían ausentes en nuestro sistema (ver discusión).

Efecto del *knockdown* de las calpaínas en la especificación axonal

La inactivación de las calpaínas a través de la sobreexpresión de la calpastatina, fue complementada mediante otra estrategia que permite la inhibición específica de las calpaínas. Es así que, neuronas hipocampales en cultivo se transfectaron con plámidios que expresan shRNAs contra calpaína 1 y calpaína 2. En una etapa inicial evaluamos un conjunto de 5 shRNA contra calpaína 1 y 6 shRNA contra calpaína 2, en cuanto a su capacidad para disminuir los respectivos niveles de proteínas en neuroblastomas de ratón N2a y N1e-115 a las 48 hrs post-transfección. Como muestra la figura 12 el shRNA #67 y el shRNA #72 fueron los más eficientes para reducir los niveles de calpaína 1 y 2 respectivamente, y fueron subsecuentemente utilizados para la transfección en neuronas hipocampales.

Las transfecciones de los shRNA para calpaína 1, calpaína 2 o la co-transfección de ambos fueron realizadas en conjunto con GFP, para la posterior identificación de las neuronas transfectadas. Es así que aquellas neuronas GFP-positivas fueron evaluadas en cuanto a la generación la polaridad neuronal, y bajo estas condiciones verificamos que la inactivación individual o conjunta de las calpaínas no indujo un cambio fenotípico significativo con respecto a la transfección de un shRNA contra un gen irrelevante (luciferasa) (figura 13).

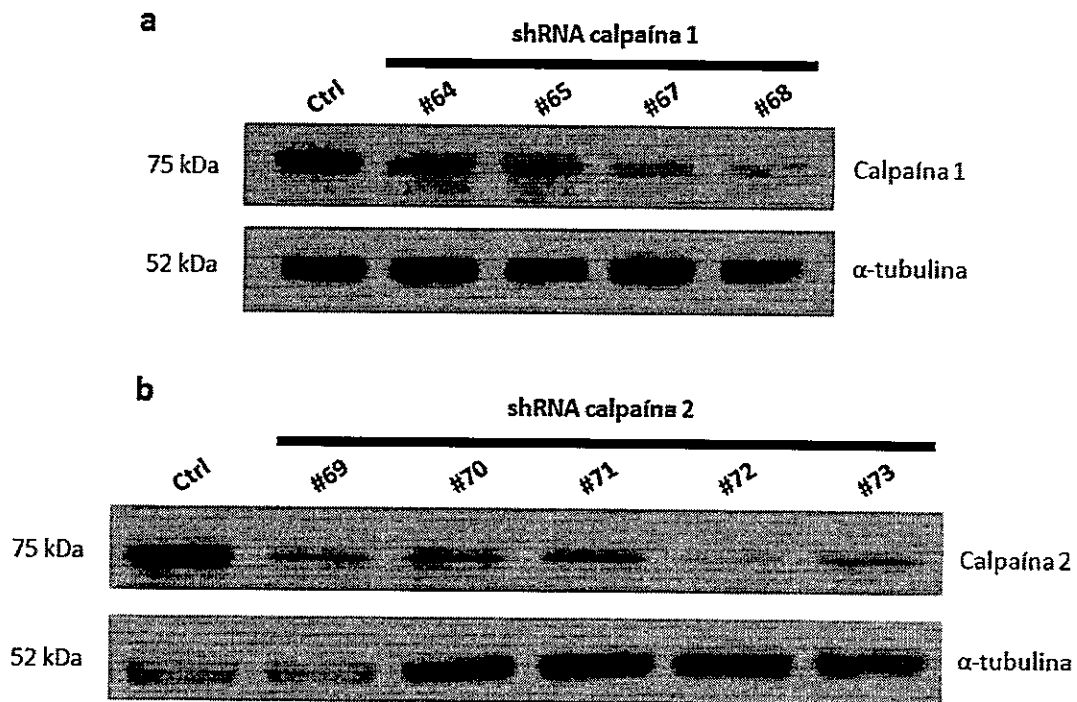


Figura 12. Caracterización de la eficiencia de *knockdown* de los shRNAs para calpaína 1 y calpaína 2. La eficiencia de *knockdown* de los shRNAs para calpaína 1 (a) y calpaína 2 (b) se evaluó por *western blot* en neuroblastomas transfectados con los distintos vectores tras 48 hrs de expresión. La figura muestra un *western blot* representativo de experimentos hechos en triplicado.

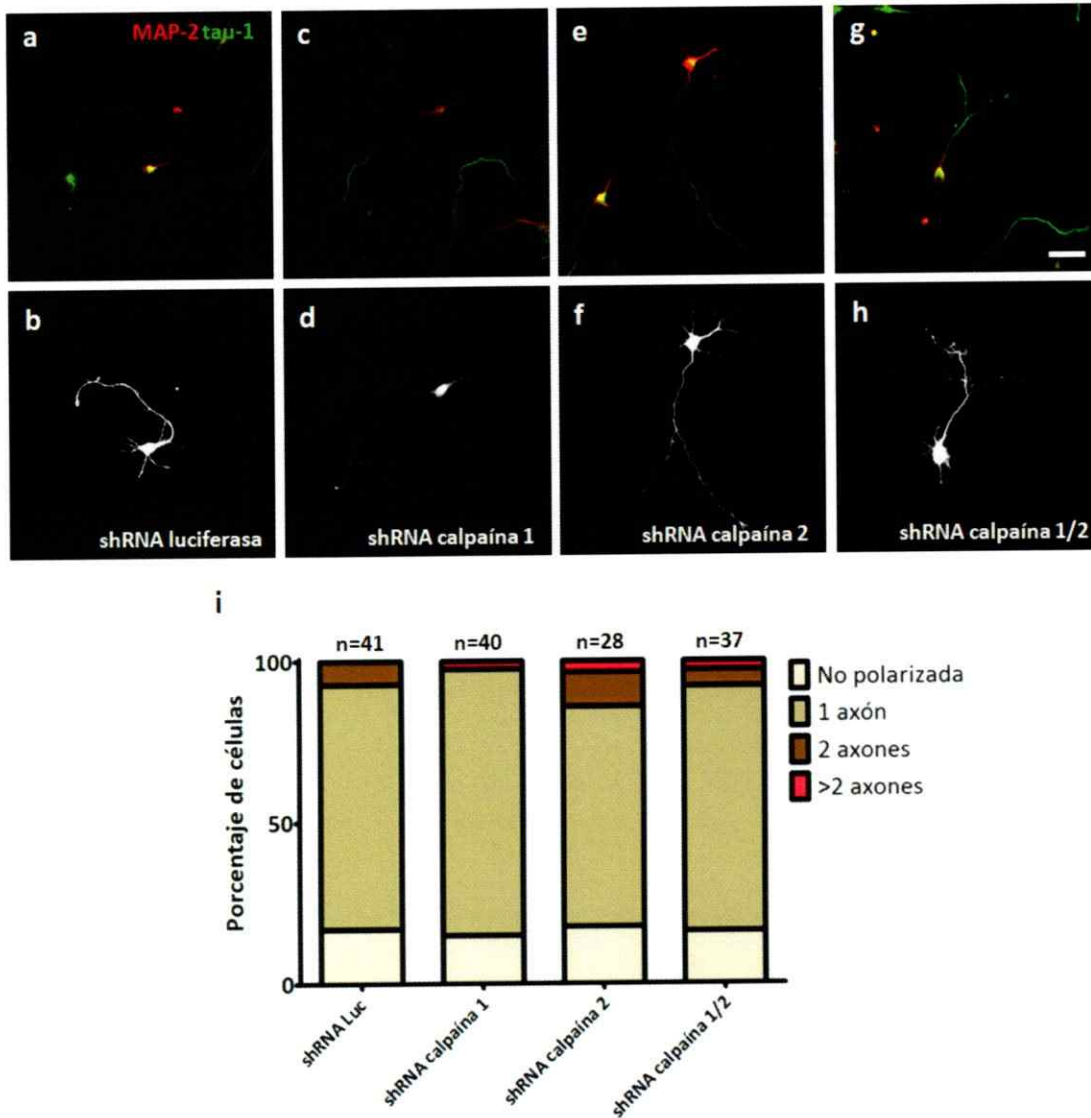


Figura 13. El *knockdown* de las calpaínas no produce cambios morfológicos en neuronas hipocámpales en cultivo. Los vectores de expresión para los shRNA de luciferasa, calpaína 1 y calpaína 2 fueron cotransfectados con maxGFP, que permitió evaluar las células transfectadas (b,d,f,h). No se observaron cambios en la determinación de polaridad en ninguna de las condiciones, como muestra la tinción para MAP-2 y tau-1 en células de 2 DIV (a,c,e,g). La cuantificación se muestra en (i) n=3. Barra de tamaño 50 μ m.

Aunque los shRNAs logran sólo una reducción de un 45% en los niveles de calpaína 1 y de un 51 % en los de calpaína 2 (figura 12) lo que podría impactar en una efectiva inhibición de la actividad de estas proteasas, los resultados obtenidos confirman lo observado con la sobreexpresión de calpastatina y contrastan con los obtenidos con ALLM.

Efecto de la sobreexpresión de una mutante proteolíticamente inactiva de calpaína 2 en la polaridad neuronal

Los datos anteriormente colectados sugerían que la inhibición de las calpaínas obtenida farmacológicamente, no era recapitulada en los experimentos de inactivación específica, ya sea sobreexpresando calpastatina o usando shRNAs para calpaína 1 y/o calpaína 2. Por lo tanto, para confirmar que la inhibición específica de las calpaínas produce fenotipos claramente distintos a los de la inhibición farmacológica, se utilizó una tercera estrategia molecular consistente en la sobreexpresión de una mutante catalíticamente inactiva de calpaína 2 (PD), en que la cisteína que realiza el ataque nucleofílico sobre el enlace peptídico se reemplazó por serina (C105S). La transfección de esta mutante ha demostrado que induce anomalías en la polarización de neutrófilos (Nuzzi y cols. 2007). La expresión de la calpaína 2 PD no produjo cambios aparentes en la polaridad axodendrítica (figura 14a). Interesantemente la calpaína 2 PD sobreexpresada conserva la distribución yuxtannuclear característica de la calpaína 2 endógena (figura 14b).

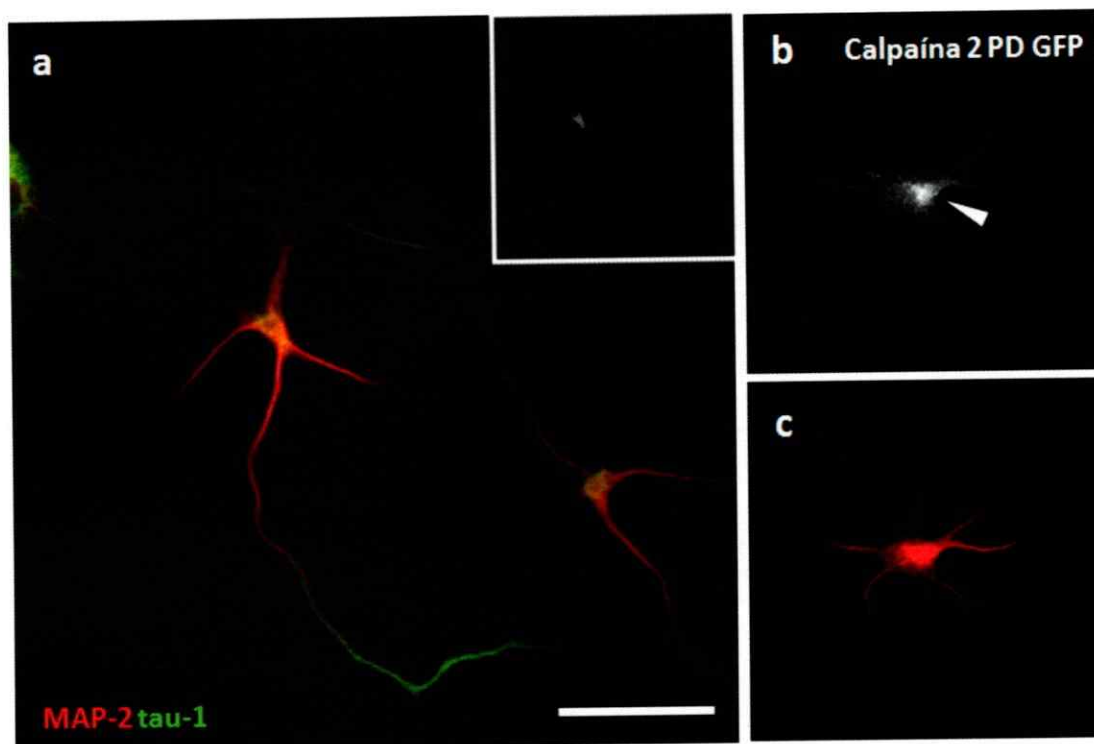


Figura 14. La expresión de una calpaína 2 catalíticamente inactiva no induce cambios en la determinación de la polaridad en neuronas hipocámpales. La nucleofección de calpaína 2 catalíticamente inactiva (PD, inserto) no produce cambios en la polaridad axo-dendrítica evaluada por inmunofluorescencia para los marcadores MAP-2 y tau-1 (a); 15 células analizadas, n=2. La distribución de la calpaína 2 PD se asemeja a la distribución endógena de la calpaína 2 limitándose al compartimiento somatodendrítico marcado con MAP-2 (c) y concentrándose el área yuxtannuclear (b, punta de flecha). Barra de tamaño 50 μm .

Estos resultados en conjunto con los obtenidos con la sobreexpresión de calpastatina y el *knockdown* de las calpaínas, nos permiten concluir que la inhibición específica de las calpaínas no induce cambios morfológicos en las neuronas hipocampales. Se sugiere de esta forma que los mecanismos moleculares subyacentes al efecto del inhibidor farmacológico ALLM podrían no estar directamente relacionados con la inactivación de las calpaínas.

Efecto de otros inhibidores de calpaínas y catepsinas en la determinación de polaridad neuronal

En la parte final de este trabajo quisimos evaluar si el efecto del ALLM es compartido por otros inhibidores de calpaínas estructuralmente similares, como calpeptina y MDL28170 o es debido a la inhibición de las catepsinas, cisteínproteasas lisosomales que son inhibidas por el ALLM con una potencia similar a las calpaínas (Sasaki y cols. 1990).

Para ellos las neuronas fueron tratadas a las 18 hrs post plaqueo con calpeptina (25 μ M) o MDL 28170 (20 μ M), y la generación de polaridad fue evaluada con los marcadores somatodendrítico (MAP2) y axonal (tau-1) a los 3 DIV. La figura 15 muestra que ambos inhibidores a las concentraciones efectivas de inhibición de calpaínas, no producen cambios en la determinación de la polaridad neuronal.

Por otra parte el tratamiento con el inhibidor de catepsinas produjo un fenotipo peculiar caracterizado por un aumento del área de los conos de crecimiento (figura 16b) y la

presencia de varicosidades en el axón similares a ondas de actina (figura 16a). Las ondas de actina fueron descritas hace más de una década y corresponden a estructuras tipo cono de crecimiento que se mueven a lo largo del axón y sustentan su elongación (Ruthel y Banker 1999). Las ondas de actina aportan material (principalmente actina y proteínas asociadas) al cono de crecimiento (Ruthel y Banker 1998), por lo que su aparición va de la mano de un incremento del tamaño de estos (Flynn y cols. 2009), fenotipos que convergen en neuronas tratadas con el inhibidor de catepsinas. No obstante estos cambios morfológicos obtenidos al tratar las neuronas con el inhibidor de catepsinas, en ninguno de los casos se observó un cambio en el desarrollo de polaridad neuronal que fuese compatible con el efecto producido por el ALLM.

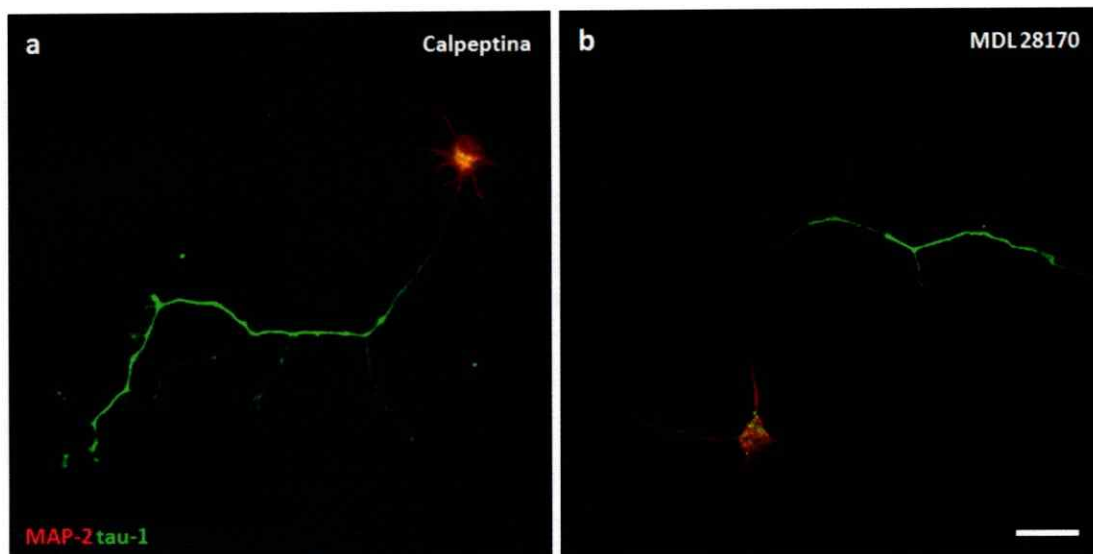


Figura 15. El tratamiento de neuronas hipocámpales con los inhibidores de calpaínas, calpeptina y MDL 28170, no induce cambios en la determinación del axón. El tratamiento con calpeptina (25 μ M) o MDL28170 (20 μ M) no produce una alteración en la morfología neuronal evaluada a los 3 DIV. La figura muestra dos células elegidas al azar de campos aleatorios en experimentos hechos en triplicado. Barra de tamaño 20 μ m.



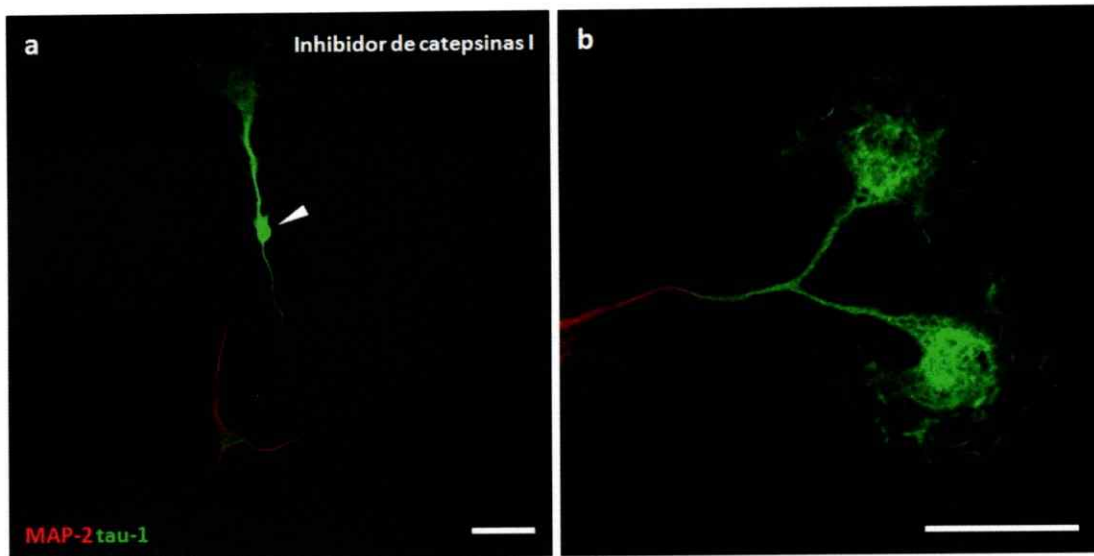


Figura 16. El tratamiento de neuronas hipocámpales con un inhibidor de catepsinas induce un aumento en el área de los conos de crecimiento sin afectar la polaridad neuronal. El tratamiento de neuronas hipocámpales con el inhibidor de catepsinas I (10 μ M) induce un notable aumento en el área de los conos de crecimiento a los 3 DIV (b). También se observa la presencia de estructuras semejantes a ondas de actina (a, punta de flecha). La figura muestra dos células elegidas al azar de campos aleatorios en experimentos hechos en triplicado. Barra de tamaño 20 μ m.

DISCUSIÓN

La participación de los sistemas de degradación de proteínas, esencialmente el UPS, ha surgido recientemente como un mecanismo relevante en la determinación de la polaridad neuronal (Bórquez y González-Billault 2011). En varios de estos estudios se observa la pérdida de la correcta polaridad y la formación de múltiples axones al utilizar inhibidores farmacológicos del proteasoma (Schwamborn y cols. 2007; Yan y cols. 2006). Estos compuestos, tales como el MG132 y el ALLN inhiben también otras proteasas como las calpaínas. De hecho el MG132 tiene un IC50 de 1.2 μM para calpaína 2, levemente superior a los 100 nM para el proteasoma (Tsubuki y cols. 1996), mientras que el ALLN es un inhibidor más potente de la calpaína 1 ($K_i=190$ nM) o de la calpaína 2 ($K_i=220$ nM) que del proteasoma ($K_i=6$ μM)(Rock y cols. 1994).

Es por esto que la participación las calpaínas no puede descartarse como un mecanismo adicional al UPS, en la determinación de la asimetría axo-dendrítica. Sin embargo al inicio de esta Tesis, no existían trabajos acerca de las funciones de las calpaínas en cultivos de neuronas hipocampales a corto plazo (1-3 DIV), por lo que procedimos con su caracterización y la evaluación para determinar si la inhibición de su actividad producía defectos en la especificación axonal.

Expresión y localización subcelular de las calpaínas en cultivos de neuronas hipocampales

El presente estudio muestra la presencia de las calpaínas 1 y 2 en cultivos de neuronas hipocampales a corto plazo (1-3 DIV) y se establecen cambios en su expresión que correlacionan con la determinación de la identidad axonal. Estos datos son confirmados por un estudio independiente aparecido en el transcurso de esta tesis, que mostró la presencia de calpaína 1 y 2 en neuronas hipocampales por inmunofluorescencia y observó que la expresión de calpaína 2 aumentaba con la maduración del cultivo entre 1 DIV y 4 DIV (Mingorance-Le Meur y O'Connor 2009), muy similar a los resultados obtenidos en este trabajo.

Interesantemente un estudio reciente mostró que cambios de expresión antagónicos, con una disminución en la expresión de calpaína 1 y un aumento en calpaína 2, se observan en células troncales neuronales cuando se diferencian a neuronas post-mitóticas positivas para β 3-tubulina (Santos y cols. 2012). Los cultivos de células hipocampales embrionarias (E18) de rata presentan inicialmente (4 horas post plaqueo) una gran proporción de precursores neuronales caracterizados por la expresión de SOX1 o nestina (30-50% de las células) y una baja inmunoreactividad (>10% de las células) para un marcador de neuronas maduras como MAP-2 (Limke y cols. 2003). Sin embargo, estas células maduran en los días sucesivos del cultivo en ausencia de factores que mantengan la pluripotencialidad como el factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF). Que los cambios en la expresión de

calpaínas observados en nuestro trabajo, puedan deberse al fenómeno subyacente de diferenciación, es una posibilidad interesante que merece estudios posteriores. Esto se ve reforzado por el hecho que *in vivo* la inmunoreactividad nuclear de calpaína 2 que se observa en los precursores neuronales en proliferación, cambia drásticamente a una somática en neuronas postmitóticas positivas para β 3-tubulina (Raynaud y cols. 2008), lo que sugiere que esta proteasa tendría un rol en la diferenciación neuronal.

Adicionalmente nuestro estudio mediante inmunocitoquímica mostró que tanto calpaína 1 como calpaína 2 poseían una distribución esencialmente somática con una colocalización parcial con marcadores de retículo endoplásmico (KDEL) y cisternas *cis* del aparato de Golgi (GM130). Estudios pioneros en la década de 1980 realizados mediante inmunohistoquímica en cortes de cerebro confirman nuestros resultados ya que muestran que la tinción para calpaínas es intensa sólo en el cuerpo celular de neuronas piramidales del hipocampo y disminuye rápidamente en las dendritas proximales (Hamakubo y cols. 1986; Siman y cols. 1985; Perlmutter y cols. 1990). Se reporta una marca axonal débil (Perlmutter y cols. 1990) o inexistente, a diferencia de los axones mielinizados que muestran una tinción más intensa (Hamakubo y cols. 1986). Estudios más recientes, realizados en neuronas hipocámpales en cultivo también reportan la ausencia de inmunotinción en los conos de crecimiento axonales (Mingorance-Lé Meur y cols. 2009).

Este es el primer estudio que reporta la asociación de las calpaínas con compartimento de endomembranas en neuronas, aunque existen estudios similares en células no

neuronales. Tanto calpaína 1, calpaína 2, CCS1 y calpastatina se asocian a las membranas del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, evaluado tanto co-localización con marcadores específicos como por fraccionamiento subcelular (Hood y cols. 2004; Hood y cols. 2003).

A nuestro conocimiento no existen precedentes que relacionen la actividad de las calpaínas con tráfico intracelular como sugeriría su conspicua distribución, aunque esta se asemeja a varios determinantes de polaridad neuronal como la proteína quinasa D (PKD)(Yin y cols. 2008), la quinasa con dominio LIM (LIMK)-1 (Rosso y cols. 2004) y GSK-3 β (Gärtner y cols. 2006). Interesantemente la inhibición de esta última genera neuronas multiaxónicas mediante un mecanismo que incluye la redistribución del tráfico vesicular, desde uno preferente hacia el axón a un tráfico equitativo a cada una de las neuritas inmaduras lo que sostiene su crecimiento (Gärtner y cols. 2006).

Efecto de la inhibición de las calpaínas en la morfología neuronal

Aunque el presente trabajo muestra claramente que el tratamiento de neuronas hipocampales con ALLM induce una pérdida de la polaridad, al generar neuronas con más de un axón, este efecto no es reproducido por otros inhibidores de las calpaínas como la calpeptina y el MDL 28170. Adicionalmente la utilización de formas más específicas de inhibición de las calpaínas, como la sobreexpresión de calpastatina, la utilización de shRNAs y la expresión de una forma dominante negativa de calpaína 2,

nos indica que el efecto del inhibidor químico se debe a su acción sobre un(os) blanco(s) por determinar.

El ALLM se ha utilizado ampliamente en la literatura como inhibidor de las calpaínas más selectivo que el ALLN, el cual también inhibe al proteasoma. Sin embargo en ensayos de proteólisis *in vitro* el ALLM muestra un leve efecto sobre la actividad del proteasoma, aunque a concentraciones mayores a las que ejerce efecto sobre la actividad de las calpaínas (Rock y cols. 1994; Figueiredo-Pereira y cols. 1994). Esto parece ser una característica común a varios inhibidores de las calpaínas del tipo peptidil aldehídos, ya que tanto el MDL 28170 (Caneda-Ferron y cols. 2008) como la calpeptina (Figueiredo-Pereira y cols. 1994) también inhiben débilmente al proteasoma. Los efectos del ALLM en la inhibición del proteasoma se encuentran limitados a ensayos *in vitro*, ya que el tratamiento de células intactas con ALLM a concentraciones incluso mayores a las utilizadas en nuestro estudio (25-50 μM), no inhibe la degradación mediada por el proteasoma de β -catenina (Aberle y cols. 1997), tuberina (Plas y Thompson 2003) o BACE-1 (Qing y cols. 2004). Sólo a concentraciones de 100 μM se ha demostrado que el ALLM inhibe la degradación mediada por el proteasoma de CREB (Taylor y cols. 2000) aunque no la de p27^{Kip1} (Borriello y cols. 2000). Estos resultados refuerzan nuestra observación que el ALLM no induce la acumulación de proteínas poliubiquitinadas en neuronas hipocampales (figura 6b).

Por otra parte, tanto el ALLM como la calpeptina inhiben a varios miembros de la familia de las catepsinas a potencias similares a las observadas para las calpaínas, por lo

que es más difícil discernir sus efectos. Sin embargo el uso de un inhibidor de las catepsinas mostró un fenotipo claramente distinguible al del ALLM.

El uso de estrategias más específicas que la inhibición farmacológica como la sobreexpresión de calpastatina o el uso de shRNAs contra las calpaínas también reviste varias dificultades.

La calpastatina aunque es un potente y altamente específico inhibidor de las calpaínas, su asociación es dependiente de los cambios conformacionales inducidos por calcio en la estructura de las calpaínas (Croall y cols. 2008; Hanna y cols. 2008). Esto puede ser relevante en ciertos contextos celulares donde la activación de las calpaínas es independiente del calcio, especialmente en neuronas (Mingorance-Le Meur y O'Connor 2009; Zadran y cols. 2010; Zadran y cols. 2009).

Por otra parte la inhibición de las calpaínas utilizando ARN interferentes posee una dificultad intrínseca en su estabilidad como proteínas. Las vidas medias de la calpaína 1, calpaína 2 y la CSS1 son de 4.6, 5.2 y 4.6 días respectivamente (Zhang y cols. 1996) por lo que realizar un *knockdown* rápido en su expresión es técnicamente desafiante (Yamada y cols. 2009).

Para descartar que la ausencia de efectos de la sobreexpresión de la calpastatina o de la expresión de los shRNAs pueda deberse a las dificultades antes mencionadas se utilizó una tercera estrategia de la expresión de una forma dominante negativa de las calpaínas, que consiste en la subunidad mayor de la calpaína 2 en que la cisteína

catalítica se encuentra mutada a serina (C105S) (Nuzzi y cols. 2007). La ausencia de efecto de estas tres estrategias indica claramente que el fenotipo producto del ALLM es independiente de calpaínas.

La molécula blanco del ALLM es desconocida, pudiendo corresponder no sólo a proteasas sino también a proteínas funcionalmente no relacionadas a las calpaínas. Por ejemplo la calpeptina, que al igual que el ALLM es un inhibidor de las calpaínas basado en un aldehído peptídico de dileucina inhibe a proteínas tirosina fosfatasa, cuya única característica estructural que las asemeja a las calpaínas es la presencia de una cisteína en el sitio catalítico (Schoenwaelder y Burridge 1999).

Implicancias del uso del ALLM como inhibidor de las calpaínas en enfermedades neurológicas

La activación aberrante de las calpaínas en las neuronas se ha asociado a múltiples patologías y consecuentemente su inhibición farmacológica con ALLM o su análogo menos específico ALLN, se ha propuesto como alternativa terapéutica para la lisencefalia (Yamada et al. 2009), daño a la médula espinal (Yu y Geddes 2007), degeneración de axones retinales (Araujo Couto y cols. 2004) y en varios modelos de excitotoxicidad (Chiu y cols. 2005; Gascon y cols. 2008). En muchos trabajos las concentraciones utilizadas de inhibidores de calpaínas superan ampliamente los límites en que estos puedan ser considerados al menos “selectivos”, por lo que las

conclusiones emanadas desde ellos son cuestionables. Por ejemplo Volbracht y cols, utilizan 200 μM de ALLM y 100 μM de ALLN para asignar un rol a la activación de las calpaínas en un modelo de apoptosis mediada por dadores de óxido nítrico en cultivos de neuronas ganglionares cerebelares (Volbracht y cols. 2005).

El problema de la falta de especificidad de los inhibidores químicos de calpaínas es un tema que no es abordado en la gran mayoría de los estudios. Los pocos que existen entregan la visión de que algunos efectos tradicionalmente asociados a la activación de las calpaínas mediante el uso de inhibidores farmacológicos son debidos a efectos *off-target*. Al citado trabajo que describió que un inhibidor de calpaínas ampliamente utilizado como la calpeptina, mediaba sus efectos en el citoesqueleto a través de la inhibición de proteínas tirosina fosfatasa y no a través de la inhibición de las calpaínas (Schoenwaelder y Burridge 1999), hay que sumar otro interesante trabajo que muestra que el PD150606 ejerce sus efectos neuroprotectores ante la excitotoxicidad mediada por ácido kainico por la inhibición de la entrada de calcio a través de los receptores de glutamato tipo AMPA y no por la inhibición de las calpaínas (Van den Bosch y cols. 2002). El PD150606 es un inhibidor de calpaínas diseñado para unirse al sitio de unión a calcio de la proteasa, y que por lo tanto se describía como una alternativa altamente específica al resto de los inhibidores cuyo blanco es el sitio catalítico (Wang y cols. 1996).

Estos antecedentes muestran claramente que la utilización de estrategias de inhibición específica resulta esencial para adjudicar una determinada respuesta biológica a la participación de las calpaínas.

Identidad del “inhibidor global” en la determinación de polaridad neuronal

Nuestros resultados indican que a diferencia de lo que ocurre en neutrófilos donde la calpaína 2 juega un rol esencial en la correcta polarización entre el frente de avance y la cola, en neuronas las calpaínas no participarían en la generación de la asimetría axo-dendrítica.

Esta diferencia resulta inesperada ya que ambos modelos de polarización poseen números elementos moleculares y mecanismos comunes:

(i) Tanto los neutrófilos como las neuronas pueden polarizarse en un microambiente uniforme.

(ii) La determinación de la asimetría en ambos tipos celulares es un fenómeno plástico y pueden re-especificar su eje de asimetría ante perturbaciones como la remoción mecánica del axón (Dotti y Banker 1987) o de su equivalente en neutrófilos, el seudópodo (Houk y cols. 2012).

(iii) El frente de avance de un neutrófilo o el axón en una neurona se caracteriza por la presencia de un arreglo característico del citoesqueleto de actina que es mantenido gracias a circuitos de retroalimentación positiva en que participan la PI3K (Wang y cols. 2002; Menager y cols. 2004), las GTPasas pequeñas Rac y Cdc42 (Nishimura y cols. 2005; Srinivasan y cols. 2003), sus moduladores como DOCK (Kunisaki y cols. 2006; Watabe-Uchida y cols. 2006) y sus efectores como la proteína quinasa Akt (Jiang y cols. 2005).

(iv) En ambos modelos la generación de múltiples frentes de avance o múltiples axones es prevenido por un mecanismo que involucra la activación de RhoA en la cola del neutrófilo (Wong y cols. 2006) o en las neuritas menores de una neurona (Cheng y cols. 2011).

Por lo tanto, conceptualmente ambos modelos funcionan a través de un circuito de retroalimentación positiva que amplifica fluctuaciones pequeñas y transitorias en asimetrías grandes y temporalmente persistentes. Estos *loops* de retroalimentación positiva se limitan a si mismos generando un mecanismo de inhibición de largo alcance que restringe su expansión a toda la célula.

Tres posibles escenarios se proponen para explicar la inhibición de largo alcance: (i) que el inhibidor sea una molécula difusible generada río abajo del activador auto-catalítico, (ii) que el activador consuma un sustrato limitante y (iii) que la protrusión

genere una tensión mecánica en la membrana o el citoesqueleto subyacente que actúe como inhibidor de largo alcance.

Por medio de elegantes experimentos, Houk y cols pusieron a prueba los tres modelos y concluyeron que la tensión mecánica generada por el frente de avance es el mecanismo de inhibición de largo alcance que permite la correcta polarización en neutrófilos (Houk y cols. 2012).

Resulta interesante que la aplicación de tensión mecánica en neuronas hipocampales en cultivo conduzca a la generación de axones (Lamoureux y cols. 2002). Más aun Houk y cols, proponen que ondas propagantes de actina mediadas por el complejo SCAR/WAVE, que permiten organizar el frente de avance de neutrófilos a través de la activación de Rac (Weiner y cols. 2007), se extinguirían con la tensión de la membrana o del citoesqueleto (Houk y cols. 2012). Este mecanismo posee notables paralelos en neuronas, donde WAVE y Rac son esenciales para la formación del axón (Tahirovic y cols. 2010) y la generación de ondas de actina parece ser un mecanismo relevante en la extensión del mismo (Flynn y cols. 2009; Ruthel y Banker 1998, 1999). Adicionalmente un estudio reciente de neuronas hipocampales crecidas en micropatrones de sustrato sugirió que diferencias en las tensiones mecánicas entre las neuritas podrían estar involucradas en la preferencia de la polarización axonal (Roth y cols. 2012). De hecho el primer evento molecular definido en la polarización de las neuronas, que es la acumulación de un *clúster* de N-cadherina en el sitio en el que se generará el futuro

axón (Gärtner y cols. 2012), puede ser un evento secundario a un cambio en la tensión de la membrana y el citoesqueleto subyacente (Delanoë-Ayari y cols. 2004).

Estos resultados sugieren que la tensión mecánica podría actuar el mecanismo central del “inhibidor global” en la determinación de polaridad en neuronas, mientras que la degradación de proteínas podría constituir un mecanismo secundario que asegure la segregación de algunos componentes de señalización una vez establecido el quiebre de la simetría y al ser un proceso de mantención de la polaridad más que instructivo sobre la misma, sería más compatible con la función proteasomal que con la actividad regulatoria más específica de las calpaínas.

CONCLUSIONES

1. La localización subcelular, expresión y actividad de las calpaínas no se relacionan con los mecanismos moleculares involucrados en la especificación y crecimiento axonal.
2. Los cambios en el desarrollo de polaridad neuronal asociados al efecto del ALLM, se deben a un efecto sobre un blanco diferente a las calpaínas.

PROYECCIONES

Nuestros resultados sugieren fuertemente que las principales isoformas de las calpaínas presentes en neuronas, las calpaínas 1 y 2, no estarían involucradas en la correcta polarización de las neuronas hipocampales en cultivo. Aunque cada una de las estrategias de inhibición de las calpaínas presenta dificultades, como la larga vida media de estas proteínas o la imposibilidad técnica de realizar ensayos bioquímicos que reflejen la inhibición local de la actividad de las calpaínas en neuronas transfectadas, el conjunto de las evidencias apuntan en la dirección de que no tendrían un rol en el proceso de desarrollo de polaridad neuronal. La evaluación del desarrollo de polaridad

en neuronas hipocampales derivadas desde ratones doble *knockout* para calpaína 1 y 2 podría ayudar a discernir definitivamente su rol en la morfología neuronal.

Por otra parte no se puede descartar la participación de otras isoformas poco caracterizadas de las calpaínas pero que se han detectado en cerebro como las calpaínas 5 (Waghray y cols. 2004), 7, 10 (Gafni y cols. 2004) y 12 (Shin y cols. 2004).

Los resultados obtenidos apuntan a la degradación proteica selectiva mediada por el proteasoma, demostrada en varios estudios recientes, como el principal mecanismo proteolítico implicado en el desarrollo de polaridad neuronal, aunque no se puede descartar la participación de otros sistemas de degradación como las caspasas, metaloproteasas o la autofagia. Sin embargo no se tiene evidencia que estos participen en mecanismos de polaridad en neuronas u otro tipo celular.

Discernir el blanco molecular sobre el cuál actúa el ALLM se muestra como una tarea compleja, teniendo en cuenta que varios inhibidores de calpaínas ejercen sus efectos *off-target* sobre proteínas no relacionadas como proteínas tirosina fosfatasa o receptores iónicos (ver discusión).

REFERENCIAS

Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., y Kemler, R. (1997). β -catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J* 16, 3797-3804.

Araujo Couto, L., Sampaio Narciso, M., Hokoc, J.N., y Blanco Martinez, A.M. (2004). Calpain inhibitor 2 prevents axonal degeneration of opossum optic nerve fibers. *J Neurosci Res* 77, 410-419.

Arthur, J.S., Elce, J.S., Hegadorn, C., Williams, K., y Greer, P.A. (2000). Disruption of the murine calpain small subunit gene, *Capn4*: calpain is essential for embryonic development but not for cell growth and division. *Mol Cell Biol* 20, 4474-4481.

Azam, M., Andrabi, S.S., Sahr, K.E., Kamath, L., Kuliopulos, A., y Chishti, A.H. (2001). Disruption of the mouse μ -calpain gene reveals an essential role in platelet function. *Mol Cell Biol* 21, 2213-2220.

Banker, G.A., y Cowan, W.M. (1977). Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. *Brain Res* 126, 397-342.

Barnes, A.P., y Polleux, F. (2009). Establishment of axon-dendrite polarity in developing neurons. *Annu Rev Neurosci* 32, 347-381.

Benson, D.L., Watkins, F.H., Steward, O., y Banker, G. (1994). Characterization of GABAergic neurons in hippocampal cell cultures. *J Neurocytol* 23, 279-295.

Borquez, D.A., y Gonzalez-Billault, C. (2011). Regulation of cell polarity by controlled proteolytic systems. *Biol Res* 44, 35-41.

Borriello, A., Pietra, V.D., Criscuolo, M., Oliva, A., Tonini, G.P., Iolascon, A., Zappia, V., y Ragione, F.D. (2000). p27Kip1 accumulation is associated with retinoic-induced neuroblastoma differentiation: evidence of a decreased proteasome-dependent degradation. *Oncogene* 19, 51-60.

Calderon de Anda, F., Gartner, A., Tsai, L.H., y Dotti, C.G. (2008). Pyramidal neuron polarity axis is defined at the bipolar stage. *J Cell Sci* 121, 178-185.

Caneda-Ferron, B., De Girolamo, L.A., Costa, T., Beck, K.E., Layfield, R., y Billett, E.E. (2008). Assessment of the direct and indirect effects of MPP⁺ and dopamine on the human proteasome: implications for Parkinson's disease aetiology. *J Neurochem* 105, 225-238.

Conde, C., Arias, C., Robin, M., Li, A., Saito, M., Chuang, J.Z., Nairn, A.C., Sung, C.H., y Caceres, A. (2010). Evidence for the involvement of Lfc and Tctex-1 in axon formation. *J Neurosci* 30, 6793-6800.

Chae, Y.C., Lee, S., Heo, K., Ha, S.H., Jung, Y., Kim, J.H., Ihara, Y., Suh, P.G., y Ryu, S.H. (2009). Collapsin response mediator protein-2 regulates neurite formation by modulating tubulin GTPase activity. *Cell Signal* 21, 1818-1826.

Cheng, P.L., Lu, H., Shelly, M., Gao, H., y Poo, M.M. (2011a). Phosphorylation of E3 ligase Smurf1 switches its substrate preference in support of axon development. *Neuron* 69, 231-243.

Cheng, P.L., Song, A.H., Wong, Y.H., Wang, S., Zhang, X., y Poo, M.M. (2011b). Self-amplifying autocrine actions of BDNF in axon development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 18430-18435.

Chiu, K., Lam, T.T., Ying Li, W.W., Caprioli, J., y Kwong Kwong, J.M. (2005). Calpain and N-methyl-d-aspartate (NMDA)-induced excitotoxicity in rat retinas. *Brain Res* 1046, 207-215.

Croall, D.E., Vanhooser, L.M., y Cashon, R.E. (2008). Detecting the active conformation of calpain with calpastatin-based reagents. *Biochim Biophys Acta* 1784, 1676-1686.

Da Silva, J.S., Medina, M., Zuliani, C., Di Nardo, A., Witke, W., y Dotti, C.G. (2003). RhoA/ROCK regulation of neuritogenesis via profilin IIa-mediated control of actin stability. *J Cell Biol* 162, 1267-1279.

Delanoe-Ayari, H., Al Kurdi, R., Vallade, M., Gulino-Debrac, D., y Riveline, D. (2004). Membrane and acto-myosin tension promote clustering of adhesion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2229-2234.

Dotti, C.G., y Banker, G.A. (1987). Experimentally induced alteration in the polarity of developing neurons. *Nature* 330, 254-256.

Dotti, C.G., Sullivan, C.A., y Banker, G.A. (1988). The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 8, 1454-1468.

Dutt, P., Croall, D.E., Arthur, J.S., Veyra, T.D., Williams, K., Elce, J.S., y Greer, P.A. (2006). m-Calpain is required for preimplantation embryonic development in mice. *BMC Dev Biol* 6, 3.

Figueiredo-Pereira, M.E., Banik, N., y Wilk, S. (1994). Comparison of the effect of calpain inhibitors on two extralysosomal proteinases: the multicatalytic proteinase complex and m-calpain. *J Neurochem* 62, 1989-1994

Fivaz, M., Bandara, S., Inoue, T., y Meyer, T. (2008). Robust neuronal symmetry breaking by Ras-triggered local positive feedback. *Curr Biol* 18, 44-50.

Flynn, K.C., Pak, C.W., Shaw, A.E., Bradke, F., y Bamberg, J.R. (2009). Growth cone-like waves transport actin and promote axonogenesis and neurite branching. *Dev Neurobiol* 69, 761-779.

Franco, S., Perrin, B., y Huttenlocher, A. (2004). Isoform specific function of calpain 2 in regulating membrane protrusion. *Exp Cell Res* 299, 179-187.

Friedrich, P., y Bozoky, Z. (2005). Digestive versus regulatory proteases: on calpain action in vivo. *Biol Chem* 386, 609-612.

Friedrich, P., Papp, H., Halasy, K., Farkas, A., Farkas, B., Tompa, P., y Kasa, P. (2004). Differential distribution of calpain small subunit 1 and 2 in rat brain. *Eur J Neurosci* 19, 1819-1825.

Gafni, J., Hermel, E., Young, J., Wellington, C., Hayden, M., y Ellerby, L. (2004). Inhibition of calpain cleavage of huntingtin reduces toxicity: accumulation of calpain/caspase fragments in the nucleus. *J Biol Chem* 279, 20211-20231.

Gartner, A., Fornasiero, E.F., Munck, S., Vennekens, K., Seuntjens, E., Huttner, W.B., Valtorta, F., y Dotti, C.G. (2012). N-cadherin specifies first asymmetry in developing neurons. *EMBO J*.

Gartner, A., Huang, X., y Hall, A. (2006). Neuronal polarity is regulated by glycogen synthase kinase-3 (GSK-3 β) independently of Akt/PKB serine phosphorylation. *J Cell Sci* 119, 3927-3934.

Garvalov, B.K., Flynn, K.C., Neukirchen, D., Meyn, L., Teusch, N., Wu, X., Brakebusch, C., Bamburg, J.R., y Bradke, F. (2007). Cdc42 regulates cofilin during the establishment of neuronal polarity. *J Neurosci* 27, 13117-13129.

Gascon, S., Sobrado, M., Roda, J.M., Rodriguez-Pena, A., y Diaz-Guerra, M. (2008). Excitotoxicity and focal cerebral ischemia induce truncation of the NR2A and NR2B subunits of the NMDA receptor and cleavage of the scaffolding protein PSD-95. *Mol Psychiatry* 13, 99-114.

Gitler, D., y Spira, M.E. (1998). Real time imaging of calcium-induced localized proteolytic activity after axotomy and its relation to growth cone formation. *Neuron* 20, 1123-1135.

Glading, A., Uberall, F., Keyse, S.M., Lauffenburger, D.A., y Wells, A. (2001). Membrane proximal ERK signaling is required for M-calpain activation downstream of epidermal growth factor receptor signaling. *J Biol Chem* 276, 23341-23348.

Gofii-Oliver, P., Lucas, J.J., Avila, J., y Hernandez, F. (2007). N-terminal cleavage of GSK-3 by calpain: a new form of GSK-3 regulation. *J Biol Chem* 282, 22406-22413.

Hamakubo, T., Kannagi, R., Murachi, T., y Matus, A. (1986). Distribution of calpains I and II in rat brain. *J Neurosci* 6, 3103-3111.

Hanna, R.A., Campbell, R.L., y Davies, P.L. (2008). Calcium-bound structure of calpain and its mechanism of inhibition by calpastatin. *Nature* 456, 409-412.

Higuchi, M., Tomioka, M., Takano, J., Shirotani, K., Iwata, N., Masumoto, H., Maki, M., Itohara, S., y Saido, T.C. (2005). Distinct mechanistic roles of calpain and caspase activation in neurodegeneration as revealed in mice overexpressing their specific inhibitors. *J Biol Chem* 280, 15229-15237.

Hood, J.L., Brooks, W.H., y Roszman, T.L. (2004). Differential compartmentalization of the calpain/calpastatin network with the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *J Biol Chem* 279, 43126-43135.

Hood, J.L., Logan, B.B., Sinai, A.P., Brooks, W.H., y Roszman, T.L. (2003). Association of the calpain/calpastatin network with subcellular organelles. *Biochem Biophys Res Commun* 310, 1200-1212.

Houk, A.R., Jilkine, A., Mejean, C.O., Boltyskiy, R., Dufresne, E.R., Angenent, S.B., Altschuler, S.J., Wu, L.F., y Weiner, O.D. (2012). Membrane tension maintains cell polarity by confining signals to the leading edge during neutrophil migration. *Cell* 148, 175-188.



Inagaki, N., Chihara, K., Arimura, N., Menager, C., Kawano, Y., Matsuo, N., Nishimura, T., Amano, M., y Kaibuchi, K. (2001). CRMP-2 induces axons in cultured hippocampal neurons. *Nat Neurosci* 4, 781-782.

Jiang, H., Guo, W., Liang, X., y Rao, Y. (2005). Both the establishment and the maintenance of neuronal polarity require active mechanisms: critical roles of GSK-3 β and its upstream regulators. *Cell* 120, 123-135.

Johnstone, M., Goold, R.G., Bei, D., Fischer, I., y Gordon-Weeks, P.R. (1997). Localisation of microtubule-associated protein 1B phosphorylation sites recognised by monoclonal antibody SMI-31. *J Neurochem* 69, 1417-1424.

Kaech, S., y Banker, G. (2006). Culturing hippocampal neurons. *Nat Protoc* 1, 2406-2415.

Kunisaki, Y., Nishikimi, A., Tanaka, Y., Takii, R., Noda, M., Inayoshi, A., Watanabe, K., Sanematsu, F., Sasazuki, T., Sasaki, T., y cols. (2006). DOCK2 is a Rac activator that regulates motility and polarity during neutrophil chemotaxis. *J Cell Biol* 174, 647-652.

Lamoureux, P., Ruthel, G., Buxbaum, R.E., y Heidemann, S.R. (2002). Mechanical tension can specify axonal fate in hippocampal neurons. *J Cell Biol* 159, 499-508.

Leloup, L., Shao, H., Bae, Y.H., Deasy, B., Stolz, D., Roy, P., y Wells, A. (2010). m-Calpain activation is regulated by its membrane localization and by its binding to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Biol Chem* 285, 33549-33566.

Li, R., y Bowerman, B. (2010). Symmetry breaking in biology. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a003475.

Limke, T.L., Cai, J., Miura, T., Rao, M.S., y Mattson, M.P. (2003). Distinguishing features of progenitor cells in the late embryonic and adult hippocampus. *Dev Neurosci* 25, 257-272.

Lokuta, M.A., Nuzzi, P.A., y Huttenlocher, A. (2003). Calpain regulates neutrophil chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4006-4011.

Mandell, J.W., y Banker, G.A. (1996). A spatial gradient of tau protein phosphorylation in nascent axons. *J Neurosci* 16, 5727-5740.

Meinhardt, H., y Gierer, A. (2000). Pattern formation by local self-activation and lateral inhibition. *Bioessays* 22, 753-760.

Menager, C., Arimura, N., Fukata, Y., y Kaibuchi, K. (2004). PIP3 is involved in neuronal polarization and axon formation. *J Neurochem* 89, 109-118.

Mingorance-Le Meur, A., y O'Connor, T.P. (2009). Neurite consolidation is an active process requiring constant repression of protrusive activity. *EMBO J* 28, 248-260.

Mingorance-Le Meur, A., Mohebiany, A.N., y O'Connor, T.P. (2009). Varicones and growth cones: two neurite terminals in PC12 cells. *PLoS One* 4, e4334.

Moldoveanu, T., Gehring, K., y Green, D.R. (2008). Concerted multi-pronged attack by calpastatin to occlude the catalytic cleft of heterodimeric calpains. *Nature* 456, 404-408.

Munarriz, E., Bano, D., Sayan, A.E., Rossi, M., Melino, G., y Nicotera, P. (2005). Calpain cleavage regulates the protein stability of p73. *Biochem Biophys Res Commun* 333, 954-960.

Naoki, H., Nakamuta, S., Kaibuchi, K., y Ishii, S. (2011). Flexible search for single-axon morphology during neuronal spontaneous polarization. *PLoS One* 6, e19034.

Nishimura, T., Yamaguchi, T., Kato, K., Yoshizawa, M., Nabeshima, Y., Ohno, S., Hoshino, M., y Kaibuchi, K. (2005). PAR-6-PAR-3 mediates Cdc42-induced Rac activation through the Rac GEFs STEF/Tiam1. *Nat Cell Biol* 7, 270-277.

Nuzzi, P.A., Senetar, M.A., y Huttenlocher, A. (2007). Asymmetric localization of calpain 2 during neutrophil chemotaxis. *Mol Biol Cell* 18, 795-805.

Oshima, M., Koizumi, S., Fujita, K., y Guroff, G. (1989). Nerve growth factor-induced decrease in the calpain activity of PC12 cells. *J Biol Chem* 264, 20811-20816.

Perlmutter, L.S., Gall, C., Baudry, M., y Lynch, G. (1990). Distribution of calcium-activated protease calpain in the rat brain. *J Comp Neurol* 296, 269-276.

Pinter, M., Aszodi, A., Friedrich, P., y Ginzburg, I. (1994). Calpeptin, a calpain inhibitor, promotes neurite elongation in differentiating PC12 cells. *Neurosci Lett* 170, 91-93.

Plas, D.R., y Thompson, C.B. (2003). Akt activation promotes degradation of tuberin and FOXO3a via the proteasome. *J Biol Chem* 278, 12361-12366.

Qin, Q., Liao, G., Baudry, M., y Bi, X. (2010). Role of calpain-mediated p53 truncation in semaphorin 3A-induced axonal growth regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 13883-13887.

Qing, H., Zhou, W., Christensen, M.A., Sun, X., Tong, Y., y Song, W. (2004). Degradation of BACE by the ubiquitin-proteasome pathway. *FASEB J* 18, 1571-1573.

Raynaud, F., Marcilhac, A., Chebli, K., Benyamin, Y., y Rossel, M. (2008). Calpain 2 expression pattern and sub-cellular localization during mouse embryogenesis. *Int J Dev Biol* 52, 383-388.

Robles, E., Huttenlocher, A., y Gomez, T.M. (2003). Filopodial calcium transients regulate growth cone motility and guidance through local activation of calpain. *Neuron* 38, 597-609.

Rock, K.L., Gramm, C., Rothstein, L., Clark, K., Stein, R., Dick, L., Hwang, D., y Goldberg, A.L. (1994). Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 78, 761-771.

Rosso, S., Bollati, F., Bisbal, M., Peretti, D., Sumi, T., Nakamura, T., Quiroga, S., Ferreira, A., y Caceres, A. (2004). LIMK1 regulates Golgi dynamics, traffic of Golgi-derived vesicles, and process extension in primary cultured neurons. *Mol Biol Cell* 15, 3433-3449.

Roth, S., Bisbal, M., Brocard, J., Bugnicourt, G., Saoudi, Y., Andrieux, A., Gory-Faure, S., y Villard, C. (2012). How morphological constraints affect axonal polarity in mouse neurons. *PLoS One* 7, e33623.

Ruthel, G., y Banker, G. (1998). Actin-dependent anterograde movement of growth-cone-like structures along growing hippocampal axons: a novel form of axonal transport? *Cell Motil Cytoskeleton* 40, 160-173.

Ruthel, G., y Banker, G. (1999). Role of moving growth cone-like "wave" structures in the outgrowth of cultured hippocampal axons and dendrites. *J Neurobiol* 39, 97-106.

Saito, Y., y Kawashima, S. (1988). Enhancement of neurite outgrowth in PC12h cells by a protease inhibitor. *Neurosci Lett* 89, 102-107.

Santos, D.M., Xavier, J.M., Morgado, A.L., Sola, S., y Rodrigues, C.M. (2012). Distinct Regulatory Functions of Calpain 1 and 2 during Neural Stem Cell Self-Renewal and Differentiation. *PLoS One* 7, e33468.

Sasaki, T., Kishi, M., Saito, M., Tanaka, T., Higuchi, N., Kominami, E., Katunuma, N., y Murachi, T. (1990). Inhibitory effect of di- and tripeptidyl aldehydes on calpains and cathepsins. *J Enzyme Inhib* 3, 195-201.

Satish, L., Blair, H.C., Glading, A., y Wells, A. (2005). Interferon-inducible protein 9 (CXCL11)-induced cell motility in keratinocytes requires calcium flux-dependent activation of mu-calpain. *Mol Cell Biol* 25, 1922-1941.

Schoenwaelder, S.M., y Burridge, K. (1999). Evidence for a calpeptin-sensitive protein-tyrosine phosphatase upstream of the small GTPase Rho. A novel role for the calpain inhibitor calpeptin in the inhibition of protein-tyrosine phosphatases. *J Biol Chem* 274, 14359-14367.

Schwamborn, J.C., Muller, M., Becker, A.H., y Puschel, A.W. (2007). Ubiquitination of the GTPase Rap1B by the ubiquitin ligase Smurf2 is required for the establishment of neuronal polarity. *EMBO J* 26, 1410-1422.

Schwamborn, J.C., y Puschel, A.W. (2004). The sequential activity of the GTPases Rap1B and Cdc42 determines neuronal polarity. *Nat Neurosci* 7, 923-929.

Shea, T.B., Beermann, M.L., y Nixon, R.A. (1991). Multiple proteases regulate neurite outgrowth in NB2a/dl neuroblastoma cells. *J Neurochem* 56, 842-851.

Shea, T.B., Cressman, C.M., Spencer, M.J., Beermann, M.L., y Nixon, R.A. (1995). Enhancement of neurite outgrowth following calpain inhibition is mediated by protein kinase C. *J Neurochem* 65, 517-527.

Shelly, M., Cancedda, L., Heilshorn, S., Sumbre, G., y Poo, M.M. (2007). LKB1/STRAD promotes axon initiation during neuronal polarization. *Cell* 129, 565-577.

Shelly, M., Lim, B.K., Cancedda, L., Heilshorn, S.C., Gao, H., y Poo, M.M. (2010). Local and long-range reciprocal regulation of cAMP and cGMP in axon/dendrite formation. *Science* 327, 547-552.

Shelly, M., Cancedda, L., Lim, B.K., Popescu, A.T., Cheng, P.L., Gao, H., y Poo, M.M. (2011). Semaphorin3A regulates neuronal polarization by suppressing axon formation and promoting dendrite growth. *Neuron* 71, 433-446.

Shi, S.H., Jan, L.Y., y Jan, Y.N. (2003). Hippocampal neuronal polarity specified by spatially localized mPar3/mPar6 and PI 3-kinase activity. *Cell* 112, 63-75.

Shin, S., Lee, S.-E., Boo, J., Kim, M., Yoon, Y.-D., Kim, S.-i., y Mook-Jung, I. (2004). Profiling proteins related to amyloid deposited brain of Tg2576 mice. *Proteomics* 4, 3359-3427.

Shiraha, H., Glading, A., Chou, J., Jia, Z., y Wells, A. (2002). Activation of m-calpain (calpain II) by epidermal growth factor is limited by protein kinase A phosphorylation of m-calpain. *Mol Cell Biol* 22, 2716-2727.

Siman, R., Gall, C., Perlmutter, L.S., Christian, C., Baudry, M., y Lynch, G. (1985). Distribution of calpain I, an enzyme associated with degenerative activity, in rat brain. *Brain Res* 347, 399-403.

Song, D.K., Malmstrom, T., Kater, S.B., y Mykles, D.L. (1994). Calpain inhibitors block Ca²⁺-induced suppression of neurite outgrowth in isolated hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci Res* 39, 474-481.

Sorimachi, H., Hata, S., y Ono, Y. (2011). Calpain chronicle--an enzyme family under multidisciplinary characterization. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 87, 287-327.

Srinivasan, S., Wang, F., Glavas, S., Ott, A., Hofmann, F., Aktories, K., Kalman, D., y Bourne, H.R. (2003). Rac and Cdc42 play distinct roles in regulating PI(3,4,5)P₃ and polarity during neutrophil chemotaxis. *J Cell Biol* 160, 375-385.

Tahirovic, S., Hellal, F., Neukirchen, D., Hindges, R., Garvalov, B.K., Flynn, K.C., Stradal, T.E., Chrostek-Grashoff, A., Brakebusch, C., y Bradke, F. (2010). Rac1 regulates neuronal polarization through the WAVE complex. *J Neurosci* 30, 6930-6943.

Takano, J., Mihira, N., Fujioka, R., Hosoki, E., Chishti, A.H., y Saido, T.C. (2011). Vital role of the calpain-calpastatin system for placental-integrity-dependent embryonic survival. *Mol Cell Biol* 31, 4097-4106.

Takano, J., Tomioka, M., Tsubuki, S., Higuchi, M., Iwata, N., Itohara, S., Maki, M., y Saido, T.C. (2005). Calpain mediates excitotoxic DNA fragmentation via mitochondrial pathways in adult brains: evidence from calpastatin mutant mice. *J Biol Chem* 280, 16175-16184.

Taylor, C.T., Furuta, G.T., Synnestvedt, K., y Colgan, S.P. (2000). Phosphorylation-dependent targeting of cAMP response element binding protein to the ubiquitin/proteasome pathway in hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12091-12096.

To, K.C., Church, J., y O'Connor, T.P. (2007). Combined activation of calpain and calcineurin during ligand-induced growth cone collapse. *Mol Cell Neurosci* 36, 425-434.

To, K.C., Church, J., y O'Connor, T.P. (2008). Growth cone collapse stimulated by both calpain- and Rho-mediated pathways. *Neuroscience* 153, 645-653.

Toriyama, M., Sakumura, Y., Shimada, T., Ishii, S., y Inagaki, N. (2010). A diffusion-based neurite length-sensing mechanism involved in neuronal symmetry breaking. *Mol Syst Biol* 6, 394.

Tsubuki, S., Saito, Y., Tomioka, M., Ito, H., y Kawashima, S. (1996). Differential inhibition of calpain and proteasome activities by peptidyl aldehydes of di-leucine and tri-leucine. *J Biochem* 119, 572-576.

Van den Bosch, L., Van Damme, P., Vleminckx, V., Van Houtte, E., Lemmens, G., Missiaen, L., Callewaert, G., y Robberecht, W. (2002). An alpha-mercaptoacrylic acid derivative (PD150606) inhibits selective motor neuron death via inhibition of kainate-induced Ca²⁺ influx and not via calpain inhibition. *Neuropharmacology* 42, 706-713.

Volbracht, C., Chua, B.T., Ng, C.P., Bahr, B.A., Hong, W., y Li, P. (2005). The critical role of calpain versus caspase activation in excitotoxic injury induced by nitric oxide. *J Neurochem* 93, 1280-1292.

Waghray, A., Wang, D.-s., McKinsey, D., Hayes, R., y Wang, K. (2004). Molecular cloning and characterization of rat and human calpain-5, *Biochem Biophys Res Commun* 324, 46-97.

Wang, F., Herzmark, P., Weiner, O.D., Srinivasan, S., Servant, G., y Bourne, H.R. (2002). Lipid products of PI(3)Ks maintain persistent cell polarity and directed motility in neutrophils. *Nat Cell Biol* 4, 513-518.

Wang, H.C., Huang, Y.S., Ho, C.C., Jeng, J.C., y Shih, H.M. (2009). SUMO modification modulates the activity of calpain-2. *Biochem Biophys Res Commun* 384, 444-449.

Wang, K.K., Nath, R., Posner, A., Raser, K.J., Buroker-Kilgore, M., Hajimohammadreza, I., Probert, A.W., Jr., Marcoux, F.W., Ye, Q., Takano, E., y cols. (1996). An alpha-mercaptoacrylic acid derivative is a selective nonpeptide cell-permeable calpain inhibitor and is neuroprotective. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6687-6692.

Watabe-Uchida, M., John, K.A., Janas, J.A., Newey, S.E., y Van Aelst, L. (2006). The Rac activator DOCK7 regulates neuronal polarity through local phosphorylation of stathmin/Op18. *Neuron* 51, 727-739.

Weiner, O.D., Marganski, W.A., Wu, L.F., Altschuler, S.J., y Kirschner, M.W. (2007). An actin-based wave generator organizes cell motility. *PLoS Biol* 5, e221.

Wong, K., Pertz, O., Hahn, K., y Bourne, H. (2006). Neutrophil polarization: spatiotemporal dynamics of RhoA activity support a self-organizing mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 3639-3644.

Yamada, M., Yoshida, Y., Mori, D., Takitoh, T., Kengaku, M., Umeshima, H., Takao, K., Miyakawa, T., Sato, M., Sorimachi, H., y cols. (2009). Inhibition of calpain increases LIS1 expression and partially rescues in vivo phenotypes in a mouse model of lissencephaly. *Nat Med* 15, 1202-1207.

Yan, D., Guo, L., y Wang, Y. (2006). Requirement of dendritic Akt degradation by the ubiquitin-proteasome system for neuronal polarity. *J Cell Biol* 174, 415-424.

Yang, G.Y., Liang, B., Zhu, J., y Luo, Z.G. (2011). Calpain activation by Wingless-type murine mammary tumor virus integration site family, member 5A (Wnt5a) promotes axonal growth. *J Biol Chem* 286, 6566-6576.

Yi, J.J., Barnes, A.P., Hand, R., Polleux, F., y Ehlers, M.D. (2010). TGF- β signaling specifies axons during brain development. *Cell* 142, 144-157.

Yin, D.M., Huang, Y.H., Zhu, Y.B., y Wang, Y. (2008). Both the establishment and maintenance of neuronal polarity require the activity of protein kinase D in the Golgi apparatus. *J Neurosci* 28, 8832-8843.

Yoshimura, T., Arimura, N., Kawano, Y., Kawabata, S., Wang, S., y Kaibuchi, K. (2006). Ras regulates neuronal polarity via the PI3-kinase/Akt/GSK-3 β /CRMP-2 pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 340, 62-68.

Yu, C.G., y Geddes, J.W. (2007). Sustained calpain inhibition improves locomotor function and tissue sparing following contusive spinal cord injury. *Neurochem Res* 32, 2046-2053.

Yoshimura, T., Kawano, Y., Arimura, N., Kawabata, S., Kikuchi, A., y Kaibuchi, K. (2005). GSK-3 β regulates phosphorylation of CRMP-2 and neuronal polarity. *Cell* 120, 137-149.

Zadran, S., Jourdi, H., Rostamiani, K., Qin, Q., Bi, X., y Baudry, M. (2010). Brain-derived neurotrophic factor and epidermal growth factor activate neuronal m-calpain via mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation. *J Neurosci* 30, 1086-1095.

Zadran, S., Qin, Q., Bi, X., Zadran, H., Kim, Y., Foy, M.R., Thompson, R., y Baudry, M. (2009). 17- β -estradiol increases neuronal excitability through MAP kinase-induced calpain activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 21936-21941.

Zeitelhofer, M., Karra, D., Vessey, J.P., Jaskic, E., Macchi, P., Thomas, S., Riefler, J., Kiebler, M., y Dahm, R. (2009). High-efficiency transfection of short hairpin RNAs-encoding plasmids into primary hippocampal neurons. *J Neurosci Res* 87, 289-300.

Zeitelhofer, M., Vessey, J.P., Xie, Y., Tubing, F., Thomas, S., Kiebler, M., y Dahm, R. (2007). High-efficiency transfection of mammalian neurons via nucleofection. *Nat Protoc* 2, 1692-1704.

Zhang, W., Lane, R.D., y Mellgren, R.L. (1996). The major calpain isozymes are long-lived proteins. Design of an antisense strategy for calpain depletion in cultured cells. *J Biol Chem* 271, 18825-18830.

Zimmerman, U.J., Boring, L., Pak, J.H., Mukerjee, N., y Wang, K.K. (2000). The calpain small subunit gene is essential: its inactivation results in embryonic lethality. *IUBMB Life* 50, 63-68.