

**DEPARTAMENT DE  
BIOLOGIA CEL·LULAR I ANATOMIA PATOLÒGICA  
FACULTAT DE MEDICINA**



**MECANISMOS INTRACELULARES DE SUPERVIVENCIA  
Y MUERTE NEURONAL EN MODELOS  
EXCITOTÓXICOS Y TRANSGÉNICOS DE LA  
ENFERMEDAD DE HUNTINGTON**

**Tesis presentada por Juan Manuel García Martínez  
para optar al título de Doctor por la Universidad de Barcelona**

## **IV.- DISCUSIÓN**



En el desarrollo de esta tesis nos hemos centrado en el estudio de diferentes mecanismos de supervivencia y muerte neuronal que pueden ser activados en el núcleo estriado, en el contexto de diferentes modelos de enfermedad de Huntington. Comenzamos el trabajo con el estudio de las vías intracelulares que median los efectos biológicos del GDNF sobre las neuronas estriatales en cultivo. Seguidamente, nos centramos en el estudio de mecanismos de muerte y supervivencia, y más concretamente en la regulación de las proteínas de la familia de Bcl-2 en el núcleo estriado analizando tres paradigmas diferentes: (1) El desarrollo postnatal; (2) un modelo excitotóxico de la enfermedad de Huntington donde se produce una lesión estriatal aguda; y (3) un modelo transgénico de la enfermedad donde se produce una degeneración estriatal paulatina. Finalmente, la escasa muerte neuronal que se produce en el modelo transgénico, nos condujo a estudiar la activación de la vía de supervivencia AKT en respuesta a la toxicidad inducida por la expresión de htt mutada, y su posible participación en la compensación de las vías de muerte neuronal.

## **1.- EFECTOS BIOLÓGICOS DEL GDNF SOBRE CULTIVOS PRIMARIOS DE NEURONAS ESTRIATALES**

En el primer trabajo analizamos el efecto que ejercía el GDNF sobre las neuronas estriatales en cultivo con el objetivo de complementar los conocimientos sobre las vías de señalización y los efectos biológicos de diferentes factores tróficos sobre la maduración y diferenciación de las distintas poblaciones neuronales estriatales (Gratacos y col., 2001a, 2001c, 2002; Gavalda y col., 2004).

### **1.1.- VÍAS INTRACELULARES ACTIVADAS POR GDNF**

Nuestro primer objetivo era determinar el efecto del GDNF sobre las vías intracelulares implicadas en la supervivencia y diferenciación neuronal, y nos centramos en las vías PI3K/AKT y ERK/MAPK que, como hemos descrito en la introducción, pueden ser activadas por GDNF en diferentes modelos celulares (Worby y col., 1996; Murakami y col., 1999). En nuestras condiciones de cultivo, la adición de GDNF a las neuronas estriatales indujo una activación específica de la vía de ERK/MAPK sin afectar a la vía de PI3K/AKT. Estudiamos la participación de los *lipid rafts* en esta señalización mediada por GDNF, dado que se ha descrito que estos microdominios de membrana pueden jugar un papel esencial en la señalización de los factores neurotróficos (Paratcha e Ibañez, 2002). Observamos que al desorganizar los *lipid rafts* de las neuronas en cultivo mediante la adición de 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, podíamos bloquear la activación específica de la vía de ERK/MAPK, lo

que sugería un papel esencial de los *lipid rafts* en la señalización intracelular inducida por GDNF. Es importante señalar que el receptor RET activado se asocia preferentemente con la proteína adaptadora Shc fuera del *raft*, lo que se vincula a una activación de la vía de PI3K/AKT. La asociación preferente de RET activado en el *raft* es con FRS2 (del inglés *FGF receptor substrate 2*), induciendo una mayor activación de la vía de ERK/MAPK (Airaksinen y Saarma, 2002; Paratcha e Ibañez, 2002). En este sentido, planteamos la hipótesis por la cual la adición de GDNF a las neuronas estriatales en cultivo produce una señalización intracelular dependiente de RET y GFR $\alpha$ 1. Para esta señalización, RET es reclutado hacia los *lipid rafts* donde induce una activación específica de la vía de ERK/MAPK mediante su asociación a la proteína adaptadora FRS2.

En las neuronas estriatales en cultivo, ambos receptores, RET y GFR $\alpha$ 1, se encontraban presentes, por lo que descartamos la posibilidad de que la activación específica de ERK1/ERK2 estuviera mediada exclusivamente por el complejo GFR $\alpha$ 1 y la familia de quinasas Src como había sido previamente descrita en un modelo celular carente de RET (Poteryaev y col., 1999).

### **1.2.- EFECTOS BIOLÓGICOS DEL GDNF SOBRE LAS NEURONAS ESTRIATALES EN CULTIVO**

En referencia al GDNF existían pocos estudios donde se analizaran los efectos de este factor trófico en el núcleo estriado (Humpel y col., 1996; Farkas y col., 1997; Perez-Navarro y col., 1999a; Gratacos y col., 2001). De manera que, una vez que determinamos que el GDNF producía una activación específica de la vía de ERK/MAPK, pasamos al estudio de los efectos biológicos inducidos por dicha activación en las neuronas estriatales en cultivo.

El GDNF ha sido descrito como un potente inductor de la supervivencia en diferentes tipos celulares, como por ejemplo en neuronas dopaminérgicas (Lin y col., 1993) y motoneuronas (Henderson y col., 1994; Oppenheim y col., 1995). Sin embargo, en nuestras condiciones de cultivo, la adición de GDNF no supuso un aumento en la supervivencia de las neuronas estriatales, y en este sentido no observamos una disminución en el número de células que experimentaban muerte apoptótica, ni un aumento en el número total de neuronas a 7DIV. La ausencia de un efecto del GDNF sobre la supervivencia de las neuronas estriatales puede deberse a la incapacidad del factor trófico de inducir una activación efectiva de la vía de PI3K/AKT en nuestras condiciones de cultivo. De acuerdo con esta hipótesis, la

relación directa de una activación de la vía de PI3K/AKT con la supervivencia neuronal está ampliamente descrita en diferentes modelos (Miller y col., 1997; Soler y col., 1999; Encinas y col., 2001; Gavalda y col., 2004).

Además de la supervivencia neuronal, estudiamos la inducción de la expresión de calbindina como proceso de maduración de las neuronas estriatales en cultivo. En lo que respecta a este proceso, el GDNF no era capaz de promover la maduración, y el número total de neuronas que expresaban calbindina se mantenía constante. Sin embargo, cuando estudiamos su morfología, así como la de las neuronas GABA-positivas, mediante el análisis de la arborización dendrítica y la longitud del axón, observamos que la adición de GDNF tenía un efecto significativo, y aumentaba todos los parámetros excepto el área del soma. Estudios previos han demostrado que tanto la vía de PI3K/AKT como la de ERK/MAPK pueden estar implicadas en promover procesos de diferenciación como la extensión neurítica (Thompson y col., 2004; Dijkhuizen y Ghosh, 2005), y la elongación y ramificación del axón (Markus y col., 2002). Sin embargo, en nuestro modelo, el GDNF sólo induce una activación efectiva de la vía de ERK/MAPK, por lo que sería ésta la encargada de promover el proceso de arborización. La activación específica mediada por GDNF podía bloquearse con la adición de los inhibidores específicos de la vía de ERK/MAPK, PD98059 y U0126. Y, como se esperaba, el tratamiento con PD98059 también era capaz de bloquear el efecto del GDNF sobre la arborización de las neuronas, reforzando el papel esencial de la activación de la vía de ERK/MAPK en los efectos biológicos mediados por GDNF en las neuronas estriatales en cultivo.

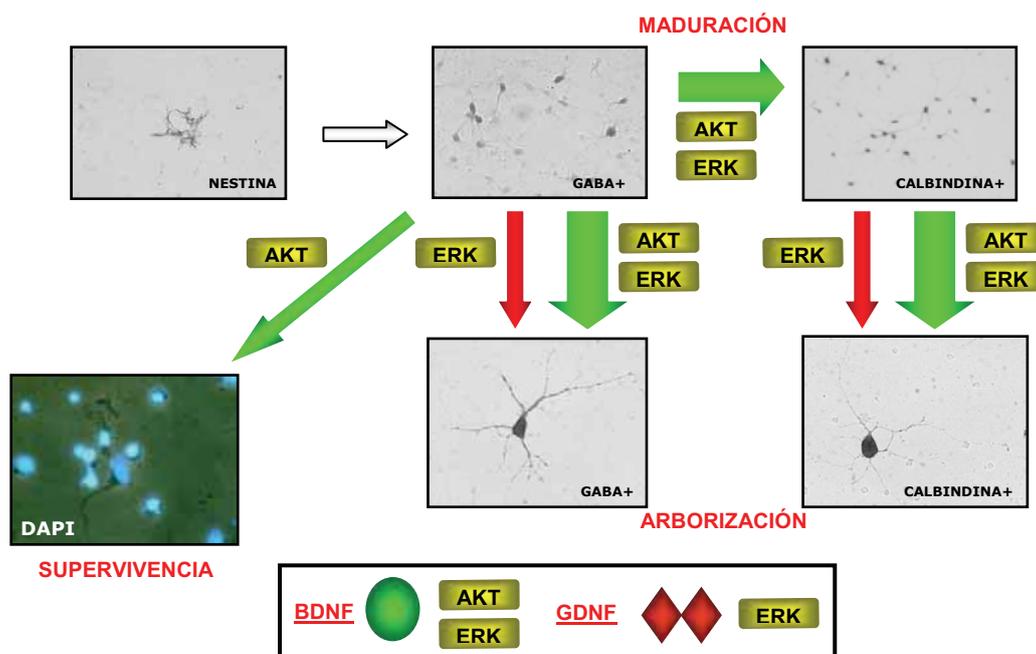
No obstante, nuestros experimentos también muestran que el tratamiento con LY294002, un inhibidor específico de la vía de PI3K/AKT, también es capaz de bloquear los efectos biológicos mediados por GDNF. Este resultado no puede atribuirse a ninguno de los cruces entre ambas vías descritos previamente para las neuronas estriatales (Fuller y col., 2001; Stropollo y col., 2001; Perkinson y col., 2002), dado que la adición de GDNF era incapaz de inducir una activación efectiva de la vía de PI3K/AKT, y además la dosis de LY294002 usada para el análisis de los efectos biológicos, 25 $\mu$ M, no inhibía la activación de la vía de ERK/MAPK. Un mecanismo potencial sería una dependencia, por parte de la vía de ERK/MAPK, de la actividad basal de la vía de PI3K/AKT, dado que la adición de LY294002 inhibe esta actividad basal de forma efectiva. De acuerdo con esta hipótesis, diferentes trabajos han descrito que una activación débil de la vía de ERK/MAPK puede depender de la activación basal de la vía de PI3K/AKT, mientras que activaciones de mayor intensidad

pueden ejercer su efecto de manera independiente (Duckworth y Cantley, 1997; Wennstrom y Downward, 1999). En nuestros experimentos, la adición de GDNF induce una activación de la vía de ERK/MAPK de menor intensidad y duración que la producida por el otro factor neurotrófico analizado en nuestro grupo, el BDNF, en las mismas condiciones de cultivo (Gavalda y col., 2004). En consecuencia, podemos sugerir que aunque el GDNF no induce una activación específica de la vía de PI3K/AKT en nuestras condiciones de cultivo, si que necesita de su actividad basal para inducir la arborización de las neuronas estriatales. Este nivel de activación basal de la vía de PI3K/AKT debe estar regulado por la presencia de otros factores en el medio de cultivo.

### **1.3.- IMPLICACIÓN DE LOS FACTORES NEUROTRÓFICOS GDNF Y BDNF EN LA MADURACIÓN DE LAS NEURONAS ESTRIATALES**

El desarrollo de las neuronas estriatales, su maduración, y el establecimiento de las conexiones sinápticas está regulado por diferentes factores tróficos (Maisonpierre y col., 1990; Checa y col., 2000; Ciccolini y Svendsen, 2001). En etapas tempranas del desarrollo, las células presentan un marcaje positivo para el marcador nestina, el cual corresponde a un marcaje de precursor neural (Dahlstrand y col., 1995) y, cuando las células avanzan en el proceso de maduración, van adquiriendo otros marcadores neuronales específicos de una determinada población neuronal. En nuestro modelo, aproximadamente un 70% de las células expresan el marcador GABA, correspondiendo a las neuronas de proyección estriatales. No obstante, no podemos descartar que algunas de estas células correspondan a interneuronas, aunque representarían menos de un 3 % de la población total estriatal (Kawaguchi y col., 1995). Las neuronas GABAérgicas de proyección todavía pueden alcanzar otro paso más avanzado de maduración, ya que además del GABA pueden expresar la proteína quelante de calcio calbindina (Celio, 1990). En nuestro modelo *in vitro* esta población representa alrededor de un 4% de la población total, mientras que *in vivo* llega a alcanzar un 90%, lo que significa que prácticamente todas las neuronas GABAérgicas de proyección expresan también la calbindina en la etapa adulta (Gerfen, 1992).

Los efectos del GDNF en ambas poblaciones son más discretos que los mediados por el BDNF (Fig. 19), estudiados previamente en nuestro laboratorio (Gavalda y col., 2004). Este fenómeno podría ser debido a que el BDNF es capaz de



**Figura 19.-Efectos biológicos mediados por el BDNF y el GDNF sobre los cultivos de neuronas estriatales.**

activar la vía de la PI3-K/AKT y la de ERK/MAPK mientras que el GDNF sólo activa ésta última. Otra diferencia en cuanto a la activación de estas vías por los dos factores que podría explicar estos efectos distintos es que los niveles de ERK1/2 fosforilados son más elevados tras la adición de BDNF, y además se mantienen durante más tiempo. De acuerdo con esta sugerencia, trabajos anteriores también han demostrado que la intensidad y la duración de la activación de la vía de la ERK/MAPK es importante para obtener efectos biológicos (Mariathasan y col., 2001; Rossler y col., 2004). Del mismo modo, nuestro grupo también ha demostrado un efecto más potente del BDNF en otros paradigmas experimentales, por ejemplo, tras una lesión excitotóxica en el núcleo estriado, el efecto neuroprotector del BDNF es mucho más potente que el del GDNF sobre las neuronas de proyección. Además, el BDNF protege a las neuronas que proyectan a la sustancia negra y a las que proyectan al globo pálido, mientras que el GDNF sólo es capaz de tener efecto sobre las neuronas estriatonigrales (Perez-Navarro y col., 1999a, 1999b, 2000a; Gratacos y col., 2001b). Sin embargo, los resultados obtenidos con el tratamiento con GDNF demuestran un efecto específico de este factor neurotrófico incrementando la arborización dendrítica de las neuronas GABAérgicas, teniendo además un efecto más marcado sobre aquellas que también eran positivas para calbindina. Esto indica que el GDNF estaría implicado en una etapa bastante tardía de la maduración de las células estriatales a través de la activación específica de la vía de ERK/MAPK. Esto concuerda con la expresión del receptor GFR $\alpha$ 1 *in vivo*, cuyo nivel máximo en las neuronas estriatales de proyección se da entre los días postnatales 10 y 14 (Cho y col., 2004), y con la

implicación de la vía de ERK/MAPK en la regulación de procesos neuronales más maduros en el núcleo estriado (Mazzuccheli y col., 2002).

## **2.- IMPLICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE LA FAMILIA DE BCL-2 EN LOS PROCESOS DE MUERTE NEURONAL EN EL NÚCLEO ESTRIADO**

En el segundo y tercer trabajo nos centramos en el estudio de la regulación de las proteínas de la familia de Bcl-2 en el núcleo estriado. La implicación de estas proteínas en el control de la apoptosis neuronal ha sido ampliamente descrita (Martin, 2001; Benn y Wolf, 2004; Ward y col., 2004), además, trabajos previos realizados en nuestro laboratorio han demostrado un papel fundamental de estas proteínas en la muerte de las neuronas estriatales en un modelo excitotóxico de la enfermedad de Huntington (Perez-Navarro y col., 2005).

### **2.1.- REGULACIÓN DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL**

En un trabajo previo de nuestro grupo se describió un papel esencial de la proteína Bax en el proceso apoptótico de las neuronas estriatales activado por la inyección de agonistas de los receptores de glutamato (Perez-Navarro y col., 2005), por lo que nos interesamos en estudiar específicamente a esta proteína pro-apoptótica, y comenzamos por analizar su participación en el proceso apoptótico durante el desarrollo postnatal del núcleo estriado y de la corteza cerebral.

En primer lugar analizamos los niveles de la proteína Bax durante el desarrollo postnatal (P3, P7, P15, P21) y en el adulto, y observamos que los niveles de esta proteína presentaban un patrón similar en ambas zonas, con niveles de expresión elevados entre P3 y P7. Esto suponía una correlación entre los niveles elevados de la proteína y la muerte neuronal natural que tiene lugar durante el desarrollo postnatal del núcleo estriado (Fishell y Van der Kooy, 1991) y de la corteza cerebral (Spreafico y col., 1995), sugiriendo un papel relevante de la proteína pro-apoptótica Bax en este proceso. Sin embargo, cuando analizamos el número de células en el núcleo estriado y en la corteza del ratón KO para Bax adulto no encontramos diferencias respecto a un animal control, lo que sugería una posible compensación por parte de otras proteínas de la familia de Bcl-2. Como consecuencia, analizamos los niveles de otras proteínas pro-apoptóticas y observamos que Bak, la proteína efectora con una función más similar a Bax (Lindsten y col., 2000), únicamente aumentaba en la corteza cerebral a P3 con respecto a sus niveles en el ratón control. Aunque los cambios observados no eran generalizados, pensamos que Bak puede jugar un papel importante en la muerte neuronal durante el desarrollo que se produce en los ratones deficientes para Bax sin

necesidad de presentar unos niveles más altos, mediante un mecanismo como el que habíamos observado para Bax en los animales lesionados con KA, donde los niveles no incrementaban pero sí variaba su dimerización con los miembros anti-apoptóticos de la familia (Perez-Navarro y col., 2005).

Sin embargo, la regulación más llamativa inducida por la ausencia de Bax se daba en los niveles de la proteína Bim, miembro de la subfamilia de las proteínas solo-BH3, que estaba incrementado en ambas zonas cerebrales aunque siguiendo patrones temporales distintos. Como se ha comentado en la introducción, la proteína Bim es un potente inductor de la apoptosis dado que puede antagonizar a todos los miembros anti-apoptóticos de la familia y además puede interactuar directamente activando a las proteínas efectoras Bak y Bax (Willis y Adams, 2005; Fletcher y Huang, 2006). En este sentido, un posible mecanismo sería que las neuronas, tanto estriatales como corticales, respondieran a la ausencia de Bax mediante unos niveles elevados de Bim, éstos podrían regular la dimerización y por tanto la función de los demás miembros de la familia asegurando el correcto funcionamiento de la muerte celular programada durante el desarrollo postnatal. Aún así, con los resultados de este trabajo no podemos descartar la participación de la vía extrínseca o de otros mecanismos alternativos de muerte en la eliminación natural de neuronas ocurrida durante el desarrollo postnatal de ambas zonas cerebrales en ausencia de Bax.

## **2.2.- REGULACIÓN EN EL MODELO EXCITOTÓXICO DE ENFERMEDAD DE HUNTINGTON**

En el segundo trabajo estudiamos los efectos de una lesión estriatal aguda como modelo de enfermedad de Huntington. Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que el ratón KO para Bax es resistente a la lesión excitotóxica inducida en el núcleo estriado (Perez-Navarro y col., 2005), lo que indica un papel esencial de esta proteína pro-apoptótica en respuesta a la inyección de QUIN. En este sentido, de nuevo nos centramos específicamente en el papel de esta proteína pro-apoptótica, y analizamos las diferencias en la regulación de las proteínas de la familia de Bcl-2 frente a la lesión entre el ratón control y el KO para Bax.

En el animal control, tras la inyección intraestriatal de QUIN, no se observaba un aumento de los niveles totales de Bax, sin embargo, sí que se producía una disminución de su heterodimerización con Bcl-2 y un incremento importante de sus niveles en la fracción mitocondrial, todo acompañado de una salida efectiva de cit c

hacia el citoplasma, que era la responsable última de la activación de la fase de ejecución de la apoptosis en nuestro modelo excitotóxico.

En el animal KO para Bax observamos que la inyección de QUIN producía un aumento específico de los niveles de Bak. Estudios previos en animales doble KO para Bax y Bak han demostrado que estas dos proteínas pro-apoptóticas pueden tener un papel redundante en la regulación de la apoptosis (Lindsten y col., 2000; Wei y col., 2001; Degenhardt y col., 2002), lo que podría explicar que en ausencia de Bax, se indujera este aumento específico de los niveles de Bak. Sin embargo, este incremento de Bak no se veía acompañado de aumento de cit c en la fracción citosólica coincidiendo con la práctica ausencia de muerte celular después de la lesión. Este hecho puede ser debido a que en el animal KO para Bax, la lesión inducía también un aumento en los niveles de Bcl-x<sub>L</sub>, proteína anti-apoptótica con una clara preferencia por formar heterodímeros con Bak (Sattler y col., 1997). De acuerdo con estos trabajos, tanto en el animal control como en el KO para Bax, observamos una heterodimerización Bak:Bcl-x<sub>L</sub>, y lo que es aún más importante, tras la inyección de QUIN, la proteína Bak continuaba secuestrada por su unión a Bcl-x<sub>L</sub>, incluso tras el aumento específico de Bak que se induce en el animal KO para Bax. Estudios recientes han demostrado que Bak se mantiene inactiva mediante su unión a Bcl-x<sub>L</sub> y MCL-1, y que su función pro-apoptótica sólo se dispara de manera efectiva si ambas proteínas anti-apoptóticas son neutralizadas por miembros de la familia de proteínas solo-BH3 (Willis y Adams, 2005). De este modo, la regulación paralela de Bcl-x<sub>L</sub> y su continuidad en la unión con Bak tras la lesión, podrían explicar la incapacidad de los elevados niveles de la proteína pro-apoptótica de inducir una efectiva liberación de cit c y la posterior muerte celular en respuesta a la inyección de QUIN.

Por último, y al igual que habíamos descrito durante el desarrollo postnatal, observamos que la proteína Bim jugaba un papel muy importante en la regulación del proceso apoptótico en respuesta a la lesión excitotóxica. En este sentido, los niveles de esta proteína aumentaban de manera significativa en ambos genotipos tras la inyección de QUIN. Es importante señalar que, aunque la expresión basal de Bim era mayor en el animal KO para Bax adulto, el incremento de los niveles tras la lesión era similar, sugiriendo que podía tratarse de una regulación diferente a la ocurrida durante el desarrollo, y que estaría iniciando una respuesta apoptótica frente a la inyección de QUIN. De acuerdo con esta hipótesis, trabajos previos describen una regulación en los niveles de Bim *in vivo* en respuesta a episodios epilépticos (Shinoda y col., 2004), isquémicos (Okuno y col., 2004) y en la retina tras un daño en el nervio óptico

(Napankangas y col., 2003). Además, en el animal control, observamos un incremento de los niveles de Bim en la fracción mitocondrial tras la lesión. Este hecho podría contribuir con la integración de Bax en la membrana mitocondrial externa, dado que la localización de Bim en la mitocondria puede contribuir a la multimerización de Bax facilitando la liberación de cit c al citoplasma (Putcha y col., 2001; Yamaguchi y Wang, 2002). Con respecto al animal KO para Bax, los niveles de Bim en la mitocondria no aumentaban tras la lesión excitotóxica. No obstante, estos niveles mitocondriales ya estaban muy elevados considerando el continuo incremento de los niveles totales durante el desarrollo. Esta asociación constitutiva de Bim en la mitocondria sin un previo estímulo han sido previamente descritos en células T (Zhu y col., 2004), pero lo único que parece claro es que estos elevados niveles mitocondriales por sí solos, y teniendo en cuenta la ausencia de Bax y la neutralización de Bak mediante su unión a Bcl-x<sub>L</sub>, eran incapaces de inducir la muerte celular en respuesta a la lesión excitotóxica (Fig. 20).

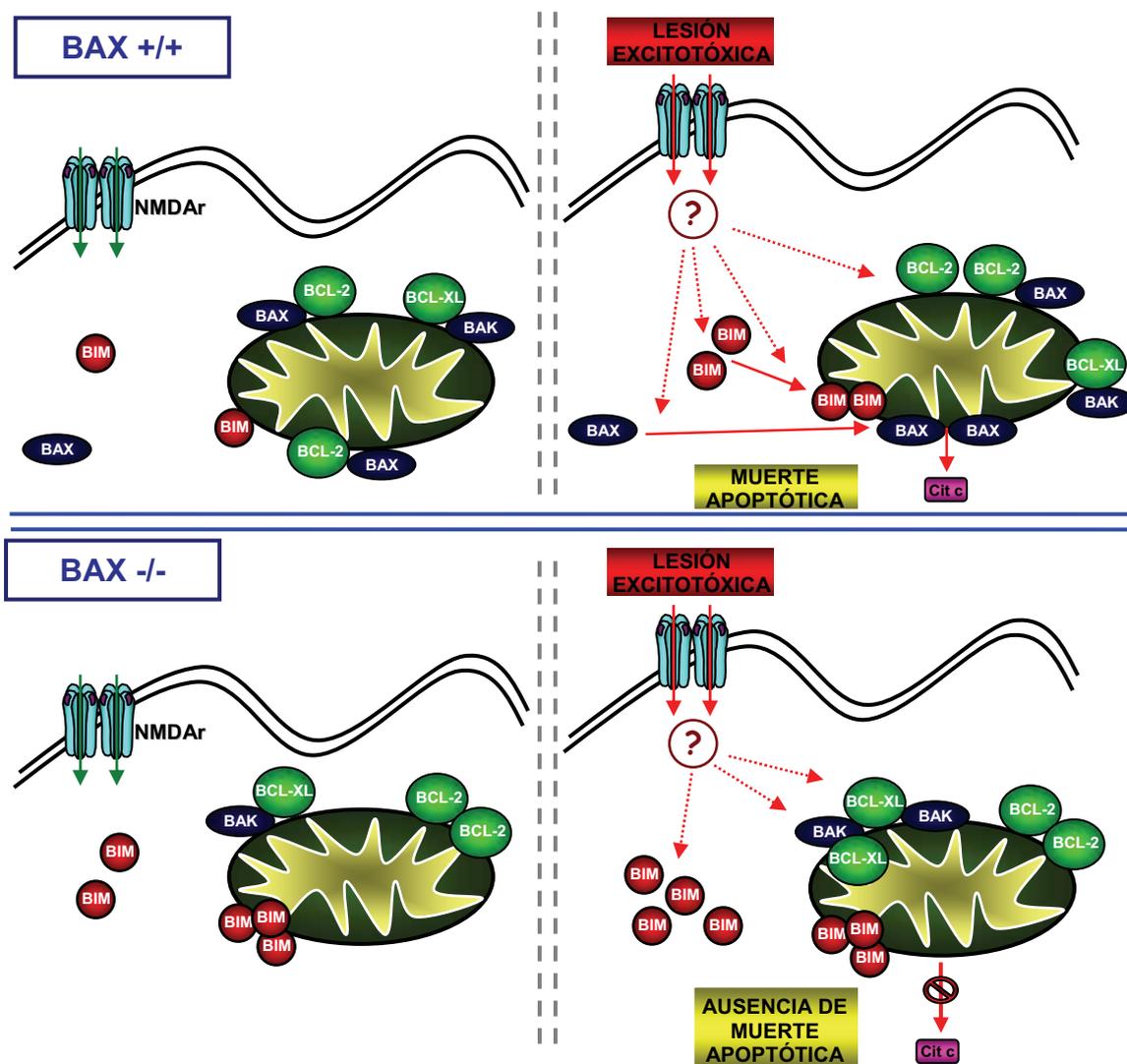


Figura 20.-Modelo propuesto para la regulación de las proteínas de la familia de Bcl-2 en el modelo excitotóxico en el ratón control y Bax-/-

En resumen, estos resultados sobre la regulación de Bim, junto con los datos obtenidos durante el estudio del desarrollo postnatal, sugieren un papel muy importante de esta proteína como sensor de diferentes estímulos pro-apoptóticos. También señalamos que, durante el desarrollo, la inducción de Bim parece relacionada con su capacidad de antagonizar a todos los miembros anti-apoptóticos de la familia facilitando así la activación de Bak. Sin embargo, su inducción en respuesta a la inyección de QUIN parece un mecanismo directamente relacionado con su localización en la mitocondria, hecho que favorecería la oligomerización de Bax dentro de la misma. Esta hipótesis se ve apoyada por la ausencia de dímeros con Bcl-2, Bak o el propio Bax tras la lesión excitotóxica. Así, nuestros resultados apoyarían la fusión de los modelos de funcionamiento de las proteínas solo-BH3, como ha sido sugerido previamente (Willis y Adams, 2005). De este modo, cada uno de estos modelos representaría diferentes mecanismos de activación para cada una de las proteínas pro-apoptóticas multiméricas.

### **2.3.- REGULACIÓN EN EL MODELO TRANSGÉNICO DE ENFERMEDAD DE HUNTINGTON**

El tercer trabajo corresponde al estudio de la regulación de la familia de Bcl-2 en un modelo transgénico de la enfermedad de Huntington, el ratón R6/1, el cual presenta una degeneración estriatal paulatina frente a la degeneración aguda del modelo excitotóxico. Además, el estudio se realizó en paralelo con el modelo desarrollado previamente en nuestro laboratorio, el ratón R6/1:BDNF+/- (Canals y col., 2004), lo que nos permitió evaluar la implicación de los niveles de BDNF en esta regulación.

Al igual que en el modelo excitotóxico, durante el desarrollo de este estudio observamos que la degeneración estriatal producida por la expresión de la htt mutada afecta principalmente y de manera específica a miembros de la familia de las proteínas solo-BH3, concretamente a Bid y Bim. Estos cambios apoyan el papel de “sensores celulares de estrés” que ha sido propuesto para estas proteínas (Huang y Strasser, 2000; Fletcher y Huang, 2006). Las alteraciones de los niveles de Bid y Bim aparecían desde etapas tempranas de la enfermedad en nuestros modelos (16 semanas), sin embargo, mientras que el incremento en los niveles de Bid era similar tanto en el ratón R6/1, como en el R6/1:BDNF+/-, el incremento de los niveles de Bim sólo era patente en el núcleo estriado del ratón R6/1:BDNF+/- . Estos primeros resultados apuntaban a que la regulación de ambas proteínas era inducida por diferentes mecanismos, y estaban de acuerdo con resultados previos obtenidos en el ratón R6/2, un modelo

transgénico de enfermedad de Huntington más agudo (Mangiarini y col., 1996), donde los incrementos en los niveles de Bid precedían a los de Bim durante la progresión de la enfermedad (Zhang y col., 2003b). Como se ha descrito en la introducción, el déficit de BDNF se ha propuesto como uno de los elementos que pueden participar en la degeneración estriatal inducida por la expresión de htt mutada (Zuccato y col., 2001; 2003). En este sentido, nuestros resultados apuntan a que la reducción de los niveles endógenos de BDNF favorece el incremento de los niveles de Bim en el núcleo estriado durante las primeras etapas de la enfermedad (Fig. 21). Además, sugieren también que estos niveles de Bim elevados pueden contribuir a la aceleración de la disfunción neuronal y a la degeneración descrita en el ratón R6/1:BDNF+/- (Canals y col., 2004).

Cuando analizamos cual era la regulación de las proteínas de la familia de Bcl-2 durante las últimas etapas de la enfermedad (30 semanas), observamos que el efecto principal seguía focalizado en las proteínas Bid y Bim, si bien, ahora los niveles de ambas proteínas estaban incrementados de forma similar en el núcleo estriado tanto en el ratón R6/1, como en el R6/1:BDNF+/- . Sin embargo, la regulación de estas proteínas seguía apuntando hacia mecanismos diferentes. Así, nuestros resultados de los niveles de mRNA mostraban que la expresión de Bid estaba incrementada en el ratón R6/1 y en el R6/1:BDNF+/-, mientras que la expresión de Bim sólo aumentaba en aquellos ratones con niveles endógenos de BDNF disminuidos (BDNF +/- y R6/1:BDNF +/-). De acuerdo con estos datos, se ha descrito recientemente un efecto similar en el que la adición de BDNF induce una disminución de la expresión de Bim *in vitro* (Li y col., 2007). Para confirmar nuestros resultados sobre estos mecanismos diferentes de regulación de Bim y Bid, analizamos los niveles de estas proteínas en el modelo de enfermedad de Huntington condicional Tet/HD94 (Yamamoto y col., 2000). A los 22 meses, este ratón sufre déficits de coordinación motora, una disminución del volumen del núcleo estriado y una pérdida progresiva del número de neuronas estriatales (Diaz-Hernandez y col., 2005). De acuerdo con los resultados obtenidos en los ratones R6/1 y R6/1:BDNF+/-, el ratón Tet/HD94 presentaba un incremento significativo de los niveles de Bid y Bim en el núcleo estriado. De manera interesante, observamos que el silenciamiento del transgen de la htt mutada durante 5 meses, revertía completamente el incremento en los niveles de Bid, pero no en los de Bim, reforzando la idea de que eran mecanismos distintos los encargados de la regulación de los niveles de las diferentes proteínas pro-apoptóticas. Todos estos datos apuntan a una regulación continua de la htt mutada actuando directamente sobre la transcripción de la proteína Bid (Fig. 21). Sin embargo, la acumulación de niveles

elevados de Bim parece estar regulada por un mecanismo más indirecto y lento, y nuestros resultados sugieren que la presencia de la htt mutada podría interferir con vías implicadas en la degradación de esta proteína (Fig. 21). De acuerdo con esta hipótesis, aunque ambos ratones, BDNF +/- y R6/1:BDNF +/-, tenían aumentada la expresión del mRNA de Bim, tan sólo el R6/1:BDNF +/- que expresaba la htt mutada, presentaba además unos niveles elevados de la proteína.

En las últimas etapas de la evolución de la enfermedad en los ratones R6/1 y R6/1:BDNF +/-, también observamos una importante localización de las proteínas Bid y Bim en la mitocondria, hecho que puede interpretarse como un paso más en el proceso apoptótico. De hecho, y de acuerdo con datos previos que describen como la localización de Bid en la mitocondria contribuye a la inducción de la apoptosis (Sarig y col., 2003; Ward y col., 2006), nuestros resultados sugieren que los niveles elevados de Bid durante la progresión de la enfermedad y su acumulación en la mitocondria podrían contribuir al daño mitocondrial (Beal, 2000; Rego y Oliveira, 2003) y a la disfunción neuronal que precede a la muerte (Fig. 21). Esta hipótesis se ve apoyada por los resultados *in vitro* de este mismo trabajo, donde la sobre-expresión de Bid afecta a la viabilidad de progenitores estriatales control, y de manera más severa a aquellos que expresan htt mutada. De manera interesante, la combinación de niveles altos de Bim con la expresión de htt mutada suponía también un descenso, aunque más moderado, de la viabilidad en nuestro modelo *in vitro*. Sin embargo, la sobre-expresión de Bim no tenía efectos sobre la viabilidad de progenitores estriatales control, de acuerdo con la expresión elevada de Bim durante toda la vida del ratón KO para Bax (trabajo 2), y con el hecho de que el ratón Tet/HD94, revertiera sus síntomas motores y mantuviera unos niveles elevados de Bim.

El incremento en la fracción mitocondrial de Bid y Bim estaba acompañado de una ligera re-localización de la proteína efectora Bax hacia este orgánulo (Fig. 21). Sin embargo, la acumulación de proteínas pro-apoptóticas en la mitocondria no estaba induciendo una salida efectiva de factores apoptogénicos hacia el citoplasma y no observamos ningún aumento en la actividad de la caspasa-3 en ninguno de los genotipos analizados. Dado que la enfermedad de Huntington es una enfermedad progresiva con una degeneración lenta, podemos asumir que en un periodo concreto de tiempo sólo un número reducido de células está consumando la apoptosis, lo que haría difícil la detección de los marcadores mediante técnicas bioquímicas. En este sentido, una aproximación inmunohistoquímica nos permitió detectar un número muy reducido de células positivas para caspasa-3 activa en el núcleo estriado de los

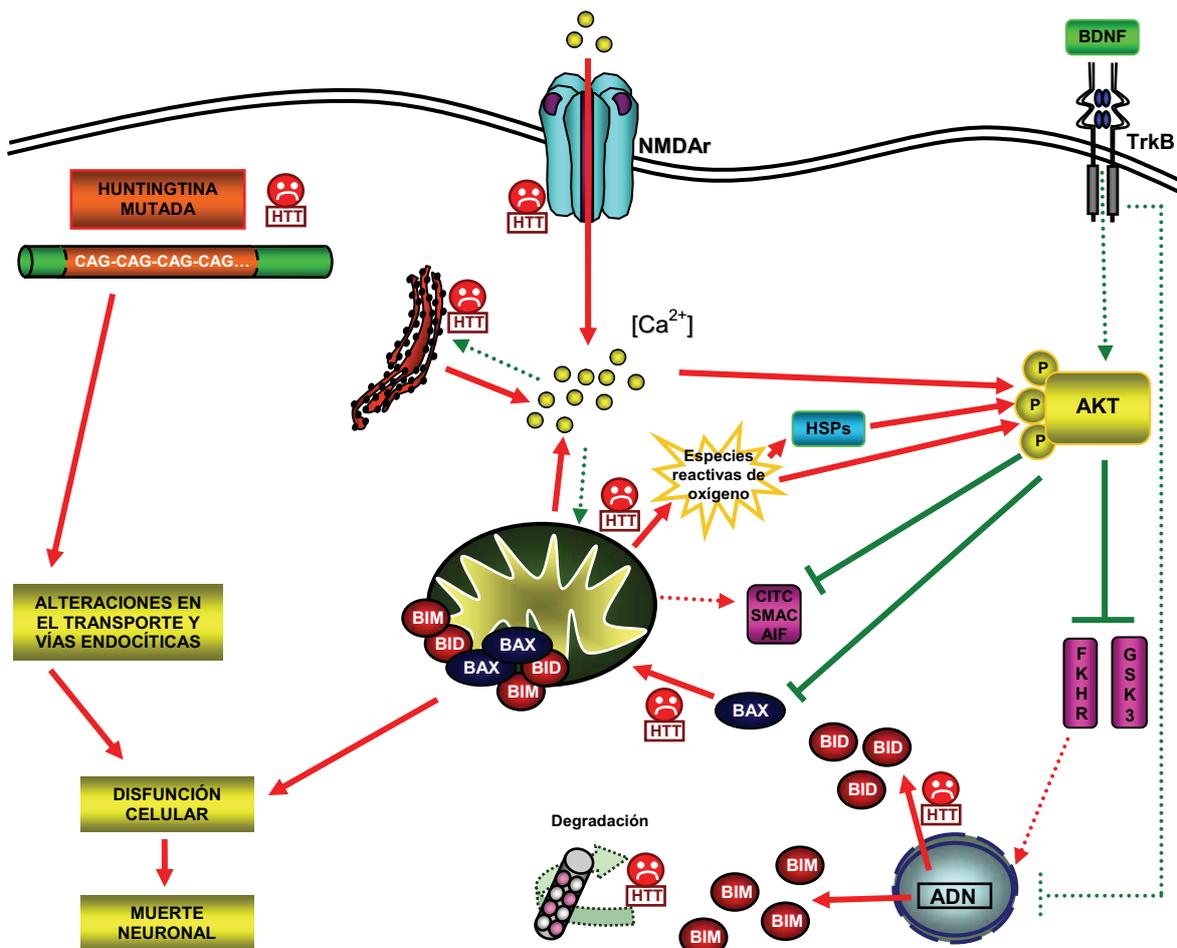
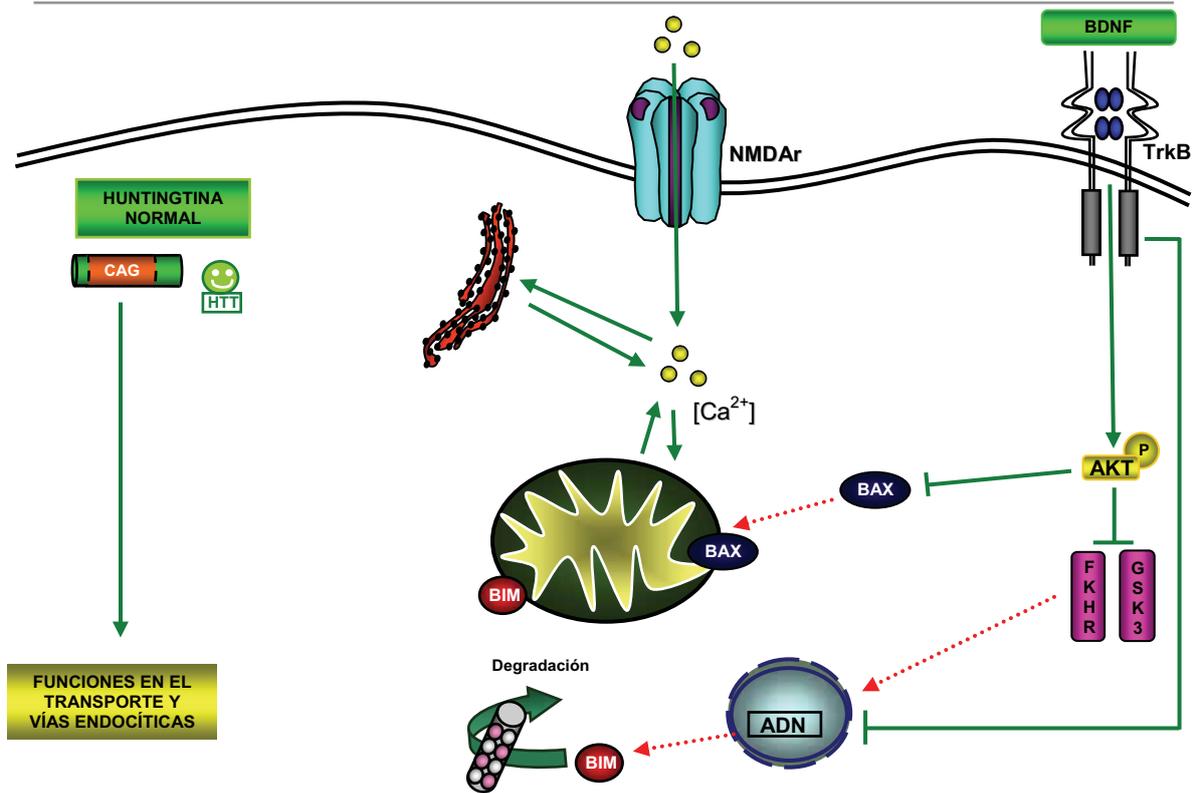


Figura 21.-Modelo propuesto para la regulación de las vías de muerte y supervivencia en el modelo transgénico

ratones R6/1 y R6/1:BDNF+/-, de acuerdo con resultados previos obtenidos en el análisis de muestras humanas de diferentes grados de la enfermedad (Vis y col., 2005).

Nuestros resultados dejan también una puerta abierta a la hipótesis de que algún tipo de mecanismo protector pueda estar activado en respuesta a la toxicidad mediada por la expresión de la htt mutada, evitando así una respuesta apoptótica masiva, dado que estos modelos murinos sufren una grave degeneración estriatal sin pérdida de neuronas (R6/1) o con una pérdida moderada (R6/1:BDNF+/- y Tet/HD94). En este sentido, aunque detectamos un gran aumento en los niveles de Bid, no hay señales de su fragmento truncado, tBid, mucho más potente que la proteína completa en la activación de Bax. Del mismo modo, tampoco existe un gran aumento de la localización de Bax en la mitocondria, ni una salida de cit c hacia el citoplasma como en el caso del modelo excitotóxico (trabajo 2). La activación de mecanismos anti-apoptóticos constituiría una explicación plausible por la cual el proceso apoptótico, que se inicia con el aumento de las proteínas solo-BH3, parece detenido en la mitocondria y no se traduce en una gran actividad de las caspasas, ni grandes cambios en otros mecanismos de muerte celular, como últimos efectores de la muerte neuronal.

### **3.- MECANISMOS DE SUPERVIVENCIA ACTIVADOS EN RESPUESTA A LA TOXICIDAD INDUCIDA POR LA EXPRESIÓN DE HUNTINGTINA MUTADA**

Teniendo en cuenta que el progreso de la enfermedad en el modelo transgénico cursaba con una grave degeneración estriatal pero con cambios discretos o nulos en el número de células (Mangiarini y col., 1996; Canals y col., 2004), y de acuerdo con la hipótesis de que algún tipo de mecanismo anti-apoptótico pudiera estar activado en respuesta a la toxicidad inducida por la htt mutada, bloqueando, o al menos retrasando, las consecuencias de los cambios apoptóticos observados en el trabajo 3, en el último trabajo analizamos la activación de la vía PI3K/AKT en los ratones R6/1 y R6/1:BDNF+/-.

En nuestro modelo, observamos un aumento de la fosforilación de la proteína quinasa AKT, específico del núcleo estriado en los ratones que expresan la htt mutada. Este incremento en la fosforilación era detectable desde etapas tempranas de la enfermedad (12 semanas) tanto en el núcleo estriado del ratón R6/1 como del R6/1:BDNF+/-, y además, aparecía acoplado a una señalización anti-apoptótica mediante la fosforilación, y consiguiente inhibición, de GSK3 $\beta$ . Notablemente, los niveles de fosforilación de AKT no solo seguían aumentados durante las últimas fases

del desarrollo de la enfermedad (30 semanas), sino que eran más elevados que a etapas tempranas. Además, su señalización anti-apoptótica parecía extenderse hacia la inhibición de otras vías deletéreas para la célula como la del factor pro-apoptótico FoxO. La alteración de esta vía durante la progresión de la enfermedad de Huntington ha sido previamente descrita en diferentes trabajos (Humbert y col., 2002; Gines y col., 2003b; Colin y col., 2005), aunque algunos aspectos en relación al mecanismo de activación y al curso temporal no están tan definidos. En este sentido, aunque algunos de estos estudios describen un aumento de los niveles de AKT fosforilada como una respuesta a la expresión de la htt mutada en un modelo *knock-in* tanto *in vivo* como *in vitro* (Gines y col., 2003b), resultados recientes, obtenidos del estudio de un modelo agudo (mediante la inyección estriatal de lentivirus que expresan fragmentos N-terminales de la htt mutada), describen como los niveles de AKT fosforilada, así como su forma total, disminuyen progresivamente durante el avance de los síntomas. Además, estos autores muestran como la quinasa AKT se encuentra procesada y por consiguiente irreversiblemente inactiva en tejido cerebral de pacientes de grado 3 y 4 de enfermedad de Huntington (Colin y col., 2005). Así pues, nuestros resultados apoyarían la hipótesis de que la vía de la quinasa AKT aparece afectada durante la progresión de la enfermedad. Sin embargo, nuestros experimentos demuestran como estos modelos murinos que cursan con una pérdida de neuronas estriatales muy reducida, mantienen unos niveles elevados de la proteína fosforilada ligada a una señalización anti-apoptótica hasta las últimas fases de la enfermedad, en claro contraste con la señalización reducida de AKT del modelo de lesión más aguda mediante la inyección de lentivirus. En este sentido, estos datos apuntan a un papel muy importante del aumento de la actividad de AKT como mecanismo de resistencia de las neuronas estriatales en respuesta al efecto tóxico de la htt mutada, y señalan a la pérdida de esta actividad anti-apoptótica como uno de los eventos que podría desencadenar una muerte neuronal masiva en las últimas etapas de la progresión de la enfermedad.

Un aspecto importante de analizar es el mecanismo preciso que conduce a un aumento de la actividad de AKT. Trabajos previos han descrito una regulación de la actividad de esta proteína quinasa en respuesta a cambios fisiológicos y patológicos de los niveles de glucosa en el cerebro *in vivo*. Estos autores han demostrado que diferentes modelos animales de diabetes exhiben un aumento de la fosforilación tanto de AKT como de su sustrato GSK3 $\beta$  en el hipocampo y la corteza cerebral, efecto que puede revertirse mediante la administración de insulina (Clodfelder-Miller y col., 2005). Estos datos podrían tener una gran relevancia en nuestro trabajo dado que se ha

descrito que la diabetes tiene una mayor incidencia en la enfermedad de Huntington y otras enfermedades provocadas por la repetición del triplete CAG (Hurlbert y col., 1999). Además, en el ratón R6/2, que contiene el mismo fragmento de la *htt* mutada que nuestros modelos aunque con más repeticiones CAG, ha sido previamente descrita la manifestación de un tipo específico de diabetes (Hurlbert y col., 1999). Sin embargo, nuestros resultados en los ratones R6/1 y R6/1:BDNF+/- muestran como el aumento de AKT no se debe a un mecanismo general en todas las áreas cerebrales, y en este sentido no se observan cambios ni en el hipocampo ni en la corteza cerebral, apuntando por tanto hacia un mecanismo específico de activación de AKT en el núcleo estriado. Esta hipótesis se ve reforzada por nuestros resultados en el modelo Tet/HD94, donde observamos un incremento específico de AKT fosforilada en el núcleo estriado del modelo condicional que se revierte parcialmente tras el silenciamiento del transgen, apuntando a una relación directa entre el efecto neurotóxico de la *htt* mutada y el incremento de la actividad de AKT. Un posible mecanismo específico podría estar relacionado con los resultados observados en la línea estriatal Q111/Q111, que expresa la *htt* mutada. Estos autores demuestran una activación de AKT que puede bloquearse mediante la adición del inhibidor específico de los receptores NMDA, MK-801, y además, que esta activación es dependiente de los niveles intracelulares de  $Ca^{2+}$  (Gines y col., 2003b). Es importante señalar que diferentes modelos de enfermedad de Huntington presentan un incremento de las corrientes inducidas por la activación selectiva de los receptores NMDA, así como un aumento de la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  tanto en etapas pre-sintomáticas como sintomáticas (Cepeda y col., 2001). La elevada concentración  $Ca^{2+}$  podría afectar a la funcionalidad de la mitocondria, a lo que habría que sumar la interacción directa de la *htt* mutada con la mitocondria con lo que se agravaría una ya perjudicada homeostasis del  $Ca^{2+}$  intracelular (Levine y col., 1999; Panov y col., 2002; 2003). Por lo tanto, y al igual que se propone en el modelo *in vitro*, una mayor actividad de los receptores NMDA con el consiguiente aumento de la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular podría ser el detonante del incremento de la fosforilación de AKT que observamos en nuestros modelos. Una posibilidad diferente sería que la quinasa AKT se mantuviera activada hasta etapas muy avanzadas de la neurodegeneración en respuesta al estrés intracelular. Este mecanismo se ha descrito para otras quinasas como la SGK (Imaizumi y col., 1994; Leong y col., 2003), la cual también es capaz de ejercer un efecto neuroprotector frente a la toxicidad de la *htt* mutada, y cuya actividad aparece incrementada durante etapas tardías de la progresión de la enfermedad en cerebros de pacientes de enfermedad de Huntington (Rangone y col., 2004). En este sentido, diferentes chaperonas inducidas en respuesta a distintos estímulos de estrés

intracelular, como la Hsp27 y la Hsp90, pueden unirse específicamente a AKT fosforilada impidiendo su degradación (Konishi y col., 1997; Rane y col., 2003). Además de mantener sus niveles, la asociación con Hsp27 parece formar parte de un mecanismo de activación de AKT en respuesta al estrés intracelular independiente de PI3-K (Konishi y col., 1997). También, y de manera interesante, la activación de AKT en respuesta al estrés oxidativo, una característica bien definida de la patología de la enfermedad de Huntington (Rego y Oliveira, 2003), ha sido descrita en un modelo de células cardíacas (Tu y col., 2002). Así pues, y aunque la concentración elevada de  $Ca^{2+}$  intracelular pueda constituir el detonante para la activación de AKT en nuestros modelos *in vivo*, la participación de los mecanismos en respuesta al estrés intracelular en el mantenimiento de la señalización anti-apoptótica también debe ser considerada (Fig. 21).

La actividad neuroprotectora mejor descrita para la AKT en la enfermedad de Huntington es la fosforilación directa de la htt mutada en su serina 421, hecho que reduce su toxicidad (Humbert y col., 2002). Sin embargo, dada la naturaleza de la quinasa AKT como pieza esencial de la supervivencia neuronal, su efecto anti-apoptótico en la progresión de la enfermedad es mucho más amplio y puede abarcar a la regulación de múltiples vías más allá de la fosforilación de la proteína mutada como estos mismos autores proponen (Humbert y col., 2002; Rangone y col., 2005). Es importante considerar que todos los modelos utilizados en el trabajo 4 expresan un fragmento del exon1 de la htt mutada que carece de la serina 421. Debido a esto el efecto anti-apoptótico de AKT debe estar mediado por la inhibición de otras vías diferentes como es el caso de GSK3 $\beta$  y FoxO (Fig. 21). Otro aspecto destacable es la regulación que puede ejercer la proteína quinasa sobre diferentes miembros de la familia de Bcl-2. En este sentido, y aunque la actividad de AKT no sea suficiente para impedir un aumento importante de las proteínas Bid y Bim como se ha descrito en el trabajo 3, esta quinasa podría estar impidiendo una gran acumulación de Bax en la mitocondria tal y como ha sido previamente descrito (Yamaguchi y Wang, 2001), lo que detendría en la mitocondria el proceso apoptótico, impidiendo la liberación de factores apoptogénicos al citoplasma y una masiva activación de caspasas (Fig. 21).

Por último, es importante considerar que la elevada actividad de AKT que encontramos en el núcleo estriado de los modelos *in vivo* no es capaz de frenar la progresión de la enfermedad y en todo momento está acompañada de una importante neurodegeneración e incluso de una pérdida de células en los ratones R6/1:BDNF+/- y Tet/HD94. Sin embargo, nuestros resultados sobre la fosforilación aumentada de

GSK3 $\beta$  y FoxO apoyan una función anti-apoptótica de AKT durante las últimas etapas, en contraste con las observaciones realizadas en otro modelo de enfermedad provocada por la repetición del triplete CAG, la Ataxia espinocerebral de tipo 1 (SCA1, del inglés *Spinocerebellar ataxia type 1*), donde la actividad de AKT tiene un efecto deletéreo y contribuye a la neurodegeneración (Chen y col., 2003). Así que, considerando que mantiene su naturaleza anti-apoptótica, la subsistencia de una elevada actividad de AKT permitiría que las neuronas estriatales pudieran sobrevivir durante un largo tiempo con la expresión de la htt mutada. Si bien, con la progresión de la enfermedad y dada la gran acumulación de proteínas apoptóticas junto a el fallo de otros mecanismos intracelulares provocados por la expresión de la proteína mutada, este mecanismo sería insuficiente y se acabaría afectando gravemente a la viabilidad celular, e induciendo por último la pérdida neuronal (Fig. 21). En el modelo Tet/HD94, a pesar de una pérdida celular importante, se propone un mecanismo según el cual, una vez silenciada la expresión de la proteína mutada, el 80 % de las neuronas estriatales que sobreviven son capaces de compensar la función de las células perdidas y producir una recuperación total de los síntomas motores (Diaz-Hernandez y col., 2005). Estos datos subrayan la relevancia de la vía anti-apoptótica durante la progresión de la enfermedad, y apoyan la importancia de mantener unos niveles elevados de AKT fosforilada, que permitan retrasar la pérdida irreversible de las neuronas estriatales permitiendo la recuperación de la viabilidad celular una vez detenida la expresión del transgen.