

Estudio de las vías de supervivencia y muerte neuronal en modelos de la enfermedad de Huntington

Paola Paoletti Rubia

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

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

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



Departamento de
Biología Celular, Inmunología y Neurociencias
Facultad de Medicina

ESTUDIO DE LAS VÍAS DE SUPERVIVENCIA Y MUERTE NEURONAL EN MODELOS DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

**Tesis presentada por Paola Paoletti Rubia
para optar al título de Doctora por la Universidad de Barcelona**

Programa de Doctorado en Biomedicina

IV. DISCUSIÓN

En el desarrollo de esta tesis doctoral nos hemos centrado en el estudio de diferentes vías de señalización intracelular implicadas en los procesos de supervivencia y muerte neuronal en el contexto de la enfermedad de Huntington, con el objetivo de entender cómo la presencia de la proteína htt mutada afecta de forma específica a la normal viabilidad y supervivencia de las neuronas GABAérgicas del núcleo estriado. En un primer trabajo se estudió la implicación de los sistemas glutamatérgicos y dopaminérgicos en la mayor vulnerabilidad de las células estriatales. Los resultados obtenidos nos demostraron que la presencia de la htt mutada potencia la muerte celular inducida por la activación de los receptores glutamatérgicos y dopaminérgicos. Asimismo, demostramos que el efecto neurotóxico asociado a la activación glutamatérgica y dopaminérgica está mediado por una aberrante activación de la vía de la quinasa Cdk5. De esta manera, la htt mutada incrementa la sensibilidad estriatal al glutamato y a la dopamina, modificando una vía de señalización común a ambos sistemas, la vía de Cdk5. En un segundo trabajo se analizó si la alteración en los niveles del receptor TrkB asociada a la expresión de la htt mutada se traduce en una anómala señalización intracelular en respuesta a BDNF. Los resultados obtenidos nos permitieron concluir que en presencia de la htt mutada se produce una específica alteración en la vía de señalización de TrkB-ERK1/2. Además, comprobamos que la menor activación de esta vía intracelular conlleva una mayor susceptibilidad de las células estriatales frente a un estímulo de estrés oxidativo inducido con H₂O₂.

Tal y como quedará reflejado en la discusión y de acuerdo con los resultados obtenidos en esta tesis, la mayor vulnerabilidad de las neuronas estriatales frente a la presencia de la htt mutada podría ser el resultado de (1) una sobreactivación de vías intracelulares con un efecto neurotóxico, como sería, en este caso, la vía de Cdk5 tras una estimulación glutamatérgica y dopaminérgica, y (2) una menor activación de las vías intracelulares involucradas en el mantenimiento de la supervivencia neuronal, como es la vía de ERK1/2.

La identificación y caracterización de los diferentes mecanismos moleculares responsables de la selectiva muerte neuronal en la enfermedad de Huntington puede ser de gran utilidad para el futuro diseño de nuevas terapias farmacológicas que permitan retrasar o prevenir la progresión de la enfermedad.

1.- POTENCIACIÓN DE VÍAS INTRACELULARES IMPLICADAS EN PROCESOS DE MUERTE NEURONAL EN LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

1.1.- IMPLICACIÓN DEL SISTEMA GLUTAMATÉRGICO Y DOPAMINÉRGICO EN LA VULNERABILIDAD ESTRIATAL EN LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

Se desconoce el motivo por el cual las neuronas estriatales resultan ser más vulnerables frente a la expresión de la proteína htt mutada en el contexto de la enfermedad de Huntington. Dado que la htt mutada se expresa de forma ubicua, se ha postulado que la afectación neuronal selectiva que se observa en la enfermedad de Huntington podría estar relacionada no sólo con la expresión *per se* de la htt mutada sino también con las propiedades intrínsecas de cada tipo neuronal y el contexto o ambiente celular en el que se encuentran.

Las neuronas GABAérgicas de proyección en el estriado reciben aferencias glutamatérgicas y una potente inervación dopaminérgica que, a pesar de ser tolerada en condiciones fisiológicas, puede llegar a ser potencialmente tóxica en neuronas comprometidas debido por ejemplo a estrés excitotóxico (Jakel y Maragos, 2000). Tal y como se ha detallado en la introducción, estudios previos han demostrado que el proceso excitotóxico juega un papel relevante en la patogénesis de la enfermedad de Huntington (Zeron y col., 2004; Tang y col., 2005; Perez-Navarro y col., 2006; Fan y Raymond, 2007). De la misma manera, la dopamina puede resultar neurotóxica, bien por su carácter auto-oxidativo y generación de radicales libres dando lugar a estrés oxidativo (McLaughlin y col, 1998; Sulzer y Zecca, 2000), o mediante mecanismos dependientes de la interacción del neurotransmisor con sus receptores, ya sea el receptor D₁ (Chen y col., 2003, 2004) o el receptor D₂ (Coronas y col., 1997; Charvin y col., 2005; Deyts y col., 2009). A pesar de los múltiples indicios que sugieren una participación de la dopamina en el proceso fisiopatológico de la enfermedad de Huntington, se desconoce el mecanismo exacto mediante el cuál la dopamina puede participar en la toxicidad inducida por la htt mutada.

Por todo ello, nos planteamos analizar en profundidad la interacción entre los sistemas glutamatérgicos y dopaminérgicos en el contexto de la enfermedad de Huntington. Así, hipotetizamos que la htt mutada podría alterar las vías de señalización asociadas a los receptores glutamatérgicos y dopaminérgicos y, de este modo, incrementar la disfunción y/o muerte estriatal inducida por una activación glutamatérgica y dopaminérgica en la enfermedad de Huntington. Para llevar a cabo

este estudio utilizamos el modelo celular *knock-in* que, tal y como se ha descrito en la introducción, expresa de forma endógena la secuencia completa de la htt salvaje (7/7Q, células control) o la htt mutada (111/111Q, células mutadas), siendo una muy buena herramienta para el estudio *in vitro* de los efectos deletéreos asociados a la expresión de la htt mutada.

En primer lugar se evaluó si la activación dopaminérgica inducía muerte estriatal, para lo que se analizó la supervivencia de las células *knock-in* tras el tratamiento con concentraciones crecientes de los agonistas dopaminérgicos del receptor D₁, SKF38393, o del receptor D₂, quinpirol. Los resultados obtenidos nos permitieron concluir que la dopamina ejerce un efecto neurotóxico en neuronas estriatales por activación del receptor D₁ y no del receptor D₂, y que la presencia de la htt mutada potencia este efecto. Dado este resultado, se analizó si la activación dopaminérgica y glutamatérgica produce un efecto sinérgico en la neurotoxicidad estriatal, para lo que se evaluó la supervivencia de las células tras ser sometidas a una activación glutamatérgica con NMDA y dopaminérgica con el agonista del receptor D₁. Los resultados obtenidos muestran como la activación del receptor de NMDA incrementa la muerte celular inducida por dopamina vía el receptor D₁ únicamente en las células estriatales que expresan htt mutada pero no en aquellas que expresan htt salvaje.

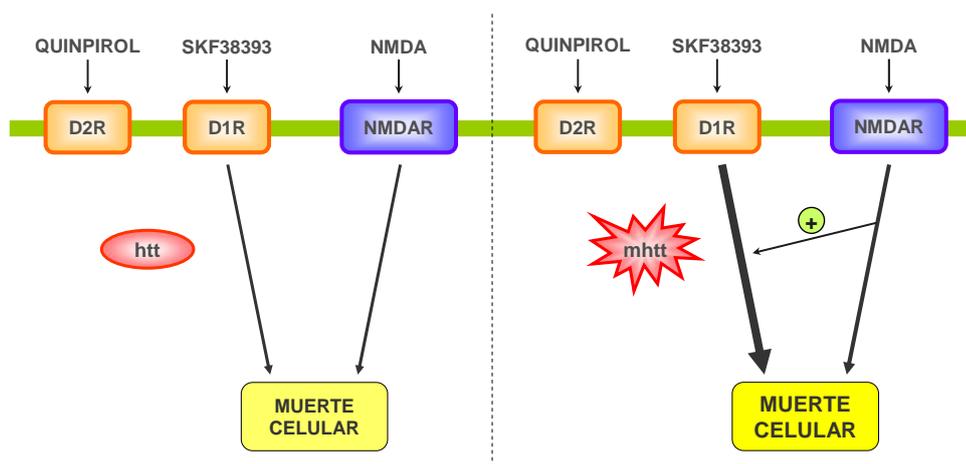


Figura 11. Efecto de la estimulación glutamatérgica y dopaminérgica en la viabilidad de las células estriatales *knock-in*. La estimulación dopaminérgica mediante los agonistas del receptor D₁ (SKF38393) o del receptor D₂ (quinpirol) ejerce un efecto neurotóxico en las células estriatales por activación del receptor D₁ de dopamina (D1R) pero no del receptor D₂ (D2R). Este efecto se ve potenciado en presencia de la htt mutada (mhtt). La estimulación glutamatérgica mediante NMDA potencia la muerte celular inducida por la estimulación dopaminérgica vía el receptor D₁ únicamente en las células que expresan la htt mutada.

Estos resultados ponen de manifiesto que, en presencia de la htt mutada, la activación dopaminérgica puede ejercer un efecto neurotóxico en las células estriatales. Concretamente, este estudio nos ha permitido determinar que el efecto neurotóxico de la dopamina en el modelo celular *knock-in* está asociado con la activación del receptor D₁ de dopamina. La implicación del receptor D₁ de dopamina en la muerte neuronal estriatal ya había quedado patente en trabajos anteriores en los que el uso del antagonista del receptor D₁ resultaba ser protector frente a la citotoxicidad inducida por el agonista D₁ en modelos celulares estriatales (Chen y col., 2003, 2004). Por otro lado, también se había demostrado que la dopamina vía activación del receptor D₁ potenciaba la muerte estriatal inducida por glutamato (Tang y col., 2007). Sin embargo, diversos trabajos *in vitro* llevados a cabo en modelos celulares estriatales exón-1, centrados en determinar el posible efecto neurotóxico de la dopamina por interacción con sus receptores, han descrito que la dopamina vía activación del receptor D₂ es capaz de potenciar la formación de agregados de htt mutada así como de agravar el daño mitocondrial (Charvin y col., 2005; Benchoua y col., 2008; Deyts y col., 2009).

En global, nuestros resultados, junto con estos trabajos, avalan la hipótesis de que la señalización dopaminérgica, por activación de sus receptores, juega un papel importante en la mayor vulnerabilidad de las neuronas estriatales frente a la expresión de la htt mutada. A pesar de que nuestros resultados demuestran una clara implicación del sistema dopaminérgico por activación del receptor D₁ en la muerte estriatal en el contexto de la enfermedad de Huntington, teniendo en cuenta los diferentes trabajos publicados sobre el tema, no podemos descartar la participación del receptor D₂ en la patología de la enfermedad de Huntington. Así, podría ser que en etapas iniciales del desarrollo de la enfermedad, cuando todavía no existe un procesamiento de la proteína htt mutada y, por lo tanto, no hay formación de agregados, el efecto neurotóxico de la dopamina sea principalmente por acción del receptor D₁, coincidiendo de esta manera con nuestros resultados obtenidos en el modelo celular *knock-in*, en el que no se observa ni procesamiento de la htt mutada ni formación de agregados. En cambio, en etapas avanzadas de la enfermedad, una anómala señalización tanto de los receptores D₁ como D₂ de dopamina podría contribuir a la patología de la enfermedad de Huntington.

Por otro lado, nuestro trabajo nos ha permitido demostrar que existe un efecto sinérgico entre la actividad neurotóxica de la dopamina y los mecanismos de excitotoxicidad glutamatérgicos en la enfermedad de Huntington, pues únicamente en

las células que expresan la htt mutada hemos observado que la activación del receptor de NMDA potencia la muerte celular inducida por la activación del receptor D₁ de dopamina. Múltiples trabajos han descrito con anterioridad que la activación del receptor de NMDA es capaz de alterar la señalización dopaminérgica, favoreciendo la incorporación en la membrana plasmática y posterior activación del receptor D₁ en detrimento del receptor D₂, a través de una interacción directa entre los receptores de NMDA y D₁ de dopamina (Lee y col., 2002; Scott y col., 2002, 2006; Fiorentini y col., 2003; Pei y col., 2004). La teoría sobre la existencia de un vínculo dopamina-glutamato se ha visto reforzada por estudios en los que la toxicidad dopaminérgica se veía potenciada por la adición de glutamato en neuronas corticales (Hoyt y col., 1997). Un estudio más reciente ha demostrado que las vías de señalización glutamatérgicas y dopaminérgicas actúan de manera sinérgica, incrementando los niveles de calcio intracelular, causando la degeneración de las neuronas estriatales en el modelo de Huntington YAC128 (Tang y col., 2007). Coincidiendo con nuestros resultados, Tang y col. han descrito que los efectos potenciadores de la dopamina sobre la activación glutamatérgica mediaban vía la activación del receptor D₁ pero no el receptor D₂ de dopamina. A diferencia de nuestros resultados, en los que observamos que la activación dopaminérgica por sí sola ya ejerce un efecto neurotóxico en las células, en el trabajo de Tang y col. describen que el tratamiento únicamente con dopamina no induce muerte celular y que el efecto neurotóxico sinérgico entre glutamato y dopamina requiere la activación tanto de receptores ionotrópicos como metabotrópicos de glutamato. La diferencia entre nuestros resultados y los de Tang y col. puede ser debida a la utilización de diferentes modelos de la enfermedad de Huntington y por el diferente protocolo metodológico que se ha aplicado para evaluar el efecto combinado glutamatérgico y dopaminérgico.

Teniendo todos estos datos en cuenta, podemos afirmar que la mayor vulnerabilidad de las neuronas estriatales a la presencia de la htt mutada se puede explicar, en parte, por el contexto o ambiente celular en el que se encuentran. De esta manera, la potente inervación dopaminérgica que reciben las neuronas estriatales de proyección, a pesar de ser tolerada en condiciones fisiológicas, resulta potencialmente tóxica en neuronas ya comprometidas debido a la propia presencia de la htt mutada o el estrés excitotóxico potenciado por ésta.

1.2.- ABERRANTE ACTIVACIÓN DE LA QUINASA CDK5 EN RESPUESTA A UNA ESTIMULACIÓN GLUTAMATÉRGICA Y DOPAMINÉRGICA EN LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

Dados los resultados descritos anteriormente en los que observamos que en presencia de la *htt* mutada las células estriatales son más vulnerables frente a la estimulación glutamatérgica y dopaminérgica, nos planteamos a continuación analizar los mecanismos de señalización intracelular que podían estar mediando este proceso.

Trabajos anteriores han descrito un incremento en la actividad de la quinasa Cdk5 en diferentes modelos experimentales de neurodegeneración (Patrick y col., 1999; Lee y col., 2000). Hasta el momento se ha involucrado la participación de Cdk5 en la enfermedad de Alzheimer (Maccioni y col., 2001; Lee y Tsai, 2003), esclerosis lateral amiotrófica (Krieger y col., 2003; Nguyen y Julien, 2003), enfermedad de Parkinson (Neystat y col., 2001; Hamdane y col., 2003) y daño neuronal agudo (Shelton y Johnson, 2004). Así, estudios recientes han identificado la participación de la quinasa Cdk5 en la pérdida neuronal dopaminérgica en modelos murinos de Parkinson, en los que la inhibición de la quinasa tiene un efecto protector al disminuir tanto la neurodegeneración como las alteraciones motoras (Smith y col., 2003, 2006; Przedborski, 2007). Por otro lado, varios trabajos habían descrito que Cdk5 es capaz de potenciar la señalización de los receptores de NMDA, directamente por fosforilación de las subunidades NR1 y NR2A (Li y col., 2001; Wang y col., 2003), o indirectamente mediante la fosforilación de la proteína PSD-95 (Morabito y col., 2004). Teniendo esto en cuenta, nos planteamos analizar si la activación de la quinasa Cdk5 podía estar involucrada en la mayor vulnerabilidad de las neuronas estriatales frente a una activación de los receptores de NMDA y D₁ de dopamina en el contexto de la enfermedad de Huntington.

En primer lugar, se evaluó el estado de activación de la quinasa Cdk5 en el modelo celular *knock-in*, para lo que analizamos dos características importantes que determinan su grado de actividad y funcionalidad: los niveles de fosforilación en el residuo Tyr15 y la acumulación de la proteína co-activadoras p25 respecto a p35. Tal y como se ha detallado en la introducción, la fosforilación de Cdk5 en el residuo Tyr15 parece ser necesaria para la correcta activación de la quinasa y tiene un efecto estimulador (Zukerberg y col., 2000; Lin y col., 2007). Asimismo, la proteína p25, fragmento proteolítico obtenido a partir de p35 por acción de la proteasa dependiente de calcio calpaína (Lee y col., 2000; Nath y col., 2000; Patzke y Tsai, 2002), mantiene

a la quinasa Cdk5 en un estado de hiperactivación y modifica su distribución celular, permitiéndole acceder a nuevos sustratos, fenómenos que se han asociado con neurotoxicidad (Patrick y col., 1998, 1999; Lee y col., 2000; Dhavan y Tsai, 2001; Patzke y Tsai, 2002). Mediante técnicas de *Western blot* demostramos que la presencia de htt mutada modifica la vía de Cdk5 a través de dos mecanismos, (1) disminuyendo los niveles de expresión de Cdk5 total e incrementando la forma fosforilada de ésta y (2) potenciando la conversión de p35 a p25 y su posterior acumulación, lo que se traduce en una mayor activación de Cdk5. Además, hemos observado que, en el modelo celular *knock-in*, la disminución de los niveles totales de Cdk5 y el incremento en su forma fosforilada son dependientes de la longitud de poliglutaminas. Esto demuestra que las alteraciones que observamos en la vía de Cdk5 son consecuencia directa de la expresión de la htt mutada y no un efecto secundario asociado a la toxicidad inducida por la htt mutada en las células estriatales. Asimismo, estos resultados nos permiten concluir que la htt mutada es capaz de ejercer un nuevo rol sobre la vía de Cdk5, modificando los niveles de expresión y su actividad.

En base a estos datos, nos planteamos determinar si la aberrante activación de la quinasa Cdk5 podía participar en la mayor vulnerabilidad de las células estriatales frente a la activación de los sistemas glutamatérgicos y dopaminérgicos. Los resultados obtenidos muestran que la activación glutamatérgica mediante NMDA induce un incremento en la fosforilación de Cdk5 similar entre las células que expresan la htt salvaje o la htt mutada, por lo que la activación *per se* de Cdk5 no puede explicar la diferente vulnerabilidad de las células *knock-in* a la activación glutamatérgica. En relación con esto, estudios previos llevados a cabo en el mismo modelo celular han demostrado que la proteína calcineurina juega un papel relevante en la mayor vulnerabilidad de las células que expresan htt mutada a la estimulación con NMDA (Xifró y col., 2008). Por otro lado, la activación dopaminérgica a través del receptor D₁ mediante SKF38393 también incrementa la fosforilación de Cdk5. Sin embargo, en este caso observamos que, en presencia de la htt mutada, dicho incremento se produce antes y es mayor y más sostenido en el tiempo en comparación con el observado en las células que expresan la htt salvaje. Estos resultados coinciden con la mayor vulnerabilidad de las células estriatales en presencia de la htt mutada a la estimulación del receptor D₁ descrita anteriormente. Finalmente, la activación glutamatérgica mediante NMDA y dopaminérgica por SKF38393 produce en las células estriatales que expresan la htt salvaje un incremento en la fosforilación de Cdk5 similar al inducido por la estimulación únicamente con SKF38393. En cambio, en

presencia de la htt mutada, el tratamiento combinado conlleva un incremento en la fosforilación de Cdk5 mayor en comparación con el observado en las células que expresan la htt salvaje, manteniéndose elevada hasta 60 minutos después del tratamiento. En cuanto a las proteínas activadoras p35 y p25, a pesar de que los diferentes tratamientos no modifican sus niveles, se mantienen constantes las diferencias de expresión entre ambas proteínas observadas a nivel basal, siendo mayor la proporción de p25 respecto a p35 en presencia de la htt mutada. Estos resultados nos han permitido concluir que el efecto neurotóxico asociado a la activación glutamatérgica y dopaminérgica en presencia de la htt mutada está mediado, en parte, por una hiperactivación de la quinasa Cdk5, que se manifiesta como un incremento en su fosforilación junto con una mayor presencia de la proteína activadora p25. Para corroborar la relevancia de estos resultados *in vivo*, se analizó el estado de activación de la vía de Cdk5 tanto en muestras de ratones *knock-in* como en muestras de pacientes afectados por la enfermedad, obteniendo los mismos resultados. Estos datos nos han permitido situar el complejo Cdk5/p25 como un importante mediador de la neurotoxicidad estriatal glutamatérgica y dopaminérgica en modelos de la enfermedad de Huntington.

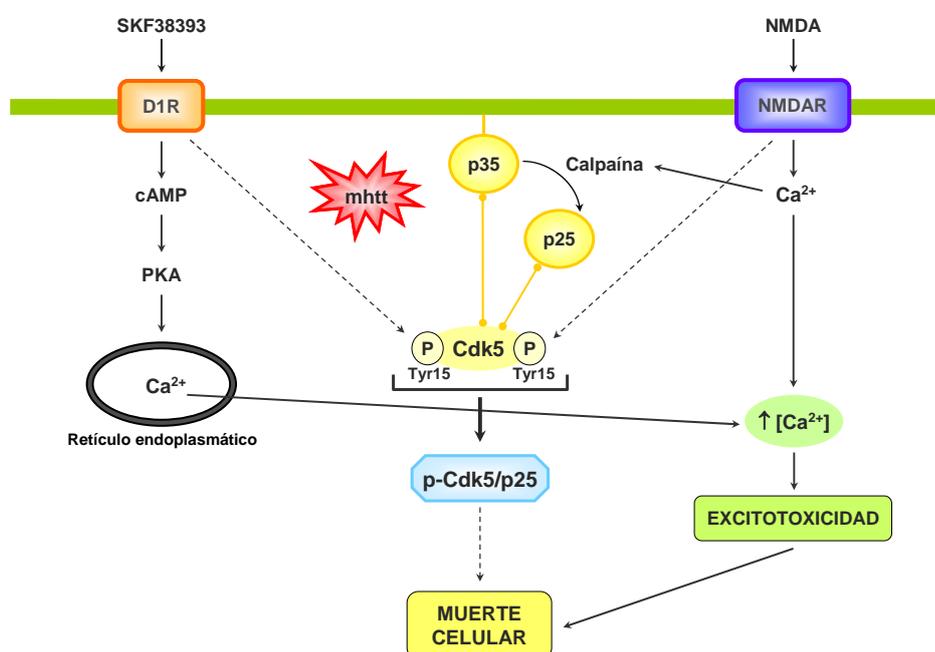


Figura 12. La mayor sensibilidad de las células estriales a una activación glutamatérgica y dopaminérgica en presencia de la htt mutada implica la participación de la quinasa Cdk5. Modelo hipotético para ilustrar la relación entre la neurotoxicidad inducida por la activación glutamatérgica y dopaminérgica, y la vía de Cdk5 en la enfermedad de Huntington. En presencia de la htt mutada (mhtt) existe una mayor activación de los receptores de NMDA (NMDAR) y D₁ de dopamina (D1R), desregulando la homeostasis del calcio. Los niveles incrementados de calcio intracelular, a su vez, potencian la actividad de la proteasa calpaína, favoreciendo el procesamiento de p35 a p25. Asimismo, la activación de los NMDAR y D1R incrementa la fosforilación de Cdk5 en el residuo Tyr15. La formación de los complejos p-Cdk5/p25 conlleva una hiperactivación de la quinasa, contribuyendo a la muerte celular estriatal en el contexto de la enfermedad de Huntington.

Reforzando nuestros resultados, otra línea de investigación, centrada en definir los mecanismos moleculares que llevan a la pérdida neuronal en modelos de Huntington inducidos con 3-NP, ha vinculado la quinasa Cdk5 en este proceso neurodegenerativo (Crespo-Biel y col., 2007, 2009). Así, los trabajos de Crespo-Biel y col. demuestran que la administración de 3-NP induce la acumulación de p25, lo que se traduce en una mayor activación de Cdk5 que, a su vez, disminuye el efecto neuroprotector del factor de transcripción MEF-2 (Mao y col., 1999; Gong y col., 2003), vinculando la actividad de la quinasa con la pérdida neuronal observada en su modelo de Huntington. En contraposición a nuestros resultados y los de Crespo-Biel y col., los trabajos de Luo y col. y Anne y col. han postulado que existe una disminución en la actividad de la quinasa Cdk5 en la patología de Huntington (Luo y col., 2005; Anne y col., 2007). Sus trabajos se centran en el papel protector que ejerce el complejo Cdk5/p35 ante la presencia de la htt mutada, ya que este complejo es capaz de fosforilar y disminuir el procesamiento y posterior agregación de la htt mutada. Así, a pesar de que observan una reducción en los niveles de Cdk5 total y p35, datos que coinciden con nuestros resultados, concluyen que la menor presencia de complejos Cdk5/p35 se traduce en una pérdida de su efecto protector. Sin embargo, no plantean ninguna referencia al estado de la proteína p25 en su modelo. Dada la clara implicación de la proteína co-activadora p25 en la inducción de procesos de muerte neuronal (Dhavan y Tsai, 2001; Cruz y Tsai, 2004), y teniendo en cuenta nuestros resultados, es posible que la acumulación de p25 explique el aparente efecto dual que es capaz de ejercer la quinasa Cdk5 en el contexto de la enfermedad de Huntington. De esta manera, mientras que el complejo Cdk5/p35 ejercería una función protectora ante la toxicidad inducida por la presencia de la htt mutada, el complejo Cdk5/p25 potenciaría este efecto neurotóxico. Es por esto que sería interesante analizar los niveles de htt fosforilada en nuestro sistema.

En resumen, nuestro estudio nos ha permitido definir la quinasa Cdk5 como una potencial diana terapéutica en el contexto de la enfermedad de Huntington. No obstante, esta quinasa participa en múltiples procesos fisiológicos y resulta esencial para el correcto desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso (Dhariwala y col., 2008; Lalioti y col., 2010), por lo que una inhibición general podría tener efectos nocivos. Por lo tanto, dado este papel dual de la quinasa Cdk5, resulta crucial definir (1) los mecanismos moleculares mediante los cuáles la htt mutada desregula la actividad de Cdk5 y (2) las dianas intracelulares activadas por la aberrante activación de Cdk5, responsables de la muerte estriatal en el contexto de la enfermedad de

Huntington. El conocimiento de estos mecanismos permitirá establecer una inhibición selectiva de Cdk5 sin alterar sus funciones fisiológicas en el sistema nervioso.

1.2.1.- Mecanismos moleculares que desregulan la actividad de Cdk5

No es de extrañar que en presencia de la htt mutada las células estriatales presenten niveles incrementados de p25, pues ésta es el resultado del procesamiento proteolítico de p35 por acción de las calpaínas, caspasas activadas por calcio (Lee y col., 2000; Nath y col., 2000; Patzke y Tsai, 2002), y está ampliamente descrito que, en presencia de la htt mutada, la señalización intracelular vía calcio se encuentra alterada en diferentes modelos de la enfermedad de Huntington (Tang y col., 2003, 2005; Seong y col., 2005; Shehadeh y col., 2006; Zhang y col., 2008). Dada esta alteración en la homeostasis del calcio y teniendo en cuenta que en presencia de la htt mutada la activación glutamatérgica y dopaminérgica conduce a una excesiva movilización de los niveles de calcio intracelular (Tang y col., 2007), sería interesante determinar si el calcio intracelular es capaz de regular algún otro mecanismo, al margen de su papel en la activación de la proteasa dependiente de calcio calpaína (Lee y col., 2000; Nath y col., 2000; Patzke y Tsai, 2002), que conlleve una mayor fosforilación de Cdk5. Por otro lado, estudios previos han demostrado la participación de la quinasa c-Abl en la fosforilación del residuo Tyr15 de Cdk5 y en la desregulación de su actividad fisiológica (Zukerberg y col., 2000; Lin y col., 2007). Así, se ha descrito la participación de c-Abl en la aberrante activación de Cdk5 en modelos murinos de la enfermedad de Alzheimer, donde se ha observado que inhibidores de c-Abl disminuyen la apoptosis y revierten déficits conductuales (Cancino y col., 2008, 2009). Del mismo modo, algún trabajo ha demostrado también la participación de Fyn, quinasa de la familia de las Src-quinasas, en la fosforilación de Cdk5 (Sasaki y col., 2002; Miyamoto y col., 2008). En conjunto, estos datos apuntan a la posibilidad de que alguna de estas quinasas, c-Abl o Fyn, esté involucrada en la desregulación de la normal actividad de Cdk5, promoviendo la fosforilación de ésta en presencia de la htt mutada en nuestro modelo neurotóxico. Del mismo modo, se podría comprobar si la mayor fosforilación y, por lo tanto, mayor actividad de Cdk5 observada es consecuencia no sólo de una mayor actividad de las quinasas encargadas de fosforilar Cdk5 sino también debido a una alteración en las fosfatasa responsables de su defosforilación. Sin embargo, se desconoce qué tirosina fosfatasa está involucrada en la defosforilación del residuo Tyr15 de Cdk5.

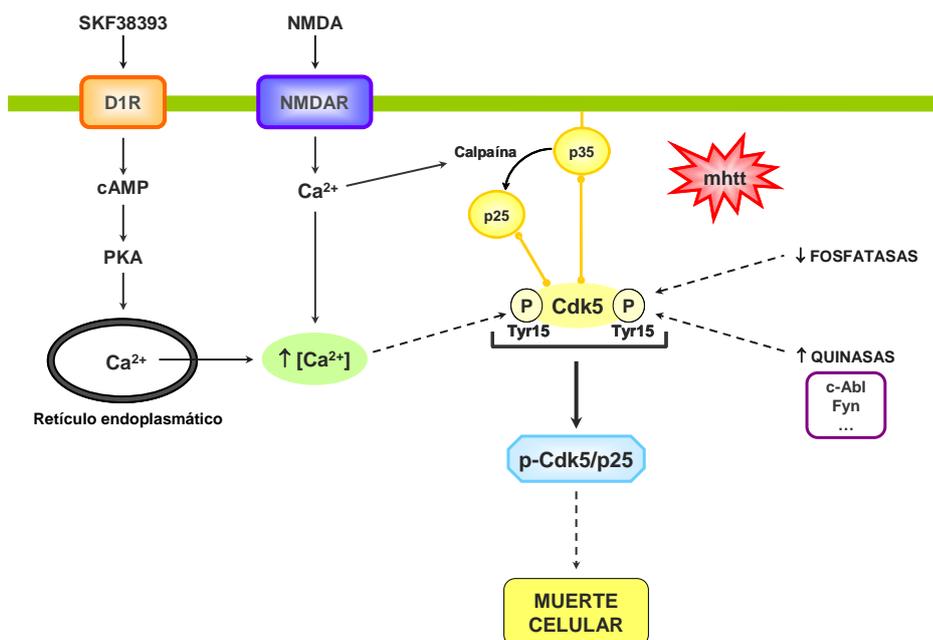


Figura 13. Mecanismos moleculares que pueden desregular la actividad de Cdk5. Modelo hipotético para ilustrar las diferentes vías intracelulares que, en presencia de la htt mutada (mhtt), pueden incrementar la actividad de Cdk5. Por un lado, los mayores niveles de calcio intracelular en presencia de la htt mutada pueden regular procesos encargados de controlar los niveles de fosforilación de Cdk5, además de modular el procesamiento de p35 a p25. Por otro lado, la mayor fosforilación de Cdk5 puede deberse a una mayor actividad de las quinasas responsables de fosforilar Cdk5 así como a una menor actividad de las fosfatasas responsables de su defosforilación.

1.2.2.- Dianas intracelulares de Cdk5 que desencadenan muerte celular

En cuanto a las cascadas intracelulares activadas por Cdk5 que conducen a la muerte neuronal, está descrito en la literatura que la quinasa Cdk5 puede desencadenar procesos de muerte celular principalmente mediante dos mecanismos diferentes. De esta manera, Cdk5 puede actuar a nivel citoplasmático, induciendo alteraciones del citoesqueleto tanto de actina como de microtúbulos (Patrick y col., 1999; Weishaupt y col., 2003; Dhariwala y col., 2008; Lalioti y col., 2010), o a nivel nuclear, donde puede interferir en la expresión de factores de supervivencia como MEF2 (Mao y col., 1999; Gong y col., 2003; Tang y col., 2005) o puede fosforilar las proteínas del retinoblastoma (Rb) o p53, activando las cascadas clásicas de muerte celular apoptótica (Lee y col., 1997; Hamdane y col., 2005; Lee y col., 2007, 2008).

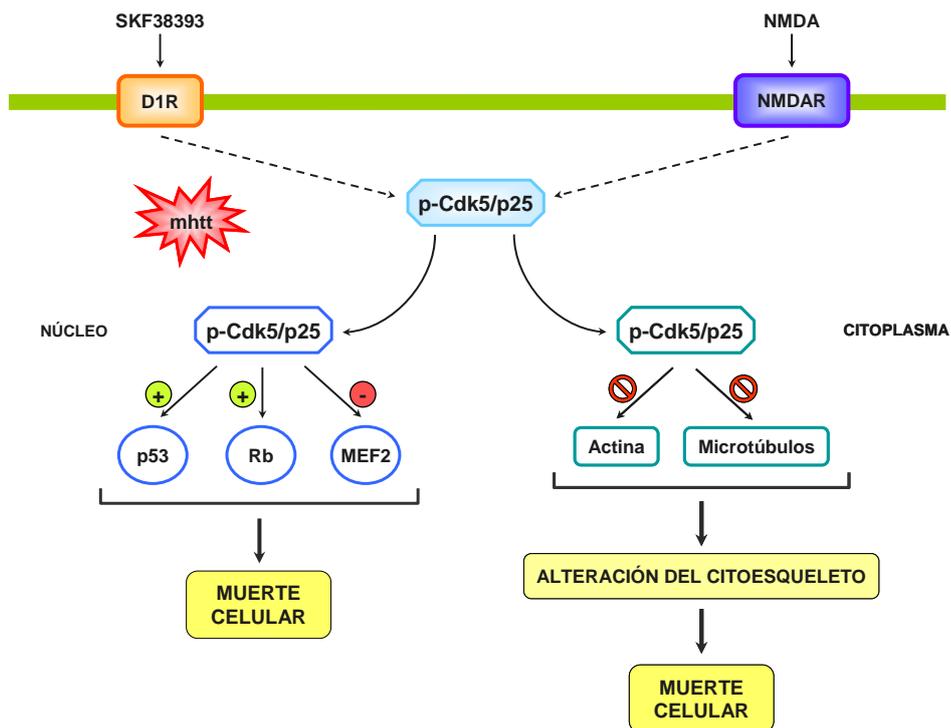


Figura 14. Dianas intracelulares de Cdk5 que pueden desencadenar procesos de muerte celular. Modelo hipotético para ilustrar los diferentes mecanismos de muerte celular desencadenados por la hiperactivación de Cdk5. A nivel nuclear, la quinasa puede actuar sobre las proteínas del retinoblastoma (Rb) o p53, activando las vías clásicas de apoptosis, o interferir en la expresión de factores de supervivencia como MEF2. A nivel citoplasmático, Cdk5 puede alterar la estabilidad y ensamblaje de la actina y los microtúbulos, desencadenando muerte celular por alteración del citoesqueleto.

De hecho, se ha descrito que la mayor actividad de Cdk5 que se observa en el modelo de Huntington inducido con 3-NP disminuye el efecto protector del factor de transcripción MEF2, vinculando la actividad de la quinasa con la pérdida neuronal detectada en ese modelo de la enfermedad de Huntington (Crespo-Biel y col., 2007; 2009). Del mismo modo, diversos trabajos han involucrado la participación de p53 en la patología de Huntington. Así, se ha descrito que dicha proteína es capaz de modificar el promotor del gen *HD* y *Hdh* tanto *in vivo* como *in vitro*, potenciando la expresión de la proteína htt (Ryan y col., 2006). Asimismo, se ha descrito que la proteína htt mutada, a su vez, es capaz de incrementar los niveles de expresión de p53, potenciando la disfunción mitocondrial y la toxicidad inducida por la htt mutada (Bae y col., 2005). Así lo corroboran trabajos que han observado niveles incrementados de p53 tanto en modelos celulares y murinos de Huntington como en muestras de pacientes afectados por la enfermedad (Trettel y col., 2000; Bae y col., 2005; Ryan y col., 2006). En base a estos datos y teniendo en cuenta nuestros resultados, sería de gran utilidad definir mediante qué mecanismos la quinasa Cdk5

lleva a la muerte neuronal tras la activación glutamatérgica y dopaminérgica con el fin de identificar la óptima diana terapéutica.

2.- DEFICIENTE ACTIVACIÓN DE VÍAS INTRACELULARES INVOLUCRADAS EN EL MANTENIMIENTO DE LA SUPERVIVENCIA NEURONAL EN LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

2.1.- ANÓMALA ACTIVACIÓN DE LA VÍA DE TRKB-ERK1/2 EN RESPUESTA A LA ESTIMULACIÓN CON BDNF EN LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

La importancia de los factores tróficos reside en el hecho de que participan en la regulación de múltiples aspectos neuronales tales como la supervivencia o el correcto mantenimiento y diferenciación celular, además de ejercer un efecto neuroprotector frente al daño neuronal (Murphy y col., 1997; Huang y Reichardt, 2001; Airaksinen y Saarma, 2002; Chao, 2003). Es por esto que los factores tróficos se han considerado como unos buenos candidatos para el posible tratamiento de diferentes enfermedades neurodegenerativas, entre ellas la enfermedad de Huntington (Alexi y col., 2000; Aebischer y Ridet, 2001; Thoenen y Sendtner, 2002; Alberch y col., 2004).

Centrándonos en el contexto de la enfermedad de Huntington, de entre los diferentes factores neurotróficos, el BDNF se ha descrito como un potente neuroprotector de las neuronas de proyección, pues varios estudios han demostrado que el BDNF protege dichas neuronas frente a estímulos excitotóxicos inducidos por la administración del agonista de NMDA, ácido quinolínico (Perez-Navarro y col., 1999, 2000, 2005; Gratacos y col., 2001). Además, diversos estudios han demostrado que la propia proteína htt participa en la regulación transcripcional de BDNF, viéndose su transcripción disminuida cuando la proteína htt está mutada (Zuccato y col., 2001, 2003). En relación con esto, diferentes trabajos han observado niveles reducidos de BDNF en el estriado y la corteza cerebral de pacientes de Huntington (Ferrer y col., 2000; Zuccato y col., 2001), así como en áreas corticales y estriatales en diferentes modelos transgénicos de la enfermedad de Huntington (Zuccato y col., 2001; Zhang y col., 2003; Gines y col., 2003). En conjunto, estos datos han llevado a plantear la hipótesis de que la pérdida neuronal selectiva característica de la enfermedad de Huntington podría explicarse, en parte, por déficits de BDNF. Es por esto que se ha planteado la administración de BDNF como una estrategia terapéutica para retrasar o prevenir la progresión de la enfermedad (Alberch y col., 2004).

Para que la administración de BDNF sea efectiva y desarrolle un efecto neuroprotector en las neuronas estriatales, es imprescindible que éstas presenten una apropiada expresión y funcionalidad del receptor de BDNF, TrkB. Estudios previos de nuestro grupo de investigación han descrito que los niveles estriatales de receptor TrkB se encuentran disminuidos en diferentes modelos murinos de la enfermedad así como en muestras de pacientes afectados por la enfermedad de Huntington (Gines y col., 2006; Zuccato y col., 2008). De esta manera, podría ser que los déficits en los niveles del receptor TrkB acentuasen la falta de aporte trófico ocasionado por la insuficiencia de BDNF en las neuronas estriatales. Teniendo en cuenta estos datos nos planteamos estudiar si la alteración en los niveles de TrkB asociada a la expresión de la htt mutada se traducía en una anómala señalización intracelular en respuesta a BDNF.

Dado que la actividad de BDNF está directamente asociada a la expresión de receptores TrkB en membrana, analizamos en el modelo celular *knock-in* tanto los niveles de expresión en membrana como la fosforilación de dichos receptores tras la estimulación con BDNF. Asimismo, evaluamos el nivel de activación de las vías de señalización intracelular que median el efecto neuroprotector de BDNF a través del receptor TrkB: las vías de las MAPK-ERK1/2, PI3K/Akt y PLC- γ . Mediante técnicas de *Western blot* demostramos que, en presencia de la htt mutada, si bien existe una significativa reducción de los niveles de receptor TrkB en superficie, sus niveles de fosforilación tras la estimulación con BDNF están preservados. Sin embargo, la señalización a través de dicho receptor se encuentra selectivamente alterada en detrimento de la vía de ERK1/2 sin alterar las vías de la PI3K/Akt y PLC- γ . En conjunto, estos resultados sugieren que la menor expresión de receptores TrkB en superficie no puede explicar la deficiente activación de la vía de ERK1/2 inducida por el tratamiento con BDNF en presencia de la htt mutada, puesto que los niveles totales de TrkB activado no difieren entre las células que expresan la htt salvaje de aquellas que expresan la htt mutada.

La interacción de BDNF con su receptor TrkB conlleva que éste se active y se autofosforile, dando lugar a sitios de unión relevantes para el ensamblaje de proteínas adaptadoras. Éstas permiten el reclutamiento de las diferentes cascadas de señalización involucradas en mediar el efecto intracelular, favoreciendo así la continuidad de la señal desde la activación del receptor hasta la proteína efectora final (Kaplan y Miller, 2000). De entre las diferentes proteínas acopladoras, destacan la

proteína Shc, que permite la activación de Ras a través de Grb2 y SOS, mediando la activación de la vía de ERK1/2 (Kaplan y Miller, 1997; Ravichandran, 2001), y la familia de proteínas adaptadoras IRS que median la activación de la vía PI3K/Akt (Yamada y col., 1997; Kaplan y Miller, 2000). Teniendo esto en cuenta, analizamos si la menor activación de la vía de ERK1/2 en respuesta a BDNF en presencia de la htt mutada se debía a una alteración a nivel de las proteínas acopladoras. Los resultados obtenidos muestran como, en presencia de la htt mutada, existe una menor expresión, tanto a nivel de proteína como de mRNA, de las proteínas de andamiaje p52/p46Shc. Se desconocen los mecanismos que controlan la expresión de las diferentes isoformas Shc. Lo que si está bien caracterizado es que ambas isoformas, p52 y p46Shc, junto con una tercera, p66Shc, se obtienen por acción de diferentes promotores y *splicing* alternativo a partir de un mismo gen (Migliaccio y col., 1997). Mientras que en nuestro modelo observamos una alteración en la expresión de p52/p46Shc en presencia de la htt mutada, no detectamos variaciones en los niveles de p66Shc, que no participa en la activación de ERK1/2. De la misma manera, no observamos diferencias en los niveles de IRS-1, proteína adaptadora involucrada en mediar la activación de la vía PI3K/Akt en respuesta a BDNF (Kaplan y Miller, 2000; Reichardt, 2006). Estos resultados sugieren que la htt mutada afectaría de forma específica las isoformas p52/p46Shc.

A nivel funcional, observamos que la menor expresión de receptor TrkB así como de las proteínas p52/p46Shc se traduce en una menor activación de la proteína Ras en respuesta a la estimulación con BDNF, en presencia de la htt mutada. Sin embargo, la estimulación del receptor de EGF, capaz de fosforilar y reclutar ambas isoformas p52/p46Shc (Okada y col., 1995; Ravichandran, 2001), induce la normal activación de la proteína Ras en presencia de la htt mutada. Estos resultados nos han permitido concluir que, en el modelo celular *knock-in*, la presencia de la htt mutada altera de forma específica la señalización TrkB-ERK1/2 mediante (1) la reducción de los niveles de las proteínas acopladoras p52/p46Shc, y (2) la alteración de forma específica de su reclutamiento por parte del receptor TrkB. Pese a que no se ha descrito cuál es el mecanismo específico que lleva al reclutamiento y activación de las proteínas de andamiaje Shc hacia los receptores tirosina-quinasa, se ha postulado que la eficiencia de reclutamiento y activación de éstas podría estar modulada por el estado o accesibilidad de los residuos o dominios susceptibles de ser fosforilados por diferentes receptores (Gotoh y col., 1995, 1996, 1997; Ravichandran, 2001). Acorde con nuestros resultados en los que observamos una alteración en la asociación de las proteínas Shc con TrkB tras la estimulación con BDNF en presencia de la htt mutada,

un trabajo anterior ha descrito que la sobre-expresión de htt mutada en células PC12 altera la interacción de la proteína acopladora Grb2 con el receptor TrkA tras la estimulación con NGF induciendo una disminución en la señalización (Song y col., 2002).

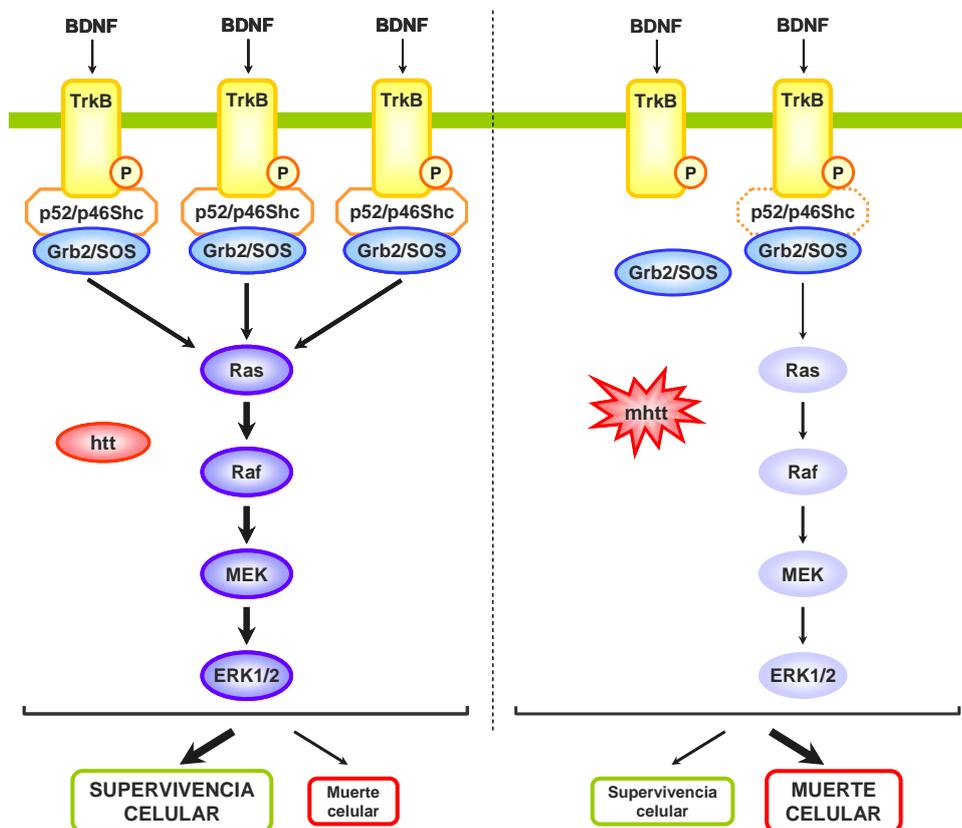


Figura 15. Alteración de la vía de señalización de TrkB-ERK1/2 en células estriales *knock-in* en presencia de la htt mutada. Modelo hipotético para ilustrar la reducida activación de la vía de ERK1/2 en respuesta a la estimulación del receptor TrkB en el contexto de la enfermedad de Huntington. En presencia de la htt mutada (mhtt) las células estriales presentan una menor expresión en membrana de los receptores TrkB. La estimulación de estos receptores con BDNF promueve la activación de la vía de ERK1/2. La presencia de la htt mutada induce una reducción en los niveles de la proteína acopladora p52/p46Shc, así como una alteración en su reclutamiento por parte del receptor TrkB, lo que se traduce en una menor activación de la proteína efectora Ras. Esto conlleva una menor activación de la vía de ERK1/2 en presencia de la htt mutada, reduciéndose el carácter pro-supervivencia de esta vía.

Múltiples trabajos han descrito que la activación de la vía de ERK1/2 resulta imprescindible para mediar un efecto neuroprotector y mantener la supervivencia celular en respuesta a estrés oxidativo (Jiang y col., 2005; Cavanaugh y col., 2006; Huang y col., 2007; Gu y col., 2009). De hecho, procesos de estrés oxidativo, debidos a una disfunción mitocondrial o por metabolización de neurotransmisores tales como la dopamina, se han asociado a la patología de la enfermedad de Huntington (Butterworth y col., 1998; Charvin y col., 2005; Browne y Beal, 2006). Además, se ha

descrito que la activación de ERK1/2 protege frente a la toxicidad inducida por la presencia de htt mutada (Wu y col., 2002; Apostol y col., 2006). Teniendo en cuenta estos datos y los resultados obtenidos hasta el momento, nos planteamos analizar si, en presencia de la htt mutada, la menor activación de la vía TrkB-ERK1/2 se traducía en una mayor susceptibilidad de dichas células a un estímulo de estrés oxidativo inducido por el tratamiento con H₂O₂. Nuestros resultados demuestran que las células que expresan htt mutada son más vulnerables a la inducción de estrés oxidativo con H₂O₂ en comparación con las células que expresan htt salvaje. En consonancia con la deficiente activación de TrkB por BDNF, el tratamiento con esta neurotrofina protege frente a la inducción de estrés oxidativo únicamente en las células que expresan htt salvaje. Con el fin de corroborar la participación de la vía de ERK1/2 en esta protección, utilizamos PMA, un activador farmacológico de la vía de las MAPK que actúa activando Ras independientemente de la vía Shc-Grb2-SOS (Rubio y col., 2006). El resultado obtenido muestra como el tratamiento con PMA induce una activación de ERK1/2 similar entre las células que expresan htt salvaje o htt mutada. Esto demuestra que la vía de activación de las MAPK por debajo de Shc-Grb2-SOS no se encuentra comprometida en presencia de la htt mutada. Además, la activación de la vía de ERK1/2 mediante PMA previene de la toxicidad inducida por H₂O₂ tanto en las células con htt salvaje como con htt mutada, lo que demuestra que la deficiente activación de ERK1/2 responde a la falta de protección de BDNF ante el estrés oxidativo inducido por H₂O₂ en la células con htt mutada. En línea con nuestros resultados, se ha demostrado que la inhibición de la actividad de ERK1/2 incrementa la susceptibilidad de las células estriatales a la toxicidad asociada a la presencia de la htt mutada (Apostol y col., 2006). Del mismo modo, otro trabajo ha descrito que el mantenimiento de la fosforilación y, por tanto, de la activación de ERK1/2, mediante el tratamiento con ortovanadato, disminuye la muerte celular en presencia de la htt mutada (Wu y col., 2002). En conjunto, podemos concluir que, en presencia de la htt mutada, la correcta activación de la vía de ERK1/2 resulta imprescindible para desencadenar mecanismos intracelulares de supervivencia celular. Así, la falta de activación de la vía TrkB-ERK1/2 contribuye, en parte, a la patología de la enfermedad de Huntington.

Dado el efecto dual que puede ejercer la activación de la vía de ERK1/2 a nivel neuronal, desempeñando tanto funciones protectoras como deletéreas para la célula (Fukunaga y Miyamoto, 1998; Grewal y col., 1999; Cheung y Slack, 2004; Subramaniam y Unsicker, 2010), resulta complejo determinar el papel que dicha quinasa desempeña en el contexto de la enfermedad de Huntington. Un ejemplo de

esto lo encontramos en el modelo transgénico R6/2, que expresa el exón 1 de la htt mutada. En este modelo se ha observado que, mientras que en el estriado se produce un aumento progresivo en los niveles de ERK1/2, en la corteza se aprecia el efecto contrario (Lievens y col., 2002). Estos resultados sugieren que la actividad que desempeña ERK1/2 puede variar en función del tipo neuronal en el que se encuentra, o bien que los diferentes tipos neuronales responden de manera diferente ante la presencia de la htt mutada. Así, podría ser que la reducción de ERK1/2 a nivel de la corteza cerebral conlleve una reducción en los niveles de BDNF, pues ERK1/2 regula la activación de múltiples factores de transcripción, como CREB, responsable entre otros de la transcripción de BDNF (Roux y Blenis, 2004; Zebisch y col., 2007). La falta de aporte trófico en el estriado puede desencadenar un mecanismo compensatorio que lleve al incremento de los niveles de ERK1/2 con el objetivo de potenciar los mecanismos de supervivencia celular. Por otro lado, un estudio llevado a cabo en un modelo de Huntington de *Drosophila* ha descrito que la presencia de la htt mutada disminuye la señalización a través de ERK1/2, dato que asocian con la mayor formación de agregados y la reducción en la esperanza de vida (Lievens y col., 2005).

En resumen, podemos afirmar que para llevar a cabo una estrategia terapéutica para el tratamiento de la enfermedad de Huntington centrada en la administración de BDNF se debe tener en cuenta el estado de la vía de señalización intracelular TrkB-ERK1/2 para que ésta resulte de máxima eficacia. Por lo tanto, sería óptimo diseñar una terapia farmacológica en la que, además de BDNF, se actuara directamente sobre la vía intracelular Ras-Raf-MEK-ERK1/2, pues en el contexto de la enfermedad de Huntington el carácter pro-supervivencia de la quinasa ERK1/2 parece desempeñar un papel relevante para el mantenimiento de la supervivencia neuronal.