

Departamento de Bioquímica  
Universidad Autónoma de Madrid



PROTECCIÓN Y MECANISMOS DE  
MUERTE EN LA ENFERMEDAD DE  
HUNTINGTON:  
INDUCCIÓN DE AUTOFAGIA COMO  
HERRAMIENTA TERAPÉUTICA

María Ángeles Fernández Estévez

Madrid, 2015



Departamento de Bioquímica  
Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de Madrid

PROTECCIÓN Y MECANISMOS DE  
MUERTE EN LA ENFERMEDAD DE  
HUNTINGTON:  
INDUCCIÓN DE AUTOFAGIA COMO  
HERRAMIENTA TERAPÉUTICA

Memoria de Tesis para optar al grafo de Doctor presentada por la  
licenciada en Bioquímica:

**María Ángeles Fernández Estévez**

Director de Tesis:

**Dra. M<sup>a</sup> Ángeles Mena Gómez**  
Servicio de Neurobiología-Investigación  
Hospital Universitario Ramón y Cajal





## *Agradecimientos*

En primer lugar, querría mostrar mi enorme agradecimiento a la doctora M<sup>a</sup> Angeles Mena, no solo por haberme dado la oportunidad de realizar esta Tesis Doctoral bajo su tutela, sino también por su apoyo y su interés en mi futuro, brindándome la oportunidad, junto con el doctor Justo García de Yébenes, de realizar una estancia predoctoral, más larga de lo habitual, en un centro extranjero. Junto con ella, en el laboratorio, han estado siempre mis compañeros, de los cuales he aprendido mucho. Maria José Casarejos, Juan Perucho, Ana Gómez, Mari Paz Muñoz, gracias por vuestra ayuda y por todos los buenos momentos en el laboratorio. Gracias también a toda la “familia” del departamento de investigación, de todos me llevo algo aprendido y mucho cariño. Mil gracias a Javier Fernández Ruiz por haberme acogido en esos momentos de incertidumbre, siempre dispuesto a ayudar con gran amabilidad y cariño.

No puedo olvidar mencionar a dos personas que aparte de haber sido mis compañeras en la ciencia en el Hospital Ramón y Cajal, han sido mis compañeras en la vida. Carolina Ruiz y Silvia Sacristán, nunca podré agradecerlos como se merece el apoyo que me habéis brindado durante estos años de tesis y que me seguís brindando hoy en día, gracias por vuestra amistad. Silvia, personas con la calidad humana que tú tienes no existen, espero poder seguir disfrutando de buenos momentos contigo y seguir aprendiendo de ti.

Como en casi todo lo importante en la vida, la familia siempre ha estado apoyándome y dándome su cariño. Desafortunadamente mi padre no ha podido estar conmigo físicamente en esta etapa, aunque si ha estado en mi corazón. Mi madre María Rosa y mis 5 hermanos, han estado pendientes de mis progresos y, aunque no pudiesen entender mucho de que trataba, se alegraron infinitamente con mi primera publicación. Gracias por todo, y gracias a sus familias, que también son la mía; cuñados/as, sobrinos/as, primos, etc., en fin, a todos vosotros.

Gracias a todos mis amigos, compañeros en ciencia y amigos de toda la vida, por aguantarme en los momentos difíciles y alegrarse conmigo en mis logros. Gracias a mis compañeros del máster por todos los buenos momentos, en especial a Irmina, con la que he compartido tanto. Gracias a mis amigos de siempre David y Adriana, sin cuyo apoyo constante no habría podido llegar muy lejos. Gracias a mis amigas de la protectora, las cuales han marcado un cambio muy importante en mi vida y con las que he podido compartir partes

de mi misma que son muy importantes. Agradecer a mis amigos de la playa el hecho de haber estado ahí siempre y gracias a todas las personas que han pasado por mi vida de una forma u otra, y que han ayudado a forjarme tal y como soy y a elegir el camino de la ciencia, el cual me fascina más a cada día que pasa.

No olvidaré nunca mi paso por otros laboratorios, que también me ha aportado tanto. Gracias a todo el laboratorio de la doctora Ana Cuenda en el CNB, al laboratorio de la doctora Carmen San Martín en el CNB y de José María Almendral en el CBM. Gracias a vosotros por haber confiado en mí y por haberme enseñado a ser mejor en diferentes ámbitos de mi vida.

Inmensamente importantes para mí han sido mis compañeros y mi director de proyecto en la estancia realizada en Cambridge, y puesto que el español no es una lengua conocida para ellos, voy a regalarles estos agradecimientos en inglés, para que sean conscientes de todo lo que me han ayudado en este viaje.

Professor David Rubinsztein, I have no words to describe the gratitude I feel. Thanks for giving me the opportunity to work in your lab, I hope to have acquired some of your exceptionality. None of my work could have been done without the supervision and help from Fiona Menzies, extremely brilliant, always helpful and amazing. Fiona, I have learned a lot from you, you will always be in my memories. I want to thank all the PhD students for all the good times and for those scientific talks so interesting, thanks Becca, Gautham, Shirley, Ting, Anne, Marcus, Mandy, Ruby, Mariana and Eszter. Thanks also to all the postdocs in the lab, always willing to help. Thanks for everything Mautizio, Maria, Ghuita, Rany, Farah, Claudia, Mariella, Carla, Tom, Floriana and Avi. Also thanks to Brigitte and Oana for such an amazing work in the lab. Oana, I will never forget your amazing ability to make the lab work. Thank you all for your support.

Thanks Henry, for “dealing” with me in all the bad moments, when the stress was too much, thanks for your support and love.

No puedo más que decir nuevamente GRACIAS a todos, gracias de todo corazón.

# *Índice*

---





# ÍNDICE

	Página
<i>RESUMEN</i> .....	1
<i>ABREVIATURAS</i> .....	5
<i>INTRODUCCIÓN</i> .....	9
1. LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON .....	9
1.1 Aspectos clínicos de la EH .....	9
1.2 Neuropatología de la enfermedad .....	10
1.3 La proteína huntingtina .....	12
1.4 Mecanismos patogénicos .....	13
1.4.1 Formación de agregados .....	14
1.4.2 Alteraciones en la transcripción de genes .....	15
1.4.3 Excitotoxicidad .....	15
1.4.4 Disfunción mitocondrial y déficit en el metabolismo energético..	15
1.4.5 Alteraciones en el tráfico vesicular .....	16
1.4.6 Proteostasis y sistema ubiquitina-proteasoma. ....	16
2. MODELOS EXPERIMENTALES PARA LA EH.....	16
2.1 Modelos animales en la EH.....	16
2.1.1 Modelos de lesión excitotóxica .....	16

2.1.2 Modelos de lesión por toxinas mitocondriales .....	17
2.1.3 Modelos de ratones transgénicos .....	17
2.1.3.1 Ratones transgénicos con fragmentos de huntingtina .....	17
2.1.3.2 Ratones transgénicos con la proteína huntingtina completa ...	18
2.1.4 Modelos de ratones knock-in .....	18
2.2 Modelos celulares en la EH .....	18
3. TRATAMIENTOS Y ESTRATEGIAS CONTRA LA EH .....	19
3.1 Tratamientos contra la excitotoxicidad .....	20
3.2 Inhibidores de la ruta de la dopamina.....	20
3.3 Inhibidores de caspasas.....	20
3.4 Estimulación de la función mitocondrial y compuestos antioxidantes..	20
3.5 Tratamientos contra la desregulación transcripcional.....	21
3.6 Estimuladores de la autofagia y eliminación de proteínas.....	22
3.7 Neurorestauración.....	22
4. TREHALOSA COMO NEUROPROTECTOR EN HUNTINGTON.....	22
4.1 Trehalosa y sus propiedades bioprotectoras.....	23
4.2 Capacidad neuroprotectora de la trehalosa.....	24
4.2.1 Autofagia.....	25
5. FENOTIAZINAS .....	25
5.1 Farmacocinética y acciones farmacológicas en el sistema nervioso central.....	26
5.2 Efectos en el sistema calcio-calmodulina.....	27

5.3 Efectos en la composición lipídica y permeabilidad de las membranas celulares.....	28
<b><i>OBJETIVOS.....</i></b>	<b>29</b>
<b><i>MÉTODOS.....</i></b>	<b>33</b>
I. ESTUDIO REALIZADO CON FIBROBLASTOS HUMANOS DE PACIENTES CON EH.....	35
Declaración ética.....	35
I.1 Cultivo de fibroblastos de piel humanos.....	35
I.2 Reactivos químicos.....	36
I.3 Estudios de viabilidad celular y proliferación .....	37
I.4 Cuantificación de radicales libres.....	37
I.5 Técnicas de inmunocitoquímica.....	38
I.6 Análisis por western blot.....	39
I.7 Detección de proteínas ubiquitinazadas.....	39
I.8 Cuantificación de la actividad proteasomal.....	40
I.9 Análisis estadístico.....	40
II ESTUDIOS PARA LA DETERMINACIÓN DEL MECANISMO DE ACTUACIÓN DE LA TREHALOSA Y EVALUACIÓN DE DIVERSAS DROGAS COMO MODULADORES DE LA AUTOFAGIA.....	41
II.1 Cultivos celulares.....	41
II.2 Reactivos químicos.....	42

II.3	Recolección celular.....	42
II.4	Ensayos de inmunoprecipitación.....	43
II.5	Construcciones de ADN.....	43
II.6	Transformación celular para producción de plásmidos.....	43
II.7	Transfección de ADN.....	44
II.8	Silenciamiento de genes mediante siRNA.....	44
II.9	Técnicas de inmunocitoquímica y cuantificación de fluorescencia.....	44
II.10	Fraccionamiento citosólico/nuclear.....	45
II.11	Medición del pH lisosomal (lysosensor yellow/blue).....	46
II.12	Western blot.....	46
II.13	Microscopía.....	48
II.14	Análisis estadístico.....	48
 <b><i>RESULTADOS</i></b> .....		<b>49</b>
1.	TREHALOSA COMO AGENTE PROTECTOR Y TERAPÉUTICO EN EH.....	51
1.1	Efectos de epoxomicina y trehalosa sobre viabilidad celular.....	51
1.2	Alteraciones en ciclo celular.....	53
1.3	Estudio de los niveles de especies reactivas de oxígeno.....	54
1.4	Efectos sobre la acumulación de proteínas y la actividad proteasomal...	54
1.5	Efectos de la epoxomicina y la trehalosa en la activación de ERK y en la expresión de chaperonas.....	57
1.6	Macroautofagia y autofagia mediada por chaperonas en la EH.....	59
2.	MECANISMO MOLECULAR DE LA TREHALOSA COMO AGENTE TERAPÉUTICO Y POTENCIADOR DE LA AUTOFAGIA.....	61

2.1 Inducción de la autofagia y eliminación de proteínas inducido por trehalosa.....	61
2.2 Estudio de las principales rutas de señalización.....	63
2.3 Actividad de ERK en células HeLa .....	66
2.4 Activación de TFEB e inducción de genes relacionados con autofagia...	66
2.5 Comprobación del modelo de actuación en otras líneas celulares.....	70
<b>3. SCREENING DE NUEVOS MODULADORES DE LA AUTOFAGIA.....</b>	<b>72</b>
3.1 Screening en células PC12 de nuevos moduladores de autofagia.....	72
3.2 Curvas dosis de las drogas seleccionadas .....	74
3.3 Estudio de la función de receptores dopaminérgicos en el efecto de las fenotiazinas .....	74
3.4 Estudio del flujo autofágico .....	77
3.5 Estudios de eliminación de proteínas. ....	79
3.6 Análisis de la disposición de las vesículas intracelulares y afectación lisosomal.....	81
 <b><i>DISCUSIÓN</i></b> .....	 <b>85</b>
 <b><i>CONCLUSIONES</i></b> .....	 <b>101</b>
 <b><i>BIBLIOGRAFÍA</i></b> .....	 <b>105</b>

Artículos publicados durante el desarrollo de la tesis doctoral que forman parte de la misma.....	<b>125</b>
Artículos publicados durante el desarrollo de la tesis doctoral que no forman parte de la misma.....	<b>126</b>
Comunicaciones a congresos relacionadas con la tesis.....	<b>127</b>

# ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Conjunto de alteraciones en el circuito corticoestriatal en la patología de la EH.....	<b>11</b>
<b>Figura 2.</b> Diagrama esquemático de la secuencia de aminoácidos de la proteína huntingtina.....	<b>12</b>
<b>Figura 3.</b> Modelo de patogénesis intracelular para EH.....	<b>14</b>
<b>Figura 4.</b> Estructura de la trehalosa.....	<b>23</b>
<b>Figura 5.</b> Estructura de los antipsicóticos derivados de la fenotiazina.....	<b>26</b>
<b>Tabla 1.</b> Enzimas activadas por calcio-calmodulina inhibidas por fenotiazinas..	<b>27</b>
<b>Figura 6.</b> Efectos diferenciales de la epoxomicina y la trehalosa en la viabilidad celular de fibroblastos humanos control y con EH.....	<b>52</b>
<b>Figura 7.</b> Efectos de la epoxomicina y trehalosa en el ciclo celular de fibroblastos de piel humanos.....	<b>53</b>
<b>Figura 8.</b> La epoxomicina incrementa los niveles de ROS, los cuales son reducidos por trehalosa en fibroblastos controles y EH.....	<b>55</b>
<b>Figura 9.</b> La trehalosa protege de la acumulación de huntingtina y proteínas poli-ubiquitinadas inducida por epoxomicina e incrementa la actividad UPS.....	<b>56</b>
<b>Figura 10.</b> Efectos de la epoxomicina y la trehalosa en la activación de ERK1/2 y en la expresión de la chaperona HSP70 en fibroblastos control y EH.....	<b>58</b>
<b>Figura 11.</b> Ruta de macroautofagia y autofagia mediada por chaperonas en fibroblastos de piel humanos control y EH.....	<b>60</b>
<b>Figura 12.</b> Efecto de la trehalosa en la inducción de autofagia y eliminación de proteínas.....	<b>62</b>
<b>Figura 13.</b> Paralelismos entre la señalización metabólica e inmune en la activación de la autofagia.....	<b>63</b>
<b>Figura 14.</b> Estudio del papel de ULK1 y TRAF6 en la activación de la autofagia por la trehalosa.....	<b>65</b>



<b>Figura 15.</b> Determinación de la actividad ERK a lo largo del tiempo y su implicación en la inducción de la autofagia por trehalosa en células Hela.....	<b>67</b>
<b>Figura 16.</b> Translocación de TFEB al núcleo y expresión de LAMP1 producido por trehalosa en células Hela.....	<b>68</b>
<b>Figura 17.</b> Estudio de la activación de la ruta de TFEB a tiempos cortos tras el tratamiento con trehalosa en células Hela.....	<b>69</b>
<b>Figura 18.</b> Estudio de la implicación de la activación de ERK1/2 en la inducción de la autofagia mediada por trehalosa en células RAW 264.7 y SH-SY5Y.....	<b>71</b>
<b>Figura 19.</b> Screening de diversos fármacos como posibles moduladores de la autofagia utilizando la expresión de LC3-II en células PC12.....	<b>73</b>
<b>Figura 20.</b> Curva dosis respuesta con las drogas seleccionadas para la expresión de LC3-II en células PC12 y neuronas corticales de ratón.....	<b>75</b>
<b>Figura 21.</b> Estudio de la implicación de los receptores de dopamina sobre el efecto en la autofagia producido por las fenotiazinas.....	<b>76</b>
<b>Figura 22.</b> Análisis del flujo autofágico en diferentes tipos celulares tras el tratamiento con fenotiazinas.....	<b>78</b>
<b>Figura 23.</b> Eliminación de huntingtina y p62 tras el tratamiento con fenotiazinas en diversos tipos celulares.....	<b>80</b>
<b>Figura 24.</b> Co-localización de vesículas positivas a LC3 y vesículas positivas a LAMP1.....	<b>82</b>
<b>Figura 25.</b> Estudio de afectación lisosomal en células Hela tras el tratamiento con las fenotiazinas.....	<b>84</b>
<b>Figura 26.</b> Agentes lisosomotrópicos se acumulan en los lisosomas debido a la captura de iones.....	<b>97</b>
<b>Figura 27.</b> Rutas letales activadas después de la permeabilización de la membrana lisosomal.....	<b>98</b>

# *Resumen*

---



## ***RESUMEN***

La enfermedad de Huntington (EH) es una enfermedad neurodegenerativa hereditaria, autosómica dominante, que se produce por la expansión anómala del triplete CAG, que codifica para glutamina, en la región N-terminal de la proteína huntingtina. Esta enfermedad se caracteriza por presentar síntomas motores, cognitivos y conductuales. La proteína huntingtina mutada se acumula y tiende a formar inclusiones citoplasmáticas y nucleares, altera la transcripción de genes, disminuye la actividad mitocondrial y produce activación de moléculas proapoptóticas. También se produce un aumento en excitotoxicidad, alteración de la función proteasomal, producción de daño oxidativo y alteraciones metabólicas, producido por la acumulación de la huntingtina mutada en el interior celular. Debido a esto decidimos utilizar la estimulación de una de las rutas de eliminación celular de proteínas, la autofagia, como mecanismo terapéutico contra EH.

Hemos estudiado en cultivos primarios de fibroblastos de piel humanos, de pacientes sanos y con EH, el efecto de la trehalosa, un inductor de la autofagia, en condiciones basales y tras la inhibición proteasomal con epoxomicina. El estudio revela una disminución de la activación de caspasas, producción de especies reactivas de oxígeno y acumulación de proteínas en fibroblastos EH al tratar con trehalosa, incluso tras la inhibición del proteasoma con epoxomicina. La trehalosa, que incrementa los niveles de LC3 y LAMP2A (marcadores de autofagia), promueve la actividad proteasomal tanto en fibroblastos control como EH, lo que sugiere un importante potencial como herramienta terapéutica en EH. Debido a esto, hemos profundizado en el estudio de los mecanismos moleculares de la trehalosa en la inducción de autofagia, determinando la implicación de ERK y TFEB en células Hela, aunque dicha vía de señalización no está clara en otros tipos celulares. Dada la importancia de la inducción de la autofagia en el tratamiento de EH, decidimos realizar un screening farmacológico para determinar nuevos moduladores de la autofagia que pudiesen ser utilizados como tratamiento contra EH. El screening reveló al grupo de las fenotiazinas como principal candidato que, tras diversos estudios, mostró un fenotipo bloqueador de la autofagia, produciendo una fusión autofagosoma-lisosoma disfuncional debido a cambios en el pH de los lisosomas. Este efecto en las rutas autofágicas produce la acumulación de proteínas sustrato y muestra la importancia de profundizar aún más en el estudio ya que las fenotiazinas se están utilizando actualmente como fármacos antipsicóticos.

## *SUMMARY*

Huntington's disease (HD) is a hereditary neurodegenerative disorder, autosomal dominant, caused by polyglutamine expansion in the CAG triplet in the N-terminal region in the huntingtin protein. This disease is characterized by progressive motor, cognitive and psychiatric deficits. The mutated huntingtin protein accumulates and tend to form cytoplasmic and nuclear inclusions, produces alterations in gene transcription, diminishes the mitochondrion activity and produces activation of proapoptotic molecules. The accumulation of the mutated protein also produces an increase in excitotoxicity, alterations in proteasomal function, oxidative damage and metabolic alterations. Due to this, we decided to stimulate one of the degradation pathways, autophagy, as a therapeutic tool against HD.

We have studied the trehalose effect, an autophagy inducer, in primary cultures of human skin fibroblasts from healthy and HD patients, in basal conditions and after proteasomal impairment with epoxomicine. The study reveals a decrease in the activation of caspases, in production of reactive oxygen species and protein accumulation in HD fibroblasts after treating the cells with trehalose, even after proteasomal inhibition with epoxomicine. Trehalosae which increases LC3 and LAMP2A levels (autophagy markers), promotes proteasomal activity in control and HD fibroblasts, this suggest an important potential as a therapeutic tool in HD. Due to this results, we have got deeper in the study of the molecular mechanisms of trehalose in autophagy induction, determining the implication of ERK and TFEB in Hela cells, although this signalling pathway is not clear in other cell types. The importance of autophagy induction in HD treatment take us to perform a pharmacological screening to determine new autophagy modulators which can be used as a treatment against this disease. The screening showed the phenothiazine group as the main hit and, after some studies, it showed as an autophagy blocker, producing a non-productive autophagosome-lysosome fusion due to changes in lysosomal pH. This effect in autophagic pathways produces the accumulation of cargo protein and shows the importance of getting deeper in this study because these drugs are being used nowadays as antipsychotic drugs on patients.

## *ABREVIATURAS*

EH	Enfermedad de Huntington
LC3	Microtubule-associated protein light chain 3
LAMP	Lysosome-associated membrane protein
TFEB	Transcriptor factor EB
Htt	Huntingtina
HAP	Huntingtin-associated protein
UPS	Ubiquitin proteasome system
3-NP	Ácido 3-nitropropiónico
SDH	Succinate deshidrogenasa
YAC	Yeast artificial chromosome
GDNF	Glial derived neurotrophic factor
TBZ	Tetrabenazina
VMAT2	Vesicular monoamine transporter 2
SAHA	Ácido suberanihidroxamínico
HDAC	Histone deacetylase
mTOR	Mammalian target of rapamycin
SOD1	Superoxide dismutase 1
Pgp	P glycoprotein
AMC	7-amino-4-metilcoumarina
HBSS	Hank's balanced salt solution
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
CMA	Chaperone-mediated autophagy

Baf	Bafilomicina
Rap	Rapamicina
HD	Huntington's disease
3-MA	3- metiladenina
PC12	Línea celular derivada de feocromocitoma de médula adrenal de rata
SH-SY5Y	Sub-línea celular de la línea celular de neuroblastoma SK-N-SH
RAW 264.7	Línea celular derivada de monocitos macrófagos de ratón leucémico
HeLa	Línea celular derivada de cáncer cérvico-uterino
HEK 293	Células derivadas de riñón embrionario humano
NB69	Línea celular de neuroblastoma humano

# *Introducción*

---





# *INTRODUCCIÓN*

## **1. LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON**

La EH es un trastorno neurodegenerativo autosómico dominante causado por la expansión de repeticiones de tripletes CAG, que codifican para glutaminas, en el gen de la proteína huntingtina (Andrew, Goldberg et al. 1993). Esta enfermedad tiene como característica diversos síntomas, entre los que se incluyen problemas motores como la corea, distonía, bradiquinesia, daños cognitivos y alteraciones psiquiátricas (Harper 1992).

La EH fue descrita probablemente por primera vez por Waters en 1842, pero posteriormente en el año 1872, George Huntington dio a conocer todas sus características clínicas y genéticas y recibió el crédito de la descripción princeps. Durante muchos años se la denominó como corea de Huntington, hasta la década de los ochenta-noventa, cuando se comprobó que la corea no era el único síntoma de la enfermedad, sino que había muchos otros signos no-motores, por lo que se la denominó EH (Bruyn 1968). El descubrimiento del gen de la huntingtina no llegó hasta el año 1993, el gen se localiza en el cromosoma 4p16.3 (Huntington's-disease-Collaborative-Research-Group 1993).

Esta enfermedad es predominantemente un trastorno adulto, con una edad de inicio entre los 35 y 50 años, pero el rango puede variar desde 1 a 85 años, es más, el 6% de los casos corresponde a formas juveniles de la enfermedad, con una edad de inicio anterior a los 20 años. La enfermedad se desarrolla cuando el sujeto posee más de 38 repeticiones del triplete CAG (que da lugar al aminoácido glutamina), la edad de inicio y la gravedad del fenotipo están estrechamente relacionadas con el número de repeticiones del triplete CAG en el gen de la proteína huntingtina (Vonsattel and DiFiglia 1998).

La EH es el trastorno más prevalente dentro de las enfermedades neurodegenerativas causadas por la expansión de glutaminas en la proteína asociada, su prevalencia en la población caucásica es de 10 casos sobre 100.000 pero es notablemente rara en países como Finlandia y Japón (Harper 1992).

### **1.1 Aspectos clínicos de la EH**

La EH es un trastorno neurodegenerativo progresivo caracterizado por la aparición de corea, rigidez y demencia. La corea es el desorden motor más característico y se describe como movimientos anormales breves, involuntarios y que aparecen de manera impredecible

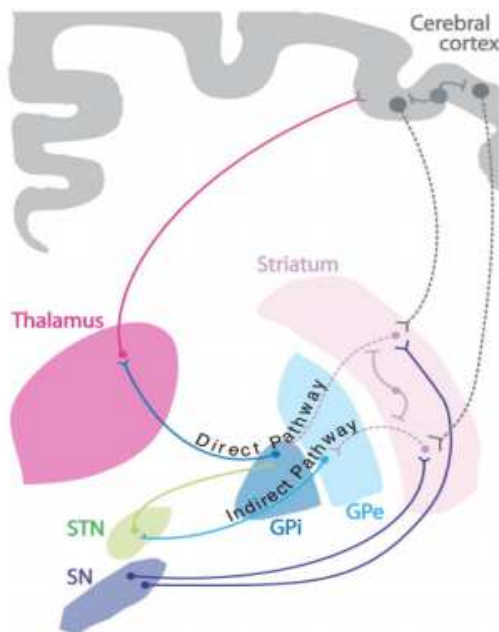
en todas las partes del cuerpo (Quinn and Schrag 1998). Durante el desarrollo de la enfermedad, los movimientos involuntarios tienden a disminuir su intensidad y son reemplazados por rigidez, hipoquinesia y aquinesia asociados a posturas distónicas, que llevan al paciente a una disminución de su actividad o bradiquinesia (Kremer, Weber et al. 1992, Roos 2010).

En la forma juvenil de la EH, denominada variante Westphal, el paciente generalmente experimenta rigidez muscular y bradiquinesia sin que aparezca previamente la corea. El número de repeticiones de glutamina en estos pacientes suele ser mayor de 55 y la enfermedad aparece antes de los 20 años de edad. Esta variante se caracteriza por la combinación de parkinsonismo con aquinesia y rigidez progresiva, distonía, ataxia, demencia y alteraciones psiquiátricas (Siesling, der Vlis et al. 1997, Gonzalez-Alegre and Afifi 2006).

Los pacientes con EH tienen tendencia a la irritabilidad, agitación, apatía, ansiedad, aislamiento social, abuso de alcohol y trastornos obsesivo-compulsivos sociopáticos, incluyendo los sexuales (Cummings and Cunningham 1992, Paulsen, Ready et al. 2001, Kirkwood, Siemers et al. 2002). La pérdida de peso es una de las características de la enfermedad en estado avanzado y no se relaciona con una pobre ingesta dietética (Morales LM 1989).

## **1.2 Neuropatología de la enfermedad**

Los hallazgos más característicos del examen macroscópico del cerebro consisten en atrofia de los ganglios basales, principalmente del núcleo caudado y el putamen (juntos son denominados como “estriado”). El estriado es el componente más voluminoso de los ganglios basales y actúa como modulador de la información de aferencias sensoriomotoras, cognitivas y emocionales para el control óptimo del comportamiento (Reiner, Albin et al. 1988, Graybiel, Aosaki et al. 1994). El estriado está interconectado con otros núcleos subcorticales involucrados en la regulación del movimiento o los impulsos en contextos particulares (Balleine, Liljeholm et al. 2009). Recibe aferencias excitatorias glutamatérgicas procedentes de la corteza y del tálamo así como aferencias dopaminérgicas procedentes de las neuronas dopaminérgicas del mesencefalo (substantia nigra pars compacta) (Bolam, Hanley et al. 2000, Miller and Bezprozvanny 2010) (Figura 1).



**Figura 1. Conjunto de las alteraciones en el circuito corticoestriatal en la patología de la EH (modificado de Han et al., J Neurochem. 2010 Jun; 113(5): 1073-91).** Un subconjunto de proyecciones neuronales en el estriado y en el córtex (representadas por líneas discontinuas) son particularmente vulnerables en EH. Éstas incluyen las neuronas espinosas de medio tamaño (MSNs, líneas discontinuas rosas) del estriado y las neuronas largas piramidales en las capas corticales V, VI y III del córtex cerebral (líneas discontinuas grises). MSNs en la ruta indirecta del ganglio basal proyectan hacia el segmento externo del glóbulo pálido (GPe) y son tempranamente afectadas en el transcurso de la enfermedad. A medida que la enfermedad progresa, MSNs proyectan hacia el segmento interno del glóbulo pálido (GPi) utilizando la ruta directa y las células piramidales corticales que proyectan hacia el estriado también se ven afectadas. STN, núcleo subtalámico; GPe, glóbulo pálido externo; GPi, glóbulo pálido interno; SN, sustancia negra.

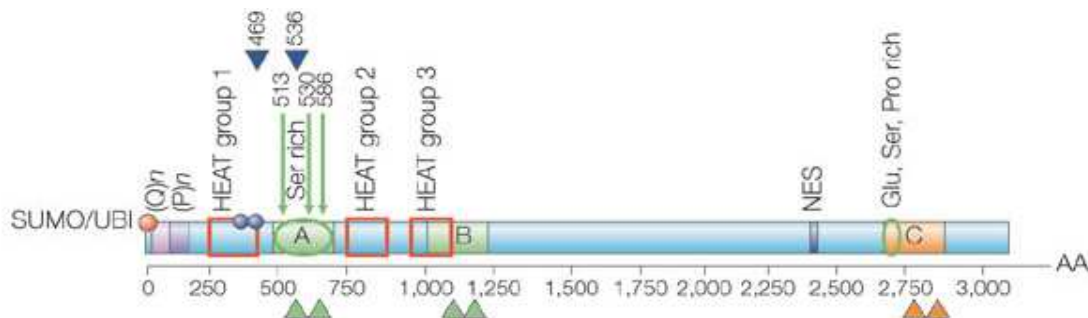
Además, existe atrofia cortical de predominio frontal y parietal y de sustancia blanda. Todo ello deriva en una significativa pérdida de peso del volumen cerebral (Vonsattel, Keller et al. 2011). Microscópicamente es característica la pérdida de neuronas espinosas GABAérgicas de mediano tamaño estriatales que proyectan hacia el pálido externo junto con gliosis secundaria. También es frecuente la presencia de inclusiones neuronales intranucleares y citoplasmáticas inmunorreactivas para ubiquitina y huntingtina (Graveland GA 1985).

Vonsattel estableció cinco grados de afectación cerebral en la enfermedad de huntinton en función del grado de atrofia, de la pérdida neuronal y de la gliosis secundaria (Vonsattel JP 1985), siendo el grado 0 el de menor intensidad y 4 el de mayor. Consistente en atrofia severa del caudado, putamen y pálido, mostrando la zona de contacto del ventrículo con la cabeza del caudado un perfil cóncavo.

### 1.3 La proteína huntingtina

La proteína huntingtina consta de 3144 aminoácidos. Contiene un dominio de poliglutaminas (poliQ) que generalmente contiene de 5 a 30 residuos de glutamina en la población sana. Los sujetos pre-mutacionales presentan un número de repeticiones de entre 31 a 35, mientras que los pacientes con la enfermedad contienen más de 35 repeticiones y en la mayoría de los casos 38 glutaminas (Li and Li 2004). Esta proteína se expresa de forma ubicua en todos los tejidos, además está asociada a diferentes orgánulos celulares como el núcleo, el retículo endoplásmico, vesículas sinápticas, el aparato de Golgi y las mitocondrias (DiFiglia, Sapp et al. 1995, Sharp, Loev et al. 1995), lo que dificulta la identificación del mecanismo patogénico primario. La secuencia de aminoácidos primaria revela poco acerca de las funciones de la proteína, ya que solo posee unos pocos motivos y dominios no estructurales con funciones definidas (Figura 2).

La proteína huntingtina tiene un rol importante en la función sináptica, es necesaria en el periodo post-embrionario, puede tener efectos antiapoptóticos e incluso un efecto protector contra la proteína huntingtina mutada (Rubinsztein 2002). En experimentos in vivo, se ha demostrado que la proteína huntingtina reduce la apoptosis después de un estímulo tóxico (Dong X 2012) y tiene un efecto neuroprotector contra la excitotoxicidad (Cisbani G 2012).



**Figura 2. Diagrama esquemático de la secuencia de aminoácidos de la proteína huntingtina (Beal, Marshall et al. 1985).** (Q)n indica la zona de poliglutaminas, seguida de una secuencia de poliprolinas, (P)n, y los cuadros rojos indican los tres grandes grupos de repeticiones HEAT. Las flechas indican los sitios de corte por caspasas y su posición en aminoácidos, y las cabezas de flecha azules muestran los sitios de corte de calpaína y su posición en aminoácidos. B identifica las regiones de corte preferencial en el córtex cerebral, C indica los cortes en estriado, y A indica regiones de corte en ambos. Las cabezas de flecha naranjas y verdes señalan la región aminoacídica aproximada de corte por proteasas. NES, es la señal de exporte nuclear. Los círculos rojos y azules indican modificaciones post-translacionales: ubiquitinación (UBI) y/o sumoilación (SUMO) (rojo), y fosforilaciones en serina 421 y 434 (azules). Las regiones ricas en ácido glutámico (Glu), serina (Ser) y prolina (pro) están indicadas (regiones dentro de círculos verdes).

Estudios recientes han dado lugar a nuevas ideas sobre el papel de esta proteína como un integrador del tráfico vesicular. Datos sobre la intervención de la huntingtina en

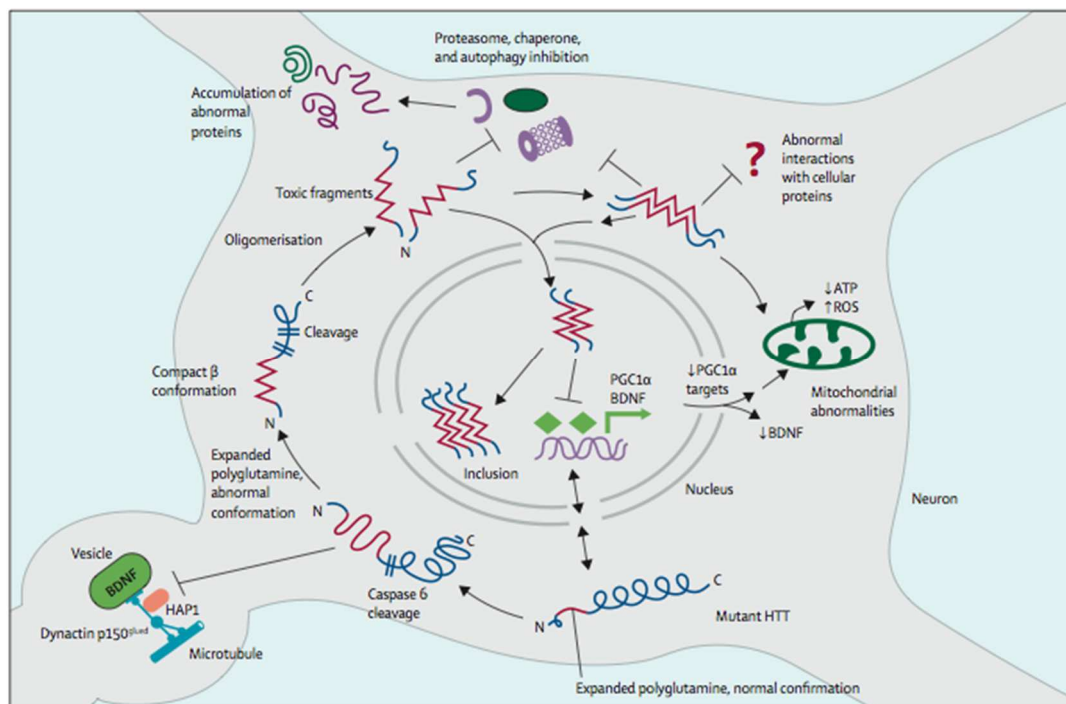
endocitosis, motilidad endosomal y transporte axonal, han dado lugar a un modelo emergente para la huntingtina como integrador del transporte a lo largo del citoesqueleto: los datos que sustentan estas posibilidades han sido revisados recientemente (Brouillet, Jacquard et al. 2005). La huntingtina mutada se acumula en células de pacientes con EH, se transloca dentro del núcleo, altera la transcripción génica, la función mitocondrial y la actividad caspasa y produce la muerte celular.

#### **1.4 Mecanismos patogénicos**

La proteína huntingtina tiene muchos sitios de interacción con otras proteínas, sobre todo en su zona N-terminal, sugiriendo que funciona como una proteína molde (scaffold) que coordina otros complejos de proteínas (Li and Li 2004). Las funciones de la proteína huntingtina siguen sin ser completamente entendidas (Young 2003, Cattaneo E 2005). La proteína es mayoritariamente citoplasmática y se asocia a la membrana mediante una palmitoilación en la cisteína 214 (Yanai 2006). La huntingtina mutada se transloca hacia el núcleo, tiene un papel en el transporte vesicular y puede alterar la transcripción de genes (Cattaneo E 2005, Sadri-Vakili G 2006). La mayoría de las evidencias sugieren que la EH conlleva predominantemente una ganancia de función tóxica de la conformación anormal de la proteína huntingtina mutada (Tobin 2000, Shao J 2007).

Las características de la patogénesis de esta enfermedad han sido consistentemente descritas. Primero, la proteína huntingtina mutada tiene propensión a formar conformaciones anormales (Li and Li 2004). Posteriormente, los sistemas para la eliminación de proteínas anormales se bloquean en células y en tejidos de pacientes con la enfermedad. La proteína huntingtina se trunca y da lugar a fragmentos N-terminales tóxicos, que junto con modificaciones postranslacionales y cortes por caspasas, influyen la toxicidad mediante cambios conformacionales, propensión a la agregación, localización celular y bloqueo de la eliminación de proteínas. La translocación nuclear de la proteína mutante incrementa los efectos tóxicos, para producir finalmente un bloqueo de las rutas metabólicas (Ross and Tabrizi 2011) (Figura 3).

No está del todo claro el porqué de una relativa selectividad estriatal en el transcurso de la enfermedad. Algunas hipótesis incluyen la susceptibilidad a la pérdida de BDNF (brain derived neurotrophic factor) producida por la desregulación transcripcional desde las proyecciones córtico-estriatales o la susceptibilidad a la excitotoxicidad proveniente de las proyecciones glutamatérgicas (Cowan and Raymond 2006, Wang, Wang et al. 2008)



**Figura 3. Modelo de patogénesis intracelular para EH.** La huntingtina mutada (mostrada como una estructura helicoidal azul) con repeticiones de glutamina (mostradas en rojo) producen un cambio conformacional que interfiere con el tráfico celular, especialmente de BDNF. La huntingtina mutada es cortada por diversos sitios generando fragmentos tóxicos con conformación  $\beta$  compacta anormal. Las especies patogénicas pueden ser monoméricas o pequeños oligómeros. Efectos tóxicos en el citoplasma incluyen la inhibición de chaperonas, proteasoma, y autofagia, los cuales pueden causar acumulación de proteínas mal plegadas y otros constituyentes celulares. Se producen interacciones directas entre la proteína mutada y la mitocondria. Otras interacciones entre la huntingtina mutada y proteínas celulares en el citoplasma siguen siendo pobremente entendidas. Inclusiones patognomónicas se encuentran en el núcleo (pequeñas inclusiones también en la región citoplasmática). Las inclusiones son las primeras especies patogénicas. La mayor acción de la proteína mutada es la interferencia con la transcripción de genes, en parte vía PGC1 $\alpha$ , produciendo una disminución de la transcripción de BDNF y proteínas mitocondriales. ROS= especies reactivas del oxígeno.

### 1.4.1 Formación de agregados

Una de las principales características de la patología de la EH es la aparición de agregados intranucleares de proteína huntingtina mutada. Los agregados también se pueden localizar en cualquier parte de la célula, incluyendo el citoplasma, dendritas y axones (DiFiglia M 2007, Vonsattel 2008). Se ha mostrado que muchas proteínas interactúan de forma anormal y son reclutadas en los agregados de huntingtina, causando importantes desregulaciones en diferentes rutas claves intracelulares (Gil JM 2008). Los agregados podrían ser protectores ya que secuestran los fragmentos tóxicos N-terminales y los oligómeros de huntingtina mutada, así como otras proteínas mal plegadas, que de forma soluble podrían causar un daño mayor y más rápido. En estados más tardíos de la enfermedad, los agregados podrían físicamente bloquear el transporte axonal, pero este hecho está todavía por esclarecer (Ross and Poirier 2005).

### **1.4.2 Alteraciones en la transcripción de genes**

Estudios en cultivos celulares y estudios bioquímicos indican que la huntingtina mutada puede interferir en la transcripción de genes (Cattaneo E 2005). Existe una desregulación en numerosos genes que codifican para receptores de neurotransmisores, enzimas y proteínas implicadas en la estructura de las neuronas, respuestas a estrés y transporte axonal (Luthi-Carter, Strand et al. 2000, Roze, Cahill et al. 2011). La desregulación transcripcional puede encontrarse en regiones genómicas de gran tamaño de manera coordinada y está asociada con la progresión de la enfermedad. Uno de los genes diana que ven disminuida su transcripción en la EH es el BDNF (Zuccato and Cattaneo 2009). La disminución del BDNF en estriado de ratones empeora con el fenotipo, mientras que la expresión elevada de BDNF en el cerebro, atenúa el fenotipo de la EH (Canals, Pineda et al. 2004, Gharami, Xie et al. 2008).

### **1.4.3 Excitotoxicidad**

La excitotoxicidad es la excesiva estimulación de receptores de aminoácidos excitadores, especialmente del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), y es un mecanismo celular no autónomo que juega un papel importante en la EH (Cowan and Raymond 2006). En la EH, existen niveles muy elevados de glutamato en el estriado y esto conlleva a una reducción de la recaptación glial de este aminoácido (Lievens, Woodman et al. 2001). La homeostasis de Ca<sup>2+</sup> está alterada en las neuronas estriatales, lo que conlleva a la muerte celular a través de numerosas rutas de señalización. La implicación prioritaria del receptor de NMDA en excitotoxicidad, es debido precisamente a su alta permeabilidad al calcio y su baja cinética de activación/inactivación (Rothman and Olney 1995).

### **1.4.4 Disfunción mitocondrial y déficit en el metabolismo energético**

La proteína huntingtina mutada podría tener efectos directos o indirectos sobre la mitocondria, comprometiendo el metabolismo energético e incrementando el daño oxidativo (Browne 2008). También se correlaciona con una mayor activación de la caspasa-3 (Wang, Lim et al. 2009), con anomalías en la cadena transportadora de electrones y con la maquinaria glucolítica, ya que se ha visto una reducción en el consumo de glucosa en pacientes con Huntington (Grafton, Mazziotta et al. 1992, Jenkins, Rosas et al. 1998). Los mecanismos por los cuales se produce este déficit energético incluyen daño en la fosforilación oxidativa, estrés oxidativo, daño en el manejo del calcio mitocondrial, anomalías en el tráfico mitocondrial, descenso de la glucólisis y un déficit en el complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial



(succinato deshidrogenasa, SDH), y complejo IV (citocromo C oxidasa) (Napolitano, Centonze et al. 2004, Rosenstock, Duarte et al. 2010).

#### **1.4.5 Alteraciones en el tráfico vesicular**

La huntingtina regula las funciones motoras del citoesqueleto, incluyendo transporte vesicular y reciclaje gracias a la interacción con HAP1, HAP40 (proteínas asociadas a huntingtina de 40 KDa) y con dineína. Los fallos en el transporte podrían explicarse debido al fallo en la interacción entre la huntingtina mutada y estas proteínas motoras o a consecuencia de los agregados neuríticos que pueden actuar bloqueando estas vías (Szebenyi, Morfini et al. 2003, Caviston JP 2009). En ratones knock-out condicionales, el tráfico vesicular y mitocondrial está afectado en ambas direcciones, y se observa una degeneración cerebral progresiva (Trushina, Dyer et al. 2004)

#### **1.4.6 Proteostasis y sistema ubiquitina proteasoma**

La presencia de huntingtina ubiquitinada sugiere un fallo en el sistema ubiquitina-proteasoma (UPS). La huntingtina se ubiquitina (Kalchman, Graham et al. 1996) pero se ha propuesto que el proteasoma podría no ser capaz de procesar los fragmentos con poliglutaminas expandidas, resultando una acumulación de fragmentos (Venkatraman, Wetzel et al. 2004). El destino de estos fragmentos no está claro, pero podrían quedarse asociados al proteasoma, inhibiendo su función (Holmberg, Staniszewski et al. 2004, Raspe, Gillis et al. 2009). La idea de que la patología inducida por la proteína huntingtina mutada incluye una deficiencia en el UPS, se sustenta por los efectos beneficiosos observados al intentar incrementar la actividad proteasomal en modelos de EH (Seo, Sonntag et al. 2007).

## **2. MODELOS EXPERIMENTALES PARA LA EH**

Tanto los modelos animales como los modelos in vitro para enfermedades neurodegenerativas han sido establecidos para entender los mecanismos e investigar nuevas estrategias terapéuticas.

### **2.1 Modelos animales en la EH**

#### **2.1.1 Modelos de lesiones excitotóxicas**

La excitotoxicidad se produce cuando hay interacción entre elevadas concentraciones de glutamato con sus respectivos receptores de membrana o cuando hay un déficit de función

del transportador o un cambio de afinidad, lo que provoca efectos nocivos en las células. El ácido kaínico, agonista glutamatérgico, es capaz de provocar lesiones en el estriado de ratón similares a las ocurridas en la EH (Beal, Marshall et al. 1985, Roberts, Ahn et al. 1993). Otro modelo, es el producido por la inyección intraestriatal de ácido quinolínico, un agonista de glutamato NMDA-selectivo, cuyo precursor endógeno es el triptófano y que induce preferentemente la degeneración de neuronas GABAérgicas (Roberts, Ahn et al. 1993).

### **2.1.2 Modelos de lesión por toxinas mitocondriales**

La inyección de varias toxinas mitocondriales como rotenona, malonato, MPP+, etc., en el estriado de ratas, produce un aumento de la formación de lactato, pérdida de ATP y una degeneración neuronal debido a mecanismos de interrupción del metabolismo energético de las mitocondrias y una excitotoxicidad secundaria (Wang and Qin 2006). El ácido 3 nitropropiónico (3-NP) es un inhibidor del complejo II succinato deshidrogenasa (SDH) de la cadena respiratoria mitocondrial que, administrado en ratones, produce lesiones en el estriado y, en humanos, en caudado y putamen (Brouillet, Jacquard et al. 2005) y se utiliza como modelo experimental de la EH.

### **2.1.3 Modelos de ratones transgénicos**

En los ratones transgénicos se inserta de manera controlada el gen mutado o parte de él, permitiendo la expresión de la proteína mutante además de la proteína endógena normal.

#### 2.1.3.1. Ratones transgénicos que expresan fragmentos de huntingtina

El primer ratón transgénico, R6, se generó sobre-expresando el exón 1 del gen humano de la huntingtina con 141-157 repeticiones. Existen seis líneas de ratones, donde 4 de ellas tienen repeticiones CAG de un tamaño mayor que la EH juvenil en humanos: R6/1 (CAG=115); R6/2 (CAG=145); R6/5 (CAG = 135-156) y R6/0 (CAG = 142). Las edades de inicio del fenotipo de la enfermedad son de 2 meses para los R6/2 y de 4-5 meses para los R6/1 (Mangiarini, Sathasivam et al. 1996, Sathasivam, Hobbs et al. 1999).

Otros ratones que expresan fragmentos N-terminales de la proteína huntingtina, son los modelos transgénicos N171-82Q, que contienen el fragmento de 171 aminoácidos o el modelo N586-82Q que contiene el fragmento de caspasa 6 o 586 aminoácidos de la región N-terminal. Estos dos modelos presentan un agravamiento de la enfermedad más rápido, comparten los mismos síntomas motores que las otras líneas y los animales mueren a edades más tempranas (Heng, Detloff et al. 2008).

### 2.1.3.2. Ratones transgénicos con la proteína huntingtina completa

Los modelos más utilizados son los ratones YAC (Yeast Artificial Chromosome) donde el gen completo de la proteína humana se inserta en un cromosoma de levadura y éste se integra en el genoma del ratón. El ratón YAC128 muestra atrofia cerebral selectiva y pérdida neuronal, no aparecen apenas agregados de huntingtina mutada y presenta problemas motores a los 3 meses de edad, muriendo a edades similares a los ratones control (Heng, Detloff et al. 2008).

### **2.1.4 Modelos de ratones knock-in**

Los ratones knock-in expresan la proteína huntingtina mutada en un contexto genómico y protéico apropiado con un promotor Hdh. Poseen el exón 1 quimérico ratón/humano que codifica para un determinado número de glutaminas. Los ratones se denominan HdhQ94, HdhQ140, HdhQ111 y Hdh(CAG)150 (éste contiene el exón proveniente de ratón) (Wheeler, Auerbach et al. 1999, Heng, Detloff et al. 2008).

## **2.2 Modelos celulares de la EH**

Los modelos de EH en líneas celulares son útiles para poder estudiar la patogénesis de la enfermedad a nivel bioquímico. Considerando el rol de la huntingtina mutada en la patogénesis de la enfermedad, esta proteína ha sido utilizada como la principal herramienta en los estudios in vitro, en los que un aumento en la frecuencia de los agregados se asocia generalmente con toxicidad (Hackam AS 1998, Hackam AS 1999). Se ha demostrado que la expresión del fragmento con la cola de poliglutaminas de la proteína huntingtina mutada, en los modelos de la enfermedad, se asemeja al proceso patológico en un estado tardío de toxicidad. Inversamente, la expresión de la proteína mutada completa proporcionaría una visión más representativa del proceso observado durante el transcurso de la enfermedad (Dong X 2012).

Muchos aspectos de la patología observada en EH se pueden estudiar en células neuronales como las células de feocromocitoma de rata (PC12), la línea de ratón Neuro2a (N2a) y las células humanas provenientes de neuroblastoma SH-SY5Y (Cisbani G 2012). En este proyecto se han utilizado células PC12 transfectadas con el exón 1 de la proteína con 74 repeticiones, marcadas con la proteína GFP, que ayuda al seguimiento de la proteína en la célula, y que además su expresión es inducible por doxiciclina. Su efecto se asocia con

formación de agregados, muerte celular dependiente de caspasas y una reducción en el crecimiento de las neuritas (Wytenbach A 2001)

Las células ST14A se derivan del estriado de ratas en estado embrionario E14, que exhiben características de neuronas espinosas de tamaño medio y también pueden ser transfectadas con la proteína huntingtina mutada (Ehrlich ME 2001, Ossato G 2010). Otro modelo celular importante, son las células híbridas ratón-rata de glioma-neuroblastoma NG108-15, que exhiben propiedades neuronales después de diferenciación, permitiendo la expresión de huntingtina mutada durante muchos días (Holzmann C 1998, Lunkes A 1998, Ravache M 2010). Otro modelo celular derivado de embriones en estadio E14 de ratones wild-type y knock-in HdhQ111, son las células STHdhQ7/Q7 con 7 repeticiones de glutaminas (consideradas como modelos wild type) y las células STHdhQ111/Q111 que contienen la proteína huntingtina mutada con 111 repeticiones de glutamina y dan lugar a la patología (Trettel, Rigamonti et al. 2000, Ruiz C 2012). Frecuentemente, también se utilizan neuronas provenientes de cultivos primarios de modelos de EH en ratones, como pueden ser los cultivos neuroestriatales de YAC46, YAC72 y YAC128 los cuales expresan la proteína huntingtina mutada completa con 46, 72 o 128 repeticiones de glutamina (Zeron MM 2004, Milnerwood AJ 2012).

Actualmente se están usando células madre pluripotentes inducidas derivadas de pacientes con EH, para el estudio de la patología de la enfermedad y para realizar screenings terapéuticos (Park IH 2008). Por otro lado, ante la dificultad de conseguir cultivos primarios neuronales de pacientes, la utilización de fibroblastos de piel humanos (o células provenientes de otros tejidos periféricos) de pacientes sanos y pacientes con EH, permite estudiar el mecanismo molecular de la afectación por huntingtina mutada, así como testar diferentes fármacos y evaluar los efectos tóxicos o terapéuticos de éstos (Seo, Sonntag et al. 2004).

### **3. TRATAMIENTOS Y ESTRATEGIAS EN LA EH**

Hasta el momento, no hay cura para la EH. La mayoría de los tratamientos utilizados actualmente están diseñados para disminuir la sintomatología primaria de la enfermedad y mejorar la calidad de vida de los pacientes.

### **3.1 Tratamientos contra la excitotoxicidad**

El riluzol es un antagonista glutamatérgico que actúa sobre canales de sodio limitando la liberación de glutamato. Este fármaco incrementa los niveles de factores neuroprotectores como el BDNF y el GDNF (glial derived neurotrophic factor) en modelos químicos de la enfermedad y en ratones transgénicos (Mary, Wahl et al. 1995, Guyot, Palfi et al. 1997). La memantina actúa en el sistema glutamatérgico, bloqueando los receptores NMDA, reduce la muerte celular por excitotoxicidad, ralentiza la progresión y produce una mejora cognitiva en diversos modelos de la EH (Cankurtaran, Ozalp et al. 2006, Lee, Chu et al. 2006).

### **3.2 Inhibidores de la ruta de la dopamina**

Un sistema dopaminérgico hiperactivo puede contribuir a incrementar la corea y está implicado en la neurotoxicidad en la EH (Jakel and Maragos 2000). La tetrabenazina (TBZ), actúa produciendo una depleción de dopamina en la terminal presináptica a través de la unión selectiva y reversible al transportador de monoaminas tipo II (VMAT2). Este fármaco alivia los déficits motores y reduce la pérdida de células estriatales y controla los movimientos coreicos en ratones con EH, confirmando que la ruta de señalización de la dopamina tiene un papel importante en la patogénesis de la enfermedad (Tang, Chen et al. 2007). La levodopa, aminoácido precursor de la dopamina, muy utilizado en la enfermedad de Parkinson, se utiliza en la EH para tratar la rigidez, especialmente en su variante juvenil (Ross and Tabrizi 2011).

### **3.3 Inhibidores de caspasas**

La mutación de sitios de caspasa previene la neurodegeneración y mejora el fenotipo de la enfermedad, en ratones de modelos experimentales de EH (Graham, Deng et al. 2006). La minociclina (una tetraciclina de segunda generación) inhibe rutas dependientes de caspasa (como Smac/Diablo y citocromo C) e independientes (como el factor inductor de apoptosis AIF) en ratones R6/2 mejorando el fenotipo de la enfermedad y mostrando capacidad neuroprotectora (Chen, Ona et al. 2000, Hersch, Fink et al. 2003).

### **3.4 Estimulación de la función mitocondrial y compuestos antioxidantes**

La proteína huntingtina mutada bloquea la producción de energía mitocondrial y la respiración celular, produciendo una reducción de los niveles de ATP intracelulares, promoviendo apoptosis, estrés oxidativo y susceptibilidad a la excitotoxicidad. Consecuentemente, fármacos que incrementen la función mitocondrial o con propiedades antioxidantes, representan una estrategia neuroprotectora potencial en EH.

La creatina estimula la respiración mitocondrial y tiene además propiedades antioxidantes. Es neuroprotectora en modelos de ratones R6/2 y en modelos químicos (Ferrante, Andreassen et al. 2000), reduce los niveles en suero de 8-hidroxi-2-deoxiguanosina, un indicador de daño oxidativo en EH (Hersch, Gevorkian et al. 2006). La coenzima Q10 (una bezoquinona liposoluble) está involucrada en la producción de ATP, en la estimulación de la actividad mitocondrial y neuroprotección en ratones R6/2 y N171-82Q (Ferrante, Andreassen et al. 2002). La combinación de creatina y coenzima Q10 produce efectos neuroprotectores aditivos al incrementar el rendimiento motor e incrementar la supervivencia en ratones R6/2 (Yang, Calingasan et al. 2009).

Otros fármacos utilizados como antioxidantes son el ácido lipoico, el tocoferol y la idebenona. Este último, es análogo sintético de la coenzima Q10 e inhibe la peroxidación de lípidos mediante la producción de ATP (Gillis, Benefield et al. 1994), pero tiene el inconveniente de que atraviesa la barrera hematoencefálica por lo que su efecto sobre la función mitocondrial de las neuronas es problemático.

### **3.5. Tratamientos contra la disregulación transcripcional**

La disregulación transcripcional en EH apoya la idea de que el tratamiento con inhibidores HDAC (deacetilasas de histonas) pueden paliar las anomalías en los niveles de ARNm por efecto directo en la acetilación de histonas. El SAHA (ácido hidroxámico suberoilánilida) atraviesa la barrera hematoencefálica, incrementa la acetilación de histonas en el cerebro y reduce la discapacidad motora en ratones R6/2 (Hockly, Richon et al. 2003). De una forma similar, el compuesto HDACi4b previene de forma eficiente los déficits motores y los procesos neurodegenerativos con un perfil poco tóxico in vitro (Thomas, Coppola et al. 2008).

Como suplemento a los compuestos que interactúan con las HDAC, los compuestos que interactúan directamente con el ADN pueden tener también un potencial terapéutico en EH influenciando la actividad transcripcional. La mitramicina y la cromomicina (antibióticos de antraciclina) inhiben la apoptosis neuronal, se unen al ADN y modulan modificaciones epigenéticas de histonas que influyen la transcripción (Chakrabarti, Bhattacharyya et al. 2000). Además, los tratamientos con estos compuestos son capaces de re-balancear las modificaciones epigenéticas de histonas en ratones R6/2 y N171-82Q (Ryu, Lee et al. 2006, Stack, Del Signore et al. 2007).

### **3.6 Estimuladores de la autofagia y eliminación de proteínas**

El inhibidor de mTOR (mammalian target of rapamycin), rapamicina, produce una significativa reducción de los agregados de huntingtina mutada, mejora la supervivencia neuronal en modelos de *Drosophila* y la actividad motora y neuropatología estriatal en ratones con EH con pocos efectos secundarios (Ravikumar, Vacher et al. 2004). La combinación de la inhibición de mTOR y de la inositol monofosfatasa por rapamicina y litio respectivamente, tiene efectos aditivos en la eliminación de la proteína mutada *in vitro* (Sarkar, Krishna et al. 2008). La trehalosa induce autofagia y protege a las células del daño proapoptótico por la vía mitocondrial, reduciendo la formación y aumentando la eliminación de agregados de huntingtina (Sarkar, Davies et al. 2007).

### **3.7 Neurorestauración**

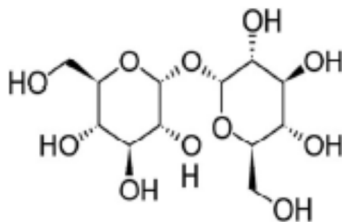
Debido a que el estriado degenera en la EH como resultado de la pérdida de funciones motoras y cognitivas, se han hecho esfuerzos para restaurar estas funciones mediante el trasplante de neuroblastos fetales estriatales, dentro del estriado de pacientes con EH. Los precursores neuronales, neuroblastos, son capaces de migrar a determinadas regiones cerebrales y re-establecer automáticamente el daño en los circuitos neurales del cerebro de animales adultos (Lepore, Neuhuber et al. 2006). Sin embargo, esta terapia no ha sido muy exitosa a largo plazo. En un estudio con pacientes transplantados, se muestra una mejoría y estabilidad de la enfermedad durante los dos primeros años, pero posteriormente la mejoría desaparece (Bachoud-Levi, Remy et al. 2000).

## **4. TREHALOSA COMO NEUROPROTECTOR EN HUNTINGTON**

La trehalosa es un disacárido presente en muchas especies no mamíferas y protege a las células contra varios tipos de estrés ambiental. Aunque algunos de sus efectos protectores pueden ser explicados debido a sus propiedades como chaperona química y como antioxidante, también son conocidos sus efectos beneficiosos mediante la inducción de la autofagia, especialmente en enfermedades neurodegenerativas, donde hay acumulación de proteínas mal plegadas.

#### 4.1 Trehalosa y sus propiedades bioprotectoras

La trehalosa es un disacárido que se encuentra en numerosos organismos, incluidas bacterias, levaduras, hongos, insectos, invertebrados y plantas. También se conoce a este compuesto como  $\alpha$ -D-glucopiranosil  $\alpha$ -D-glucopiranosido y debido a su enlace entre los dos anillos de glucopiranososa en el final reductor de los residuos glicosil (carbonos  $\alpha$ ), la trehalosa es un azúcar no reductor con una estabilidad excepcional (Colaco CALS 1995, Higashiyama T 2002) (figura 4). Su función es proteger la integridad de las células contra varios agentes estresantes ambientales como el calor, frío, desecación, deshidratación y oxidación, previniendo la desnaturalización de las proteínas (Chen and Haddad 2004). Muchas de sus propiedades protectoras fueron descubiertas en levaduras (Kandror, Bretschneider et al. 2004); sin embargo, también tiene efectos beneficiosos en mamíferos, en los cuales no es sintetizada endógenamente, pero si mantienen la enzima que la hidroliza (la trehalasa) en intestino delgado y riñones (Sasai-Takedatsu M 1996). Por ejemplo, es una herramienta valiosa para la criopreservación celular (Wolkers, Walker et al. 2001, Chen and Haddad 2004). No está del todo claro como la trehalosa media sus efectos protectores, pero algunos de ellos podrían ser por su capacidad de actuar como una chaperona química e influenciar el plegamiento de proteínas mediante interacciones directas proteína-trehalosa (Welch and Brown 1996).



**Figura 4. Estructura de la trehalosa.**

La trehalosa está implicada en la *anhidrobiosis*, habilidad de animales y plantas de soportar largos periodos de desecación debido a su alta capacidad de retención de agua. Este azúcar forma un gel en las fases de deshidratación conservando y manteniendo en su posición las estructuras, lo que previene de la degradación de los orgánulos (Paiva and Panek 1996). La posterior rehidratación permite la recuperación de las funciones celulares tras la sustitución de la fase gelatinosa por agua. Además la trehalosa se ha mostrado como un agente antioxidante (Simola, Hanninen et al. 2000, Benaroudj, Lee et al. 2001), se le atribuyen capacidades de plegamiento de proteínas mediante interacción directa (Singer and



Lindquist 1998); (Welch and Brown 1996) y la inducción de procesos de autofagia (Sarkar, Davies et al. 2007, Casarejos, Solano et al. 2011).

#### **4.2 Capacidad neuroprotectora de la trehalosa**

La acumulación de proteínas insolubles mal plegadas debido a la agregación de proteínas alteradas, es un mecanismo patogénico clave en la neurodegeneración. Muchos estudios han mostrado que los agregados de proteínas (incluyendo  $\beta$ -amiloide y tau en la enfermedad de Alzheimer,  $\alpha$ -sinucleína en la enfermedad de Parkinson, poliglutaminas en la EH, proteínas priónicas, y la cobre/zinc superoxidasa dismutasa 1 (SOD1) en la esclerosis amiotrofia lateral) pueden afectar la conectividad y plasticidad neuronal, disparando, por último, rutas de señalización de muerte celular (Agorogiannis, Agorogiannis et al. 2004, Soto and Estrada 2008, Naeem and Fazili 2011, Mulligan and Chakrabartty 2013). La principal estrategia mediante la cual el sistema nervioso central lidia con los agregados de proteínas anormales en el cerebro es la autofagia, una ruta de degradación para agregados intracitosólicos (Metcalf, Garcia-Arencibia et al. 2012, Meng, Yong et al. 2013). La trehalosa tiene un número único de propiedades que apuntan hacia su potencial utilidad en prevenir la neurodegeneración mediante la inhibición de agregación de proteínas (Sarkar, Davies et al. 2007, Jain and Roy 2009, Rodríguez-Navarro, Rodríguez et al. 2010) y como inductor de autofagia (Sarkar, Davies et al. 2007).

La estimulación farmacológica de la autofagia vía inhibición de mTOR, utilizando rapamicina, acelera la eliminación de proteínas mal plegadas, protege ante la pérdida neuronal y atenúa la severidad de la enfermedad en modelos animales de neurodegeneración (Pan, Kondo et al. 2008, Bove, Martinez-Vicente et al. 2011). Remarcablemente, Sarkar et al. (Sarkar, Davies et al. 2007) mostraron que la trehalosa actúa de una forma independiente a mTOR, datos que sugieren que la trehalosa puede añadir eficacia al tratamiento en enfermedades neurodegenerativas en combinación con la rapamicina.

Estas características hicieron que se testara como agente protector en agregación de proteínas. La trehalosa ha demostrado ser efectiva al prevenir la formación de agregados de huntingtina y  $\alpha$ -sinucleína (Tanaka, Machida et al. 2004, Sarkar, Davies et al. 2007) e inhibiendo la agregación de la proteína  $\beta$ -amiloide y proteínas priónicas reduciendo su citotoxicidad (Liu, Barkhordarian et al. 2005, Beranger, Crozet et al. 2008, Izmitli, Schebor et al. 2011). La trehalosa muestra características biopreservativas (ya sea de manera directa como indirecta) de proteínas en la naturaleza e industria, además varias investigaciones la

apuntan como antioxidante e inductor de autofagia. Debido a su característica común de acumulación de proteínas, existen varios estudios sobre el posible papel de la autofagia en las enfermedades neurodegenerativas (Hara, Nakamura et al. 2006, Komatsu and Ichimura 2008, Sarkar, Krishna et al. 2008), se considera que aumentar la reacción autofágica podría ser una posible estrategia para disminuir la agregación de dichas proteínas y con ello la toxicidad.

#### **4.2.1 Autofagia**

Durante la autofagia se produce una elongación de la membrana citoplasmática englobando partes del citoplasma con los productos a digerir y formando los fagosomas (autofagosomas si la partícula englobada finalmente es de la propia célula). Estas vesículas de doble membrana se funden con los lisosomas, vesículas que contienen enzimas de degradación dependientes de pH, para formar los lisosomas (autolisosomas en el caso de degradación autógena de la célula). La única proteína conocida en mamíferos que se une a los autofagosomas es el LC3, de las cual hay dos formas: I y II. Tras la activación de la autofagia la forma I citosólica se conjuga con fosfatidiletanolamina y resulta la forma de LC3-II (Sarkar and Rubinsztein 2008). También la Beclina-1 es una proteína clave para la autofagia y el p62 se considera un sustrato de los procesos autofágicos (Stumptner, Heid et al. 1999, Babu, Geetha et al. 2005, Bjorkoy, Lamark et al. 2005, Klionsky, Abdalla et al. 2012).

### **5. FENOTIAZINAS**

Las fenotiazinas son compuestos orgánicos que derivan de varias drogas antihistamínicas y antipsicóticas. La fenotiazina es un compuesto amarillento tricíclico soluble en ácido acético, benceno y éter. El compuesto se relaciona con la clase de tiazinas de compuestos heterocíclicos. El termino fenotiazinas se utiliza para describir una de las clases de neurolépticos antipsicóticos. Los antipsicóticos derivados de la fenotiazina se clasifican dentro de tres grupos que difieren en la amina terciaria (figura 5):

- Compuestos alifáticos: tienen un grupo acíclico asociado a la amina terciaria.
- Piperidinas: tienen un grupo derivado de la piperidina.
- Piperazinas: el grupo que poseen es derivado de la piperazina.



**Figura 5: Estructura de los antipsicóticos derivados de la fenotiazina.**

La clorpromazina fue el primer derivado de la fenotiazina introducido en la práctica psiquiátrica a mediados de 1950, mostrando efectos terapéuticos en el tratamiento de la psicosis como la esquizofrenia. Las fenotiazinas tienen un efecto en la actividad del sistema nervioso central, induciendo a los pacientes a un estado sedativo (Buckley 1989). En este trabajo nos centraremos en las fenotiazinas piperazínicas (trifluoperazina, perfenazina y flufenazina) como posibles moduladores de la autofagia.

### **5.1 Farmacocinética y acciones farmacológicas en el sistema nervioso central**

Los derivados de la fenotiazina se absorben por vía oral y parenteral, difunden con rapidez por el organismo, atraviesan la barrera hematoencefálica y alcanzan en cerebro concentraciones superiores a las plasmáticas, se acumulan en pulmón y bazo y se unen a las proteínas plasmáticas en una proporción superior al 90 por 100 (Velasco Martín A. 1988).

Estas drogas se utilizan como antipsicóticos e interactúan con varios receptores en el sistema nervioso central, especialmente bloquean fuertemente los receptores de dopamina (Snyder, Banerjee et al. 1974). Las fenotiazinas también inhiben otros receptores en las neuronas del sistema nervioso central, incluyendo receptores alfa-adrenérgicos, receptores de serotonina, histamina, muscarínicos o GABAérgicos, aunque la afinidad por los receptores dopaminérgicos es la más fuerte (Peroutka and Snyder 1980, Zorumski and Yang 1988, Schotte, Janssen et al. 1996, Motohashi, Kawase et al. 2006). Las fenotiazinas cruzan la barrera hematoencefálica muy fácilmente, debido a que exhiben una alta afinidad por las bicapas lipídicas en las membranas neuronales, ya que poseen un alto grado de lipofilia (Seelig, Gottschlich et al. 1994). Las piperazinas han demostrado tener la acción antipsicótica más fuerte, pero también inducen otros efectos secundarios indeseables, como disquinesia y efectos extrapiramidales.

## 5.2 Efectos en el sistema calcio-calmodulina

La calmodulina es una proteína multifuncional que se une a 4 cationes de calcio (Sakai and Krishna 1999), es uno de los mayores reguladores de procesos biológicos dependientes de calcio y juega un importante papel en la fisiología celular. El efecto de las fenotiazinas sobre la actividad de la calmodulina puede explicar sus efectos pleiotrópicos en la fisiología celular, entre los que se encuentran la inhibición de la proliferación celular y el decremento de la actividad de muchas enzimas dependientes de calcio-calmodulina (Weiss, Prozialeck et al. 1982). El grupo de las piperazinas, constituye los antagonistas de calmodulina de mayor actividad (Weiss, Prozialeck et al. 1982). Algunas de las enzimas dependientes de calmodulina inhibidas por fenotiazinas se muestran en la tabla 1.

ENZIMA	FUNCIÓN
<b>AMPC</b>	Síntesis de ácido adenílico cíclico
<b>GMPc</b>	Síntesis de ácido gluanílico cíclico
<b>Calmodulina dependiente proteína kinasa</b>	Fosforilación de diversas proteínas
<b>Calcineurina</b>	Defosforilación de diversas proteínas
<b>Nicotinamida adenina dinucleótido kinasa</b>	Síntesis de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
<b>Fosforilasa kinasa</b>	Degradación de glucógeno
<b>Inositol trifosfato kinasa</b>	Metabolismo del fosfoinositol
<b>Kinasa de la cadena corta de la miosina</b>	Motilidad y contractibilidad
<b>Fosfodiesterasa calcio dependiente (PDE1)</b>	Hidrolisis de AMPC y GMPc

Tabla1. EnZimas activadas por calcio-calmodulina inhibidas por fenotiazinas (Cheung 1980, Weiss, Prozialeck et al. 1982).

Las enzimas activadas por calcio-calmodulina participan en la fosforilación de la glicoproteína P (Pgp), proceso que es importante en la función de transporte de la proteína y en su actividad ATPasa (Hait and Aftab 1992, Ford 1996, Ermak and Davies 2002). Las células han desarrollado varios mecanismos de protección contra los compuestos foráneos, uno de los mecanismos efectivos está conectado con la actividad de la Pgp. La función fisiológica de la Pgp, radica en el transporte de sustratos endógenos, así como distintos xenobióticos (como las drogas) fuera de la célula (Taheri, Mahjoubi et al. 2010). Está bien establecido que la inducción por fenotiazinas de la inactivación de las enzimas dependientes de calcio-calmodulina, así como la inhibición de la proteína kinasa C, producen una disminución en la fosforilación de Pgp e inhiben su función transportadora (Chambers, Pohl et al. 1993, Ahmad, Safa et al. 1994, Teodori, Dei et al. 2002).

### **5.3 Efectos en la composición lipídica y permeabilidad de las membranas celulares**

Las fenotiazinas son capaces de cambiar la composición lipídica en diversos sistemas modelo. Se ha visto que la trifluoperazina y la clorpromazina inhiben la síntesis de fosfatidilcolina en células HeLa (Pelech SL 1983, Pelech SL 1984, Frølich KW 1992). Trifluoperazina también altera la composición de ácidos grasos en fosfolípidos de fibroblastos humanos. La capacidad de las fenotiazinas para alterar la actividad de proteínas asociadas a membrana ha sido descrita en varios trabajos. Clorpromazina activa la fosfatidato citidiltransferasa (Sturton RG 1977) y la CDP diacilglicerol inositol fosfatidiltransferasa (Zborowski J 1983). La trifluoperazina también afecta a la actividad de ATPasas independientes de calcio-calmodulina (Luthra 1982) y bombas de calcio (Hirata M 1982). Se ha observado que la fluidificación de la estructura de lípidos de la membrana celular, que ocurre en presencia de flufenazina, es uno de los mecanismos por los que se produce inhibición de Pgp y el elemento esencial del incremento de la quimiosensibilidad de las células (Cieslik-Boczula, Szwed et al. 2009, Szwed, Cieslik-Boczula et al. 2010).

Otros estudios muestran como la trifluoperazina puede depolarizar el potencial de membrana mitocondrial en sinaptosomas corticales en un modelo de conejillo de indias (Snelling R 1984), producir un decrecimiento en la viabilidad celular y cambios morfológicos y permeabilización de la membrana plasmática así como de la membrana mitocondrial en células hepáticas (de Faria, Bettanin et al. 2015).

En este trabajo estudiamos el efecto de la trehalosa como un neuroprotector sobre la toxicidad provocada por un inhibidor del proteasoma y por la propia EH en un modelo celular (fibroblastos) proveniente de pacientes humanos. Además, siendo este compuesto tan prometedor en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, hemos estudiado los mecanismos moleculares de este disacárido en la inducción de la autofagia, como herramienta terapéutica. Para ampliar el proyecto, se ha llevado a cabo un screening de diversos fármacos para determinar moduladores de la autofagia que puedan ser relevantes en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. Dicho screening ha resultado en la determinación de las fenotiazinas como uno de los grupos más destacados en la alteración del flujo autofágico, cuyo mecanismo de acción también ha sido estudiado en este proyecto.

## *Objetivos*

---



## *OBJETIVOS*

1. Determinar el efecto producido por el bloqueo de la degradación de proteínas mediado por proteasoma, en un modelo celular de Huntington, en fibroblastos de pacientes con la enfermedad.
2. Estudio del tratamiento con trehalosa como neuroprotector contra el daño producido por la inhibición proteasomal en modelos control y con EH.
3. Estudio del mecanismo molecular de actuación de la trehalosa como inductor de autofagia y terapia neuroprotectora en la EH.
4. Desarrollo de un screening farmacológico para la determinación de nuevos moduladores de la autofagia como tratamiento para la EH.
5. Estudio del mecanismo de acción de los moduladores de autofagia seleccionados en diferentes modelos celulares así como su efecto en eliminación de proteínas.





## *Métodos*

---



# ***MÉTODOS***

Debido a que parte de la tesis se ha desarrollado en un laboratorio extranjero, para un mismo procedimiento o técnica experimental, se han podido utilizar materiales distintos o provenientes de diferentes casas comerciales. Por lo tanto, la sección de materiales y métodos queda subdividida en dos apartados para facilitar el entendimiento de los métodos utilizados.

## **I ESTUDIO REALIZADO EN FIBROBLASTOS HUMANOS DE PACIENTES CON EH**

### ***Declaración ética***

Este trabajo ha sido desarrollado con fibroblastos humanos en cultivo primario y ha sido aprobado por el Comité ético para la investigación del hospital Ramón y Cajal en Madrid. El consentimiento escrito ha sido obtenido directamente de los pacientes, lo cual, de acuerdo con la ley española de Investigación Biomédica 14/2007 y debido a la naturaleza del estudio, es suficiente para el desarrollo de la investigación.

### ***1.1. Cultivo de fibroblastos de piel humanos***

Los fibroblastos humanos fueron obtenidos de biopsias de piel de sujetos sanos y de pacientes con EH. Las biopsias de piel de 3 a 5 mm de diámetro fueron cortadas en fragmentos de menor tamaño, depositadas en un frasco y cultivadas en medio Amniomed (Genycell, EK AMG-200). Después del primer pase, las células se crecieron en un medio que contenía DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) con alta concentración de glucosa (4.5 g/L) (Biowest, L0101-500), 4 mM L-glutamina (GIBCO, 25030-024), 1 mM sodio-piruvato (GIBCO, 11360-039), penicilina/estreptomizina/fungizona (100 U/ml) (GIBCO, 15240-062) y 15% suero fetal bovino (origen USA) (GIBCO-Life Technologies, 16000-044). Las células se mantuvieron en un incubador a 37°C con un 5% de CO<sub>2</sub>. Para los experimentos con fibroblastos humanos se tuvieron en cuenta el número de repeticiones de CAG, edad y sexo de los pacientes y número de pases en cultivo, manteniendo siempre condiciones equiparables entre genotipos y experimentos.

Los cultivos primarios de fibroblastos de piel humanos se congelaron siguiendo el siguiente protocolo para su uso posterior, nunca utilizando fibroblastos con un número de pases mayor de 13. Las células se lavaron con PBS previamente a su tripsinización,

posteriormente se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos. El pellet de células se resuspendió en medio DMEM + 10% DMSO y se distribuyó en criotubos de 1 mL. Los criotubos se congelaron en nieve carbónica para su posterior almacenaje a -80°C. Para la descongelación de los viales éstos se sumergieron en un baño a 37°C para rápidamente añadir medio completo hasta un volumen final de 10 mL. Posteriormente las células se centrifugaron a 1500 rpm, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las células nuevamente en medio DMEM completo fresco y atemperado para su siembra en frascos. Para la detección de proteínas ubiquitinizadas, el medio estándar fue reemplazado por medio definido MEM/Ham's F12 1:1 (F12; PAA, E15-817, MEM; GIBCO, 041-01095), 20 nM progesterona (Sigma-Aldrich, P6149), 100 mM putrescina (Sigma-Aldrich, P5780), 30 nM sodio selenita (Sigma-Aldrich, S9133), 5 mg/ml insulina (Sigma-Aldrich, I1882) and 100 mM transferrina (Boehringer, M1073974) suplementado con 0.6% de glucosa (Sigma-Aldrich G8769).

Las células fueron mantenidas durante cuatro días antes del tratamiento con epoxomicina y trehalosa. Para todos los experimentos las células se trataron con trehalosa 100 mM durante 15 minutos antes de la adición de epoxomicina durante 24h. En el caso de los experimentos para medir la proliferación celular (BrdU), el tratamiento se prolongó hasta 48 horas.

## ***1.2. Reactivos Químicos***

Para los tratamientos celulares se utilizó epoxomicina (Calbiochem, 324800), que es un inhibidor del proteasoma, trehalosa (Calbiochem, 625625) como inductor de autofagia y bioprotector y 3-metiladenina (Sigma-Aldrich, M9281) como inhibidor de autofagia. Para la cuantificación de la actividad del proteasoma se utilizó como sustrato de la actividad quimotripsina Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (Calbiochem, 539142). Se utilizó el kit para la medida de proteínas BCA de Pierce (Pierce, 23228, 1859078). Para los ensayos de viabilidad celular se incubaron las células con BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridina) (SIGMA-Aldrich, B-5002) y para la determinación de radicales libres con DCF (diclorofluoresceina, Invitrogen, C6827). Los siguientes reactivos se utilizaron en el cultivo celular: poly-D-lisina (4.5 µg/cm<sup>2</sup>) (SIGMA-Aldrich, P6407-5MG), fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) (SIGMA-Aldrich, P7626), inhibidores de proteasas (Calbiochem, 539131). Para la detección de proteínas mediante la técnica de western blot descrita posteriormente, las membranas se incubaron con ECL (enhanced chemiluminescence) (Bio-Rad, 970442/3).

### ***1.3. Estudios de viabilidad celular y proliferación***

La supervivencia de los fibroblastos se midió analizando el porcentaje de células inmunoreactivas al fragmento cortado de la caspasa-3. Los cultivos fueron fijados en 4% de paraformaldehído, lavados en 0.1 M PBS (phosphate-buffered saline) pH 7.4, permeabilizados con etanol-ácido acético (19:1), e incubados a 4°C durante 24h con un anticuerpo primario policlonal de conejo anti-caspasa-3 cortada (1/400) (Cell-Signaling, 9664P). Las células fueron lavadas tres veces en PBS e incubadas con un anticuerpo secundario de ratón Alexa Fluor 488 (verde) (Invitrogen, A11034) por una hora a temperatura ambiente. Después de los últimos tres lavados con PBS, los cubreobjetos se montaron en portaobjetos sobre una gota de solución antidecolorante non-fade (50 mg de p-fenilendiamina disuelta en PBS 0.01 M glicerina 1:9 ajustando a pH 8, con tampón carbonato-bicarbonato 0.5 M) que contenía bisbenzimidida (Hoescht 33342, que tiñe todos los núcleos al unirse al ADN) (SIGMA-Aldrich, B-2261) a una concentración de  $3 \times 10^{-5}$  M. Para valorar la fluorescencia inespecífica, se incubaron algunos cubreobjetos con el anticuerpo secundario, sin haber incubado con el anticuerpo primario.

Para el estudio del efecto del inhibidor del proteosoma, epoxomicina, y el inductor de autofagia, trehalosa, sobre la proliferación celular, los cultivos celulares se trataron con trehalosa 100 mM durante 15 minutos antes de añadir epoxomicina (15 nM) durante 48 horas. Durante las últimas 24h de tratamiento, las células se incubaron con 50 mM BrdU por 24 horas antes de la fijación. Para la inmunodetección de BrdU y medición de la captación de éste por las células, se utilizó un anticuerpo específico generado en ratón (1/20) (DAKO, M0744) y un anticuerpo secundario Ig acoplado a fluoresceína.

### ***1.4. Cuantificación de radicales libres***

Los radicales oxidativos libres intracelulares se detectaron utilizando un ensayo intracelular de ROS (especies reactivas de oxígeno). El compuesto no fluorescente DCF (diclorofluoresceína) es oxidado por los radicales libres para formar un DCF altamente fluorescente. Los fibroblastos control y EH, fueron sembrados a una densidad de  $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en cubreobjetos previamente recubiertos con poly-D-lisina tres días antes del experimento. Después de 15 minutos de tratamiento con trehalosa 100 mM, las células fueron incubadas con epoxomicina 15 nM durante 24 horas. Posteriormente las células se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con 5 µM DCFH-DA en medio MEM libre de rojo fenol

durante 30 minutos a 37°C en el incubador. Posteriormente, las células fueron lavadas dos veces con PBS 1 mM glucosa y los núcleos se tiñeron con bis-benzimida. Para realizar determinaciones cuantitativas, los cubreobjetos se analizaron en un microscopio de fluorescencia utilizando el filtro FITC (fluoresceína isotiocianato) y cuantificados en 1/10 del área total. Las células positivas a ROS se identificaron por la emisión de fluorescencia y el número total de células por la tinción de bis-benzimida.

### ***1.5. Técnicas de Inmunocitoquímica***

Para la determinación de la actividad autofágica tras los diferentes tratamientos en fibroblastos humanos, se utilizaron diferentes anticuerpos para su estudio por inmunocitoquímica. Se analizaron el porcentaje de células inmunoreactivas a LC3 (microtubule-associated protein *light chain 3*), HSC70 (heat shock cognate 70 kDa protein) y LAMP-2A (lysosome-associated membrane protein 2-A) como marcadores de macroautofagia (LC3) y autofagia mediada por chaperonas (co-localización de Hsc70 y LAMP2-A) (Kaushik and Cuervo 2008). Los cultivos de fibroblastos se fijaron en 4% paraformaldehído durante 5 minutos, lavados con PBS, permeabilizados con etanol-ácido acético (19:1) durante 15 minutos, bloqueados con 10% de suero fetal bovino durante 1 hora a temperatura ambiente e incubados a 4°C durante 24h con los anticuerpos primarios diluidos en PBS con 10% de suero fetal bovino. El anticuerpo policlonal de ratón anti-LC3 (MBL, PM036) fue diluido a 1/200. El anticuerpo monoclonal anti-huntingtina mAB 2166 (Chemicon, mAB 2166) fue diluido a 1/500.

Para cuantificar la huntingtina dentro de los fibroblastos se tuvo que utilizar medidas de Densidad óptica integrada (IOD) dado que los fibroblastos no forman agregados de huntingtina (Sathasivam, Woodman et al. 2001). El anticuerpo anti HSC70 generado en ratón, fue utilizado a una dilución 1/100 (Abcam, Ab2788) y el anticuerpo anti-LAMP2A generado en conejo fue utilizado a una dilución 1/100 (Abcam, Ab37024). Los anticuerpos secundarios conjugados a fluoresceína o rodamina fueron utilizados para visualizar células positivas bajo el microscopio de fluorescencia. Las imágenes de co-localización para HSC70 y LAMP2A fueron adquiridas utilizando un microscopio Nikon C1 plus ECLIPSE Ti-e. El número de células inmunoreactivas se contó en 1/7 del área total de los cubreobjetos. Las células fueron contadas en líneas paralelas predefinidas utilizando una retícula de contar insertada en el ocular.

## ***1.6. Análisis por Western Blot***

Los cultivos de fibroblastos fueron homogenizados con un sonicador (VibraCell, nivel 0.5 durante 30 s) en buffer de lisis [20 mM Tris HCl, 10 mM acetato potásico (AcK), 1 mM ditioneitol (DTT), 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM benzamidina, leupeptina, aprotinina, pepstatina 5 mg/ml cada uno, 0.25% NP-40, pH 7.4] y luego centrifugados a 12.000 xg durante 30 minutos a 4°C. Para la detección de fosfo-ERK (p-ERK) y ERK total (Extracellular signal-regulated kinases), se añadió 10 mM NaF (fluoruro de sodio), 2 mM molibdato de sodio, 10 mM b-glicerofosfato, and 0.2 mM ortovanadato. El sobrenadante fue utilizado para determinación de proteínas utilizando el método BCA y para la separación electroforética. Las muestras (20-30 µg de proteína) fueron añadidas a buffer de carga SDS (dodecil sulfato sódico), electroforetizadas en geles de poliacrilamida-SDS 10-15% y transferidas a membranas de nitrocelulosa de 0.45 mm, como se describe previamente en (Casarejos, Solano et al. 2005, Solano, Casarejos et al. 2008).

Los anticuerpos utilizados en el estudio fueron los siguientes: Anti HSP-70 (heat shock protein 70 KDa) generado en ratón (1/750) de Santa Cruz (Heidelberg, Germany) para determinar la respuesta a estrés por la maquinaria de plegamiento de proteínas; anticuerpo monoclonal de ratón anti-huntingtina mAB 2166 (1/500) (Chemicon, mAB 2166) para la comprobación de la eliminación de proteínas mal plegadas o su acumulación debido a un mal funcionamiento de los sistemas de “limpieza” celular; anticuerpo monoclonal de ratón anti-ERK1/2 (SIGMA-Aldrich, M5670) y Anti-P-ERK1/2 (SIGMA-Aldrich, M8159) (1/1000) utilizados como una primera aproximación a posibles rutas de señalización activadas por los diferentes tratamientos; anticuerpo monoclonal anti beta-actina generado en ratón y diluido 1/5000 (SIGMA-Aldrich, A5441) fue utilizado como control de carga.

## ***1.7. Detección de proteínas ubiquitinizadas.***

Con objeto de comprobar el efecto de la epoxomicina sobre la degradación de proteínas por proteasoma y el posible efecto protector de la trehalosa, realizamos la medición de proteínas marcadas con ubiquitina. Los cultivos de fibroblastos de piel humanos fueron tratados con epoxomicina (15 nM) o pretratados con trehalosa (100 mM) 15 minutos antes del tratamiento de epoxomicina durante 24 horas. Las células se lavaron con PBS con fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF), recolectadas en 150 µL de buffer de lisis [50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, 20 mM EDTA, 1 % Tritón X-100, 50 mM fluoruro de sodio (NaF), 20



mM N-etil-maleimida, 100  $\mu$ M ortovanadato sódico, 1 mM PMSF y mezcla de inhibidores de proteasas] e inmediatamente hervidos durante 5 minutos. Los lisados fueron centrifugados a 12.000 xg a 4° C durante 30 minutos. El sobrenadante fue utilizado para determinación de proteínas por el método BCA. Para la detección de proteínas ubiquitinizadas se utilizaron 15  $\mu$ g de proteína para el ensayo por inmunoblot con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-ubiquitina diluido 1/500 (Chemicon, MAB1510). Los anticuerpos secundarios (1/1000) seguidos de detección por ECL (enhanced chemiluminiscence), fueron usados para la inmunodetección. La detección de beta-actina (1/5000) (SIGMA-Aldrich, A5441) fue utilizada como control de carga en los geles.

### ***1.8. Cuantificación de la actividad proteasomal***

Después de los diversos tratamientos descritos anteriormente, los fibroblastos fueron lavados en PBS, recolectados en buffer de lisis especial para actividad proteasomal y sonicados (VibraCell, nivel 0.5 durante 30 s). Los lisados fueron centrifugados a 12.000 xg a 4°C durante 30 min. La concentración de proteínas se llevó a cabo utilizando el método BCA con el sobrenadante obtenido. La actividad quimotripsina 20S fue cuantificada monitorizando la acumulación del producto fluorescente 7-amino-4-metilcoumarina (AMC) obtenido tras el procesamiento proteasomal del substrato sintético Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-aminometilcoumarina (LLVY-AMC), utilizando el kit de actividad proteasomal 20S (Chemicon) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (las cuantificaciones se realizaron cada 30 minutos durante 3 horas).

### ***1.9. Análisis estadístico***

Los resultados fueron evaluados con ANOVA de una vía, con medidas repetidas con dos factores, seguidas de un test de comparación múltiple Bonferroni. Las interacciones entre genotipos y tratamiento fueron analizadas mediante un ANOVA de dos vías seguidos de un test de Bonferroni. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando el valor p era inferior a 0.05. El análisis de los resultados fue realizado utilizando el software SPSS.

## II ESTUDIOS PARA LA DETERMINACIÓN DEL MECANISMO DE ACTUACIÓN DE LA TREHALOSA Y EVALUACIÓN DE DIVERSAS DROGAS COMO MODULADORES DE LA AUTOFAGIA.

### *II.1.Cultivos celulares*

Para la validación de los resultados, los experimentos se realizaron en diferentes tipos celulares; Hela, SH-SY5Y, RAW 264.7 y PC12. Además se realizaron estudios de eliminación de proteínas utilizando líneas celulares transfectadas e inducibles que expresaban plasmidos de forma estable; PC12-EGFP-htt74Q y GFP-p62-HEK. Las células de epitelio humano cervical (HeLa), línea celular de ratón derivada de monocitos leucémicos (RAW 264.7) y las células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) se mantuvieron en medio DMEM 4500 mg/L de glucosa, suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 100 unidades/mL de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 2 mM de L-glutamina (todo de Sigma-Aldrich) a 37°C y 5% de dióxido de carbono. Las células derivadas de feocromocitoma de medula adrenal de rata (PC12) expresando de forma estable el exón 1 de la proteína Huntingtina con 74 repeticiones de glutamina marcado con EGFP (PC12-EGFP-htt74Q), descritas previamente en (Hackam AS 1998), fueron mantenidas en el medio descrito anteriormente con la adición de 500 µg/ml G418 (Invitrogen), 100 µg/ml de higromicina B (Calbiochem), 10% suero de caballo (Sigma-Aldrich) y la reducción de suero fetal bovino al 5% y mantenidas con un 10% de dióxido de carbono. Células Hela expresando de forma estable mRFP-GFP-LC3 se mantuvieron en el medio indicado anteriormente suplementado con 500 µg/ml of G418. Las neuronas provenientes de cultivos celulares primarios (embriones E16.5) fueron mantenidas en medio Neurobasal suplementado con glutamina 2 mM, B27 200 mM y 1% de penicilina-estreptomicina a 37°C y 5% dióxido de carbono y tratadas al día 7 post-cultivo. Para los cultivos de neuronas wild type se utilizaron los ratones C57BL/6. Las células HEK 293 (células derivadas de riñón embrionario humano) que expresaban de forma estable GFP-p62 (HEK GFP-p62), descritas previamente por (Hackam AS 1999), se mantuvieron en medio DMEM suplementado con 1% penicilina-estreptomicina, 7.5 µg/ml de blasticidina (life Technologies), 100 µg/ml de higromicina B y 10% de suero fetal bovino a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.

## ***II.2. Reactivos Químicos***

Los siguientes agentes químicos fueron utilizados en los cultivos celulares, todos obtenidos de Sigma-Aldrich: Bafilomicina A disuelta en DMSO y utilizada a 400 nM durante 4 horas o 100 nM durante 16 horas. La trehalosa fue disuelta en medio de cultivo y utilizada a 100 mM durante el tiempo indicado en cada experimento. DMSO fue utilizado como control en los experimentos apropiados. Doxiciclina fue utilizada a 1 µg/ml para la inducción en células PC12 GFP-htt-74Q durante 8 horas y tetraciclina (Sigma) a 1 µg/ml para la inducción de HEK GFP-p62 durante 48 horas. Rapamicina (200 nM, LC laboratories) y 3-metiladenina (100 µM, Sigma) fueron utilizadas durante 24 horas a menos que se indique lo contrario. Para el estudio de la ruta de señalización por ERK se utilizaron los inhibidores de ERK UO126 (Cell signalling 9903S) y PD184352 (Cell signalling 12147S).

Las drogas empleadas en el screening farmacológico fueron las siguientes: Histamina (Sigma); trifluoperazina dihidrocloruro (Sigma); ambroxol HCl (microsouce Discovery systems); nicergolina (microsouce Discovery systems), tetradotoxina (Abcam); trimeprazina tertrato (microsouce Discovery systems); propafenona HCl (microsouce Discovery systems); clonidina hidrocloreuro (Sigma); flufenazina (microsouce Discovery systems) y perfenazina (microsouce Discovery systems).

Para el estudio de la activación de la ruta de los receptores dopaminérgicos se utilizaron los siguientes compuestos todos de Sigma: Dopamina hidrocloreuro; sulpiride como antagonista de los receptores D2 dopaminérgicos; SKF-38393 hidrocloreuro como agonista de los receptores D1; quinpirole hidrocloreuro como agonista de los receptores D2; SCH-23390 hidrocloreuro como antagonista de los receptores D1.

## ***II.3.Recolección celular***

Las células fueron directamente recogidas en buffer Laemmli (Bio-Rad) con 5% de β-Mercaptoethanol (Sigma). Las muestras se sometieron a ebullición a 100°C durante 5 minutos. Para los ensayos de inmunoprecipitación, las células se recogieron en buffer de lisis: 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl, 5 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 0.5% NP-40, cocktail de inhibidores de proteasas (Roche); y lisadas durante 20 minutos en hielo, seguido de centrifugación a 13.000 xg durante 15 minutos.

#### ***II.4. Ensayos de Inmunoprecipitación***

Las células se recolectaron como se describe en el apartado anterior. 500 ng de proteína fueron incubados con el anticuerpo anti-Flag M2 (Sigma) a una concentración final de 5 µg/mL e incubado durante la noche a 4°C. Posteriormente, la mezcla se incubó con Dynabeads (Life technologies – Thermo Fisher Scientific) durante 2 horas. El conjugado Dynabeads-anticuerpo-proteína se extrajo mediante campo magnético, incubado con buffer Laemmli y llevado a ebullición durante 5 minutos a 100°C.

#### ***II.5. Construcciones de ADN***

El exón 1 de la proteína huntingtina con 74 repeticiones de glutamina, marcado con EGFP en un vector pEGFP-C1 ha sido descrito previamente (Narain et al., 1999; Ravikumar et al., 2002). Wasabi-RFP-LC3 ha sido generosamente proporcionado por C. Zhou y fue descrito previamente (Zhou C 2012). La construcción de pcADN3.1-HA-Ubiquitina (WT-HA-Ubi) fue generosamente proporcionada por C. Patterson y descrita previamente (Li, Willis et al. 2007), la construcción de pcADN3.1-HA-K63 Ubiquitina fue obtenida modificando la construcción WT en el laboratorio.

#### ***II.6. Transformación celular para producción de plásmidos***

Para la preparación de los plásmidos de ADN, aproximadamente 30 µL de *Escherichia coli* químicamente competentes ( $\alpha$ -Select Bronze efficiency, Bionline) se mezclaron con 0.5 µL de ADN e incubados en hielos durante 30 minutos. Los tubos fueron transferidos a un baño a 42°C durante 45 segundos y devueltos al hielo. Las células se resuspendieron en 250 µL de medio SOC y se incubaron durante 1 hora a 37°C en constante agitación de 220 rpm. Posteriormente a la incubación, 100 µL de bacteria fueron propagados en placas de LB agar, con el correspondiente antibiótico, para la selección (Ampicilina). Las placas fueron incubadas durante 16 horas a 37°C. Se recolectaron colonias individuales, que fueron incubadas en 3 mL de LB con el antibiótico apropiado a (20 µg/mL) durante aproximadamente 8 horas, y posteriormente transferidos a 200 mL de LB con el correspondiente antibiótico e incubados a 37°C en agitación constante durante 16 horas. Los cultivos se recogieron por centrifugación a 4500 rpm durante 10 minutos. El ADN fue purificado de la bacteria utilizando kits de maxiprep de Qiagen y Life technologies siguiendo

el protocolo del distribuidor. El ADN purificado fue resuspendido en buffer TE y su concentración medida en un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific).

### ***II.7. Transfección de ADN***

Las transfecciones de ADN fueron llevadas a cabo en medio OptiMEM (Gibco) utilizando TransIT 2020 (Mirus Bio). Por un pocillo de una placa de 6 pocillos, 100  $\mu$ L de OptiMEM se mezclaron con 2  $\mu$ g de ADN. Mientras tanto, 100  $\mu$ L de OptiMEM fueron mezclados con 5  $\mu$ L de TransIT e incubados durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las dos mezclas se combinaron e incubaron por otros 20 minutos a temperatura ambiente. El medio de las células fue sustituido por 800  $\mu$ L de medio completo fresco, al cual se le añadió 200  $\mu$ L de la mezcla, para un volumen total de 1 mL. Las células fueron incubadas durante 4 horas a 37°C, y seguidamente se volvió a cambiar el medio por medio completo fresco.

### ***II.8. Silenciamiento de genes mediante siRNA***

El procedimiento para la generación de Knock-downs mediante siRNA es similar al descrito anteriormente para la transfección de plásmidos. Tras la primera transfección, en este caso, se realizó una segunda transfección para asegurar un mejor silenciamiento. En cada ciclo de transfección se añadieron 3  $\mu$ L de siRNA a 20  $\mu$ M. El siRNA utilizado para el silenciamiento de TFEB fue el siguiente: ON-TARGETplus human TFEB siRNA Ref. L-009798-00 Dharmacon; como control en el silenciamiento, se transfectaron las células con Non target scrambled siRNA (Dharmacon D0018-10-50)

### ***II.9. Técnicas de Inmunocitoquímica y cuantificación de fluorescencia***

Las células se fijaron durante 10 minutos en metanol frío (co-localización entre 1LAMP1/LC3) (LAMP1 clon H4A3 Dev. Studies Hybridoma Bank 1/100; LC3 Novus NB100-2220 1/100), fueron lavadas 3 veces con PBS y permeabilizadas con 0.1% tritón x-100 durante 10 minutos a temperatura ambiente o en paraformaldehído 4% durante 5 minutos y permeabilizadas con metanol frío 3 minutos (co-localización LAMP1/Cathepsina D) (LAMP1 Cell signalling 9091S 1/100; Cathepsina D Abcam ab6313 1/200). Posteriormente, se lavaron otras 3 veces con PBS y se bloquearon con una solución al 10% de suero fetal de cabra en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Se incubó con el anticuerpo primario durante toda la noche en el medio de bloqueo a 4°C en cámara húmeda. Tras tres lavados con PBS, las células se incubaron con el anticuerpo secundario durante 1 hora en medio de

bloqueo a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron 3 veces con PBS y una vez con agua destilada para proceder a su montaje con ProLong con DAPI (Invitrogen). Los anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromos Alexa utilizados en las inmunocitoquímicas se obtuvieron todos de life technologies y fueron utilizados a una dilución 1/400: para la inmunocitoquímica LAMP1/catepsina D, se utilizaron cabra anti conejo alexa488 y cabra anti ratón Alexa555; para la inmunocitoquímica LAMP1/LC3, se utilizaron burro anti conejo alexa555 y burro anti ratón alexa488.

En los ensayos con microscopia de fluorescencia automatizada (células Hela transfectadas con wasabi-RFP-LC3 para medir el flujo autofágico), las placas de 96 pocillos fueron tratadas durante 5 minutos a 37°C con medio hipertónico (1 parte de medio DMEM más 4 partes de agua) para ayudar a la dispersión de las moléculas en el interior celular. Posteriormente fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 5 minutos y lavadas 3 veces con PBS para su posterior lectura en el lector Cellomics ArrayScan VTI HCS. Este ensayo está basado en la débil emisión de fluorescencia verde en los compartimientos ácidos (como los lisosomas). Cuando la proteína LC3 se encuentra en los autofagosomas, se puede observar la fluorescencia verde y roja, mientras que si se encuentra en los lisosomas, la fluorescencia verde se vuelve débil y prácticamente solo se puede apreciar la roja. El lector Cellomics cuenta la cantidad de vesículas que emiten solo en rojo (autolisosomas) y las vesículas que emiten en ambas longitudes de onda (autofagosomas), lo que nos permite distinguir entre compuestos que inducen o bloquean el flujo autofágico.

En los ensayos con células transfectadas con proteínas marcadas con GFP (PC12-GFP-htt74Q), las células se sembraron en placas de 96 pocillos con poliornitina 15 µg/mL (incubadas durante 1h a 37 °C) y fueron fijadas durante 10 minutos en paraformaldehído 4% y lavadas 3 veces con PBS. Posteriormente, la lectura de la señal de GFP fue llevada a cabo en un lector Thyphoon a 488nm. Para la determinación del número de células, la placa fue incubada con una dilución 1:2000 en PBS-tween de Cell Tag (Li-COR) durante 1 hora y escaneadas en un sistema Odyssey a 700nm después de dos lavados con PBS.

### ***II.10.Fraccionamiento citosólico/nuclear***

Las células se lavaron dos veces con PBS y fueron lisadas con 4 volúmenes (un volumen corresponde a 25 µL para un pocillo de una placa de 6 pocillos) de Buffer A (10 mM HEPES, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.4% NP-40, 1 mM DTT y 1x cocktail de inhibidores

de proteasas/fosfatasa) e incubados en hielo durante 30 minutos. Los lisados fueron centrifugados a 16,000 xg a 4°C durante 5 minutos. Se recolectó el sobrenadante y se desnaturizó con buffer Laemmli y se hirvió a 100°C durante 5 minutos.

Los pellets nucleares se resuspendieron en 3.5 volúmenes de Buffer B (20 mM HEPES, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 10% Glicerol, 1 mM DTT 1x cocktail de inhibidores de proteasas/fosfatasa), se incubaron durante 1 hora en hielo y se sonicaron ligeramente. Después de la centrifugación a 16,000 xg durante 5 minutos a 4°C, el sobrenadante se recolectó y desnaturizó como se ha descrito anteriormente. Ambas fracciones se utilizaron para realizar el inmunoblot. Los anticuerpos contra GAPDH (fracción citosólica) (Abcam ab8245) y Lamin-B (fracción nuclear) (Santa Cruz biotechnology sc-6217) se utilizaron como controles de la eficiencia de la purificación.

### ***II.11. Medición de pH lisosomal (Lysosensor yellow/blue)***

Las células se sembraron en placas especiales para la observación en el microscopio confocal de células vivas, se trataron durante 24 horas con las drogas apropiadas en cada experimento y posteriormente durante 30 minutos con 1µM del agente Lysosensor yellow/blue DND-160 (Molecular probes – Life technologies)

Para la medición del pH de los lisosomas se siguió el protocolo especificado por el fabricante. Lysosensor yellow/blue DND-160 proporciona una medida ratiométrica de la basificación del pH en los lisosomas. En pH ácidos, el agente da una coloración amarilla, mientras que en medios neutros o básicos, la coloración es azul. Debido a esta característica, se puede establecer el ratio de la fluorescencia obtenida para la emisión en amarillo con respecto a la emisión en azul y evaluar si hay cambios en el pH de los lisosomas.

### ***II.12. Western blot***

Las muestras se cargaron en geles del 10-15% de acrilamida y fueron transferidas a membranas de PVDF activadas con metanol en transferencia húmeda. Para los inmunoblot visualizados mediante ECL, se utilizaron membranas Immobilon-P PVDF, mientras que para las visualizadas mediante el sistema Odyssey se utilizaron Immobilon-FL (Millipore). El resto del protocolo para western blot se desarrolló de la manera descrita en el apartado I. Las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente (HRP-anticuerpos

para ECL e IRDye-secundarios para el sistema Odyssey) y revelados con ECL (Thermo Fisgher Scientific) y películas Fujifilm o directamente en Odyssey.

Para la evaluación de las principales rutas de señalización celular se utilizaron los siguientes anticuerpos; anti-ULK1 (unc-51 like autophagy activating kinase 1) (Cell signalling 4776S); anti-P-ULK1 S757 (Cell signalling 6888S) y anti- P-ULK1 S555 (Cell signalling 5869S) generados en conejo se utilizaron para el estudio de la reducción de la interacción entre beclina1-BCL-2, ya que es una kinasa que puede fosforilar beclina1; anti-ERK (Extracellular signal-regulated kinases) (Cell signalling 9102) y anti-P-ERK (Cell signalling 9101S) se utilizaron para determinar la activación de la ruta de MAP kinasas; anti-HMGB1 (High-mobility group protein B1) (Abcam ab18256-25) se utilizó en el estudio de la ubiquitinización de beclina1, también como posible disociador de la unión beclina1-BCL-2; anti-TFEB (Transcriptor factor EB) se utilizó para la determinación de la activación de este factor como inductor de autofagia (Cell signalling 4240); todos a una dilución 1/1000.

Para estudios de modulación de autofagia se utilizaron los siguientes anticuerpos: anti-LC3 (Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3) (Novus NB100-2220) como proteína marcadora de autofagosomas; anti-actina (sigma A2066) y anti-tubulina (sigma T9026) como controles de carga; anti-LAMP1 (Lysosomal-associated membrane protein 1) (Abcam ab24170) como proteína marcadora de lisosomas; anti-catepsina D (Abcam ab6313) como enzima proteolítica lisosomal y anti-p62 (BD transduction 610832) como sustrato de la degradación por autofagia; todos utilizados a una dilución 1/1000.

Para proteínas marcadas con tags, se han utilizado los siguientes anticuerpos en su detección: anti-GFP (Green fluorescent protein) (BD clontech 632375) a una dilución 1/3000; anti-HA (hemaglutinina) (Invitrogene 326700) y anti-Flag M2 (sigma F3165) a una dilución 1/1000.

Como anticuerpos secundarios se utilizaron anticuerpos unidos a peroxidasa para su determinación por ECL o anticuerpos con marcaje fluorescente para su detección en Odyssey: anti-Ig de conejo-HRP generado en burro (Fisher scientific NA934), de ratón generado en oveja (Fisher scientific NA931) y de cabra generado en conejo (Invitrogen 611620) fueron utilizados a una dilución 1/3000. Anti-Ig de cabra generado en burro IRDye 800cw (Odyssey 926-32214), de conejo generado en cabra IRDye 680cw (Odyssey 926-32221) y 800cw



(Odyssey 926-32211), de ratón generado en cabra IRDye 680cw (Odyssey 926-32220) y 800cw (Odyssey 926-32210) fueron utilizados a una dilución 1/4500.

Como marcador de peso molecular en las electroforesis, se utilizó seeBlue plus2 prestained standars (Invitrogen LC5925). Para el stripping the membranas en la detección de proteínas fosforiladas y su versión sin fosforilar, se utilizó la solución de stripping re-blot plus string solution 10x (Millipore 2504) diluida en agua.

### ***II.13. Microscopía***

Las imágenes fueron tomadas a 37°C con un microscopio confocal laser Zeiss LSM 710 utilizando lentes 63x/1.40 Oil DIC M27 y el programa ZEN para la adquisición de imágenes (Carl Zeiss). La microscopia de fluorescencia automatizada fue llevada a cabo con un lector Cellomics ArrayScan VTI HCS (Thermo Fisher Scientific). La aplicación de detectores de puntos fue utilizada para cuantificar el número de vesículas autofágicas y precursores, como el número de puntos positivos a GFP-LC3 y mRFP-LC3 (en células HeLa).

El porcentaje de co-localización fue determinado utilizando el software Volocity (Perkin Elmer). Se utilizó el coeficiente de Pearson que mide la proporción de una proteína que co-localiza con una segunda proteína, y es una indicación de coocurrencia (Dunn, Kamocka et al. 2011). Con esta medida se es capaz de determinar la proporción de señal para LC3 que coincide con la señal de LAMP1.

### ***II.14. Análisis estadístico***

Los niveles de significancia por comparación entre dos grupos fueron determinados utilizando un análisis por t de student pareada en el software Graphpad prism.

## *Resultados*

---



# ***RESULTADOS***

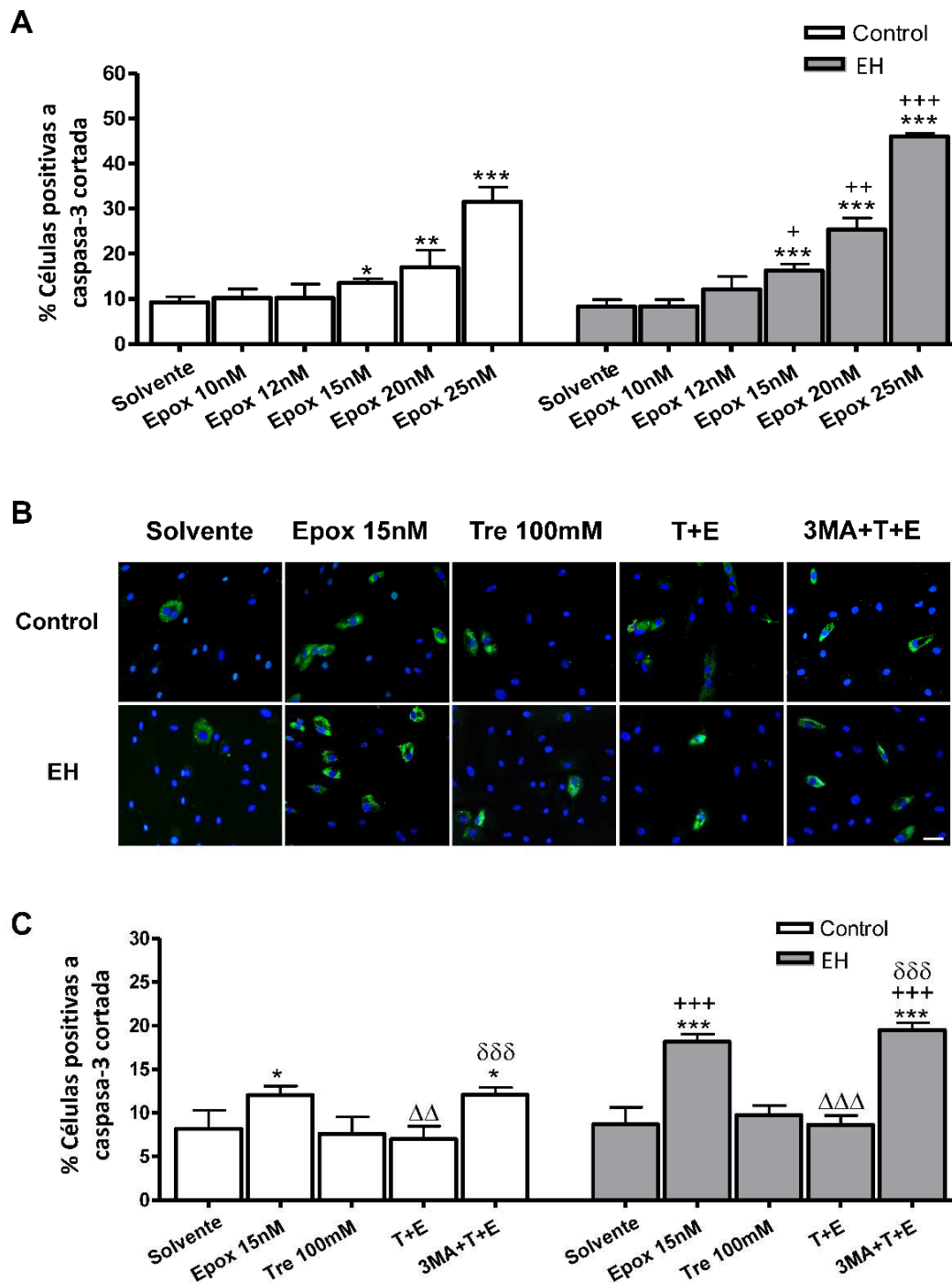
## **1. TREHALOSA COMO AGENTE PROTECTOR Y TERAPÉUTICO EN EH**

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio demostraron que la trehalosa es capaz de incrementar el número de autofagosomas y marcadores de autofagia en una línea humana de neuroblastoma (NB69), previniendo además de daños inducidos por inhibición de proteasoma (Casarejos, Solano et al. 2011). El objetivo de este estudio es determinar los efectos de la epoxomicina (un inhibidor proteasomal) en la acumulación de proteínas y la viabilidad celular, en un modelo de EH proveniente de cultivos primarios de fibroblastos de pacientes humanos. Además, se pretende estudiar si la estimulación de la autofagia producida por la trehalosa, como mecanismo protector ante la disfunción del sistema ubiquitina-proteasoma, revierte el daño inducido por la epoxomicina en fibroblastos control y con EH.

### **1.1 Efectos de la epoxomicina y trehalosa sobre viabilidad celular**

Para determinar la concentración más baja de epoxomicina, que permite discriminar en la activación de la proteína pro-apoptótica caspasa-3, entre fibroblastos controles y con EH, se realizó una curva dosis-respuesta con diferentes concentraciones del inhibidor (Figura 6A). Los resultados nos llevaron a la utilización de la concentración de 15 nM en los siguientes experimentos, ya que es la mínima concentración en la que se empiezan a observar efectos en la activación de caspasas.

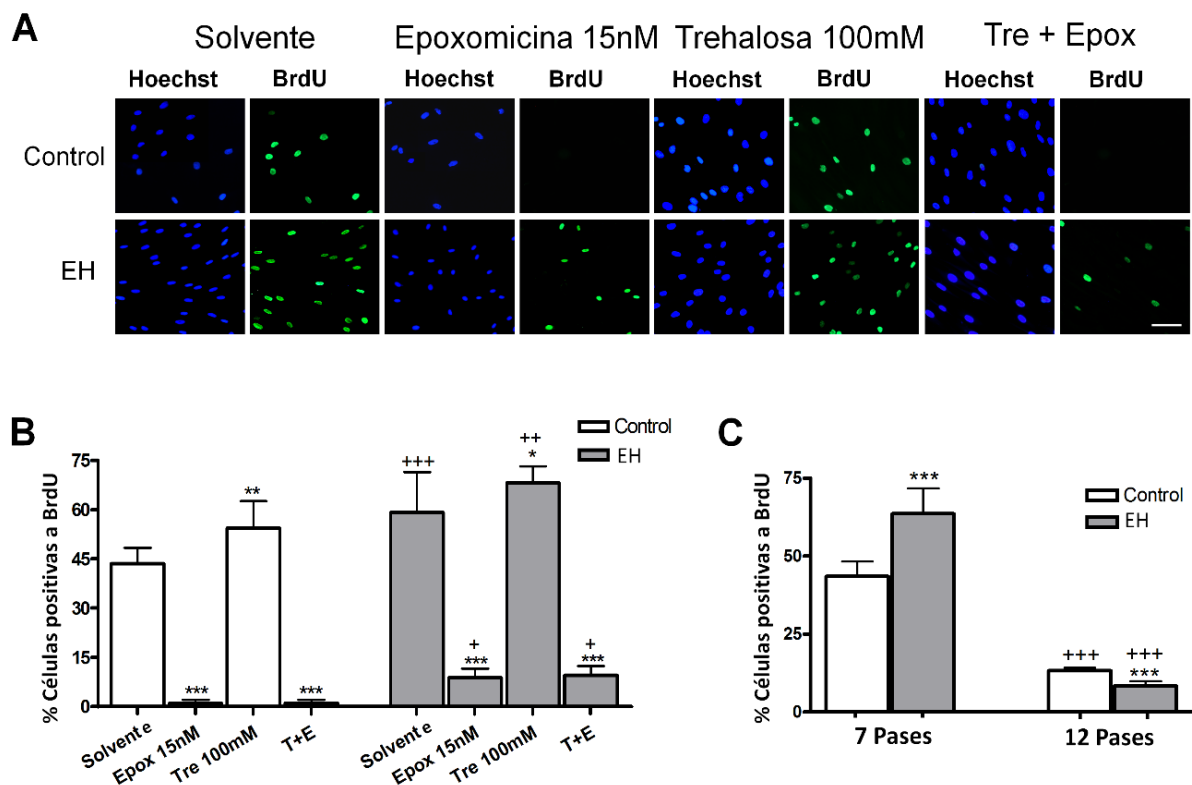
Después de 24 horas de tratamiento, se puede apreciar un efecto mayor en la activación de caspasas en los fibroblastos EH, con respecto a los controles (Figura 6). El efecto tóxico de la epoxomicina se revierte con la trehalosa a una concentración de 100 mM (añadida 15 minutos antes) en ambos genotipos, además, este efecto protector es inhibido al tratar a las células con 3-metiladenina, un inhibidor de la autofagia (Figura. 6B-C).



**Figura 6. Efectos diferenciales de la epoxomicina y la trehalosa en la viabilidad celular de fibroblastos humanos control y con EH.** (A) Efecto dosis-dependiente de la epoxomicina en la activación de caspasa-3, un indicador de apoptosis. (B) Fotomicrografías de células positivas para el fragmento activo de la caspasa-3 (verde) y núcleos totales teñidos con bis-benzimida (azul) después del tratamiento con epoxomicina y trehalosa. Escala = 20  $\mu$ m. (C) Porcentaje de células positivas para el fragmento activo de la caspasa-3 en fibroblastos control y EH después de los tratamientos con epoxomicina y trehalosa. Los valores se expresan como la media  $\pm$  SD, n = 4 pacientes. Número de células en fibroblastos control (media por campo) =  $31.876 \pm 1.124$ , n = 4. Número de células en fibroblastos EH (media por campo) =  $44.756 \pm 2.456$ , n = 4. Los datos de cada paciente fueron obtenidos utilizando 4 réplicas. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante una ANOVA de una vía con medidas repetidas, seguida de un test de comparación múltiple Bonferroni: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs Solvente; + $p < 0.05$ , ++ $p < 0.01$ , +++ $p < 0.001$  EH vs control;  $\Delta\Delta p < 0.01$ ,  $\Delta\Delta\Delta p < 0.001$  trehalosa + epoxomicina vs epoxomicina;  $\delta\delta\delta p < 0.001$  3-metiladenina + trehalosa + epoxomicina vs trehalosa + epoxomicina.

## 1.2 Alteraciones en el ciclo celular

Tras la observación en cultivo de un crecimiento diferencial entre los fibroblastos control y EH, decidimos estudiar el número de células en división, mediante la incorporación de BrdU, en condiciones basales y después de los diferentes tratamientos en ambos genotipos. Los resultados muestran una clara reducción de la capacidad divisoria tras el tratamiento con epoxomicina y, aunque la trehalosa produce un incremento en el número de células replicantes en condiciones basales, no es capaz de revertir el efecto del inhibidor proteasomal tras 48 horas de tratamiento (Figura 7A-B).



**Figura 7. Efectos de la epoxomicina y trehalosa en el ciclo celular de fibroblastos de piel humanos.** (A) Fotomicrografías de células positivas para BrdU (verde) y número total de núcleos teñidos con bis-benzimidazolo (azul) de pacientes controles y con EH. (Barra de escala = 20  $\mu$ m). (B) Porcentaje de células BrdU positivas con respecto al número total de células. (C) Comparación del porcentaje de células BrdU positivas en número de pases tempranos (entre 1 y 10 pases) y tardíos (por encima de 10 pases). Los valores se expresan como la media  $\pm$  SD, n = 4 pacientes. Número de células control (media por campo) =  $33.806 \pm 1.417$ , n = 4. Número de células EH (media por campo) =  $41.566 \pm 2.025$ , n = 4. Los datos de cada paciente se obtuvieron utilizando 4 réplicas. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante una ANOVA de una vía con medidas repetidas, seguida de un test de comparación múltiple Bonferroni: \*p<0.05, \*\*\*p<0.001 vs Solvente; +p<0.05, ++p<0.01, +++p<0.001 EH vs control.

Los fibroblastos humanos provenientes de cultivos primarios, comienzan a mostrar una disminución de la replicación a partir del pase 10-12. Nuestros experimentos muestran cómo se produce un cambio en el ciclo celular entre fibroblastos controles y EH, según el

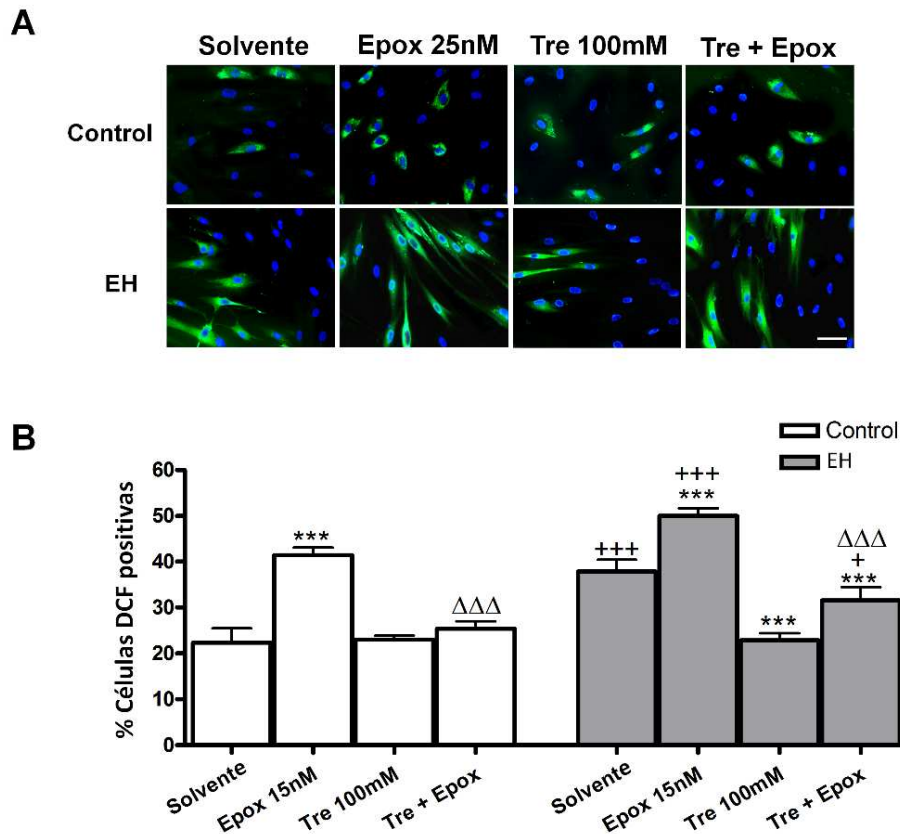
número de pases. Los fibroblastos EH jóvenes, tienen una mayor capacidad proliferativa, sin embargo, cuando estos fibroblastos han estado durante varios pases en cultivo, muestran una menor incorporación de BrdU, si se los compara con los controles (Figura 7C).

### **1.3 Estudio de los niveles de especies reactivas de oxígeno**

La acumulación de radicales libres (ROS) es indicativo de daño mitocondrial y estrés oxidativo, fenotipo que presentan los pacientes con EH. Debido a este hecho decidimos estudiar el papel de la epoxomicina y la trehalosa, ante la presencia de un exceso de radicales libres. Como es indicativo de la enfermedad, los fibroblastos EH presentan unos niveles de ROS elevados comparados con los controles, medidos como el número de células positivas a DCF con respecto al número de células totales (Figura 8). La epoxomicina incrementa los niveles de ROS en ambos tipos de fibroblastos, y dicho incremento es totalmente contrarrestado mediante el tratamiento con trehalosa, además, la trehalosa es capaz de reducir los niveles basalmente elevados de ROS en los fibroblastos EH. Las fotomicrografías se obtuvieron utilizando diferentes ajustes en la cámara para intentar obtener una intensidad similar entre los genotipos, debido a que los fibroblastos EH presentaban una mayor intensidad de fluorescencia en las medidas de ROS a nivel basal (Figura 8).

### **1.4 Efectos sobre la acumulación de proteínas y la actividad proteasomal**

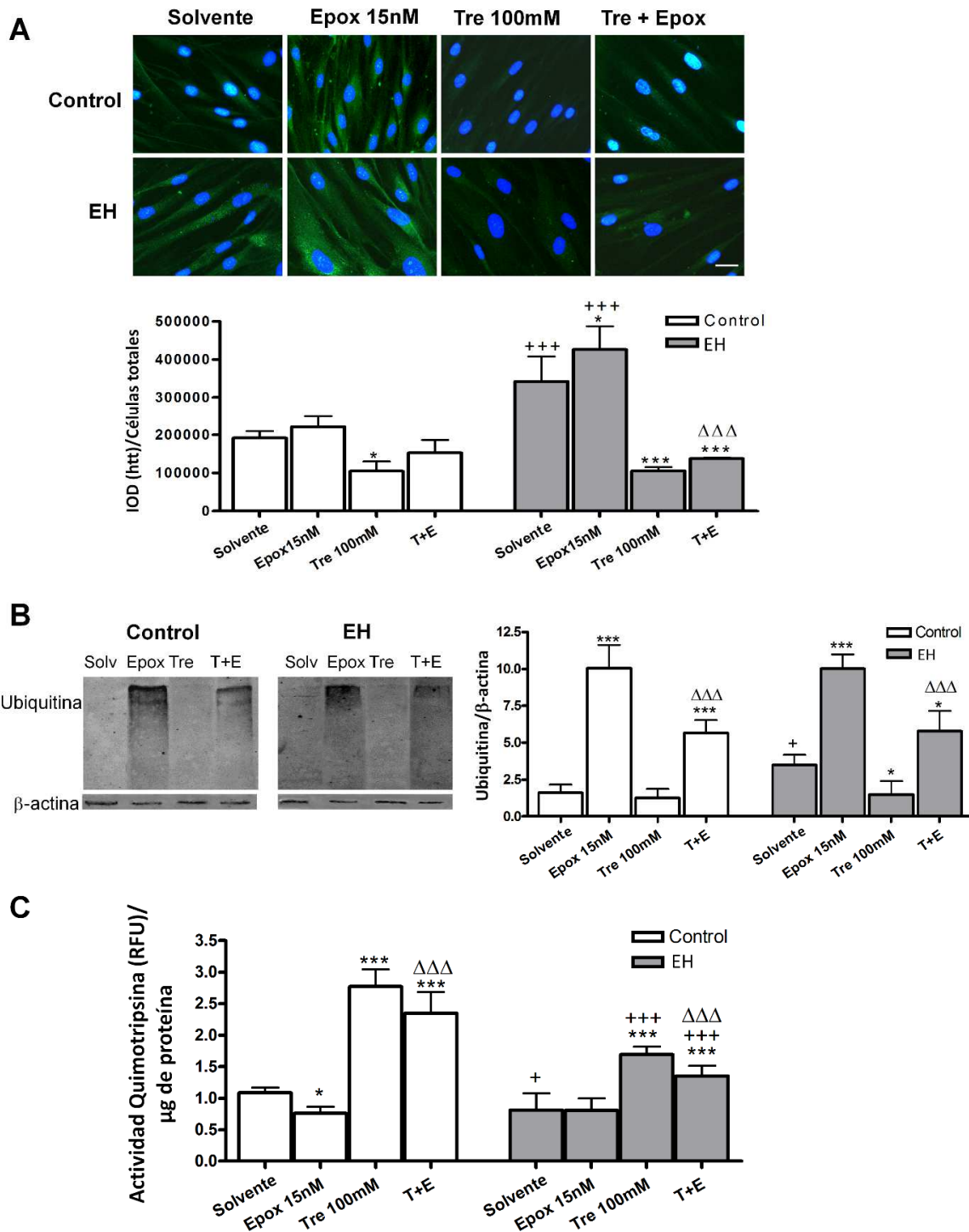
Una de las características de la EH, es la acumulación de proteínas mal plegadas, lo que sugiere un mal funcionamiento de los sistemas de degradación de proteínas. Añadiendo epoxomicina al sistema celular, estamos incrementando el fenotipo EH para comprobar si la trehalosa es capaz de revertir los efectos, cuando el sistema de degradación de proteínas está aún más comprometido. En células sin tratamiento, la proteína huntingtina y las proteínas poli-ubiquitinadas están incrementadas en fibroblastos EH comparados con controles. El tratamiento con epoxomicina incrementa aún más la acumulación de este tipo de proteínas (Figura 9A-B). La trehalosa consigue reducir los niveles de huntingtina por debajo de los basales, en fibroblastos control y EH, incluso si también han sido tratados con epoxomicina (Figura 9A). El co-tratamiento con trehalosa parcialmente contrarresta los efectos de la epoxomicina, en la acumulación de proteínas poli-ubiquitinadas. Como ocurriría con los niveles de ROS, la trehalosa es capaz de reducir los niveles basales de proteínas poli-ubiquitinadas en fibroblastos EH, siendo comparables a los niveles registrados en los fibroblastos controles (Figura 9B).



**Figura 8. La epoxomicina incrementa los niveles de ROS, los cuales son reducidos por trehalosa en fibroblastos control y EH. (A)** Inmunocitoquímica para 2',7'-dichlorofluorescina (DCF) (verde) y total de núcleos teñidos con bis-benzimida en fibroblastos control y EH. **(B)** Porcentaje de células positivas a DCF con respecto al número total de células. Barra de escala = 20  $\mu$ m. Los valores se expresan como la media  $\pm$  SD, n = 4 pacientes. Número de células control (media por campo) = 28.836  $\pm$  0.9280, n = 4. Número de células EH (media por campo) = 46.406  $\pm$  5.247, n = 4. Los datos de cada paciente fueron obtenidos utilizando 4 réplicas. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante una ANOVA de una vía con medidas repetidas, seguida de un test de comparación múltiple Bonferroni: \*\*\*p<0.001 vs solvente; +p<0.05, +++p<0.001 EH vs control;  $\Delta\Delta\Delta$ p<0.001 trehalosa + epoxomicina vs epoxomicina.

Los estudios de la actividad proteasomal (actividad quimotripsina) muestran una reducción de dicha actividad en los fibroblastos EH respecto a los controles. La epoxomicina reduce aún más la actividad quimotripsina del proteasoma, de manera significativa en los fibroblastos control, y la trehalosa contrarresta los efectos tóxicos de la epoxomicina y consigue incrementar la actividad del proteasoma por encima de los niveles basales en ambos genotipos (Figura 9C).



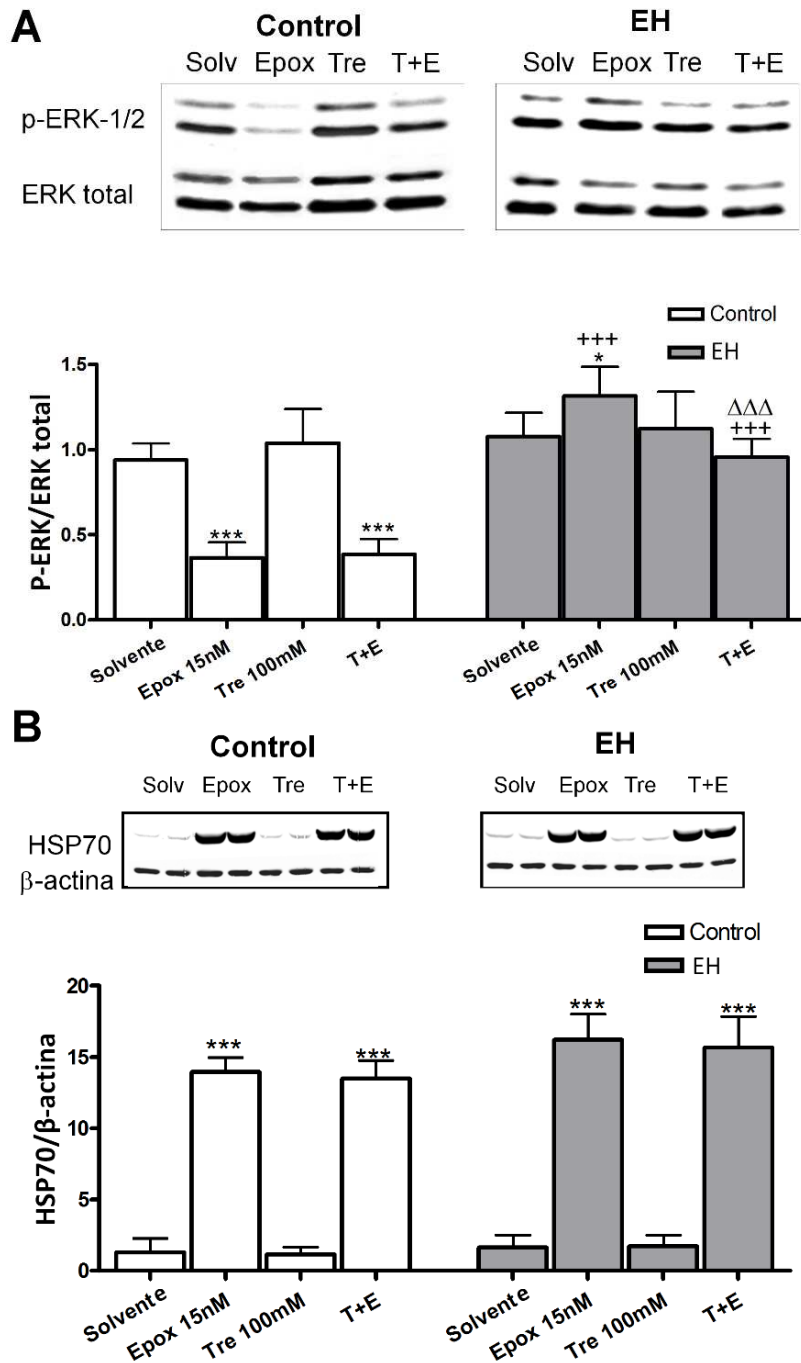


**Figura 9. La trehalosa protege de la acumulación de huntingtina y proteínas poli-ubiquitinadas inducida por epoxomicina e incrementa la actividad UPS. (A)** Inmunocitoquímica de huntingtina (verde) y núcleos totales teñidos con bis-benzimida (azul). El histograma muestra el cociente entre la intensidad de fluorescencia de la huntingtina (IOD) con respecto al número de células totales. Barra de escala = 20  $\mu$ m. **(B)** Acumulación de proteínas ubiquitinadas y su correspondiente análisis densitométrico. **(C)** Actividad quimotripsina del proteasoma. Los valores se expresan como la media  $\pm$  SD, n = 4 pacientes. Número de células control (media por campo) = 32.666  $\pm$  1.472, n = 4. Número de células EH (media por campo) = 44.676  $\pm$  0.3405, n = 4. Los datos de cada paciente fueron obtenidos utilizando 4 réplicas. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante una ANOVA de una vía con medidas repetidas, seguida de un test de comparación múltiple Bonferroni: \*p<0.05, \*\*\*p<0.001 vs solvente; +p<0.05, +++p<0.001 EH vs control;  $\Delta\Delta\Delta$ p<0.001 trehalosa + epoxomicina vs epoxomicina.

## **1.5 Efectos de la epoxomicina y la trehalosa en la activación de ERK y en la expresión de chaperonas**

Uno de los grupos de proteínas más importantes dentro de las rutas de señalización, es el grupo de las MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases). Debido a su importancia en la fosforilación de proteínas como medio de transformación de señales, decidimos estudiar la activación de una de las proteínas pertenecientes a este grupo, ERK1/2 (Extracellular signal-regulated kinases). Después de 24 horas de tratamiento, la epoxomicina produce una disminución de la activación de ERK1/2 (medido como el ratio de ERK1/2 fosforilado con respecto a ERK1/2 total) en fibroblastos controles, y la trehalosa no es capaz de modificar esta disminución producida por epoxomicina en co-tratamiento. En fibroblastos EH, la epoxomicina incrementa los niveles de ERK fosforilado y el co-tratamiento con trehalosa, en este caso, si revierte los efectos de la epoxomicina en la fosforilación de ERK1/2 (Figura. 10A).

Las proteínas HSP (Heat shock protein) son conocidas por su respuesta ante situaciones de estrés celular y por su intervención como chaperonas para ayudar en la conservación o degradación de proteínas desnaturalizadas. Debido a que la EH se caracteriza por presentar una acumulación de proteínas mal plegadas, decidimos comprobar la expresión de la proteína HSP70 en fibroblastos control y con EH, después del tratamiento con epoxomicina (que aumenta el estrés por proteínas mal plegadas) y de trehalosa (como agente protector). La epoxomicina produce un incremento notable de los niveles de HSP70 en ambos genotipos, que no es revertido por la trehalosa (Figura 10B).



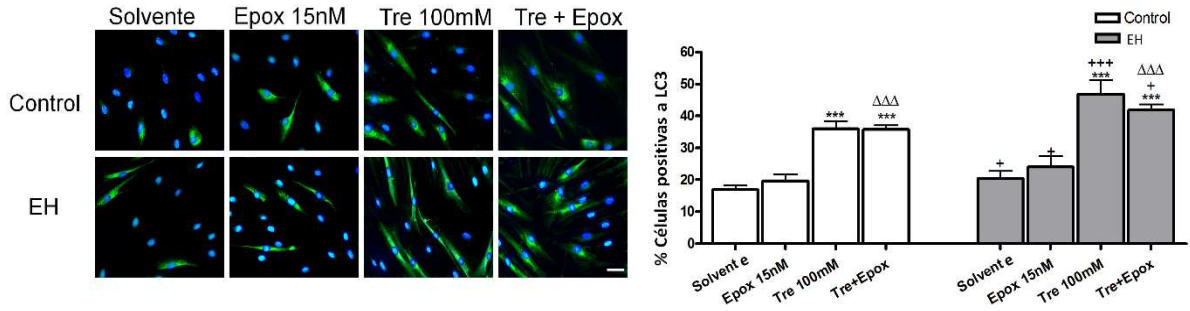
**Figura 10. Efectos de la epoxomicina y la trehalosa en la activación de ERK1/2 y en la expresión de la chaperona HSP70 en fibroblastos control y EH.** (A) Western blot de la expresión de p-ERK1/2 con respecto a ERK1/2 total y su correspondiente análisis densitométrico en fibroblastos control y EH. (B) Western blot de la expresión de HSP70 y su correspondiente análisis densitométrico. Los valores se expresan como la media  $\pm$  SD,  $n = 4$  pacientes. Los datos de cada paciente fueron obtenidos utilizando 4 réplicas. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante una ANOVA de una vía con medidas repetidas seguida de un test de comparación múltiple Bonferroni: \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs solvente; +++ $p < 0.001$  EH vs control;  $\Delta\Delta\Delta p < 0.001$  trehalosa + epoxomicina vs epoxomicina. Hay una interacción entre el efecto de la epoxomicina y el genotipo en la activación de ERK ( $F = 71.13$  con un valor  $p = 0.0001$ ). En EH, hay una interacción entre los efectos de la epoxomicina y la trehalosa en la activación de ERK ( $F = 12.67$  con un valor  $p = 0.0013$ ).

## **1.6 Macroautofagia y autofagia mediada por chaperonas en la EH**

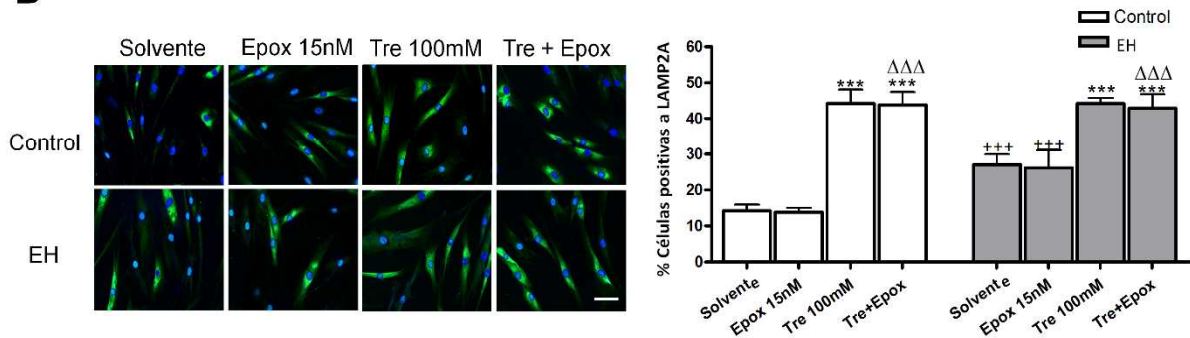
Como se ha mencionado anteriormente, en EH hay una acumulación de proteínas con un plegamiento aberrante, además de un déficit en la actividad del proteasoma. La autofagia es otro de los mecanismos de degradación de proteínas celulares que puede verse afectado por esta desregulación en los sistemas de eliminación de proteínas. Dada su importancia en la EH, decidimos estudiar la macro-autofagia mediante la expresión de LC3, un marcador de autofagosomas; y la autofagia mediada por chaperonas, mediante la co-localización de HSC70 (heat shock cognate 71 kDa protein, que actúa como chaperona) con LAMP2-A (Lysosome-associated membrane protein 2, un marcador lisosomal). La chaperona HSC70 se une a proteínas mal plegadas y media en su degradación a través de la asociación con LAMP2-A en los lisosomas.

La expresión de LC3 se incrementa en los fibroblastos con EH y la trehalosa produce un incremento 2 veces mayor, incluso cuando se ha tratado a las células con epoxomicina, en ambos genotipos (Figura 11A). Al igual que ocurre con los niveles de LC3, los niveles de LAMP2-A son más altos en los fibroblastos EH (Figura 11B), posiblemente como un mecanismo compensatorio de respuesta por el déficit de la actividad UPS y la acumulación de proteínas ubiquitinadas. La trehalosa incrementa muy significativamente, el número de células positivas a LAMP2-A en presencia o ausencia de epoxomicina (Figura 11B). El incremento en la co-localización entre HSC70 y LAMP2-A nos indica que la trehalosa también estimula la autofagia mediada por chaperonas (CMA) (Figura 11C).

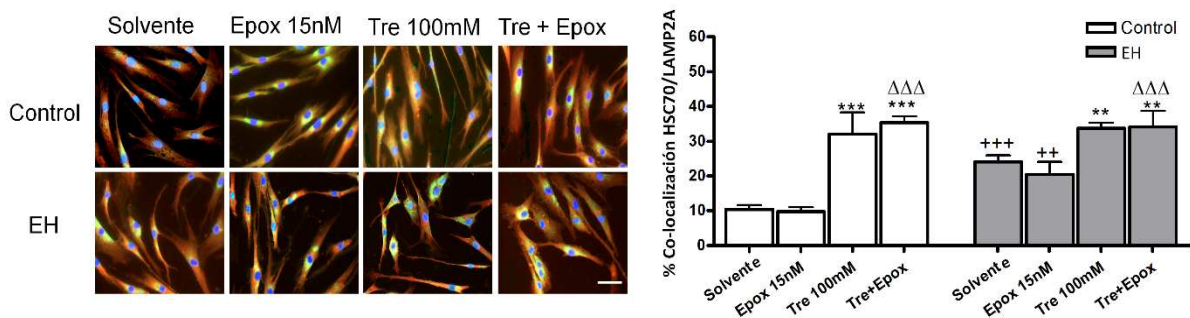
**A**



**B**



**C**



**Figura 11. Ruta de macroautofagia y autofagia mediada por chaperonas en fibroblastos de piel humanos control y EH.** (A) Inmunocitoquímica de LC3 (verde) y núcleos totales teñidos con bis-benzimida (azul) y el porcentaje de células positivas a LC3 con respecto al número total de células. (B) Inmunocitoquímica de LAMP2-A (verde) y núcleos totales teñidos con bis-benzimida (azul) y el porcentaje de células positivas a LAMP2-A con respecto al número total de células. (C) Inmunocitoquímica de la co-localización (amarillo) de LAMP2-A (verde) y HSC70 (rojo) y el porcentaje de la co-localización con respecto al número total de células. Barra de escala = 20  $\mu$ m. Los valores se expresan como la media  $\pm$  SD, n = 4 pacientes. Número de células control (media por campo) = 30.945  $\pm$  2.012, n = 4. Número de células EH (media por campo) = 46.896  $\pm$  4.587, n = 4. Los datos de cada paciente fueron obtenidos utilizando 4 réplicas. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante una ANOVA de una vía con medidas repetidas seguida de un test de comparación múltiple Bonferroni: \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 vs solvente; +p<0.05, ++p<0.01, +++p<0.001 EH vs control;  $\Delta\Delta\Delta$ p<0.001 trehalosa + epoxomicina vs epoxomicina.

## **2. MECANISMO MOLECULAR DE LA TREHALOSA COMO AGENTE TERAPÉUTICO Y POTENCIADOR DE LA AUTOFAGIA**

Los resultados prometedores obtenidos en el estudio del efecto protector de la trehalosa en fibroblastos humanos provenientes de pacientes con EH, nos alentaron a comenzar un nuevo proyecto para determinar el mecanismo molecular por el cual la trehalosa induce la autofagia.

El mecanismo por el cual la trehalosa promueve la autofagia es desconocido, aunque sí se sabe que es un proceso independiente de mTOR (Sarkar, Davies et al. 2007), por lo que empezamos estudiando las principales rutas de señalización implicadas en autofagia que no necesitan de la inhibición de mTOR para su activación.

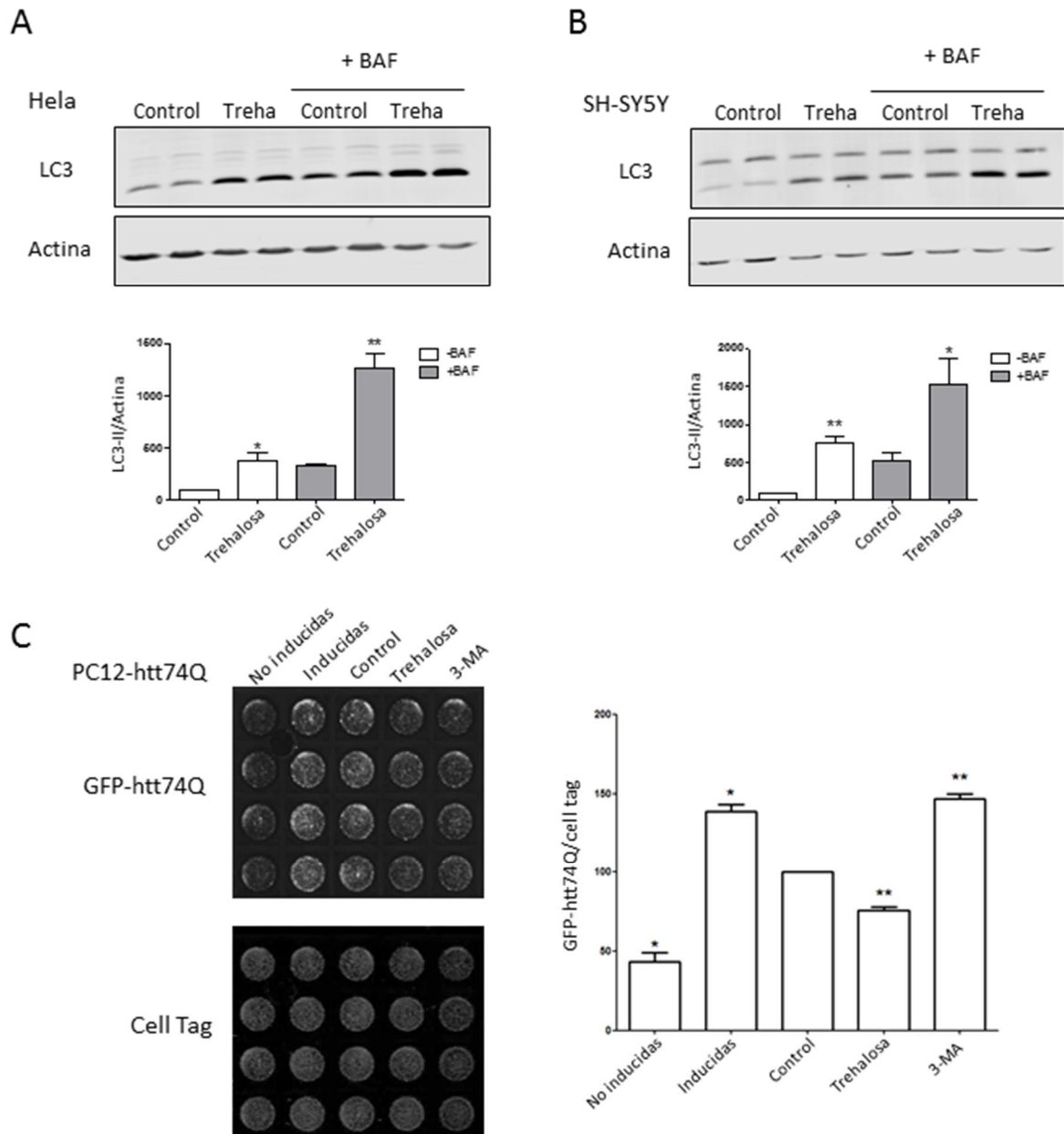
### **2.1 Inducción de la autofagia y eliminación de proteínas inducido por trehalosa**

Para corroborar el efecto de la trehalosa tanto en inducción de autofagia como en su capacidad en eliminación de proteínas, se realizaron diferentes experimentos en diferentes líneas celulares para mostrar el efecto de este disacárido.

La proteína LC3, se utiliza para la evaluación del flujo autofágico. Es una proteína que se asocia a la membrana de los autofagosomas, una mayor expresión de esta proteína generalmente se relaciona con una acumulación de autofagosomas y consecuentemente, la inducción de autofagia. Así mismo, la acumulación de estas vesículas puede tener lugar por un bloqueo en la ruta autofágica, para diferenciar la inducción del bloqueo de la autofagia, utilizamos bafilomicina, un bloqueador de la autofagia. Si el compuesto que estamos añadiendo al medio es un inductor de la autofagia, al tener bloqueada la ruta por la acción de la bafilomicina, producirá una mayor acumulación de autofagosomas en la célula. Si por el contrario, estamos añadiendo al medio un bloqueador, al estar ya ruta bloqueada previamente por la bafilomicina, no se producirá una acumulación extra de autofagosomas. Este sistema nos permite diferenciar entre inductores y bloqueadores de la autofagia. Utilizamos este tipo de aproximación en células Hela y SH-SY-5Y para mostrar el efecto inductor de autofagia de la trehalosa (Figura 12A y B).

Otra de las cualidades de un buen inductor de la autofagia, es la capacidad de incrementar la eliminación de proteínas dentro de la célula. Como se ha mostrado en el apartado anterior, la trehalosa es capaz de disminuir la acumulación de huntingtina y de proteínas ubiquitinizadas en un modelo celular humano de fibroblastos de piel. Igualmente, la

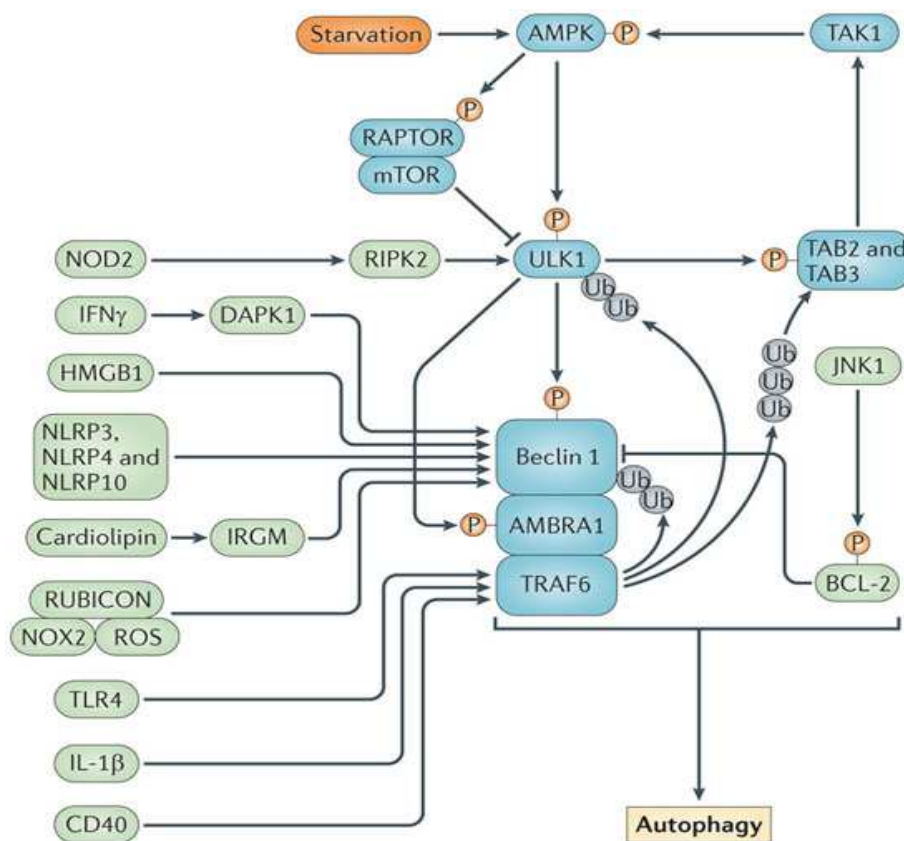
trehalosa disminuye la formación de agregados de huntingtina en células PC12-htt74Q que sobreexpresan el exon1 de la proteína huntingtina mutada (Figura 12C).



**Figura 12. Efecto de la trehalosa en la inducción de autofagia y eliminación de proteínas.** (A) Expresión de LC3-II en presencia y ausencia de bafilomicina (4h) después del tratamiento con trehalosa (24h) en células HeLa y su correspondiente análisis densitométrico. (B) Expresión de LC3-II en presencia y ausencia de bafilomicina (4h) después del tratamiento con trehalosa (24h) en células SH-SY5Y y su correspondiente análisis densitométrico. (C) Eliminación de GFP-htt74Q en células PC12 con diferentes tratamientos en células PC12 medido por fluorescencia y su correspondiente análisis densitométrico. Los valores se expresan como la media  $\pm$  SEM. Los datos corresponden a 3 experimentos independientes realizados en duplicados (figuras A y B) y en cuadruplicados (figura C). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante una t de Student Pareada: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  vs Control.

## 2.2 Estudio de las principales rutas de señalización

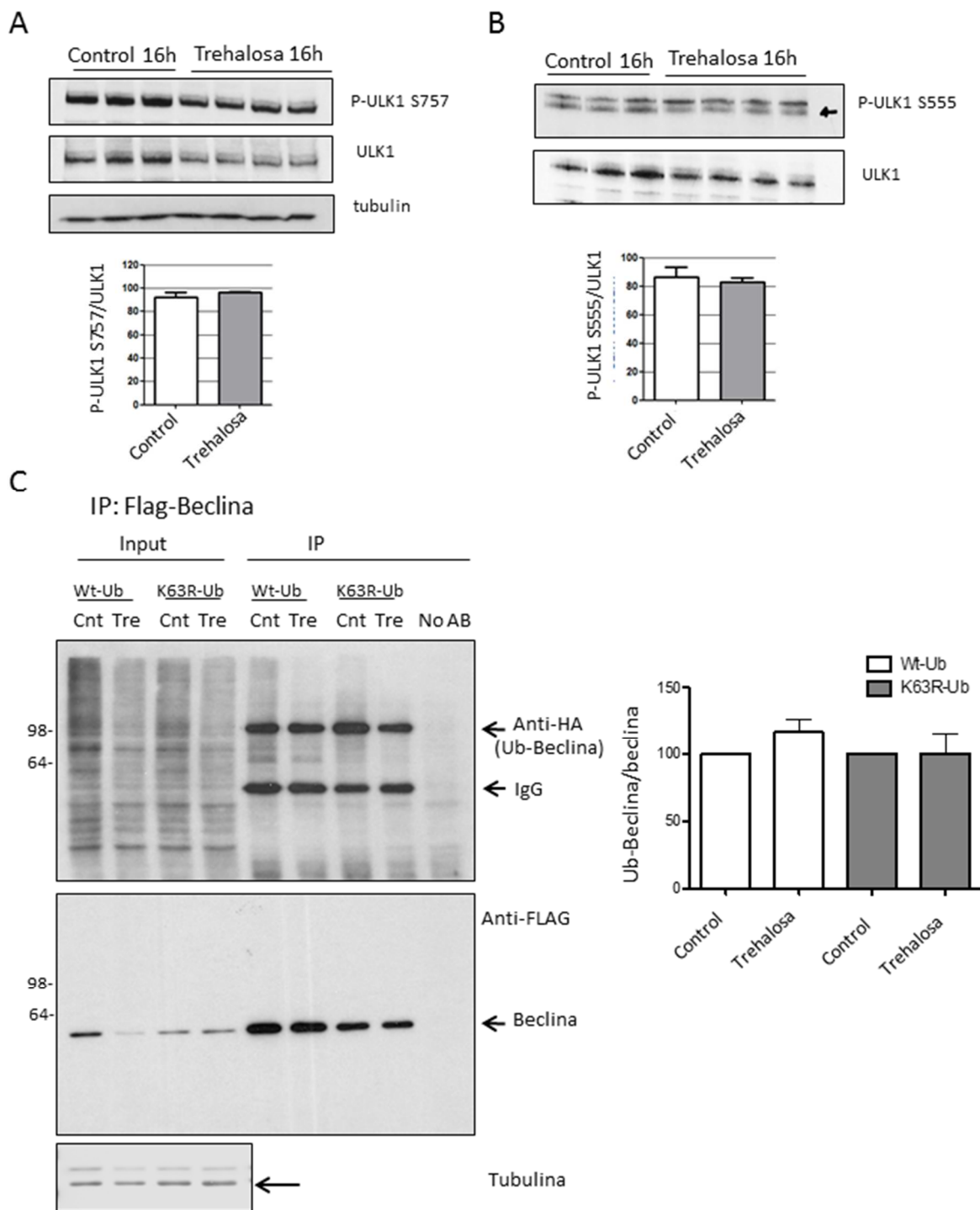
Como se muestra en la figura 13, uno de las principales proteínas implicadas en autofagia es ULK1. Esta serina/treonina quinasa es capaz de fosforilar a Beclina-1, una proteína clave para la inducción de la autofagia. Esta fosforilación facilita la disociación de Beclina-1 de Bcl-2, proteína represora de la actividad Beclina, por lo que ésta queda libre y produce la inducción de la autofagia (Russell, Tian et al. 2013).



**Figura 13. Paralelismos entre la señalización metabólica e inmune en la activación de la autofagia (Deretic, Saitoh et al. 2013).** Este modelo propone que las señales inmunes y nutricionales convergen para activar una cascada similar. El estado nutricional, como la hambruna, produce señales que se transducen vía mTOR y que activan AMPK, la cual activa ULK1 que fosforila beclina1, activando AMBRA1 y TAB2-en estado de descanso, TAB2 y TAB3 se unen a beclinal y reprimen su actividad. TAB2 activa TAK1 para aumentar aún más la actividad de AMPK. AMBRA1 junto con beclina1, reclutan a TRAF6. TRAF6 actúa como una ubiquitina ligasa E3, generando cadenas poliubiquitinadas que estabilizan y activan ULK1 y beclina1, y probablemente activa el complejo TAB2 y TAB3-TAK1. La activación concomitante de ULK1 y beclina1 induce la autofagia a través de la proteína quinasa ULK1 (vía AMPK) y la quinasa de lípidos VPS34 (vía beclina1). BCL-2, B cell lymphoma 2; DAPK1, death-associated protein kinase 1; HMGB1, high-mobility group box 1 protein; IL-1 $\beta$ , interleukin-1 $\beta$ ; IRGM, immunity-related GTPase family M protein; JNK1, Jun N-terminal kinase 1; NLRP, NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein; NOD2, nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2; NOX2, NADPH oxidase 2; P, phosphorylation; RAPTOR, regulatory-associated protein of mTOR; RIPK2, receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2; ROS, reactive oxygen species; RUBICON, run domain beclin 1-interacting and cysteine-rich-containing protein; TLR4, Toll-like receptor 4; Ub, ubiquitinación. mTOR, mammalian target of rapamycin; AMPK, AMP-activated protein kinase; AMBRA1, BECN1-regulated autophagy protein 1; TAB2, TAK1-binding protein 2; TAK1, TGF $\beta$ -activated kinase 1; TRAF6, TNF receptor-associated factor 6.



La trehalosa no produce incremento en la fosforilación (y consiguiente activación) de ULK1 en los residuos serina 757 ni serina 555 (Figura 14A y B), por lo que la ruta de ULK1 parece no ser la implicada en el mecanismo de la trehalosa. Otra de las rutas que permite la liberación de Beclina-1 del complejo Beclina-1/Bcl-2 es la ubiquitinación de Beclina-1 con ubiquitinas enlazadas en lisina 63 (Shi and Kehrl 2010). Determinamos el grado de ubiquitinación de Beclina-1 transfectando células Hela con Beclina-1 marcada con Flag y ubiquitina (WT y mutante K63S que no puede formar enlaces entre ubiquitinas mediante la lisina 63) marcada con hemaglutitina. La sobreexpresión de estas proteínas nos permite analizar la ubiquitinación de Beclina-1 y su relevancia en el mecanismo molecular de la trehalosa. Realizamos una inmunoprecipitación con anticuerpos anti Flag y analizamos cuanta proteína marcada con hemaglutinina-ubiquitina (WT y mutante) obteníamos en presencia y ausencia de trehalosa. Los resultados en la figura 14C muestran como no hay diferencias en el grado de ubiquitinación total de la proteína Beclina, ni en la ubiquitinación por lisina 63. La ubiquitinación de Beclina, consecuentemente, no parece ser el mecanismo por el cual la trehalosa induce autofagia en células Hela.



**Figura 14. Estudio del papel de ULK1 y TRAF6 en la activación de la autofagia por la trehalosa. (A y B)** Activación de ULK1 en diferentes sitios de fosforilación tras el tratamiento con trehalosa (16h) en células HeLa y su correspondiente análisis densitométrico. **(C)** Inmunoprecipitación de flag-beclina1 en células HeLa sobre-expresando ubiquitina marcada con hemaglutinina (WT y K63R) tras el tratamiento con trehalosa (24h) y su análisis densitométrico. Los valores se expresan como la media  $\pm$  SEM. Los datos corresponden a 3 experimentos independientes realizados en triplicados (figuras A y B) y en duplicados (figura C). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante una t de Student Pareada.

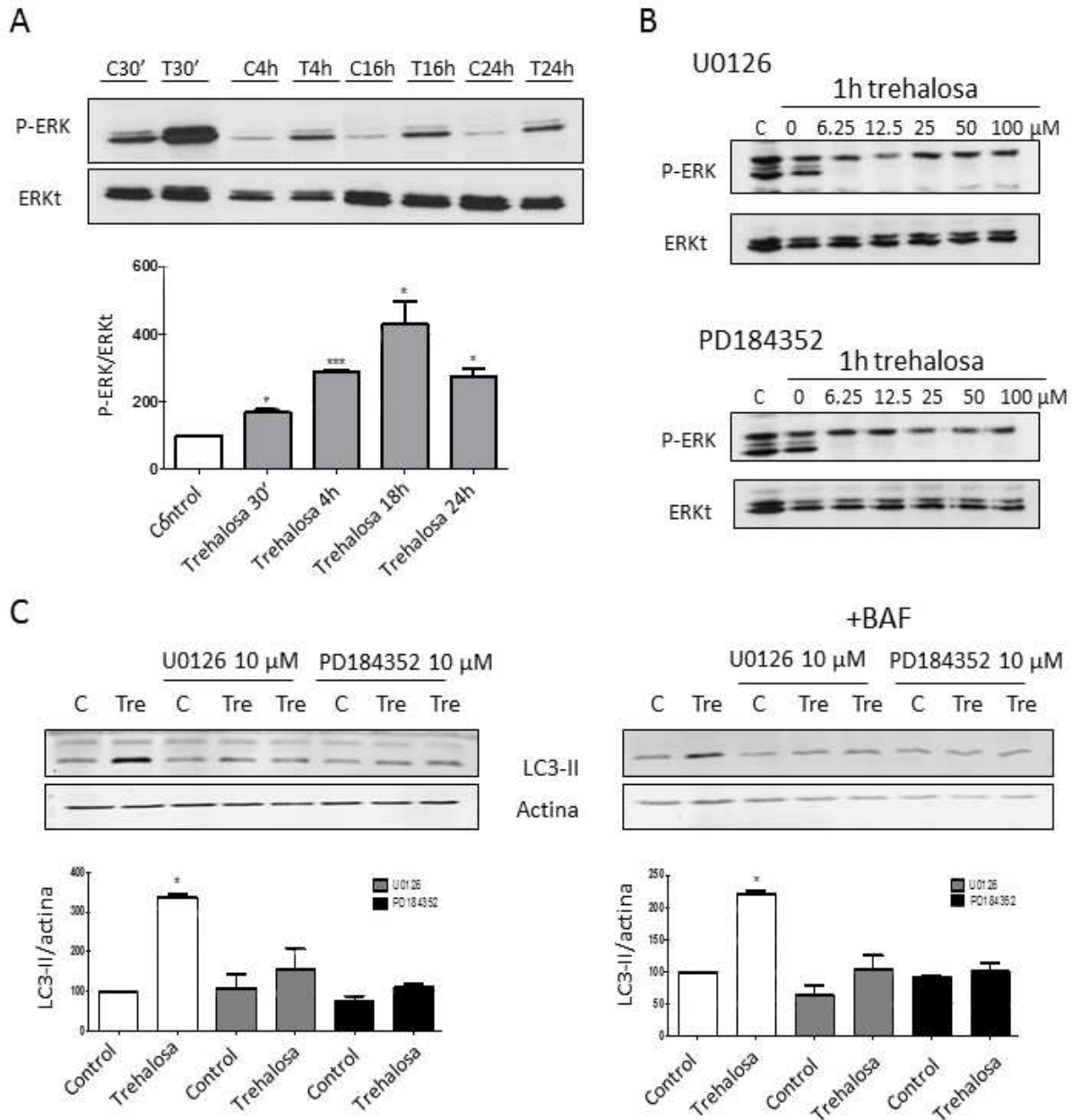
### **2.3 Actividad de ERK en células Hela**

Otra de las rutas principales en señalización dentro de la células, implicada también en autofagia, es la ruta de las MAP kinasas. Dado que estas proteínas están involucradas en numerosos procesos celulares decidimos estudiar la activación de ERK, una de las principales MAP kinasas, ante la adición de trehalosa al medio en células Hela.

Al realizar una curva tiempo en activación de ERK (Figura 15A), descubrimos que dicha proteína se activa en presencia de trehalosa, por lo que decidimos evaluar el efecto de su inhibición en la inducción de autofagia. Para ello utilizamos dos inhibidores de la activación de ERK: UO126 y PD184352. Tras realizar una curva dosis respuesta, decidimos utilizar una dosis de 10uM para ambos inhibidores en células Hela (Figura 15B). Para testar el efecto de la inhibición de ERK en la autofagia, analizamos los niveles de LC3-II con y sin tratamiento con trehalosa y en presencia y ausencia de estos inhibidores. Los resultados muestran como al inhibirse la fosforilación de ERK en células Hela, el incremento en los niveles de LC3-II producido por la trehalosa no tiene lugar (Figura 15C), lo que sugiere un papel importante de esta ruta de señalización en el mecanismo molecular de la trehalosa.

### **2.4 Activación de TFEB e inducción de genes relacionados con autofagia**

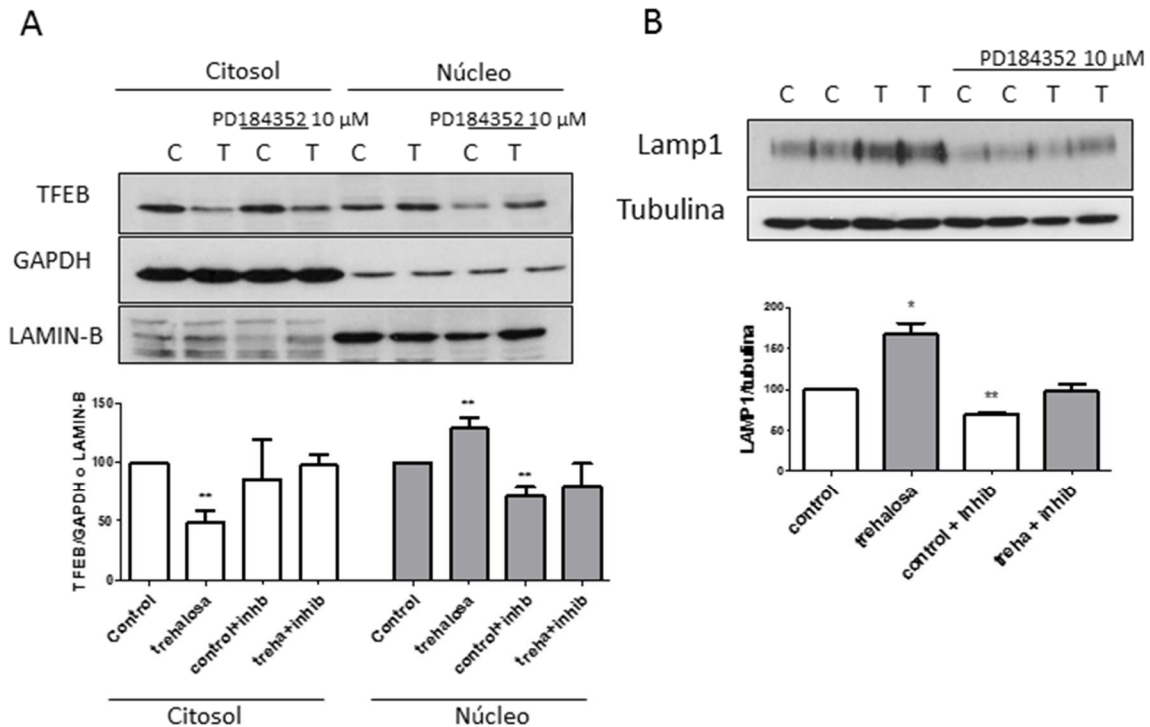
Uno de los genes modulado por ERK y que está relacionado con la activación de autofagia es TFEB. TFEB es un factor de transcripción que al activarse, se dirige hacia el núcleo celular y activa genes relacionados con la autofagia, como LAMP1 (Settembre, Di Malta et al. 2011). Dado que la trehalosa produce la activación de ERK, decidimos estudiar el papel de TFEB en el efecto de la trehalosa. Para ello estudiamos la translocación del citoplasma al núcleo de esta proteína, una mayor presencia nuclear indica que TFEB ha sido activado. Mediante el tratamiento con trehalosa, se puede observar como TFEB tiene una menor expresión en la fracción citoplasmática, mientras su presencia se ve incrementada en la fracción nuclear (Figura 16A). Esto indica que la trehalosa produce la translocación de TFEB al núcleo, y consiguientemente la transcripción de genes relacionados con autofagia. Para determinar el papel de ERK en dicha translocación, tratamos las células con los inhibidores de ERK y analizamos posteriormente la translocación de TFEB al núcleo. Tras la inhibición de la activación de ERK, la translocación de TFEB al núcleo queda inhibida en células Hela (Figura 16A).



**Figura 15. Determinación de la actividad ERK a lo largo del tiempo y su implicación en la inducción de la autofagia por trehalosa en células HeLa.** (A) Activación de ERK1/2 a diferentes tiempos tras el tratamiento con trehalosa por western blot y su análisis densitométrico. (B) Inhibición de la activación de ERK1/2 por dos inhibidores específicos a diferentes concentraciones por western blot. (C) Efecto de la inhibición de ERK1/2 por inhibidores en los niveles de LC3-II producidos tras el tratamiento con trehalosa (24h) por western blot en presencia y ausencia de bafilomicina (4h) y su análisis densitométrico. Los valores se expresan como la media  $\pm$  SEM. Los datos corresponden a 3 experimentos independientes realizados en duplicados. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante una t de Student Pareada. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs Control.

Como se ha mencionado anteriormente, LAMP1 es uno de los genes diana de TFEB. En el estudio de la expresión de esta proteína observamos un incremento en sus niveles en presencia de trehalosa, el cual no se produce al tratar a las células con inhibidores

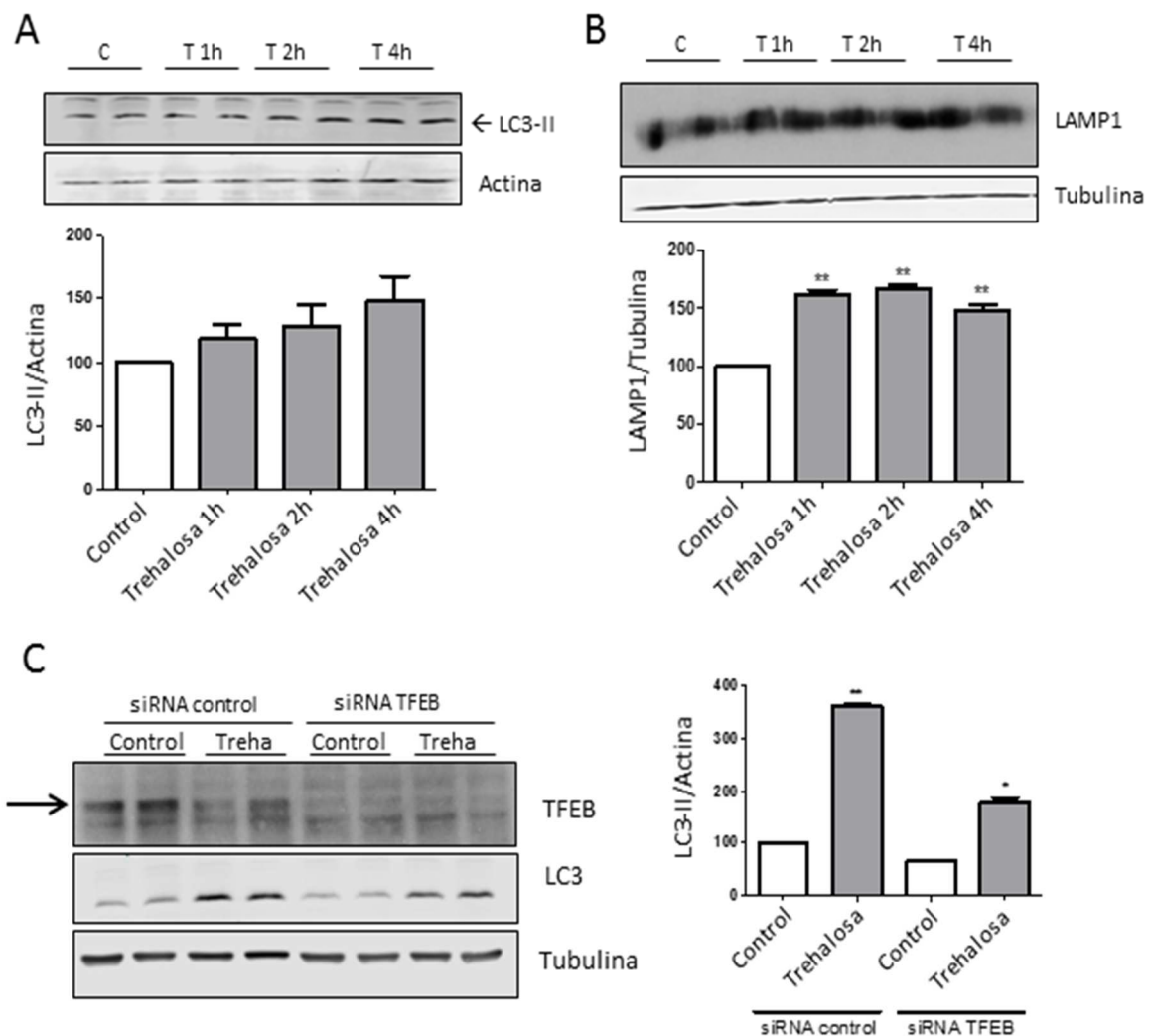
de ERK (Figura 16B). Este resultado concuerda con la translocación al núcleo de TFEB en presencia de trehalosa y a su inhibición bloqueando la activación de ERK.



**Figura 16. Translocación de TFEB al núcleo y expresión de LAMP1 producido por trehalosa en células HeLa.** (A) Expresión de TFEB en fracción citosólica y fracción enriquecida nuclear y su análisis densitométrico. Se utilizó GAPDH como control de carga para la fracción citosólica y LAMIN-B para la fracción nuclear. (B) Expresión por western blot de LAMP1 como gen diana de TFEB y su análisis densitométrico. Los valores se expresan como la media  $\pm$  SEM. Los datos corresponden a 5 experimentos independientes realizados en duplicados (figura A) y a 3 experimentos independientes realizados en triplicados (figura B). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante una t de Student Pareada. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs Control.

Dado que la inducción de la autofagia en las células por la trehalosa es bastante rápida, decidimos comprobar si es posible que este mecanismo de modulación génica fuese el principal responsable del efecto a corto y largo plazo de la trehalosa. Para ello hicimos un estudio a diferentes tiempos para determinar la activación de la autofagia y la modulación de LAMP1 en presencia de trehalosa. Estudios realizados a 1, 2 y 4 horas revelan que, aunque no de forma significativa, se produce un incremento en la expresión LC3-II en células HeLa (Figura 17A). Además, se aprecia un aumento en la expresión de LAMP1, gen diana del factor de transcripción TFEB (Figura 17B). Estos resultados validan la posibilidad de que TFEB esté produciendo el efecto inductor de autofagia de la trehalosa, aun a tiempos tempranos.

El siguiente paso era determinar si TFEB es esencial para el efecto de la trehalosa en la inducción de la autofagia. Para ello realizamos un silenciamiento del gen para TFEB mediante siRNA y evaluamos la expresión de LC3-II como marcador de autofagia. Los resultados muestran una reducción parcial en la expresión de LC3-II producida por trehalosa cuando TFEB esta silenciado (Figura 17C). La reducción parcial y no total puede ser debida a que el silenciamiento no es completo o a que la activación de TFEB no es el único mecanismo por el cual la trehalosa produce la inducción de la autofagia.



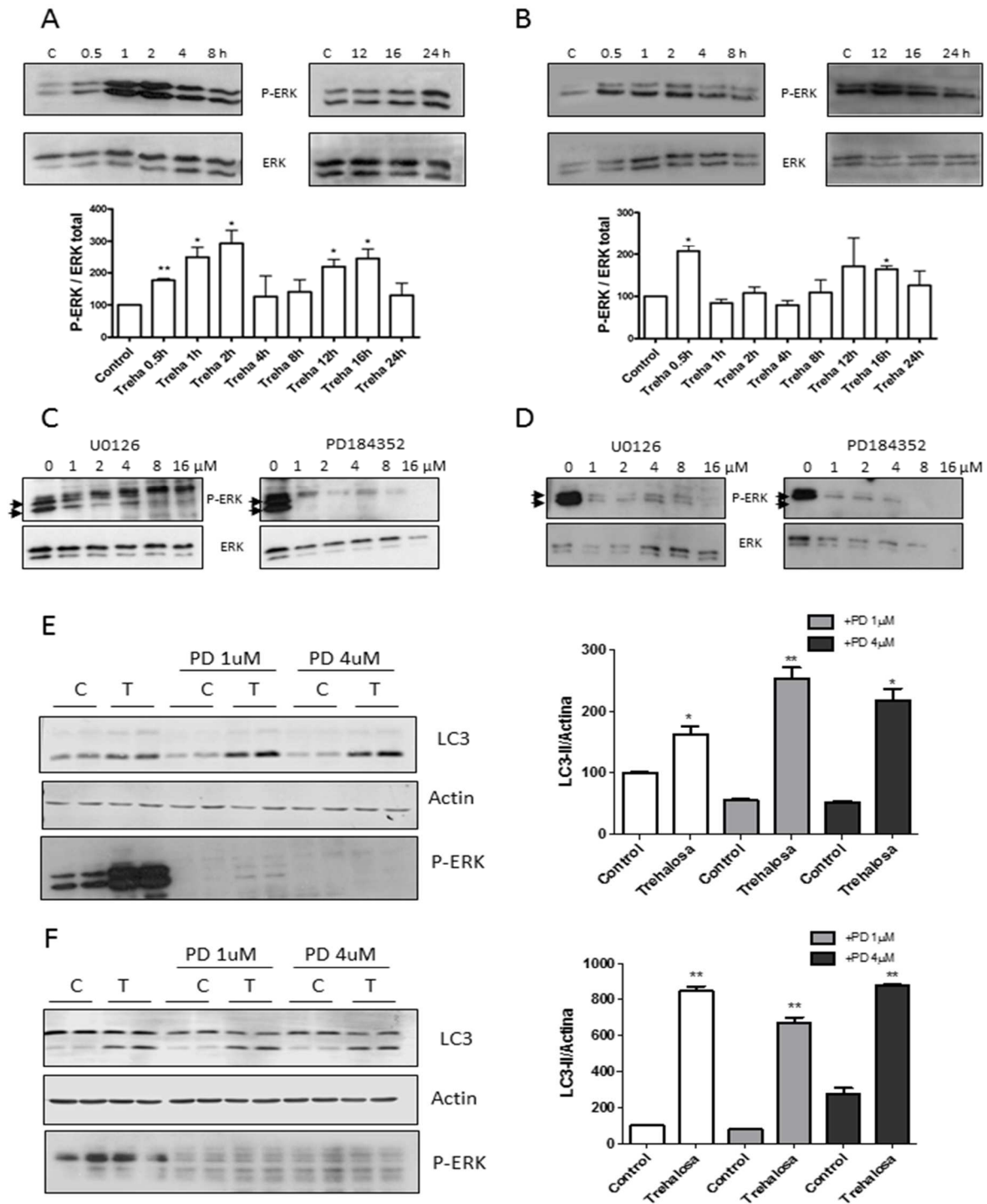
**Figura 17. Estudio de la activación de la ruta de TFEB a tiempos cortos tras el tratamiento con trehalosa en células HeLa.** (A) Expresión de LC3-II tras el tratamiento con trehalosa 1, 2 o 4 horas y su análisis densitométrico. (B) Expresión de LAMP1 tras el tratamiento con trehalosa durante 1, 2 o 4 horas y su análisis densitométrico. (C) Efecto del silenciamiento mediante siRNA de TFEB en la expresión de LC3-II producida por el tratamiento con trehalosa (24h) y su análisis densitométrico. Los valores se expresan como la media  $\pm$  SEM. Los datos corresponden a 3 experimentos independientes realizados en duplicados. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante una t de Student Pareada. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs Control.

## 2.5 Comprobación del modelo de actuación en otras líneas celulares

Los resultados mostrados anteriormente indican que la trehalosa produce la activación de ERK que de forma directa o indirecta produce la translocación de TFEB al núcleo celular, donde promueve la transcripción de genes promotores de la autofagia como LAMP1. Para evaluar el modelo decidimos testar la ruta en otras dos líneas celulares: RAW 264.7 Y SH-SY-5Y.

ERK se muestra activado en las dos líneas celulares a lo largo del tiempo (Figura 18A y B). En este caso a 24 horas no se aprecia una activación significativa de ERK, por lo que el resto de experimentos los realizamos a 16 horas para poder determinar si los inhibidores estaban o no haciendo efecto. Al igual que con las células Hela, hicimos una curva dosis con los inhibidores de ERK (Figura 18C y D). A partir de 4 $\mu$ M se empezaba a observar muerte celular por lo que decidimos utilizar dosis más bajas en el estudio de la ruta de señalización. Para la evaluación del papel de ERK utilizamos el mismo experimento que en células Hela, tratando a las células con y sin trehalosa y en presencia y ausencia del inhibidor, para medir los niveles de expresión de LC3-II como marcador de autofagia. Los resultados muestran como en este caso, el efecto de la trehalosa no depende de la activación de ERK (Figura 18E y F), presentándonos un problema de especificidad celular.

Puesto que este proyecto se realizó durante una estancia predoctoral, no se pudo profundizar más en el efecto de la trehalosa en estos dos nuevos tipos celulares, dejando abierta la cuestión de si sigue siendo TFEB el mediador de la inducción de la autofagia inducida por trehalosa.



**Figura 18. Estudio de la implicación de la activación de ERK1/2 en la inducción de la autofagia mediada por trehalosa en células RAW 264.7 y SH-SY5Y.** (A y B) Activación de ERK1/2 a diferentes tiempos tras el tratamiento con trehalosa por western blot y su análisis densitométrico en células RAW 264.7 y SH-SY5Y respectivamente. (C y D) Inhibición de la activación de ERK1/2 por inhibidores específicos a diferentes concentraciones por western blot en células RAW 264.7 y SH-SY5Y respectivamente tras un tratamiento con trehalosa de 1 hora. (E y F) Efecto de la inhibición de ERK1/2 por inhibidores en los niveles de LC3-II producidos tras el tratamiento con trehalosa (16h) por western blot y su análisis densitométrico en células RAW 264.7 y SH-SY5Y respectivamente. Los valores se expresan como la media  $\pm$  SEM. Los datos corresponden a 3 experimentos independientes realizados en duplicados. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante una t de Student Pareada. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs Control.



### **3. SCREENING DE NUEVOS MODULADORES DE LA AUTOFAGIA**

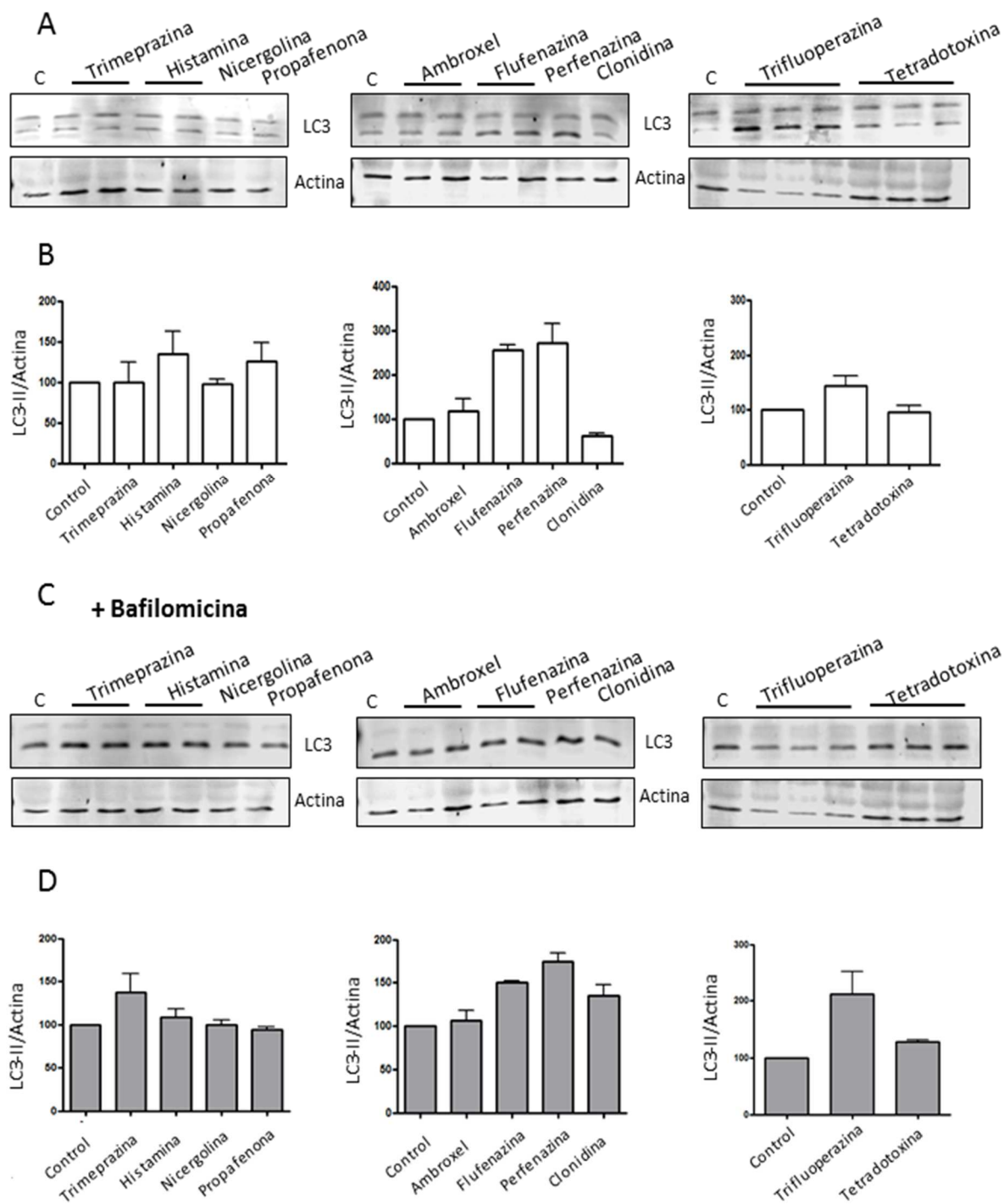
El efecto beneficioso de la inducción de la autofagia en enfermedades neurodegenerativas, como la EH, abre una puerta hacia el estudio de nuevas rutas terapéuticas para la enfermedad. Basándonos en los buenos resultados obtenidos con la trehalosa en fibroblastos EH (apartado 1 de RESULTADOS), decidimos iniciar un screening farmacológico para buscar nuevos moduladores de la autofagia que pudiesen ser utilizados como terapia en enfermedades neurodegenerativas.

#### **3.1 Screening en células PC12 de nuevos moduladores de autofagia**

Para la realización del screening de moduladores de autofagia, utilizamos la determinación de LC3-II en presencia y ausencia de bafilomicina (método descrito anteriormente en el apartado 2.1 de RESULTADOS) en células PC12. Las drogas evaluadas se distribuyen en grupos farmacológicos de la siguiente manera:

- Inhibidores de los canales de sodio:
  - o Ambroxel
  - o Tetradotoxina
  - o Propafenona
- Drogas relacionadas con la ruta de la Histamina:
  - o Histamina
  - o Trimeprazina
- Inhibidores de receptores de dopamina:
  - o Trifluoperazina
  - o Perfenazina
  - o Flufenazina
- Agonistas de receptores alfa-adrenérgicos:
  - o Nicergolina
  - o Clonidina

Los resultados obtenidos de la expresión de LC3 en presencia y ausencia de bafilomicina (Figura 19), revelan un grupo de fármacos prometedor como moduladores de autofagia, el grupo de los inhibidores de dopamina. Las tres drogas seleccionadas pertenecen al grupo de las fenotiazinas piperazínicas, que son compuestos heterocíclicos derivados de la fenotiazina y se utilizan actualmente como fármacos antipsicóticos.



**Figura 19. Screening de diversos fármacos como posibles moduladores de autofagia utilizando la expresión de LC3-II en células PC12.** (A) Estudio por western blot de la inducción de la expresión de LC3-II por las drogas testadas tras 24 horas de tratamiento en células PC12 y su análisis densitométrico. (B) Estudio por western blot de la inducción de la expresión de LC3-II por las drogas testadas tras 24 horas de tratamiento en células PC12 en presencia de bafilomicina (4 horas). Los datos corresponden a 2 experimentos independientes realizados en triplicados. En este caso no se realizó análisis estadístico ya que los datos se utilizaron como referencia para la selección de drogas para un estudio posterior más exhaustivo. Los valores se expresan como la media  $\pm$  SEM. Para el análisis por t de Student Pareada es necesario tener al menos tres experimentos independientes.

### **3.2 Curvas dosis de las drogas seleccionadas**

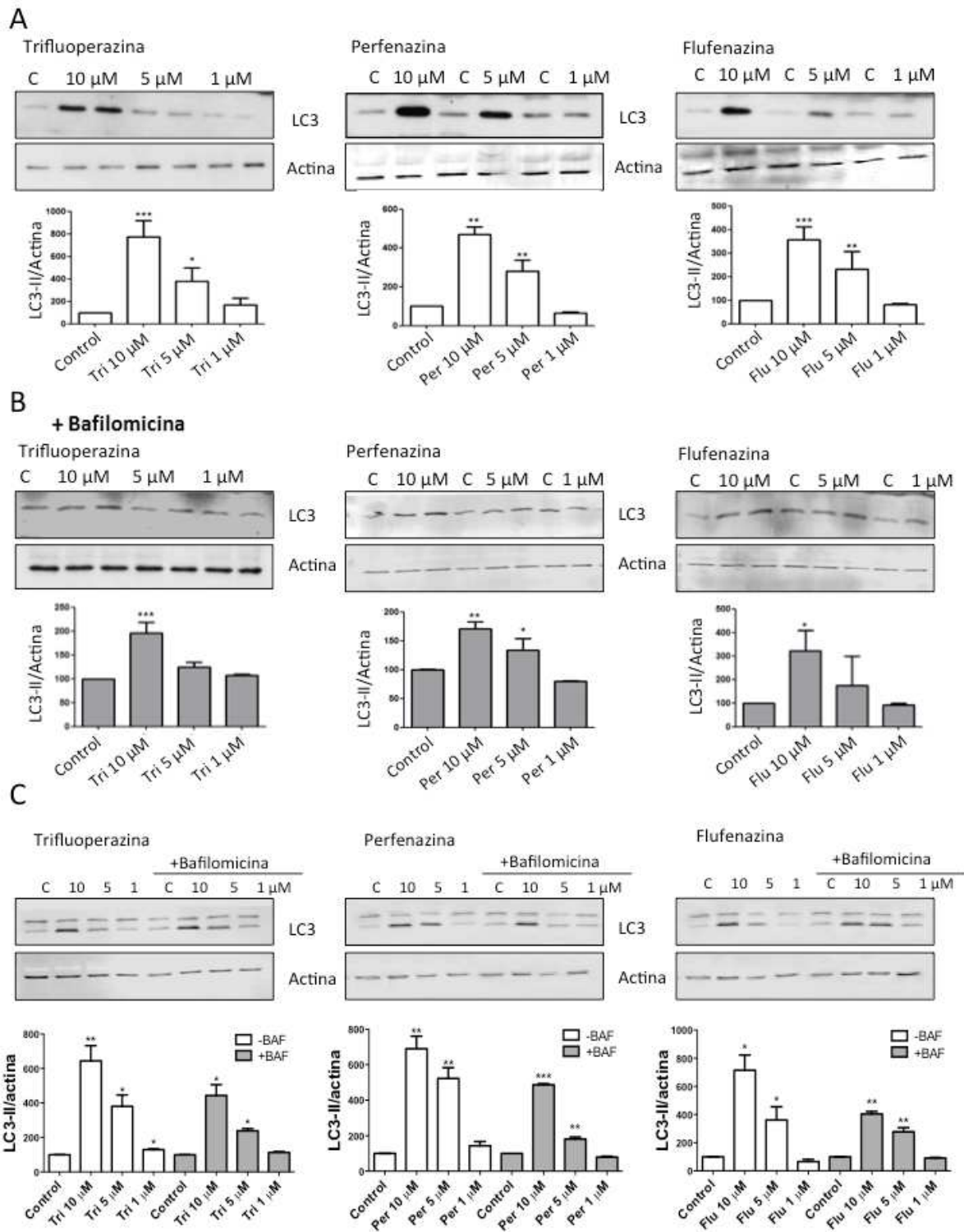
Para determinar la dosis a utilizar en los subsiguientes estudios se realizó un análisis de dosis-respuesta basado en la inducción de la expresión de LC3 en células PC12 (Figura 20A y B) y en neuronas provenientes de cultivos primarios (Figura 20C). Decidimos utilizar la dosis de 10  $\mu$ M en los siguientes experimentos para determinar el mecanismo de acción de los fármacos en la inducción de la autofagia, puesto que dicha dosis es la que mayor incremento de LC3 produce en ambos tipos celulares.

### **3.3 Estudio de la función de receptores dopaminérgicos en el efecto de las fenotiazinas**

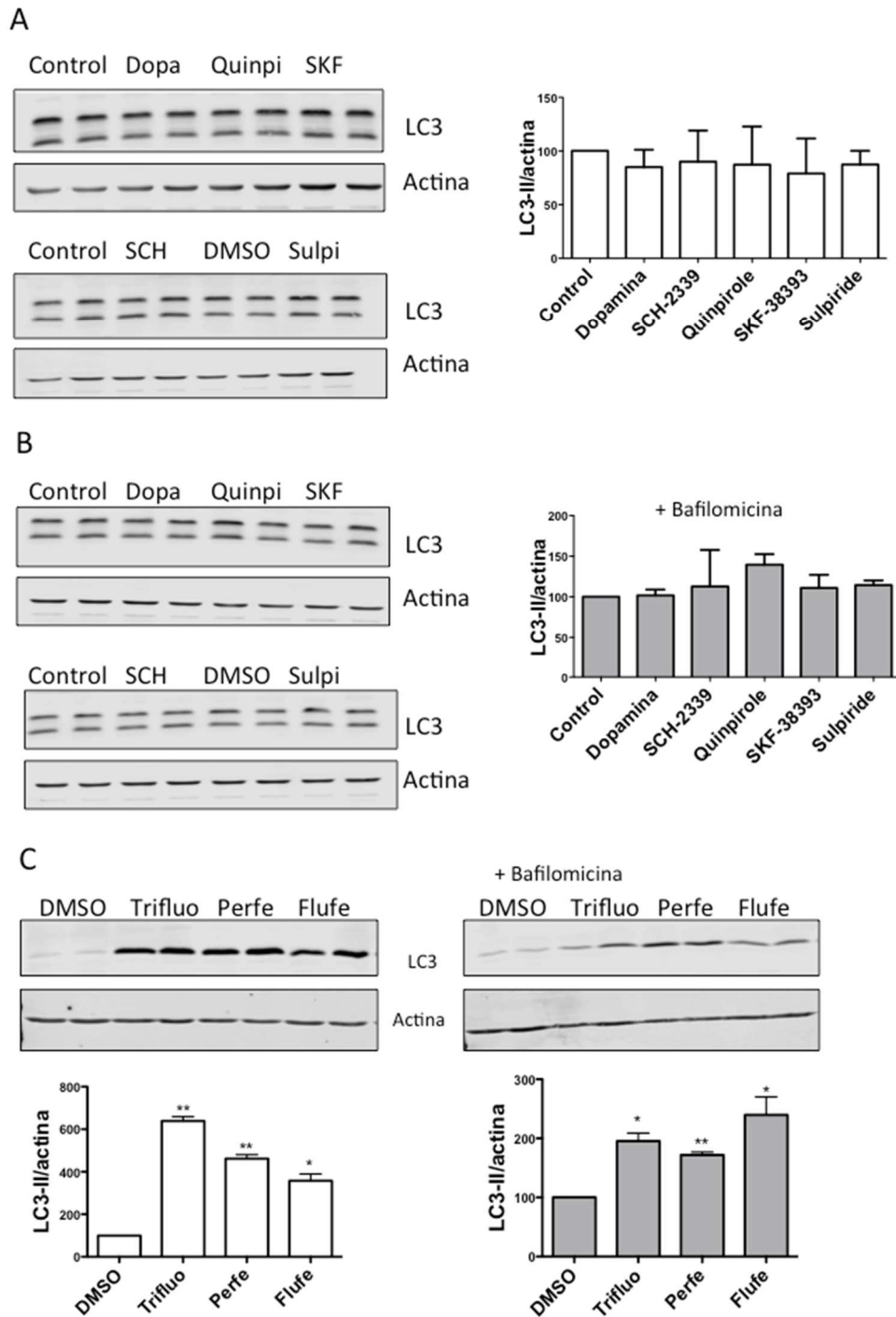
Ya que el efecto principal de las fenotiazinas es la inhibición de receptores dopaminérgicos, decidimos determinar si el efecto en la autofagia se debía a la inhibición de estos receptores. Para ello utilizamos un grupo de drogas agonistas y antagonistas de los receptores D1 y D2 dopaminérgicos y estudiamos su efecto en la expresión de LC3 (Figura 21A-B).

- Dopamina
- Quinpirole: Agonista de los receptores D2 dopaminérgicos.
- Sulpiride: Antagonista de los receptores D2 dopaminérgicos.
- SKF-38393: Agonista de los receptores D1 dopaminérgicos.
- SCH-23390: Antagonista de los receptores D1 dopaminérgicos.

Los resultados no muestran modulación de la autofagia al inhibir o activar los receptores dopaminérgicos, lo que nos llevo a pensar que posiblemente la ruta de la dopamina no estaba implicada en el efecto de estas drogas sobre la autofagia. Para comprobarlo, decidimos testar el efecto de estas drogas en una línea celular carente de receptores de dopamina, como es la línea celular Hela. Las fenotiazinas producen aumento de la expresión de LC3-II en presencia y ausencia de bafilomicina en células Hela (Figura 21C), lo que indica que su efecto modulador de la autofagia es independiente de su efecto inhibitor de receptores de dopamina.



**Figura 20. Curva dosis respuesta con las drogas seleccionadas para la expresión de LC3-II en células PC12 y neuronas corticales de ratón.** (A) Estudio por western blot de la inducción de la expresión de LC3-II por las drogas testadas a diferentes dosis tras 24 horas de tratamiento en células PC12 y su análisis densitométrico. (B) Estudio por western blot de la inducción de la expresión de LC3-II por las drogas testadas a diferentes dosis tras 24 horas de tratamiento en células PC12 en presencia de bafilomicina (4 horas). (C) Estudio por western blot de la inducción de la expresión de LC3-II por las drogas testadas a diferentes dosis tras 24 horas de tratamiento, en presencia y ausencia de bafilomicina (4 horas), en neuronas corticales provenientes de cultivos primarios de ratón y su análisis densitométrico. Los valores se expresan como la media  $\pm$  SEM. Los datos corresponden a 3 experimentos independientes realizados en duplicados. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante una t de Student Pareada. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs Control.

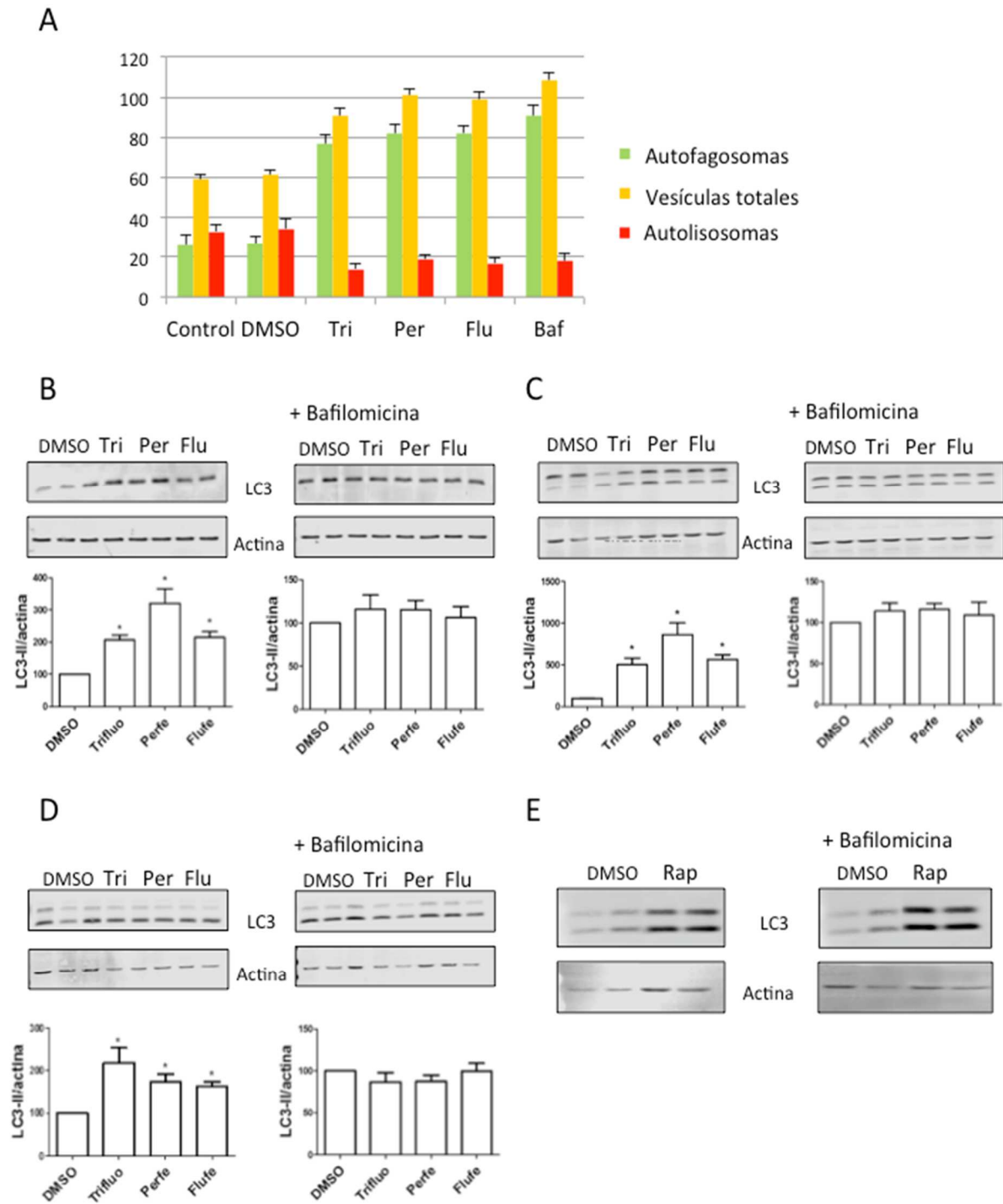


**Figura 21. Estudio de la implicación de los receptores de dopamina sobre el efecto en la autofagia producido por las fenotiazinas.** (A) Estudio por western blot de la inducción de la expresión de LC3-II por las drogas moduladoras de la actividad de los receptores dopaminérgicos tras 24 horas de tratamiento en neuronas corticales provenientes de cultivos primarios de ratón y su análisis densitométrico. Todas las drogas fueron utilizadas a una concentración de 10  $\mu$ M. (B) Estudio por western blot de la inducción de la expresión de LC3-II por las drogas moduladoras de la actividad de los receptores dopaminérgicos tras 24 horas de tratamiento en neuronas corticales provenientes de cultivos primarios de ratón en presencia de bafilomicina (4 horas) y su análisis densitométrico. (C) Estudio por western blot de la inducción de la expresión de LC3-II por las fenotiazinas tras 24 horas de tratamiento en células Hela carecientes de receptores dopaminérgicos en presencia y ausencia de bafilomicina (4 horas) y su análisis densitométrico. Los valores se expresan como la media  $\pm$  SEM. Los datos corresponden a 3 experimentos independientes realizados en duplicados. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante una t de Student Pareada. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs Control.

### 3.4 Estudio del flujo autofágico

Los estudios realizados con el ensayo de la expresión de LC3 en presencia y ausencia de bafilomicina, indican que el efecto de las fenotiazinas sobre la autofagia es inductor, ya que observamos incremento en los niveles de LC3 aun en presencia de bafilomicina. Otra técnica utilizada para analizar las variaciones en el flujo autofágico es el ensayo de “Traffic Lights”, también basado en la proteína LC3. Para este ensayo se utilizaron células Hela que expresaban de forma estable un plásmido que codifica para la proteína LC3 conjugada con RFP (red fluorescente protein) y Wasabi-green (proteína verde fluorescente). En los autofagosomas, la proteína LC3 emite fluorescencia verde y roja, debido a las dos proteínas fluorescentes que tiene conjugadas, mientras que en los autolisosomas solo se aprecia la fluorescencia roja, ya que la fluorescencia verde se ve afectada por el pH ácido de los mismos. Esta propiedad nos permite diferenciar los autofagosomas (doble fluorescencia) de los autolisosomas (fluorescencia roja) y realizar un ratio para determinar cuántas de las vesículas llegan finalmente a fusionar con los lisosomas y convertirse en autolisosomas. En la figura 22A observamos como las fenotiazinas producen una acumulación de autofagosomas y un incremento en el número total de vesículas, mismo efecto que el inhibidor de autofagia bafilomicina.

Dado que en el ensayo de “Traffic Lights” las drogas muestran un fenotipo bloqueador de la autofagia, nos planteamos la posibilidad de que la inhibición por bafilomicina en el ensayo de la expresión de LC3 no fuese suficiente para bloquear completamente la ruta. Para demostrar la posibilidad de que las fenotiazinas estuviesen bloqueando por encima de la bafilomicina, decidimos volver a realizar el ensayo de expresión de LC3 pero esta vez con un pre-tratamiento con bafilomicina de 1 hora previo a la adición de las drogas en células Hela, SH-SY5Y y en cultivos primarios de neuronas de ratón. Los resultados muestran como, en esta ocasión, si se consigue el bloqueo total de la ruta y las fenotiazinas, en presencia de bafilomicina, no producen ningún incremento en la expresión de LC3, lo que encaja con un fenotipo inhibidor de autofagia y con el resultado obtenido en el ensayo de “Traffic Lights” (Fig. 22B-E)



**Figura 22. Análisis del flujo autofágico en diferentes tipos celulares tras el tratamiento con fenotiazinas.** (A) Estudio de la formación de vesículas mediante expresión de wasabi-RFP-LC3 en células Hela. Autofagosomas (vesículas con fluorescencia roja y verde) se representan en verde; autolisosomas (vesículas con fluorescencia roja) se representan en rojo; el número total de vesículas se representa en amarillo. Tiempo total de tratamiento: 16 horas. (B, C y D) Estudio por western blot de la inducción de la expresión de LC3-II por las fenotiazinas tras 4 horas de tratamiento con y sin pretratamiento de 1 hora con bafilomicina (5 horas de tiempo total de tratamiento con bafilomicina) y su análisis densitométrico en células Hela (B), SH-SY5Y (C) y neuronas corticales de ratón (D). (E) Western blot de neuronas de ratón mostrando que el efecto del pre-tratamiento de una hora con bafilomicina, no bloquea el efecto de los inductores (rapamicina). Los valores se expresan como la media  $\pm$  SEM. Los datos corresponden a 3 experimentos independientes realizados en triplicados. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante una t de Student Pareada. \* $p < 0.05$  vs DMSO.

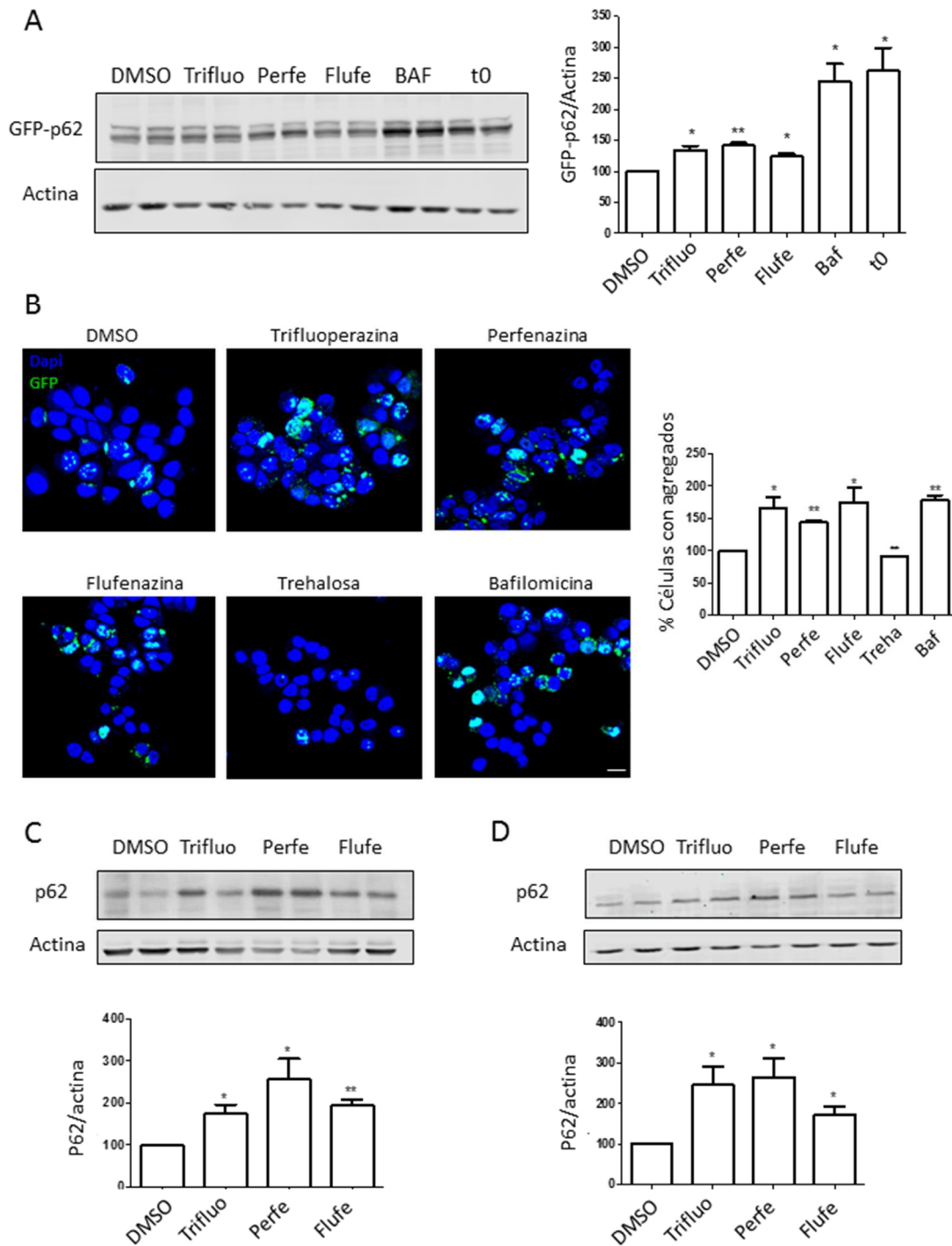
### 3.5 Estudios de eliminación de proteínas

Una vez determinado el fenotipo de las drogas ante el flujo autofágico, decidimos estudiar su efecto en la eliminación de proteínas, para corroborar el bloqueo de la autofagia. Para ello utilizamos la línea celular PC12-GFP-htt74Q inducible que expresa el exón 1 de la proteína huntingtina mutada, la línea celular HEK con expresión inducible de p62, que es una proteína sustrato de la autofagia, y medimos la acumulación de p62 en células Hela y SH-SY5Y.

Medimos por western blot la acumulación de p62 después de 24 horas de tratamiento con las drogas en las células HEK inducibles (Figura 23A), observándose una acumulación de la proteína en presencia de las tres drogas, lo que indica que hay un bloqueo en el flujo autofágico. Para determinar los cambios en la formación de agregados de huntingtina en las células inducibles PC12, contamos el número de células que presentaban agregados con respecto al total con los diferentes tratamientos en el microscopio confocal, lo que nos mostraba un incremento de los agregados al tratar las células con las tres drogas seleccionadas en el screening (Figura 23B). Por último, evaluamos la acumulación de p62 en células Hela y SH-SY5Y mediante western blot, mostrando que también se produce acumulación de p62 endógena (Figura 23C y D).

Todos estos resultados indican que las fenotiazinas bloquean en algún punto la ruta autofágica produciendo acumulación de sustratos que deberían degradarse mediante esa ruta, así como acumulación de autofagosomas en el interior celular.





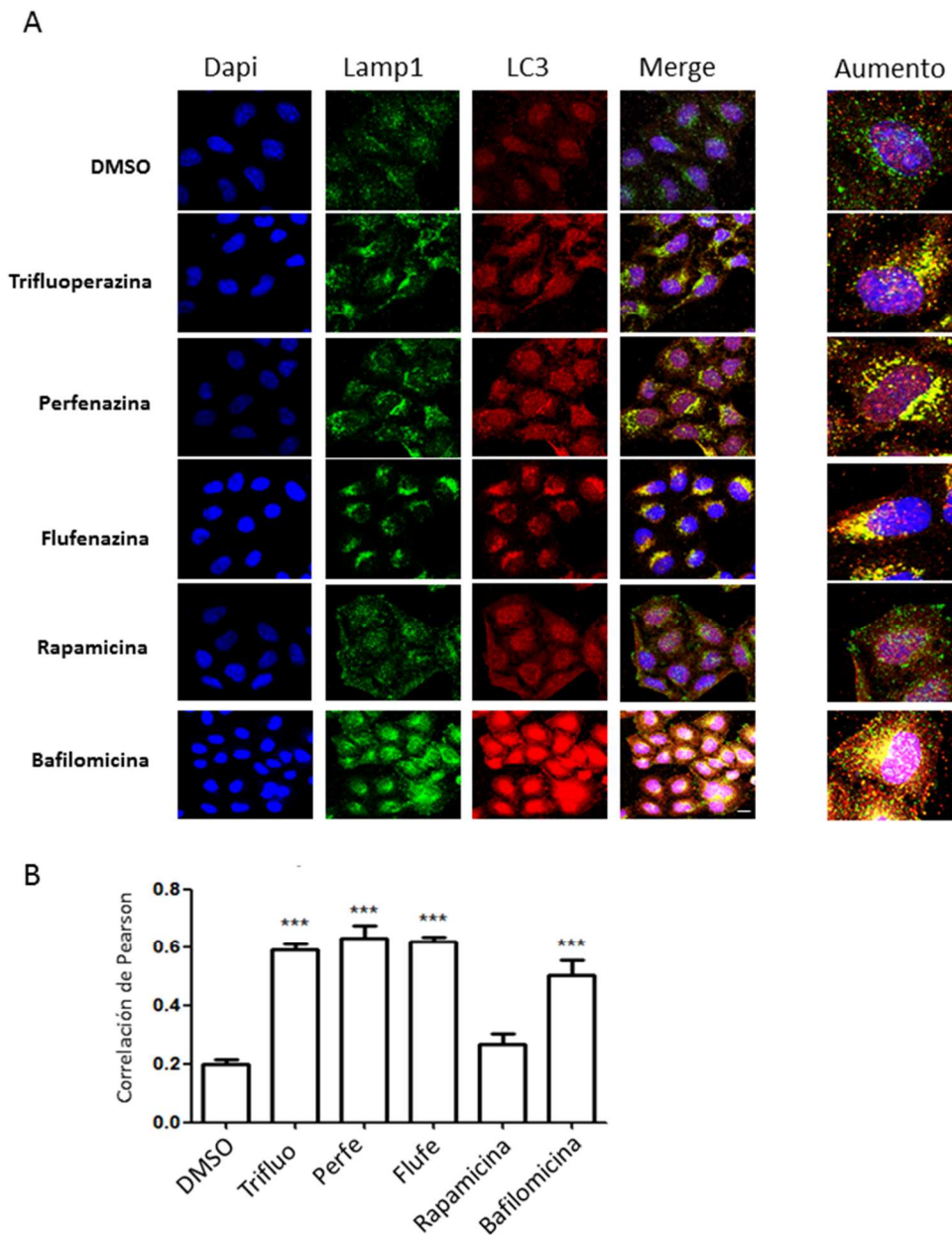
**Figura 23. Eliminación de huntingtina y p62 tras el tratamiento con fenotiazinas en diversos tipos celulares.** (A) Estudio por western blot de la acumulación de p62 por inhibición de autofagia en células HEK GFP-p62 tras el tratamiento durante 24 horas con las fenotiazinas y su análisis densitométrico. (B) Análisis de la formación de agregados de huntingtina en células PC12 GFP-htt74Q tras los diferentes tratamientos durante 48h (añadiendo medio nuevo con el tratamiento correspondiente cada 24 horas) y la correspondiente representación gráfica del número de células con agregados respecto al número total. (C) Determinación por western blot de la acumulación de p62 endógeno en células HeLa tras 24 horas de tratamiento con las fenotiazinas y su análisis densitométrico. (D) Determinación por western blot de la acumulación de p62 endógeno en células SH-SY5Y tras 24 horas de tratamiento con las fenotiazinas y su análisis densitométrico. Barra de escala = 10  $\mu$ m. Los valores se expresan como la media  $\pm$  SEM. Los datos corresponden a 3 experimentos independientes realizados en triplicados (A, C y D) y en duplicados (B). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante una t de Student Pareada. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs DMSO.

### **3.6 Análisis de localización de las vesículas intracelulares y afectación lisosomal**

Según los resultados mostrados anteriormente, las fenotiazinas producen la inhibición de la autofagia. Para determinar en que parte de la ruta se produce este bloqueo realizamos un estudio de co-localización entre las proteínas LC3 (marcador de autofagosomas) y LAMP1 (marcador de lisosomas) en células Hela. Este ensayo muestra un incremento del número de vesículas positivas a LC3 y positivas a LAMP1 y una reorganización de la disposición de los lisosomas (marcados con LAMP1) al tratar las células con las fenotiazinas (Figura 24). Además, se produce un incremento masivo de la co-localización de estos dos tipos de vesículas tanto en el tratamiento con las drogas como en el tratamiento con bafilomicina (Figura 24B). Mediante este estudio se muestra como ambas vesículas co-localizan, pero al producirse acumulación de sustratos de la autofagia, el proceso se debe ver interrumpido justo antes o después de la fusión de los autofagosomas con los lisosomas.

Dado que el bloqueo se debía estar produciendo en el proceso de fusión con los lisosomas, pensamos en la posibilidad de que el daño estuviese en los lisosomas y no fuesen funcionales, lo que impediría una correcta degradación de los sustratos. Para estudiar la función lisosomal, estudiamos la expresión de catepsina D, una de las proteínas hidrolíticas de los lisosomas. Esta proteína sufre un proceso de maduración por procesamiento proteolítico, siendo la proteína inmadura la de mayor peso molecular. El análisis por western blot revela una disminución del ratio entre la proteína madura y la inmadura, lo que indica una acumulación de las formas inmaduras de la proteína y sugiere alteración lisosomal (Figura 25A).

Una de las posibles causas de alteración de la función lisosomal podría ser una alteración en el pH de estas vesículas. Utilizando una técnica ratiométrica de medición de pH estudiamos que estaba pasando en el interior de los lisosomas. Lysosensor Yellow/blue emite una fluorescencia amarilla en compartimentos con un pH ácido, mientras que si el pH es básico o neutro, la fluorescencia es azul. Calculando el ratio entre la fluorescencia amarilla y la azul, se puede determinar si se han producido cambios en el pH de los lisosomas. Utilizando esta técnica observamos nuevamente la gran acumulación de lisosomas y su cambio en distribución dentro de la célula, de estar cerca del núcleo pero más dispersos, a concentrarse masivamente en la zona perinuclear, tras el tratamiento con las fenotiazinas. Además, realizando el ratio entre las dos fluorescencias se aprecia claramente un aumento en el pH de los lisosomas, lo que puede conllevar fácilmente a la disfunción de los mismos (Figura 25B).

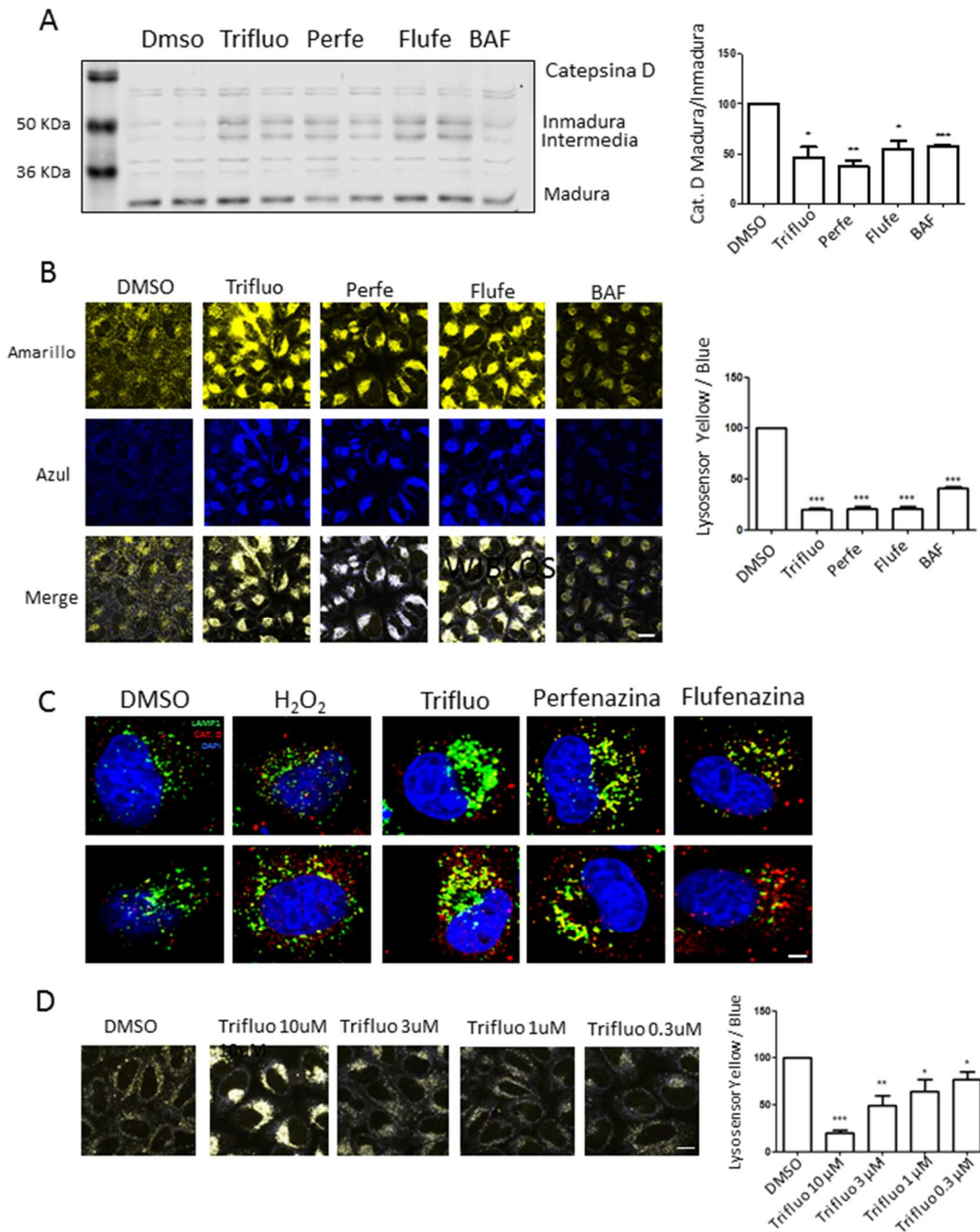


**Figura 24. Co-localización de vesículas positivas a LC3 y vesículas positivas a LAMP1.** (A) Análisis por inmunofluorescencia de la co-localización de vesículas positivas para LC3 (rojo) y vesículas positivas para LAMP1 (verde) tras 24 horas con los diferentes tratamientos. Los núcleos teñidos con Dapi se representan en azul. (B) Cuantificación mediante el coeficiente de correlación de Pearson de la co-localización de los canales rojo y verde. Barra de escala = 20  $\mu$ m. Los valores se expresan como la media  $\pm$  SEM. Los datos corresponden a 3 experimentos independientes realizados en duplicados. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante una t de Student Pareada: \*\*\* $p < 0.001$  vs DMSO.

La bibliografía indica que las fenotiazinas pueden producir permeabilización de las membranas y se ha demostrado que producen despolarización de la membrana mitocondrial externa (de Faria, Bettanin et al. 2015). Las fenotiazinas además son compuestos lisosomotróficos, se acumulan en los lisosomas y podrían ser causantes de un proceso de permeabilización de la membrana lisosomal, lo que produciría bloqueo de la ruta autofágica,

cambios en el pH lisosomal, alteración de las proteínas mitocondriales y liberación de éstas al citosol y en un proceso más avanzado, incluso la muerte celular. Para comprobar si ciertas drogas están produciendo este tipo de permeabilización lisosomal, se puede estudiar la localización de las catepsinas por inmunofluorescencia. Una mayor presencia de estas proteínas lisosomales en el citosol indicaría una permeabilización de los lisosomas. Teniendo en cuenta esta posibilidad, analizamos la localización celular de la catepsina D, utilizando LAMP1 como marcador lisosomal en células Hela. Los resultados preliminares indican una mayor presencia de esta catepsina en el citosol cuando las células han sido tratadas con las fenotiazinas (Figura 25C). Aunque este resultado aun es preliminar y necesita de un estudio a mayor profundidad, la localización de catepsina D sugiere que las fenotiazinas podrían estar induciendo la permeabilización lisosomal, así como un cambio en su pH y modificación de sus proteínas.

Los resultados obtenidos en este proyecto, muestran como las fenotiazinas, en algunas publicaciones definidas como inductores de la autofagia, presentan mayormente un fenotipo bloqueador, produciendo la acumulación de proteínas sustratos de la autofagia y generando lisosomas disfuncionales. Puesto que estas drogas están siendo utilizadas en la actualidad en pacientes como antipsicóticos, era necesario comprobar si el efecto de estas drogas se produce aun en dosis más bajas, más cercanas a las que se podrían encontrar en pacientes que las utilicen como tratamiento. Para ello utilizamos la técnica anteriormente utilizada para medición de pH lisosomal (lysosensor Yellow/blue), que nos permite observar la localización de los lisosomas así como la determinación de variaciones en el pH. Realizamos una curva dosis respuesta desde 10  $\mu\text{M}$  hasta 0.3  $\mu\text{M}$  en células Hela con una de las fenotiazinas y observamos que el cambio en el pH se produce incluso con las dosis más bajas de una forma dosis dependiente, así como el cambio en la localización de los lisosomas (Figura 25D). Karson et al. (Karson, Newton et al. 1992) determinaron mediante un estudio en pacientes humanos, que la concentración estimada en cerebro para una dosis de 40 mg/día (dosis que se utiliza actualmente) es de 0.4  $\mu\text{M}$ . En este proyecto mostramos que las fenotiazinas a una dosis incluso de 0.3  $\mu\text{M}$ , producen cambios en la localización de los lisosomas y en su pH, sugiriendo un posible efecto adverso importante que, aunque aún se necesitan estudios más exhaustivos in vivo, debería ser tenido en cuenta a la hora de elegir el tratamiento adecuado en pacientes.



**Figura 25. Estudio de afectación lisosomal en células HeLa tras el tratamiento con las fenotiazinas. (A)** Análisis por western blot de la maduración de catepsina D y su cuantificación densitométrica correspondiente tras 24 horas de tratamiento con las fenotiazinas. **(B)** Determinación del pH lisosomal tras 24 horas de tratamiento con las fenotiazinas (16h de tratamiento con bafilomicina) utilizando la prueba Lysosensor yellow/blue y su análisis ratiométrico correspondiente. **(C)** Estudio de localización de catepsina D (rojo) por inmunofluorescencia tras 24 horas de tratamiento con las fenotiazinas. Como control positivo se utilizó 200  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 3 horas. Los lisosomas marcados con LAMP1 se muestran en verde y los núcleos en azul. Las imágenes en la fila superior corresponden a un fenotipo más parecido al control, mientras que en la fila inferior se muestran células con catepsina D fuera de los lisosomas, mostrando la heterogeneidad en la localización de catepsina D. **(D)** Determinación del pH lisosomal tras 24 horas de tratamiento con trifluoperazina a diferentes concentraciones utilizando la prueba Lysosensor yellow/blue y su análisis ratiométrico correspondiente. Barra de escala (B y D) = 20  $\mu$ m; (C) = 5  $\mu$ m. Los valores se expresan como la media  $\pm$  SEM. Los datos corresponden a 3 experimentos independientes realizados en triplicados (dos experimentos independientes en duplicados en la figura C). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante una t de Student Pareada. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01. \*\*\* $p$ <0.001 vs DMSO.

## *Discusión*

---



## *DISCUSIÓN*

Durante la realización de esta tesis, hemos perseguido el objetivo de estudiar y mostrar la inducción de autofagia como un mecanismo terapéutico eficaz contra la EH. Ésta patología genética produce multitud de daños a nivel molecular, pero el desencadenante común es la acumulación de la versión mutada de la proteína huntingtina, esto nos llevó a pensar que la autofagia, como sistema de eliminación de proteínas, agregados y orgánulos, podría ser una buena estrategia a seguir para retrasar los síntomas de la enfermedad.

Diversos estudios en el laboratorio, muestran que la utilización de trehalosa es beneficiosa ante proteinopatías y ante bloqueo del proteosoma (Rodríguez-Navarro, Rodríguez et al. 2010, Casarejos, Solano et al. 2011, Perucho, Casarejos et al. 2012, Jose Casarejos, Perucho et al. 2014). Por ello, decidimos ampliar el estudio a la EH, en un modelo de fibroblastos de piel obtenidos de cultivos primarios de pacientes sanos y con la enfermedad. La utilización de muestras de pacientes nos permite acercarnos aun más a las condiciones fisiológicas en las que la enfermedad tiene lugar, ya que la obtención de tejido neuronal humano es muy compleja.

Hemos mostrado en este estudio, que la epoxomicina produce un incremento en la activación de caspasa-3, de forma dosis-dependiente, en fibroblastos controles y EH. La epoxomicina también incrementa los niveles de ROS, proteínas ubiquitinadas y huntingtina en los fibroblastos EH. Todos estos cambios producidos por este inhibidor del proteasoma, son revertidos por la trehalosa. Además, la trehalosa logra disminuir los niveles basales de estos parámetros en los fibroblastos EH que, de forma natural, tienen aumentados. Otra de las observaciones obtenidas durante el desarrollo de este proyecto, es la inducción de la actividad proteasomal en presencia de trehalosa, tanto en fibroblastos controles como en EH. El siguiente paso en el transcurso de esta tesis doctoral, fue intentar determinar el mecanismo molecular por el cual la trehalosa induce la autofagia, mecanismo hasta hoy desconocido. Nuestros resultados muestran una dependencia total de la activación de ERK y parcial de la activación de TFEB para la inducción de la autofagia por la trehalosa en células HeLa. Sin embargo, los resultados en otras líneas celulares, como las células RAW 264.7 y SH-SY5Y, descartan la activación de ERK como principal mecanismo molecular, mostrando problemas de especificidad celular y dejando la puerta abierta para la continuación de estudios para determinar el mecanismo molecular de la inducción de autofagia por la trehalosa.



Los buenos resultados de la inducción de la autofagia en fibroblastos contra la EH, nos alentaron a desarrollar un screening farmacológico para buscar nuevos moduladores de la autofagia que pudieran ser utilizados directamente como fármacos contra EH o bien, mostrasen nuevas rutas de modulación de la autofagia que pudiesen ser de utilidad para el diseño de nuevos fármacos. Así pues, realizamos un estudio con diversos fármacos, de los cuales seleccionamos el grupo de las fenotiazinas como principales moduladores de la autofagia. Estos fármacos están siendo actualmente utilizados en el tratamiento de enfermedades como la esquizofrenia y ansiedad, lo que aportaba un interés extra en el estudio de estas drogas. Durante el desarrollo del proyecto, descubrimos que estas drogas, aparentemente inductores de la autofagia, realmente mostraban un fenotipo bloqueador, produciendo acumulación de sustratos típicos de la ruta autofágica, bloqueando el flujo autofágico a nivel de la fusión entre autofagosomas y lisosomas y produciendo una basificación del pH intralisosomal, y cambios en las catepsinas lisosomales, lo que produce una disfunción severa en los lisosomas.

## 1. TREHALOSA COMO AGENTE PROTECTOR Y TERAPÉUTICO EN EH

En este proyecto, hemos investigado los efectos de la epoxomicina y la trehalosa en un modelo de fibroblastos de piel obtenidos de pacientes humanos controles y con EH. Dentro de las características moleculares de esta enfermedad se encuentra el aumento de producción de especies reactivas de oxígeno, acumulación de proteínas ubiquitinizadas debido a un bloqueo en la actividad proteasomal, y acumulación de huntingtina mutada generalmente formando agregados intracelulares. Además se produce daño mitocondrial, cambios en la transcripción de genes y disfunción en el transporte vesicular. Por todo ello, decidimos utilizar la trehalosa, un inductor de la autofagia mTOR independiente (Sarkar, Davies et al. 2007), como tratamiento contra la sintomatología de EH. Además, estudiamos el efecto que tendría un mayor bloqueo del proteasoma en el modelo utilizando la epoxomicina, pretendiendo también dilucidar si la trehalosa era capaz de paliar los síntomas de la enfermedad aun en condiciones más adversas.

Nuestro estudio muestra que la epoxomicina produce un incremento diferencial, dosis dependiente, en la activación de caspasa 3 en fibroblastos control y EH, lo que indica una mayor susceptibilidad a la activación de la muerte celular programada. El tratamiento con trehalosa contrarresta los efectos nocivos de la epoxomicina de una forma dependiente de la

autofagia, ya que al tratar las células con 3-MA, un bloqueador de la autofagia, la trehalosa pierde su efecto protector. Además, nuestros experimentos muestran que la epoxomicina también incrementa los niveles de ROS, de proteínas ubiquitinizadas y de huntingtina en los fibroblastos. Todos estos cambios producidos por el inhibidor del proteasoma, son revertidos por la trehalosa.

Nuestros experimentos han revelado diferencias basales entre los fibroblastos EH y los controles. Los fibroblastos EH presentaban un nivel de incorporación de BrDU mayor en los pases mas tempranos. Sin embargo, al estudiar la tasa proliferativa a un número de pases mayor de 12, la incorporación de BrdU se veía disminuida en ambos fenotipos, pero de una forma mas acusada en los fibroblastos EH. Estos resultados sugieren que los fibroblastos EH sufren una evolución más rápida hacia un fenotipo de senescencia, probablemente causado por su deficiencia en el sistema ubiquitina-proteasoma (Chondrogianni, Stratford et al. 2003, Seo, Sonntag et al. 2004, Torres, Lewis et al. 2006). El tratamiento con epoxomicina por 48 horas detiene la replicación en un 99% en los controles y en un 85% en los fibroblastos EH. Además, la trehalosa es capaz de incrementar la replicación en ambos genotipos, pero no es capaz de prevenir la parada en el ciclo celular producido por la epoxomicina. El sistema ubiquitina-proteasoma esta implicado en el ciclo celular (Fasanaro, Capogrossi et al. 2010, Bassermann, Eichner et al. 2014), se ha mostrado una actividad UPS disminuida en células senescentes con poca capacidad replicativa (Chondrogianni, Stratford et al. 2003), lo que es consistente con la parada del ciclo celular causado por la epoxomicina. Así mismo, hemos observado que los fibroblastos EH presentan una mayor tasa replicativa que los controles, como se describe previamente en el trabajo de Goetz et al (Goetz, Roberts et al. 1981).

La disfunción proteasomal ha sido considerada un mecanismo de producción de desórdenes neurodegenerativos, entre ellos, la EH. La proteína huntingtina es degradada por el sistema UPS y por autofagia (Qin, Wang et al. 2003, Li, Wang et al. 2010). En cerebro y fibroblastos de piel de pacientes con EH, se ha encontrado previamente una función disminuida del sistema UPS (Bence, Sampat et al. 2001, Seo, Sonntag et al. 2004). Hemos mostrado que los fibroblastos EH tienen niveles elevados de proteínas ubiquitinizadas y de huntingtina. En este estudio, mostramos que la trehalosa, como un inductor de la autofagia, compensa el bloqueo en la actividad del sistema UPS, incluso en los fibroblastos tratados con epoxomicina en ambos genotipos.

En EH existe una actividad anormal de la mitocondria y un exceso de producción de radicales libres (Arenas, Campos et al. 1998, Browne 2008, Chen 2011, Zheng and Diamond

2012). La reducción de la actividad respiratoria en EH se ha encontrado en cerebro pero no en fibroblastos (Tabrizi, Cleeter et al. 1999, Seo, Sonntag et al. 2004, del Hoyo, García-Redondo et al. 2006). Descubrimos que los fibroblastos de piel de pacientes con EH tenían aumentados los niveles de ROS y disminuida la actividad quimotripsina (UPS) con respecto a los pacientes sanos, y estos efectos son revertidos por la trehalosa. En controles, la trehalosa también consigue aumentar la actividad UPS y revertir el incremento en ROS producido por epoxomicina. Algunos estudios muestran una relación entre la disfunción del UPS, la producción de ROS y la discapacidad mitocondrial (del Hoyo, García-Redondo et al. 2006, Domingues, Arduíno et al. 2008, Torres and Perez 2008 ). Induciendo la autofagia mediante la utilización de la trehalosa, mejoramos la actividad del sistema UPS por la mayor eliminación de la huntingtina mutada, lo cual puede aliviar la disfunción mitocondrial y reducir la formación de ROS. Además, la trehalosa actúa también como un antioxidante (Simola, Hanninen et al. 2000), lo que ayuda a reducir aun más los niveles de ROS.

Las proteínas ERK pertenecen a la familia de las MAP kinasas y se relacionan con la promoción de la supervivencia celular. Sin embargo, los efectos de la activación de esta kinasa son dependientes de la intensidad y del mantenimiento en el tiempo del estado activo. Una activación persistente y fuerte de ERK produce la inducción de la muerte celular (Seo, Chong et al. 2001, Canals, Casarejos et al. 2003), mientras que una activación corta de ERK se asocia con supervivencia (Xia, Dickens et al. 1995, De Bernardo, Canals et al. 2003). Además, la regulación negativa de ERK se relaciona con inhibición de la proliferación celular (Fisher, Liu et al. 2001, Jeong, Kim et al. 2012). En nuestros experimentos mostramos que ERK estaba downregulado en presencia de epoxomicina en los fibroblastos controles, lo cual es consistente con el arresto en ciclo celular observado en el ensayo de incorporación de BrdU. La situación se mostraba diferente completamente en los fibroblastos EH. La epoxomicina inducía una activación de ERK del 22% a las 24 horas de tratamiento, resultando en la estimulación de la muerte celular, lo cual es revertido con el tratamiento con trehalosa.

HSP70 funciona como una chaperona y protege a las neuronas de la agregación de proteínas y su toxicidad mediante su unión a las proteínas no plegadas o parcialmente plegadas (Chappell, Welch et al. 1986). Miembros de la familia de las chaperonas HSP40 y HSP70 se han detectado co-localizando con los agregados nucleares en diferentes enfermedades relacionadas con expansiones de poliglutaminas, en cerebros humanos y de ratón (Chai, Koppenhafer et al. 1999, Jana, Tanaka et al. 2000). En nuestros experimentos

apreciamos un incremento notable en los niveles de HSP70 tras el tratamiento con epoxomicina en los fibroblastos de piel control y EH. Este hecho implica un rol protector de HSP70 contra los efectos nocivos del inhibidor proteosomal, entre los cuales se incluye la acumulación de proteínas.

La inhibición del sistema UPS puede inducir neurodegeneración, lo cual podría ser revertido mediante la inducción de autofagia (Pan, Kondo et al. 2008). LAMP2A es una proteína de la membrana lisosomal, por lo que su expresión significa activación de los lisosomas, y LC3 se localiza en la membrana interna y externa de los autofagosomas (Kabeya, Mizushima et al. 2000). Hemos observado en este proyecto un incremento en los marcadores LC3 y LAMP2A, en fibroblastos control y EH, tras tratar las células con trehalosa, lo que indica que efectivamente la trehalosa está actuando como un inductor de la autofagia. Además, hemos mostrado unos niveles elevados de forma basal de estos marcadores en los fibroblastos EH, lo que podría ser un mecanismo compensatorio ante la pérdida de funcionalidad del proteosoma.

Debido a los efectos beneficiosos de la trehalosa en las proteinopatías, como inductor de la autofagia, chaperona química y antioxidante, así como la ausencia de efectos tóxicos incluso en altas dosis, este disacárido es un candidato interesante para su uso en ensayos clínicos en pacientes con EH.

## 2. MECANISMO MOLECULAR DE LA TREHALOSA COMO AGENTE TERAPÉUTICO Y POTENCIADOR DE LA AUTOFAGIA

Los resultados prometedores con la trehalosa nos llevaron a investigar acerca del mecanismo molecular por el cual este disacárido actúa. Hasta el momento, el mecanismo molecular de inducción de autofagia por la trehalosa permanece desconocido, aunque si se ha demostrado que dicho mecanismo es independiente de la activación de mTOR (Sarkar, Davies et al. 2007). En nuestra búsqueda del modelo de acción de la trehalosa, estudiamos las principales rutas de señalización en autofagia, utilizando primeramente las células Hela como modelo. Empezamos evaluando la activación de ULK1, que fosforila a Beclina-1 y la libera de Bcl-2, promoviendo la inducción de autofagia (Russell, Tian et al. 2013), la implicación de TRAF6 en la ubiquitinización de Beclina y también la ruta de las MAP kinasas.

En este proyecto, después de confirmar que el tratamiento con trehalosa efectivamente produce un incremento de los niveles de LC3 en presencia y ausencia de bafilomicina, así como la disminución de formación de agregados de huntingtina en células que expresan el exón 1 mutado de la proteína huntingtina, nos dispusimos a analizar su mecanismo molecular de actuación. Basándonos en la premisa de que la trehalosa actúa de una forma mTOR independiente, decidimos empezar nuestro estudio analizando posibles modificaciones de Beclina-1, una proteína clave en la inducción de la autofagia. Beclina-1 en estado basal, interacciona con Bcl-2, ésta proteína reprime la actividad Beclina y, consecuentemente, no se produce inducción de la autofagia (Decuypere, Parys et al. 2012). Una de las proteínas principales en la inducción de autofagia que promueve la disociación de Bcl-2 de Beclina-1, es la serina/treonina kinasa ULK1. ULK1, cuando está activada, fosforila a Beclina-1 y, esta fosforilación, promueve la separación de Bcl-2 del complejo, liberando a Beclina y permitiendo la inducción de la autofagia (Russell, Tian et al. 2013). Observamos que la trehalosa no produce cambios en la fosforilación de ULK1, uno de los principales efectores de la autofagia, permitiéndonos descartar esta ruta de señalización como posible mecanismo de la trehalosa.

Otra proteína importante en la disociación del complejo Bcl-2/Beclina-1 es TRAF6. TRAF6 es una E3 ubiquitina ligasa, que cuando está activa produce la ubiquitinización (en cadenas de ubiquitina unidas por lisina 63) de Beclina-1. La ubiquitinización K63 de Beclina produce la disociación de Bcl-2 y permite la inducción de la autofagia (Shi and Kehrl 2010). Para estudiar la posibilidad de que la trehalosa estuviese promoviendo la ubiquitinización de beclina, realizamos una inmunoprecipitación de beclina (marcada con Flag) en células que además sobreexpresaban ubiquitina (marcada con hemaglutinina) WT o deficiente para la formación de enlaces K63. Nuestros experimentos no mostraron cambios significativos en la ubiquitinización de Beclina, ni con ubiquitinas WT ni con ubiquitinas deficientes para el enlace K63. Estos resultados descartaban la ubiquitinización de Beclina como la principal ruta en la activación de la autofagia por la trehalosa.

Una de las familias de proteínas más importantes en señalización celular son las MAP kinasas. Estas kinasas forman una familia muy extensa que se puede subdividir en tres grupos: JNK, p-38 y ERK MAP kinasa; y además pueden relacionarse con la modulación de la autofagia (Sridharan, Jain et al. 2011). Decidimos evaluar la participación de ERK1/2 en la inducción de la autofagia por la trehalosa. Para ello realizamos una curva tiempo y

determinamos que ERK se activaba tras el tratamiento con el disacárido. Para corroborar su participación e importancia en el mecanismo de actuación de la trehalosa, utilizamos inhibidores específicos de ERK para determinar si la inducción de LC3 se seguía produciendo. Nuestros resultados muestran que el bloqueo de la activación de ERK en células Hela impide la inducción de la autofagia por la trehalosa, lo que indica que ERK es una proteína esencial en el mecanismo estudiado en este tipo celular.

Para intentar dilucidar más proteínas implicadas en el mecanismo realizamos un estudio de proteínas relacionadas con la autofagia que también lo estaban con ERK. Una de las más importantes es TFEB. TFEB es un factor de transcripción que al activarse se transloca al núcleo celular y promueve la transcripción de genes relacionados con la autofagia (Settembre, Di Malta et al. 2011). Estudiando los niveles de TFEB en fracciones enriquecidas citoplasmáticas y nucleares, descubrimos que tras el tratamiento con trehalosa, TFEB sufría una mayor translocación al núcleo. Estudios realizados en otros laboratorios también muestran que la trehalosa es capaz de inducir la translocación al núcleo de TFEB, si bien no muestran si esta translocación es importante en la inducción de la autofagia mediada por trehalosa (Dehay, Bove et al. 2010). También observamos una mayor producción de LAMP1, uno de los genes diana de TFEB, tras el tratamiento con trehalosa. Estos resultados indican que TFEB es uno de las proteínas implicadas en la activación de la autofagia por la trehalosa. Para determinar si ERK estaba modulando la actividad de TFEB, utilizamos los inhibidores de ERK y testamos nuevamente los niveles de TFEB tanto en citoplasma como en núcleo. Nuestros resultados revelan que la inhibición de ERK en células Hela, impide la translocación de TFEB al núcleo y la producción consiguiente de LAMP1.

Nuestros experimentos indican que, en células Hela, la trehalosa está produciendo la activación de ERK, de la cual depende la inducción de la autofagia. Dicha inducción se realiza, totalmente o en parte, por la activación de TFEB y consiguiente activación de genes relacionados con la autofagia, proceso que también es ERK dependiente. Dado que la inducción de la autofagia por la trehalosa es rápida, decidimos comprobar si la inducción de los genes diana de TFEB podría también producirse a tiempos cortos. Los resultados muestran una inducción de la producción de LAMP1 incluso tras una hora de tratamiento con trehalosa. Tras estos resultados, decidimos realizar un knockdown de TFEB para determinar finalmente su importancia en la inducción de la autofagia por la trehalosa. Nuestros experimentos muestran que cuando la expresión de TFEB se ve comprometida, se produce una reducción

drástica en la inducción de LC3, que aunque no es total, nos muestra la importancia de TFEB en el mecanismo de actuación de la trehalosa.

El siguiente paso era comprobar la ruta de señalización propuesta en otros tipos celulares. Para ello utilizamos la línea de linfoma de ratón RAW 264.7 y la línea derivada de neuroblastoma SH-SY5Y. Tras comprobar que la activación de ERK seguía produciéndose en estos dos tipos celulares, realizamos el experimento con los inhibidores de ERK para determinar su importancia en la inducción de los niveles de LC3. En este caso nuestros experimentos muestran la no dependencia de ERK en la inducción de la autofagia por la trehalosa en estas dos líneas celulares, lo que sugiere que existen ciertos problemas de especificidad celular y deja abierta la cuestión de si realmente TFEB sigue siendo importante en el mecanismo de la trehalosa en estos dos tipos celulares, aunque no haya dependencia de ERK. Estudios más exhaustivos deben realizarse para responder a estas cuestiones y determinar un mecanismo de actuación de la trehalosa común en todos los tipos celulares, puesto que la trehalosa consigue la inducción de la autofagia en cualquier tipo celular.

### 3. SCREENING DE NUEVOS MODULADORES DE LA AUTOFAGIA

En este proyecto hemos realizado un screening farmacológico para buscar moduladores de la autofagia que pudiesen utilizarse como drogas en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, como la EH; o bien que sirviesen para la identificación de nuevas rutas relacionadas con la modulación de la autofagia que pudiesen utilizarse para el diseño de nuevos fármacos. Para la realización del screening se ha utilizado la determinación de los niveles de LC3-II como marcador de autofagosomas, en presencia y ausencia de bafilomicina.

Tras realizar los primeros experimentos por western blot y analizar los niveles de LC3-II, seleccionamos tres drogas que primeramente parecían actuar como inductores de autofagia, ya que producían un incremento de LC3-II tanto en ausencia como en presencia de bafilomicina. Las tres drogas seleccionadas fueron la trifluoperazina, perfenazina y flufenazina. Las tres pertenecen al grupo de las fenotiazinas, fármacos que se utilizan actualmente en el tratamiento de la esquizofrenia. Estudiando la bibliografía descubrimos referencias de estas drogas, sobre todo de trifluoperazina, como inductores de la autofagia (Zhang, Yu et al. 2007, Hoellerhage, Goebel et al. 2014). Una curva dosis-respuesta nos

permitió identificar la dosis de 10  $\mu$ M como la adecuada para realizar los experimentos, ya que era la que mayor aumento de LC3-II producía en células PC12 y neuronas.

Las fenotiazinas, como se ha mencionado anteriormente, son fármacos utilizados en el tratamiento de la esquizofrenia. Éstos fármacos son conocidos por su actuación a nivel de los receptores de dopamina, bloqueando a los receptores D1 y D2 (Seeman, Lee et al. 1976, Creese, Burt et al. 1996, Marques, Lima et al. 2004). Por ello, decidimos estudiar el papel de agonistas y antagonistas de estos receptores dopaminérgicos en la inducción de la autofagia mediante la utilización de diferentes drogas. Nuestros resultados muestran que ninguna de las drogas utilizadas, agonistas y antagonistas de los receptores D1 y D2 dopaminérgicos, tenía un efecto en la inducción de LC3-II, lo que nos indicaba que el mecanismo de acción de las fenotiazinas en inducción de autofagia, no estaba relacionado con su capacidad de bloquear los receptores dopaminérgicos. Para terminar de cerciorarnos, tratamos de determinar si se producía inducción de autofagia, medida como producción de LC3-II, en células Hela, las cuales carecen de receptores dopaminérgicos. Los experimentos realizados muestran que las fenotiazinas son capaces de estimular la producción de LC3-II en células Hela, lo que confirma que el mecanismo es independiente de los receptores dopaminérgicos.

Para apoyar la teoría de que estas drogas presentaban un fenotipo inductor de la autofagia, realizamos otro tipo de experimento también basado en la proteína LC3-II. En este caso, la proteína LC3 se encuentra fusionada a GFP y RFP. En condiciones de pH fisiológico, en los autofagosomas, se puede observar la fluorescencia de las dos proteínas fluorescentes; mientras que en pH ácido, en el interior de los lisosomas y autolisosomas, la proteína GFP se vuelve inestable y prácticamente solo se puede apreciar la fluorescencia roja. Esto nos permite diferenciar autofagosomas de autolisosomas y determinar el estado del flujo autofágico (Zhou C 2012). Tras la realización de este ensayo, descubrimos que las fenotiazinas parecían estar bloqueando el flujo autofágico, ya que observábamos una disminución en las vesículas que solo emitían fluorescencia roja (autolisosomas), al igual que ocurre con la bafilomicina, conocida droga que bloquea el flujo autofágico.

Después de estos resultados comenzamos a pensar en que quizá las fenotiazinas realmente estuviesen bloqueando la autofagia. Podría ser que el aumento en LC3-II que se apreciaba en presencia de bafilomicina y que identificaba a las drogas como inductores de la autofagia, se estuviese produciendo debido a que las fenotiazinas estaban bloqueando la ruta de una forma más potente que la bafilomicina. Para probar la nueva hipótesis decidimos

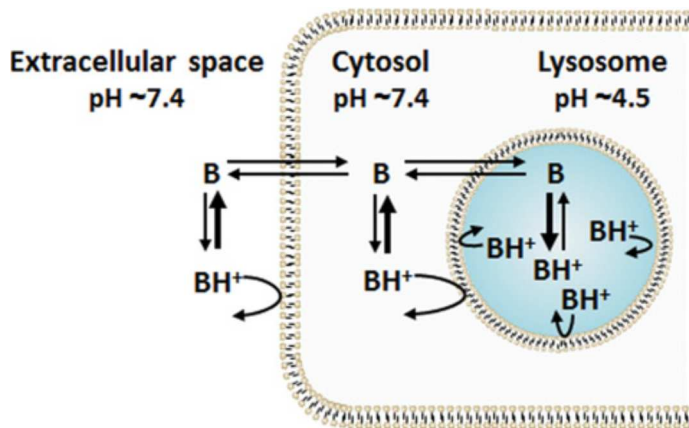


realizar un nuevo ensayo para la medición de LC3-II. Para asegurarnos de que realmente el flujo autofágico estaba siendo bloqueado, pre-tratamos las células durante 1 hora con bafilomicina y posteriormente añadimos las fenotiazinas (aun en presencia de bafilomicina) por 4 horas más. Los resultados en células Hela, SH-SY5Y y en cultivos primarios de neuronas en este ensayo, indican que las fenotiazinas presentan un fenotipo de bloqueadores de la autofagia, ya que no hay aumento de LC3-II en presencia de bafilomicina.

Para comprobar el efecto de estas drogas sobre la eliminación de sustratos, realizamos experimentos de eliminación de GFP-p62, huntingtina mutada y p62 endógeno en diferentes tipos celulares. Los tres tipos de ensayos muestran una acumulación de sustratos de la autofagia, lo que coincide con un fenotipo bloqueador. También analizamos la co-localización de las vesículas de LC3 (autofagosomas) con las vesículas de LAMP1 (autolisosomas) para determinar en qué parte de la ruta se estaba produciendo el bloqueo. Nuestros resultados muestran un aumento en la producción de lisosomas y su agregación alrededor del núcleo, y una mayor co-localización con los autofagosomas tras tratar las células con las fenotiazinas. Este resultado indica que los dos tipos de vesículas están próximos, puede que hayan incluso fusionado, pero posteriormente, el flujo se interrumpe impidiendo la degradación de los sustratos. Esto nos llevó a pensar en que las fenotiazinas, posiblemente, estuviesen dañando los lisosomas de alguna manera.

Para comprobar el estado de los lisosomas, estudiamos la maduración y expresión de catepsina D por western blot, lo que reveló una disminución del ratio entre proteína madura e inmadura, lo que indica algún tipo de afectación en esta proteína. Estudios del pH de los lisosomas revelaron un aumento en el pH tras el tratamiento con las fenotiazinas, lo que causaría una disfunción en los lisosomas. Las fenotiazinas son considerados compuestos lisosomotrópicos (Deduve, Debarsy et al. 1974). Las drogas lisosomotropicas tienen un componente lipofílico y otro básico. El componente lipofílico les permite interactuar con las membranas celulares, como los lisosomas, las bases débiles lipofílicas se acumulan de manera más efectiva que las hidrofílicas (Ohkuma and Poole 1981). Debido a las diferencias de pH entre el citosol y los lisosomas, las bases débiles se mueven hacia el interior de los lisosomas, acumulándose allí (Deduve, Debarsy et al. 1974, Goldman, Funk et al. 2009). Estos compuestos en el citosol, permanecerían sin carga y podrían cruzar libremente la membrana hacia el interior de los lisosomas (Ishizaki, Yokogawa et al. 2000). Una vez dentro de los lisosomas, estos compuestos se protonan y se quedan atrapados en su interior (Deduve,

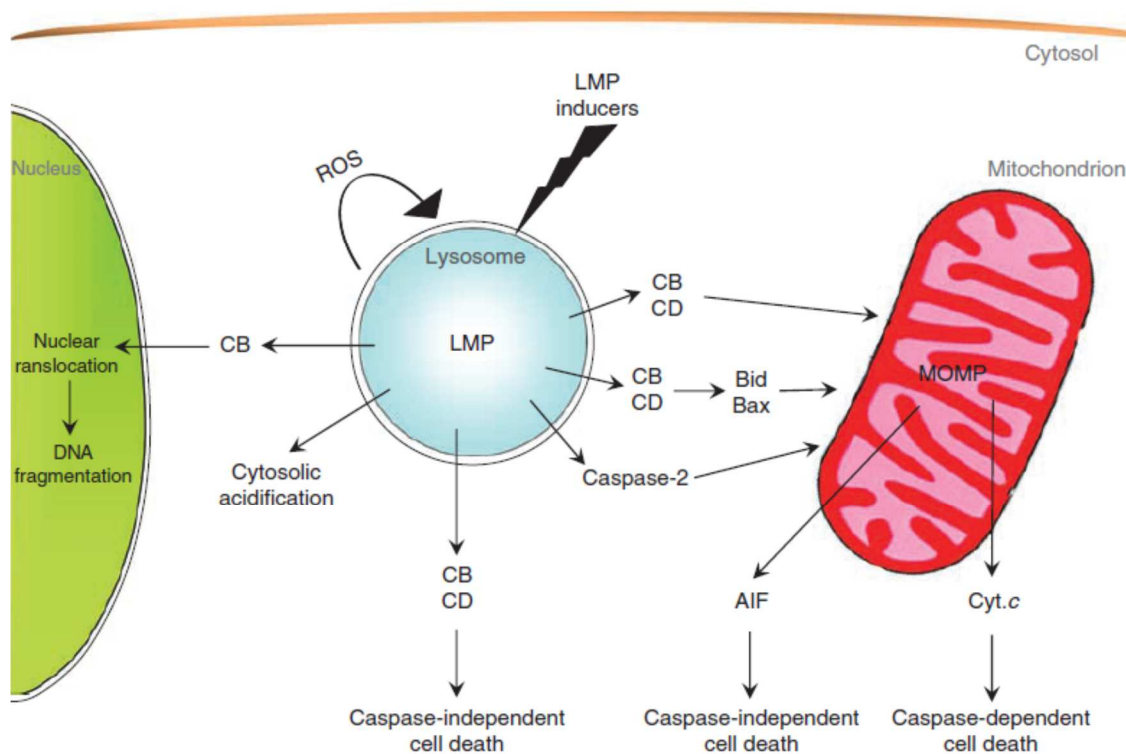
Debarsy et al. 1974, Kaufmann and Krise 2007). Los compuestos básicos incrementan el pH lisosomal, impidiendo el correcto funcionamiento de las hidrolasas del lisosoma (Poole and Ohkuma 1981) (Figura 26). Otros autores proponen que los agentes lisosomotrópicos podrían interrumpir la función degradativa lisosomal mediante el aumento de su pH, inhibiendo el paso final de la autofagia (Nadanaciva, Lu et al. 2011), efecto que concuerda con el fenotipo observado tras el tratamiento con las fenotiazinas en nuestros experimentos.



**Figura 26. Agentes lisosomotrópicos se acumulan en los lisosomas debido a la captura de iones (Giraldo, Appelqvist et al. 2014)**

Dentro de los agentes lisosomotrópicos hay un grupo que también poseen cualidades detergentes que, de acuerdo con su naturaleza anfifílica, pueden romper las bicapas lipídicas. Las aminas lisosomotrópicas contienen un grupo amino y son capaces de difundir pasivamente entre las membranas celulares. Si el compuesto también contiene una cadena hidrofóbica larga, actuará escondiendo su cola hidrofóbica en la membrana mientras que el grupo hidrofílico se quedará en la parte acuosa del lumen lisosomal (Firestone, Pisano et al. 1979). La amina se acumulará dentro de los lisosomas hasta que su concentración sea suficiente para solubilizar la membrana lisosomal (Dubowchik, Gawlak et al. 1995). El daño en la membrana lisosomal produce la liberación del contenido de los lisosomas al citosol, en un proceso denominado permeabilización de la membrana lisosomal (LMP), induciendo la muerte celular. Puesto que las fenotiazinas podrían encajar en el grupo de los agentes lisosomotrópicos detergentes, realizamos un estudio preliminar de localización de catepsina D en el interior celular, para intentar determinar si se estaba produciendo la permeabilización de la membrana mitocondrial. Nuestros resultados muestran una redistribución de la catepsina D, la cual, en numerosas células, se encontraba fuera de los lisosomas tras el

tratamiento con las fenotiazinas. Esta nueva distribución de la catepsina D fuera de los lisosomas encaja con un proceso de permeabilización lisosomal. Como se muestra en la Figura 27, la inducción de la permeabilización lisosomal y la liberación de catepsinas al citosol, induce la permeabilización de la membrana externa mitocondrial, lo que dispara mecanismos de muerte celular (Giraldo, Appelqvist et al. 2014). Diversos estudios han mostrado como la trifluoperazina puede depolarizar el potencial de membrana mitocondrial y producir la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (Snelling R 1984, de Faria, Bettanin et al. 2015). Tanto nuestros experimentos como evidencias encontradas en la bibliografía, sugieren que las fenotiazinas bloquean el flujo autofágico mediante el incremento en el pH intralisosomal y posterior permeabilización de la membrana lisosomal, que conlleva a la despolarización y permeabilización de la membrana externa mitocondrial y puede llevar a la muerte celular.



**Figura 27. Rutas letales activadas después de la permeabilización de la membrana lisosomal (Boya and Kroemer 2008).** La ruta dominante depende de la intensidad de la permeabilización de la membrana lisosomal, de la expresión de hidrolasas lisosomales, de la concentración citosólica de inhibidores de catepsinas, de la funcionalidad de la mitocondria, de la concentración de caspasas y sus agonistas, así como de múltiples factores adicionales. AIF, factor de inducción de apoptosis; CB, catepsina B; CD, catepsina D; Cyt. c, citocromo c; LMP, permeabilización de la membrana lisosomal; MOMP, permeabilización de la membrana externa mitocondrial.

Las fenotiazinas están siendo utilizadas actualmente como fármacos contra la esquizofrenia. Hemos mostrado sus capacidades bloqueadoras de la autofagia a una dosis de

10  $\mu\text{M}$ , pero dado su importancia en el tratamiento de pacientes, decidimos estudiar si los efectos lisosomales observados a esta dosis, también eran observados a una dosis más cercana a la utilizada para contrarrestar los síntomas de la esquizofrenia. Para ello analizamos el pH intralisosomal tratando a las células con diferentes concentraciones de una de las fenotiazinas, la trifluoperazina. Nuestros resultados muestran afectación lisosomal incluso a las dosis más bajas, 1 y 0.3  $\mu\text{M}$ , dosis que se ajustan a las utilizadas en la clínica para el tratamiento de los pacientes (0.4  $\mu\text{M}$  estimado en cerebro para una dosis de 40 mg/día) (Karson, Newton et al. 1992). Estos datos sugieren la necesidad de estudios in vivo para la determinación de los efectos de estas drogas en organismos completos, los efectos adversos de estas drogas a nivel celular, cuestionan los beneficios de su uso en el tratamiento de pacientes.



## *Conclusiones*

---



## *CONCLUSIONES*

1. La trehalosa, que aumenta los niveles de LC3 y LAMP2A, consigue revertir el daño por epoxomicina en fibroblastos control y EH con respecto a producción de ROS, activación de caspasa-3 y acumulación de huntingtina y proteínas ubiquitinizadas.
2. Los fibroblastos EH presentan niveles basales mas altos de ROS, mayor acumulación de proteínas y una actividad proteasomal disminuida. Este fenotipo es normalizado por la trehalosa generando unos niveles similares a los de los fibroblastos control.
3. Los fibroblastos EH presentan una mayor tasa de replicación que los fibroblastos control cuando el número de pases es inferior a 10. Posteriormente, los fibroblastos EH muestran una disminución de la replicación mucho mas acusada que los controles.
4. La trehalosa no produce ningún cambio en la fosforilación de ULK1 ni en la ubiquitinación de beclina en células Hela.
5. En células Hela, la trehalosa produce la activación de ERK1/2, la translocación de TFEB al núcleo y consecuente producción de LAMP1. La producción de LC3-II por trehalosa se ve bloqueada por la inhibición de la activación de ERK1/2 y parcialmente por el silenciamiento de TFEB.
6. La trehalosa produce la activación de ERK1/2 en células RAW 264.7 y SH-SY5Y pero la inducción de la autofagia, medida como el incremento de LC3, no es dependiente de dicha activación.
7. Las fenotiazinas, utilizadas como antipsicóticos, son moduladores de la autofagia y presentan un fenotipo de bloqueador del flujo autofágico en diferentes líneas celulares y en cultivos primarios de neuronas de ratón.



8. Las fenotiazinas producen acumulación de proteínas sustrato de la autofagia, de vesículas positivas a LAMP1 y LC3 y un aumento en la co-localización de autofagosomas y lisosomas, sugiriendo problemas de fusión entre las vesículas o de degradación de los sustratos.
  
9. Las fenotiazinas incrementan los niveles de catepsina D inmadura, aumentan el pH intralisosomal y producen una redistribución de la catepsina D en el interior de la célula, lo que indica un mal funcionamiento de los lisosomas.
  
10. La trifluoperazina, como representante del grupo de las fenotiazinas, produce incremento en el pH lisosomal a unas dosis equivalentes a las estimadas en cerebro tras un tratamiento estándar contra la esquizofrenia.

## *Bibliografía*

---



# *BIBLIOGRAFÍA*

- Agorogiannis, E. I., Agorogiannis, G. I., Papadimitriou, A. and Hadjigeorgiou, G. M. (2004). "Protein misfolding in neurodegenerative diseases." *Neuropathology and Applied Neurobiology* **30**: 215-24.
- Ahmad, S., Safa, A. R. and Glazer, R. I. (1994). "Modulation of p-glycoprotein by protein-kinase c-alpha in a baculovirus expression system." *Biochemistry* **33**: 10313-8.
- Andrew, S. E., Goldberg, Y. P., Kremer, B., Telenius, H., Theilmann, J., Adam, S., et al. (1993). "The relationship between trinucleotide (cag) repeat length and clinical features of huntington's disease." *Nature Genetics* **4**: 398-403.
- Arenas, J., Campos, Y., Ribacoba, R., Martin, M. A., Rubio, J. C., Ablanedo, P., et al. (1998). "Complex i defect in muscle from patients with huntington's disease." *Annals of Neurology* **43**: 397-400.
- Babu, J. R., Geetha, T. and Wooten, M. W. (2005). "Sequestosome 1/p62 shuttles polyubiquitinated tau for proteasomal degradation." *Journal of Neurochemistry* **94**: 192-203.
- Bachoud-Levi, A., Remy, P., Nguyen, J. P., Brugieres, P., Lefaucheur, J. P., Bourdet, C., et al. (2000). "Motor and cognitive improvements in patients with huntington's disease after neural transplantation." *Lancet* **356**: 1975-9.
- Balleine, B. W., Liljeholm, M. and Ostlund, S. B. (2009). "The integrative function of the basal ganglia in instrumental conditioning." *Behavioural Brain Research* **199**: 43-52.
- Bassermann, F., Eichner, R. and Pagano, M. (2014). "The ubiquitin proteasome system - implications for cell cycle control and the targeted treatment of cancer." *Biochimica et Biophysica Acta* **1843**: 150-62.
- Beal, M. F., Marshall, P. E., Burd, G. D., Landis, D. M. and Martin, J. B. (1985). "Excitotoxin lesions do not mimic the alteration of somatostatin in huntington's disease." *Brain Research* **361**: 135-45.
- Benaroudj, N., Lee, D. H. and Goldberg, A. L. (2001). "Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals." *Journal of Biological Chemistry* **276**: 24261-7.
- Bence, N. F., Sampat, R. M. and Kopito, R. R. (2001). "Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation." *Science* **292**: 1552-5.
- Beranger, F., Crozet, C., Goldsborough, A. and Lehmann, S. (2008). "Trehalose impairs aggregation of prpsc molecules and protects prion-infected cells against oxidative damage." *Biochemical Biophysical Research Communications* **374**: 44-8.
- Bjorkoy, G., Lamark, T., Brech, A., Outzen, H., Perander, M., Overvatn, A., et al. (2005). "P62/sqstm1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death." *Journal of Cell Biology* **171**: 603-14.

- Bolam, J. P., Hanley, J. J., Booth, P. A. and Bevan, M. D. (2000). "Synaptic organisation of the basal ganglia." *Journal of Anatomy* **196**: 527-42.
- Bove, J., Martinez-Vicente, M. and Vila, M. (2011). "Fighting neurodegeneration with rapamycin: Mechanistic insights." *Nature Reviews Neuroscience* **12**: 437-52.
- Boya, P. and Kroemer, G. (2008). "Lysosomal membrane permeabilization in cell death." *Oncogene* **27**: 6434-51.
- Brouillet, E., Jacquard, C., Bizat, N. and Blum, D. (2005). "3-nitropropionic acid: A mitochondrial toxin to uncover physiopathological mechanisms underlying striatal degeneration in huntington's disease." *Journal of Neurochemistry* **95**: 1521-40.
- Browne, S. E. (2008). "Mitochondria and huntington's disease pathogenesis: Insight from genetic and chemical models." *Annals of the New York Academy of Sciences* **1147**: 358-82.
- Bruyn, G. (1968). "Huntington's chorea: Historical, clinical and laboratory synopsis." *Handbook of Clinical Neurology* **6**: 298-378.
- Buckley, G. (1989). "Martindale: The extra pharmacopoeia (29th edition)." *The Journal of the Royal College of General Practitioners* **39**: 440-.
- Canals, J. M., Pineda, J. R., Torres-Peraza, J. F., Bosch, M., Martin-Ibanez, R., Munoz, M. T., et al. (2004). "Brain-derived neurotrophic factor regulates the onset and severity of motor dysfunction associated with enkephalinergic neuronal degeneration in huntington's disease." *J Neurosci* **24**: 7727-39.
- Canals, S., Casarejos, M. J., de Bernardo, S., Solano, R. M. and Mena, M. A. (2003). "Selective and persistent activation of extracellular signal-regulated protein kinase by nitric oxide in glial cells induces neuronal degeneration in glutathione-depleted midbrain cultures." *Molecular and Cellular Neuroscience* **24**: 1012-26.
- Cankurtaran, E. S., Ozalp, E., Soygur, H. and Cakir, A. (2006). "Clinical experience with risperidone and memantine in the treatment of huntington's disease." *Journal of the National Medical Association* **98**: 1353-5.
- Casarejos, M. J., Solano, R., Gómez, A., Perucho, J., de Yébenes, J. G. and Mena, M. A. (2011). "The accumulation of neurotoxic proteins, induced by proteasome inhibition, is reverted by trehalose, an enhancer of autophagy, in human neuroblastoma cells." *Neurochemistry International* **58**: 512-20.
- Casarejos, M. J., Solano, R. M., Menendez, J., Rodriguez-Navarro, J. A., Correa, C., Garcia de Yébenes, J., et al. (2005). "Differential effects of l-dopa on monoamine metabolism, cell survival and glutathione production in midbrain neuronal-enriched cultures from parkin knockout and wild-type mice." *Journal of Neurochemistry* **94**: 1005-14.
- Cattaneo E, Z. C., Tartari M. (2005). "Normal huntingtin function: An alternative approach to huntington's disease." *Nature Reviews Neuroscience* **6**: 919-30.

- Caviston JP, H. E. (2009). "Huntingtin as an essential integrator of intracellular vesicular trafficking." *Trends in Cell Biology* **19**: 174-55.
- Chai, Y., Koppenhafer, S. L., Bonini, N. M. and Paulson, H. L. (1999). "Analysis of the role of heat shock protein (hsp) molecular chaperones in polyglutamine disease." *Journal of Neuroscience* **19**: 10338-47.
- Chakrabarti, S., Bhattacharyya, D. and Dasgupta, D. (2000). "Structural basis of DNA recognition by anticancer antibiotics, chromomycin a3, and mithramycin: Roles of minor groove width and ligand flexibility." *Biopolymers* **56**: 85-95.
- Chambers, T. C., Pohl, J., Raynor, R. L. and Kuo, J. F. (1993). "Identification of specific sites in human p-glycoprotein phosphorylated by protein-kinase-c." *Journal of Biological Chemistry* **268**: 4592-5.
- Chappell, T. G., Welch, W. J., Schlossman, D. M., Palter, K. B., Schlesinger, M. J. and Rothman, J. E. (1986). "Uncoating atpase is a member of the 70 kilodalton family of stress proteins." *Cell* **45**: 3-13.
- Chen, C. M. (2011). "Mitochondrial dysfunction, metabolic deficits, and increased oxidative stress in huntington's disease." *Chang Gung medical journal* **34**: 135-52.
- Chen, M., Ona, V. O., Li, M. W., Ferrante, R. J., Fink, K. B., Zhu, S., et al. (2000). "Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of huntington disease." *Nature Medicine* **6**: 797-801.
- Chen, Q. and Haddad, G. G. (2004). "Role of trehalose phosphate synthase and trehalose during hypoxia: From flies to mammals." *Journal of Experimental Biology* **207**: 3125-9.
- Cheung, W. Y. (1980). "Calmodulin plays a pivotal role in cellular-regulation." *Science* **207**: 19-27.
- Chondrogianni, N., Stratford, F. L. L., Trougakos, I. P., Friguet, B., Rivett, A. J. and Gonos, E. S. (2003). "Central role of the proteasome in senescence and survival of human fibroblasts - induction of a senescence-like phenotype upon its inhibition and resistance to stress upon its activation." *Journal of Biological Chemistry* **278**: 28026-37.
- Cieslik-Boczula, K., Szwed, J., Jaszczyszyn, A., Gasiorowski, K. and Koll, A. (2009). "Interactions of dihydrochloride fluphenazine with dppc liposomes: Atr-ir and p-31 nmr studies." *Journal of Physical Chemistry B* **113**: 15495-502.
- Cisbani G, C. F. (2012). "An in vitro perspective on the molecular mechanisms underlying mutant huntingtin protein toxicity." *Cell Death and Disisease* **3**: e382.
- Colaco CALS, R. B. (1995). "Trehalose - a multifunctional additive for food preservation. In food packaging and preservation." Mathlouthi M, Ed. London: Blackie Professiona: 123-40.
- Cowan, C. M. and Raymond, L. A. (2006). "Selective neuronal degeneration in huntington's disease." *Current Topics in Developmental Biology* **75**: 25-71.

Creese, I., Burt, D. R. and Snyder, S. H. (1996). "Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs." *Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences* **8**: 223-6.

Cummings, J. L. and Cunningham, K. (1992). "Obsessive-compulsive disorder in huntington's disease." *Biol Psychiatry* **31**: 263-70.

De Bernardo, S., Canals, S., Casarejos, M. J., Rodriguez-Martin, E. and Mena, M. A. (2003). "Gli-conditioned medium induces de novo synthesis of tyrosine hydroxylase and increases dopamine cell survival by differential signaling pathways." *Journal of Neuroscience Research* **73**: 818-30.

de Faria, P. A., Bettanin, F., Cunha, R. L. O. R., Paredes-Gamero, E. J., Homem-de-Mello, P., Nantes, I. L., et al. (2015). "Cytotoxicity of phenothiazine derivatives associated with mitochondrial dysfunction: A structure-activity investigation." *Toxicology* **330**: 44-54.

Decuypere, J.-P., Parys, J. B. and Bultynck, G. (2012). "Regulation of the autophagic bcl-2/beclin 1 interaction." *Cells* **1**: 284-312.

Deduve, C., Debarsy, T., Poole, B., Trouet, A., Tulkens, P. and Vanhoof, F. (1974). "Lysosomotropic agents." *Biochemical Pharmacology* **23**: 2495-531.

Dehay, B., Bove, J., Rodriguez-Muela, N., Perier, C., Recasens, A., Boya, P., et al. (2010). "Pathogenic lysosomal depletion in parkinson's disease." *Journal of Neuroscience* **30**: 12535-44.

del Hoyo, P., García-Redondo, A., de Bustos, F., Molina, J. A., Sayed, Y., Alonso-Navarro, H., et al. (2006). "Oxidative stress in skin fibroblasts cultures of patients with huntington's disease." *Neurochemistry Reseach* **31**: 1103-9.

Deretic, V., Saitoh, T. and Akira, S. (2013). "Autophagy in infection, inflammation and immunity." *Nature Reviews Immunology* **13**: 722-37.

DiFiglia M, S.-E. M., Chase K, et al (2007). "Therapeutic silencing of mutant huntingtin with sirna attenuates striatal and cortical neuropathology and behavioral deficits." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**.

DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K., Schwarz, C., Meloni, A., Young, C., et al. (1995). "Huntingtin is a cytoplasmic protein associated with vesicles in human and rat brain neurons." *Neuron* **14**: 1075-81.

Domingues, A. F., Arduíno, D. M., Esteves, A. R., Swerdlow, R. H., Oliveira, C. R. and Cardoso, S. M. (2008). "Mitochondria and ubiquitin-proteasomal system interplay: Relevance to parkinson's disease." *Free Radical Biology & Medicine* **45**: 820-5.

Dong X, Z. S., Witting A, Lindenberg KS, Kochanek S, Huang B. (2012). "Adenovirus vector-based in vitro neuronal cell model for huntington's disease with human disease-like differential aggregation and degeneration." *Journal of Gene Medicine* **14**: 468-81.

Dubowchik, G. M., Gawlak, S. L. and Firestone, R. A. (1995). "The in-vitro effects of 3 lysosomotropic detergents against 3 human tumor-cell lines." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **5**: 893-8.

- Dunn, K. W., Kamocka, M. M. and McDonald, J. H. (2011). "A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy." *Am. J. Physiol. - Cell Physiol* **300**.
- Ehrlich ME, C. L., Toselli M, Taglietti L, Fiorillo E, Taglietti V, et al. (2001). "St14a cells have properties of a medium-size spiny neuron." *Experimental Neurology* **167**: 215-26.
- Ermak, G. and Davies, K. J. A. (2002). "Calcium and oxidative stress: From cell signaling to cell death." *Molecular Immunology* **38**: 713-21.
- Fasanaro, P., Capogrossi, M. C. and Martelli, F. (2010). "Regulation of the endothelial cell cycle by the ubiquitin-proteasome system." *Cardiovascular Research* **85**: 272-80.
- Ferrante, R. J., Andreassen, O. A., Dedeoglu, A., Ferrante, K. L., Jenkins, B. G., Hersch, S. M., et al. (2002). "Therapeutic effects of coenzyme q(10) and remacemide in transgenic mouse models of huntington's disease." *Journal of Neuroscience* **22**: 1592-9.
- Ferrante, R. J., Andreassen, O. A., Jenkins, B. G., Dedeoglu, A., Kuemmerle, S., Kubilus, J. K., et al. (2000). "Neuroprotective effects of creatine in a transgenic mouse model of huntington's disease." *Journal of Neuroscience* **20**: 4389-97.
- Firestone, R. A., Pisano, J. M. and Bonney, R. J. (1979). "Lysosomotropic agents .1. Synthesis and cytotoxic action of lysosomotropic detergents." *Journal of Medicinal Chemistry* **22**: 1130-3.
- Fisher, M., Liu, B., Glennon, P. E., Southgate, K. M., Sale, E. M., Sale, G. J., et al. (2001). "Downregulation of the erk 1 and 2 mitogen activated protein kinases using antisense oligonucleotides inhibits proliferation of porcine vascular smooth muscle cells." *Atherosclerosis*. **156**: 289-95.
- Ford, J. M. (1996). "Experimental reversal of p-glycoprotein-mediated multidrug resistance by pharmacological chemosensitisers." *European Journal of Cancer* **32A**: 991-1001.
- Frølich KW, A. G., Holmsen H. (1992). "Chlorpromazine increases the turnover of metabolically active phosphoinositides and elevates the steady-state level of phosphatidylinositol-4-phosphate in human platelets." *Biochemical Pharmacology*. **44**: 2013-20.
- Gharami, K., Xie, Y., An, J. J., Tonegawa, S. and Xu, B. (2008). "Brain-derived neurotrophic factor over-expression in the forebrain ameliorates huntington's disease phenotypes in mice." *Journal of Neurochemistry* **105**: 369-79.
- Gil JM, R. A. (2008). "Mechanisms of neurodegeneration in huntington's disease." *European Journal of Neuroscience* **27**: 2803-20.
- Gillis, J. C., Benefield, P. and McTavish, D. (1994). "Idebenone. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in age- related cognitive disorders." *Drugs Aging* **5**: 133-52.
- Giraldo, A. M. V., Appelqvist, H., Ederth, T. and Ollinger, K. (2014). "Lysosomotropic agents: Impact on lysosomal membrane permeabilization and cell death." *Biochemical Society Transactions* **42**: 1460-4.



Goetz, I. E., Roberts, E. and Warren, J. (1981). "Skin fibroblasts in huntington disease." *American Journal of Human Genetics* **32**: 187-96.

Goldman, S. D. B., Funk, R. S., Rajewski, R. A. and Krise, J. P. (2009). "Mechanisms of amine accumulation in, and egress from, lysosomes." *Bioanalysis* **1**: 1445-59.

Gonzalez-Alegre, P. and Afifi, A. K. (2006). "Clinical characteristics of childhood-onset (juvenile) huntington's disease: Report of 12 patients and review of the literature." *Journal of child neurology* **21**: 223-9.

Grafton, S. T., Mazziotta, J. C., Pahl, J. J., George-Hyslop, S., P., H., L., J., et al. (1992). "Serial changes of cerebral glucose metabolism and caudate size in persons at risk for huntington's disease." *Archives of Neurology* **49**: 1161-7.

Graham, R. K., Deng, Y., Slow, E. J., Haigh, B., Bissada, N., Lu, G., et al. (2006). "Cleavage at the caspase-6 site is required for neuronal dysfunction and degeneration due to mutant huntingtin." *Cell* **125**: 1179-91.

Graveland GA, W. R., Difiglia M (1985). "Evidence for degenerative and regenerative changes in neostriatal spiny neurons in huntington ´s disease." *Science* **22**: 770-3.

Graybiel, A. M., Aosaki, T., Flaherty, A. W. and Kimura, M. (1994). "The basal ganglia and adaptive motor control." *Science* **265**: 1826-31.

Guyot, M. C., Palfi, S., Stutzmann, J. M., Maziere, M., Hantraye, P. and Brouillet, E. (1997). "Riluzole protects from motor deficits and striatal degeneration produced by systemic 3-nitropropionic acid intoxication in rats." *Neuroscience* **81**: 141-9.

Hackam AS, H. J., Singaraja R, Zhang T, Gan L, Gutekunst CA, et al. (1999). "Evidence for both the nucleus and cytoplasm as subcellular sites of pathogenesis in huntington's disease in cell culture and in transgenic mice expressing mutant huntingtin." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **354**: 1047-55.

Hackam AS, S. R., Wellington CL, Metzler M, McCutcheon K, Zhang T, et al (1998). "The influence of huntingtin protein size on nuclear localization and cellular toxicity." *Journal of Cell Biology* **141**: 1097-105.

Hait, W. N. and Aftab, D. T. (1992). "Rational design and preclinical pharmacology of drugs for reversing multidrug resistance." *Biochemical Pharmacology* **43**: 103-7.

Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., et al. (2006). "Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice." *Nature* **441**: 885-9.

Harper, P. S. (1992). "The epidemiology of huntington's disease." *Human Genetics* **89**: 365-76.

Heng, M. Y., Detloff, P. J. and Albin, R. L. (2008). "Rodent genetic models of huntington's disease." *Neurobiology of Disease* **32**: 1-9.

Hersch, S., Fink, K., Vonsattel, J. P. and Friedlander, R. M. (2003). "Minocycline is protective in a mouse model of huntington's disease." *Annals of Neurology* **54**: 841-.

Hersch, S. M., Gevorkian, S., Marder, K., Moskowitz, C., Feigin, A., Cox, M., et al. (2006). "Creatine in huntington disease is safe, tolerable, bioavailable in brain and reduces serum 8oh2 ' dg." *Neurology* **66**: 250-2.

Higashiyama T (2002). "Novel functions and applications of trehalose." *Pure and Applied Chemistry* **74**: 1263-9.

Hirata M, S. E., Koga T. (1982). "Calmodulin antagonists inhibit ca<sup>2+</sup> uptake of mitochondria of guinea pig peritoneal macrophages." *Biochemical Biophysical Research Communications* **105**: 1176-81.

Hockly, E., Richon, V. M., Woodman, B., Smith, D. L., Zhou, X. B., Rosa, E., et al. (2003). "Suberoylanilide hydroxamic acid, a histone deacetylase inhibitor, ameliorates motor deficits in a mouse model of huntington's disease." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 2041-6.

Hoellerhage, M., Goebel, J. N., de Andrade, A., Hildebrandt, T., Dolga, A., Culmsee, C., et al. (2014). "Trifluoperazine rescues human dopaminergic cells from wild-type alpha-synuclein-induced toxicity." *Neurobiology of Aging* **35**: 1700-11.

Holmberg, C. I., Staniszewski, K. E., Mensah, K. N., Matouschek, A. and Morimoto, R. I. (2004). "Inefficient degradation of truncated polyglutamine proteins by the proteasome." *Embo Journal* **23**: 4307-18.

Holzmann C, M. W., Petersohn D, Schmidt T, Thiel G, Epplen JT, et al. (1998). "Isolation and characterization of the rat huntingtin promoter." *Biochemical Journal* **336**: 227-34.

Huntginton's-disease-Collaborative-Research-Group (1993). "A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on huntington's disease chromosomes." *Cell* **72**: 971-83.

Ishizaki, J., Yokogawa, K., Ichimura, F. and Ohkuma, S. (2000). "Uptake of imipramine in rat liver lysosomes in vitro and its inhibition by basic drugs." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **294**: 1088-98.

Izmitli, A., Schebor, C., McGovern, M. P., Reddy, A. S., Abbott, N. L. and de Pablo, J. J. (2011). "Effect of trehalose on the interaction of alzheimer's a beta-peptide and anionic lipid monolayers." *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1808**: 26-33.

Jain, N. K. and Roy, I. (2009). "Effect of trehalose on protein structure." *Protein Science* **18**: 24–36.

Jakel, R. J. and Maragos, W. F. (2000). "Neuronal cell death in huntington's disease: A potential role for dopamine." *Trends in Neurosciences* **23**: 239-45.

Jana, N. R., Tanaka, M., Wang, G. H. and Nukina, N. (2000). "Polyglutamine length-dependent interaction of hsp40 and hsp70 family chaperones with truncated n-terminal huntingtin: Their role in suppression of aggregation and cellular toxicity." *Human Molecular Genetics* **9**: 2009-18.

- Jenkins, B. G., Rosas, H. D., Chen, Y. C., Makabe, T., Myers, R., MacDonald, M., et al. (1998). "1h nmr spectroscopy studies of huntington's disease: Correlations with cag repeat numbers." *Neurology* **50**: 1357-65.
- Jeong, J. C., Kim, S. J., Kim, Y. K., Kwon, C. H. and Kim, K. H. (2012). "Lycii cortex radice extract inhibits glioma tumor growth in vitro and in vivo through downregulation of the akt/erk pathway." *Oncology Reports* **27**: 1467-74.
- Jose Casarejos, M., Perucho, J., Luis Lopez-Sendon, J., Garcia de Yébenes, J., Bettencourt, C., Gomez, A., et al. (2014). "Trehalose improves human fibroblast deficits in a new chip-mutation related ataxia." *PLoS One* **9**.
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Uero, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., et al. (2000). "Lc3, a mammalian homologue of yeast apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing." *Embo Journal* **19**: 5720-8.
- Kalchman, M. A., Graham, R. K., Xia, G., Koide, H. B., Hodgson, J. G., Graham, K. C., et al. (1996). "Huntingtin is ubiquitinated and interacts with a specific ubiquitin-conjugating enzyme." *Journal of Biological Chemistry* **271**: 19385-94.
- Kandror, O., Bretschneider, N., Kreydin, E., Cavalieri, D. and Goldberg, A. L. (2004). "Yeast adapt to near-freezing temperatures by stre/msn2,4-dependent induction of trehalose synthesis and certain molecular chaperones." *Molecular Cell* **13**: 771-81.
- Karson, C. N., Newton, J. E. O., Mohanakrishnan, P., Sprigg, J. and Komoroski, R. A. (1992). "Fluoxetine and trifluoperazine in human brain - a f-19-nuclear magnetic-resonance spectroscopy study." *Psychiatry Research-Neuroimaging* **45**: 95-104.
- Kaufmann, A. M. and Krise, J. P. (2007). "Lysosomal sequestration of amine-containing drugs: Analysis and therapeutic implications." *Journal of Pharmaceutical Sciences* **96**: 729-46.
- Kaushik, S. and Cuervo, A. M. (2008). "Chaperone-mediated autophagy." *Methods in Molecular Biology* **445**: 227-44.
- Kirkwood, S. C., Siemers, E., Viken, R., Hodes, M. E., Conneally, P. M., Christian, J. C., et al. (2002). "Longitudinal personality changes among presymptomatic huntington's disease gene carriers." *Neuropsychiatry, neuropsychology, and behavioral neurology* **15**: 192-7.
- Klionsky, D. J., Abdalla, F. C., Abeliovich, H., Abraham, R. T., Acevedo-Arozena, A., Adeli, K., et al. (2012). "Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy." *Autophagy* **8**: 445-544.
- Komatsu, M. and Ichimura, Y. (2008). "Neuronal autophagy, its defects and neurodegenerative diseases." *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **53**: 2175-81.
- Kremer, B., Weber, B. and Hayden, M. R. (1992). "New insights into the clinical features, pathogenesis and molecular genetics of huntington's disease." *Brain pathology* **2**: 321-35.

- Lee, S.-T., Chu, K., Park, J.-E., Kang, L., Ko, S.-Y., Jung, K.-H., et al. (2006). "Memantine reduces striatal cell death with decreasing calpain level in 3-nitropropionic model of huntington's disease." *Brain Research* **1118**: 199-207.
- Lepore, A. C., Neuhuber, B., Connors, T. M., Han, S. S., Liu, Y., Daniels, M. P., et al. (2006). "Long-term fate of neural precursor cells following transplantation into developing and adult." *CNS Neuroscience* **142**: 287-304.
- Li, H.-H., Willis, M. S., Lockyer, P., Miller, N., McDonough, H., Glass, D. J., et al. (2007). "Atrogin-1 inhibits akt-dependent cardiac hypertrophy in mice via ubiquitin-dependent coactivation of forkhead proteins." *Journal of Clinical Investigation* **117**: 3211-23.
- Li, S. H. and Li, X. J. (2004). "Huntingtin-protein interactions and the pathogenesis of huntington's disease." *Trends in Genetics* **20**: 146-54.
- Li, X., Wang, C. E., Huang, S., Xu, X., Li, X. J., Li, H., et al. (2010). "Inhibiting the ubiquitin-proteasome system leads to preferential accumulation of toxic n-terminal mutant huntingtin fragments." *Human Molecular Genetics* **19**: 2445-55.
- Lievens, J. C., Woodman, B., Mahal, A., Spasic-Boscovic, O., Samuel, D., Goff, K.-L., et al. (2001). "Impaired glutamate uptake in the r6 huntington's disease transgenic mice. ." *Neurobiology of Disease* **8**: 807-21.
- Liu, R., Barkhordarian, H., Emadi, S., Park, C. B. and Sierks, M. R. (2005). "Trehalose differentially inhibits aggregation and neurotoxicity of beta-amyloid 40 and 42." *Neurobiology of Disease* **20**: 74-81.
- Lunkes A, M. J. (1998). "A cellular model that recapitulates major pathogenic steps of huntington's disease." *Human Molecular Genetics* **7**: 1355-61.
- Luthi-Carter, R., Strand, A., Peters, N. L., Solano, S. M., Hollingsworth, Z. R., Menon, A. S., et al. (2000). "Decreased expression of striatal signaling genes in a mouse model of huntington's disease." *Human Molecular Genetics* **9**: 1259-71.
- Luthra, M. (1982). "Trifluoperazine inhibition of calmodulin-sensitive ca<sup>2+</sup> -atpase and calmodulin insensitive (na<sup>+</sup> +k<sup>+</sup>)- and mg<sup>2+</sup> -atpase activities of human and rat red blood cells." *Biochimica et Biophysica Acta* **692**: 271-7.
- Mangiarini, L., Sathasivam, K., Seller, M., Cozens, B., Harper, A., Hetherington, C., et al. (1996). "Exon 1 of the hd gene with an expanded cag repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice." *Cell* **87**: 493-506.
- Marques, L. O., Lima, M. S. and Soares, B. G. O. (2004). "Trifluoperazine for schizophrenia." *The Cochrane database of systematic reviews*: CD003545.
- Mary, V., Wahl, F. and Stutzmann, J. M. (1995). "Effect of riluzole on quinolinate-induced neuronal damage in rats: Comparison with blockers of glutamatergic neurotransmission." *Neuroscience Letters* **201**: 92-6.

Meng, Y., Yong, Y., Yang, G., Ding, H., Fan, Z., Tang, Y., et al. (2013). "Autophagy alleviates neurodegeneration caused by mild impairment of oxidative metabolism." *Journal of Neurochemistry* **126**: 805-18.

Metcalf, D. J., Garcia-Arencibia, M., Hochfeld, W. E. and Rubinsztein, D. C. (2012). "Autophagy and misfolded proteins in neurodegeneration." *Experimental Neurology* **238**: 22-8.

Miller, B. R. and Bezprozvanny, I. (2010). "Corticostriatal circuit dysfunction in huntington's disease: Intersection of glutamate, dopamine and calcium." *Future Neurology* **5**: 735-56.

Milnerwood AJ, K. A., Sepers MD, Gladding CM, Zhang L, Wang L, et al. (2012). "Mitigation of augmented extrasynaptic nmdar signaling and apoptosis in cortico-striatal co-cultures from huntington's disease mice." *Neurobiology of Disease* **48**: 40-51.

Morales LM, E. J., Suarez H, Villalobos R, Chacin de Bonilla L, Bonilla E (1989). "Nutritional evaluation of huntington disease patients." *American Journal of Clinical Nutrition* **50**: 145-50.

Motohashi, N., Kawase, M., Satoh, K. and Sakagami, H. (2006). "Cytotoxic potential of phenothiazines." *Current Drug Targets* **7**: 1055-66.

Mulligan, V. K. and Chakrabartty, A. (2013). "Protein misfolding in the late-onset neurodegenerative diseases: Common themes and the unique case of amyotrophic lateral sclerosis." *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* **81**: 1285-303.

Nadanaciva, S., Lu, S., Gebhard, D. F., Jessen, B. A., Pennie, W. D. and Will, Y. (2011). "A high content screening assay for identifying lysosomotropic compounds." *Toxicology in Vitro* **25**: 715-23.

Naeem, A. and Fazili, N. A. (2011). "Defective protein folding and aggregation as the basis of neurodegenerative diseases: The darker aspect of proteins." *Cell Biochemistry and Biophysics* **61**: 237-50.

Napolitano, M., Centonze, D., Gubellini, P., Rossi, S., Spiezia, S., Bernardi, G., et al. (2004). "Inhibition of mitochondrial complex ii alters striatal expression of genes involved in glutamatergic and dopaminergic signaling: Possible implications for huntington's disease." *Neurobiology of Disease* **15**: 407-14.

Ohkuma, S. and Poole, B. (1981). "Cytoplasmic vacuolation of mouse peritoneal-macrophages and the uptake into lysosomes of weakly basic substances." *Journal of Cell Biology* **90**: 656-64.

Ossato G, D. M., Aiken C, Lukacsovich T, Marsh JL, Gratton E. (2010). "A two-step path to inclusion formation of huntingtin peptides revealed by number and brightness analysis." *Biophysical Journal* **98**: 3078-85.

Paiva, C. L. and Panek, A. D. (1996). "Biotechnological applications of the disaccharide trehalose." *Biotechnology annual review* **2**: 293-314.

Pan, T., Kondo, S., Zhu, W., Xie, W., Jankovic, J. and Le, W. (2008). "Neuroprotection of rapamycin in lactacystin-induced neurodegeneration via autophagy enhancement." *Neurobiology of Disease* **32**: 16-25.

- Park IH, A. N., Huo H, Maherali N, Ahfeldt T, Shimamura A, Lensch MW, Cowan C, Hochedlinger K, Daley GQ. (2008). "Disease-specific induced pluripotent stem cells." *Cell* **134**: 887-86.
- Paulsen, J. S., Ready, R. E., Hamilton, J. M., Mega, M. S. and Cummings, J. L. (2001). "Neuropsychiatric aspects of huntington's disease." *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* **71**: 310-4.
- Pelech SL, J. F., Vance DE. (1983). "Trifluoperazine and other anaesthetics inhibit rat liver ctp: Phosphocholine cytidylyltransferase." *Febs Letters* **158**: 89-92.
- Pelech SL, V. D. (1984). "Trifluoperazine and chlorpromazine inhibit phosphatidylcholine biosynthesis and ctp:Phosphocholine cytidylyltransferase in hela cells." *Biochimica et Biophysica Acta* **795**: 441-6.
- Peroutka, S. J. and Snyder, S. H. (1980). "Relationship of neuroleptic drug effects at brain dopamine, serotonin, alpha-adrenergic, and histamine-receptors to clinical potency." *American Journal of Psychiatry* **137**: 1518-22.
- Perucho, J., Casarejos, M. J., Gomez, A., Solano, R. M., Garcia de Yebenes, J. and Mena, M. A. (2012). "Trehalose protects from aggravation of amyloid pathology induced by isoflurane anesthesia in app(swe) mutant mice." *Current Alzheimer Research* **9**: 334-43.
- Poole, B. and Ohkuma, S. (1981). "Effect of weak bases on the intralysosomal ph in mouse peritoneal-macrophages." *Journal of Cell Biology* **90**: 665-9.
- Qin, Z. H., Wang, Y., Kegel, K. B., Kazantsev, A., Apostol, B. L., Thompson, L. M., et al. (2003). "Autophagy regulates the processing of amino terminal huntingtin fragments." *Human Molecular Genetics* **12**: 3231-44.
- Quinn, N. and Schrag, A. (1998). "Huntington's disease and other choreas." *journal of neurology* **245**: 709-16.
- Raspe, M., Gillis, J., Krol, H., Krom, S., Bosch, K., van Veen, H., et al. (2009). "Mimicking proteasomal release of polyglutamine peptides initiates aggregation and toxicity." *Journal of Cell Science* **122**: 3262-71.
- Ravache M, W. C., Merienne K, Trottier Y. (2010). "Transcriptional activation of rest by sp1 in huntington's disease models." *PLoS One* **5**: e14311.
- Ravikumar, B., Vacher, C., Berger, Z., Davies, J. E., Luo, S. Q., Oroz, L. G., et al. (2004). "Inhibition of mtor induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of huntington disease." *Nature Genetics* **36**: 585-95.
- Reiner, A., Albin, R. L., Anderson, K. D., D'Amato, C. J., Penney, J. B. and Young, A. B. (1988). "Differential loss of striatal projection neurons in huntington's disease." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**: 5733-7.

- Roberts, R. C., Ahn, A., Swartz, K. J., Beal, M. F. and DiFiglia, M. (1993). "Intrastriatal injections of quinolinic acid or kainic acid: Differential patterns of cell survival and the effects of data analysis on outcome." *Experimental Neurology* **124**: 274-82.
- Rodríguez-Navarro, J. A., Rodríguez, L., Casarejos, M. J., Solano, R. M., Gómez, A., Perucho, J., et al. (2010). "Trehalose ameliorates dopaminergic and tau pathology in parkin deleted/tau overexpressing mice through autophagy activation." *Neurobiology of Disease* **39**: 423-38.
- Roos, R. A. (2010). "Huntington's disease: A clinical review." *Orphanet Journal of Rare Diseases* **5**.
- Rosenstock, T. R., Duarte, A. I. and Rego, A. C. (2010). "Mitochondrial-associated metabolic changes and neurodegeneration in huntington's disease - from clinical features to the bench." *Current Drug Targets* **11**: 1218-36.
- Ross, C. A. and Poirier, M. A. (2005). "What is the role of protein aggregation in neurodegeneration?" *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**.
- Ross, C. A. and Tabrizi, S. J. (2011). "Huntington's disease: From molecular pathogenesis to clinical treatment." *Lancet Neurology* **10**: 83-98.
- Rothman, S. M. and Olney, J. W. (1995). "Excitotoxicity and the nmda receptor--still lethal after eight years." *Trends in Neurosciences* **18**: 57-8.
- Roze, E., Cahill, E., Martin, E., Bonnet, C., Vanhoutte, P., Betuing, S., et al. (2011). "Huntington's disease and striatal signaling." *Frontiers in Neuroanatomy* **5**: 669-81.
- Rubinsztein, D. C. (2002). "Lessons from animal models of huntington's disease." *Trends in Genetics* **18**: 202-9.
- Ruiz C, C. M., Gomez A, Solano R, de Yebenes JG, Mena MA. (2012). "Protection by gli-conditioned medium in a cell model of huntington disease." *Plos curr* **4**: e4fbca54a2028b.
- Russell, R. C., Tian, Y., Yuan, H., Park, H. W., Chang, Y.-Y., Kim, J., et al. (2013). "Ulk1 induces autophagy by phosphorylating beclin-1 and activating vps34 lipid kinase." *Nature Cell Biology* **15**: 741-50.
- Ryu, H., Lee, J., Hagerty, S. W., Soh, B. Y., McAlpin, S. E., Cormier, K. A., et al. (2006). "Eset/setdb1 gene expression and histone h3 (k9) trimethylation in huntington's disease." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 19176-81.
- Sadri-Vakili G, C. J. (2006). "Mechanisms of disease: Histone modifications in huntington's disease." *Nature Clinical Practice Neurology* **2**: 330-38.
- Sakai, T. T. and Krishna, N. R. (1999). "Synthesis and properties of some novel anti-calmodulin drugs." *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **7**: 1559-65.
- Sarkar, S., Davies, J. E., Huang, Z., Tunnacliffe, A. and Rubinsztein, D. C. (2007). "Trehalose, a novel mtor-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and alpha-synuclein." *Journal of Biological Chemistry* **282**: 5641-52.

Sarkar, S., Davies, J. E., Huang, Z., Tunnacliffe, A. and Rubinsztein, D. C. (2007). "Trehalose, a novel mtor-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and alpha-synuclein." *Journal of Biological Chemistry* **282**: 5641–52.

Sarkar, S., Krishna, G., Imarisio, S., Saiki, S., O'Kane, C. J. and Rubinsztein, D. C. (2008). "A rational mechanism for combination treatment of huntington's disease using lithium and rapamycin." *Human Molecular Genetics* **17**: 170-8.

Sarkar, S. and Rubinsztein, D. C. (2008). "Small molecule enhancers of autophagy for neurodegenerative diseases." *Molecular BioSystems* **4**: 895-901.

Sasai-Takedatsu M, T. S., Nagata N, Furukawa T, Tokunaga R, Kojima T, Kobayashi Y. (1996). "Human trehalase: Characterization, localization, and its increase in urine by renal proximal tubular damage." *Nephron* **73**: 179-85.

Sathasivam, K., Hobbs, C., Mangiarini, L., Mahal, A., Turmaine, M., Doherty, P., et al. (1999). "Transgenic models of huntington's disease." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **354**: 963-9.

Sathasivam, K., Woodman, B., Mahal, A., Bertaux, F., Wanker, E. E., Shima, D. T., et al. (2001). "Centrosome disorganization in fibroblast cultures derived from r6/2 huntington's disease (hd) transgenic mice and hd patients." *Human Molecular Genetics* **10**: 2425-35.

Schotte, A., Janssen, P. F. M., Gommeren, W., Luyten, W., VanGompel, P., Lesage, A. S., et al. (1996). "Risperidone compared with new and reference antipsychotic drugs: In vitro and in vivo receptor binding." *Psychopharmacology* **124**: 57-73.

Seelig, A., Gottschlich, R. and Devant, R. M. (1994). "A method to determine the ability of drugs to diffuse through the blood-brain-barrier." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 68-72.

Seeman, P., Lee, T., Chauwong, M. and Wong, K. (1976). "Antipsychotic drug doses and neuroleptic-dopamine receptors." *Nature* **261**: 717-9.

Seo, H., Sonntag, K.-C., Kim, W., Cattaneo, E. and Isacson, O. (2007). "Proteasome activator enhances survival of huntington's disease neuronal model cells." *PLoS One* **2**: e238.

Seo, H., Sonntag, K. C. and Isacson, O. (2004). "Generalized brain and skin proteasome inhibition in huntington's disease." *Annals of Neurology* **53**: 319-28.

Seo, S. R., Chong, S. A., Lee, S. I., Sung, J. Y., Ahn, Y. S., Chung, K. C., et al. (2001). "Zn<sup>2+</sup>-induced erk activation mediated by reactive oxygen species causes cell death in differentiated pc12 cells." *Journal of Neurochemistry* **78**: 600-10.

Settembre, C., Di Malta, C., Polito, V. A., Garcia-Arencibia, M., Vetrini, F., Erdin, S., et al. (2011). "Tfeb links autophagy to lysosomal biogenesis." *Science* **332**: 1429-33.

Shao J, D. M. (2007). "Polyglutamine diseases: Emergin concepts in pathogenesis and therapy." *Human Molecular Genetics* **16**: R115-23.



Sharp, A. H., Loev, S. J., Schilling, G., Li, S. H., Li, X. J., Bao, J., et al. (1995). "Widespread expression of huntington's disease gene (it15) protein product." *Neuron* **14**: 1065-74.

Shi, C.-S. and Kehrl, J. H. (2010). "Traf6 and a20 regulate lysine 63-linked ubiquitination of beclin-1 to control tlr4-induced autophagy." *Science Signaling* **3**.

Siesling, S., der Vlis, V.-v., M. and Roos, R. A. (1997). "Juvenile huntington's disease in the netherlands." *Pediatric Neurology* **17**: 37-43.

Simola, M., Hanninen, A. L., Stranius, S. M. and Makarow, M. (2000). "Trehalose is required for conformational repair of heat-denatured proteins in the yeast endoplasmic reticulum but not for maintenance of membrane traffic functions after severe heat stress." *Molecular Microbiology* **37**: 42-53.

Singer, M. A. and Lindquist, S. (1998). "Multiple effects of trehalose on protein folding in vitro and in vivo." *Molecular Cell* **1**: 639-48.

Snelling R, N. D. (1984). "The calmodulin antagonists, trifluoperazine and r24571, depolarize the mitochondria within guinea pig cerebral cortical synaptosomes." *Journal of Neurochemistry* **46**: 1552-7.

Snyder, S. H., Banerjee, S. P., Yamamura, H. I. and Greenber.D (1974). "Drugs, neurotransmitters, and schizophrenia." *Science* **184**: 1243-53.

Solano, R. M., Casarejos, M. J., Menendez-Cuervo, J., Rodriguez-Navarro, J. A., Garcia de Yebenes, J. and Mena, M. A. (2008). "Glial dysfunction in parkin null mice: Effects of aging." *Journal of Neuroscience* **28**: 598-611.

Soto, C. and Estrada, L. D. (2008). "Protein misfolding and neurodegeneration." *Archives of Neurology* **65**: 184-9.

Sridharan, S., Jain, K. and Basu, A. (2011). "Regulation of autophagy by kinases." *Cancers* **3**: 2630-54.

Stack, E. C., Del Signore, S. J., Luthi-Carter, R., Soh, B. Y., Goldstein, D. R., Matson, S., et al. (2007). "Modulation of nucleosome dynamics in huntington's disease." *Human Molecular Genetics* **16**: 1164-75.

Stumptner, C., Heid, H., Zatloukal, K., Fuchsbichler, A., Hauser, H. and Denk, H. (1999). "Identification of p62, a phosphotyrosine independent ligand of p56lck kinase, as a major component of intracytoplasmic hyaline bodies in hepatocellular carcinoma." *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft fur Pathologie* **83**: 254-9.

Sturton RG, B. D. (1977). "Factors controlling the activities of phosphatidate phosphohydrolase and phosphatidate cytidyltransferase. The effects of chlorpromazine, demethylimipramine, cinchocaine, norfenfluramine, mepyramine and magnesium ions." *Biochemical Journal* **162**: 25-32.

- Szebenyi, G., Morfini, G. A., Babcock, A., Gould, M., Selkoe, K., Stenoien, D. L., et al. (2003). "Neuropathogenic forms of huntingtin and androgen receptor inhibit fast axonal transport." *Neuron* **40**: 41-52.
- Szwed, J., Cieslik-Boczula, K., Czarnik-Matusiewicz, B., Jaszczyszyn, A., Gasiorowski, K., Swiatek, P., et al. (2010). "Moving-window 2d correlation spectroscopy in studies of fluphenazine-dppc dehydrated film as a function of temperature." *Journal of Molecular Structure* **974**: 192-202.
- Tabrizi, S., Cleeter, M. W., Xuereb, J., Taanman, J. W., Cooper, J. M. and Schapira, A. H. (1999). "Biochemical abnormalities and excitotoxicity in huntington's disease brain." *Annals of Neurology* **45**: 25-32.
- Taheri, M., Mahjoubi, F. and Omranipour, R. (2010). "Effect of mdr1 polymorphism on multidrug resistance expression in breast cancer patients." *Genetics and Molecular Research* **9**: 34-40.
- Tanaka, M., Machida, Y., Niu, S., Ikeda, T., Jana, N. R., Doi, H., et al. (2004). "Trehalose alleviates polyglutamine-mediated pathology in a mouse model of huntington disease." *Nature Medicine* **10**: 148-54.
- Tang, T.-S., Chen, X., Liu, J. and Bezprozvanny, I. (2007). "Dopaminergic signaling and striatal neurodegeneration in huntington's disease." *Journal of Neuroscience* **27**: 7899-910.
- Teodori, E., Dei, S., Scapecchi, S. and Gualtieri, F. (2002). "The medicinal chemistry of multidrug resistance (mdr) reversing drugs." *Farmaco* **57**: 385-415.
- Thomas, E. A., Coppola, G., Desplats, P. A., Tang, B., Soragni, E., Burnett, R., et al. (2008). "The hdac inhibitor 4b ameliorates the disease phenotype and transcriptional abnormalities in huntington's disease transgenic mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 15564-9.
- Tobin, A. S. E. (2000). "Huntington's disease: The challenge for cel biologist." *Trends Cell Biol* **10**: 531-36.
- Torres, C., Lewis, L. and Cristofalo, V. J. (2006). "Proteasome inhibitors shorten replicative life span and induce a senescent-like phenotype of human fibroblasts." *Journal of Cellular Physiology* **207**: 845-53.
- Torres, C. A. and Perez, V. I. (2008 ). "Proteasome modulates mitochondrial function during cellular senescence." *Free Radical Biology & Medicine* **44**: 403-14.
- Trettel, F., Rigamonti, D., Hilditch-Maguire, P., Wheeler, V. C., Sharp, A. H., Persichetti, F., et al. (2000). "Dominant phenotypes produced by the hd mutation in sthdhq111 striatal cells." *Human Molecular Genetics* **9**: 2799-809.
- Trushina, E., Dyer, R. B., Badger, J. D., 2nd, Ure, D., Eide, L., Tran, D. D., et al. (2004). "Mutant huntingtin impairs axonal trafficking in mammalian neurons in vivo and in vitro." *Molecular and Cellular Biology* **24**: 8195-209.

Velasco Martin A., A. G. F. (1988). Compendio de psiconeurofarmacologia, Ediciones Diaz de Santos.

Venkatraman, P., Wetzel, R., Tanaka, M., Nukina, N. and Goldberg, A. L. (2004). "Eukaryotic proteasomes cannot digest polyglutamine sequences and release them during degradation of polyglutamine-containing proteins." *Molecular Cell* **14**: 95-104.

Vonsattel, J. (2008). "Huntington disease models and human neuropathology: Similarities and differences." *Acta Neuropathologica* **115**: 55-69.

Vonsattel, J. P. and DiFiglia, M. (1998). "Huntington's disease." *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* **57**: 369-84.

Vonsattel, J. P., Keller, C. and Ramirez, C. (2011). "Huntington's disease - neuropathology." *Handbook of Clinical Neurology* **100**: 83-100.

Vonsattel JP, M. R., Stevens TJ, Ferrante RJ, Bird ED, Richardson EP (1985). "Neuropathological classification of huntington's disease." *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* **44**: 559-77.

Wang, H., Lim, P. J., Karbowski, M. and Monteiro, M. J. (2009). "Effects of overexpression of huntingtin proteins on mitochondrial integrity." *Human Molecular Genetics* **18**: 737-52.

Wang, J., Wang, C. E., Orr, A., Tydlacka, S., Li, S. H. and Li, X. J. (2008). "Impaired ubiquitin-proteasome system activity in the synapses of huntington's disease mice." *Journal of Cell Biology* **180**: 1177-89.

Wang, L. H. and Qin, Z. H. (2006). "Animal models of huntington's disease: Implications in uncovering pathogenic mechanisms and developing therapies. ." *Acta of Pharmacologica sinica* **27**: 1287-302.

Weiss, B., Prozialeck, W. C. and Wallace, T. L. (1982). "Interaction of drugs with calmodulin - biochemical, pharmacological and clinical implications." *Biochemical Pharmacology* **31**: 2217-26.

Welch, W. J. and Brown, C. R. (1996). "Influence of molecular and chemical chaperones on protein folding." *Cell Stress Chaperones* **1**: 109-15.

Wheeler, V. C., Auerbach, W., White, J. K., Srinidhi, J., Auerbach, A., Ryan, A., et al. (1999). "Length-dependent gametic cag repeat instability in the huntington's disease knock-in mouse. ." *Human Molecular Genetics* **8**: 115-22.

Wolkers, W. F., Walker, N. J., Tablin, F. and Crowe, J. H. (2001). "Human platelets loaded with trehalose survive freeze-drying." *Cryobiology* **42**: 79-87.

Wytenbach A, S. J., Kita H, Thykjaer T, Carmichael J, Bradley J, Brown R, Maxwell M, Schapira A, Orntoft TF, Kato K, Rubinsztein DC. (2001). "Polyglutamine expansions cause decreased cre-mediated transcription and early gene expression changes prior to cell death in an inducible cell model of huntington's disease." *Human Molecular Genetics* **10**: 1829-45.

Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R. J. and Greenberg, M. E. (1995). "Opposing effects of erk and jnk-p38 map kinases on apoptosis." *Science* **270**: 1326-31.

Yanai, A. H., Kang, R. et al (2006). "Palmitoylation of huntingtin by hip14 is essential for its trafficking and function." *Nature Neuroscience* **9**: 824-31.

Yang, L., Calingasan, N. Y., Wille, E. J., Cormier, K., Smith, K., Ferrante, R. J., et al. (2009). "Combination therapy with coenzyme q(10) and creatine produces additive neuroprotective effects in models of parkinson's and huntington's diseases." *Journal of Neurochemistry* **109**: 1427-39.

Young, A. (2003). "Huntingtin in health and disease." *Journal of Clinical Investigation* **111**: 299-30.

Zborowski J, B. D. (1983). "The metabolism of cdp-diacylglycerol and phosphatidylinositol in the microsomal fraction of rat liver. Effects of chlorpromazine, magnesium and manganese." *Biochimica et Biophysica Acta* **751**: 81-9.

Zeron MM, F. H., Krebs C, Shehadeh J, Wellington CL, Leavitt BR, et al. (2004). "Potentiation of nmda receptor-mediated excitotoxicity linked with intrinsic apoptotic pathway in yac transgenic mouse model of huntington's disease." *Molecular and Cellular Neuroscience* **25**: 469-79.

Zhang, L., Yu, J., Pan, H., Hu, P., Hao, Y., Cai, W., et al. (2007). "Small molecule regulators of autophagy identified by an image-based high-throughput screen." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 19023-8.

Zheng, Z. and Diamond, M. I. (2012). "Huntington disease and the huntingtin protein." *Progress in Molecular Biology and Translational Science* **107**: 189-214.

Zhou C, Z. W., Zhou J, Sheng F, Fang Z, Wei Y, Chen Y, Deng X, Xia B, Lin J. (2012). "Monitoring autophagic flux by an improved tandem fluorescent-tagged lc3 (mtagrfp-mwasabi-lc3) reveals that high-dose rapamycin impairs autophagic flux in cancer cells." *Autophagy* **8**: 1215-26.

Zorumski, C. F. and Yang, J. (1988). "Non-competitive inhibition of gaba currents by phenothiazines in cultured chick spinal-cord and rat hippocampal-neurons." *Neuroscience Letters* **92**: 86-91.

Zuccato, C. and Cattaneo, E. (2009). "Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative diseases." *Nature Reviews Neurology* **5**: 311-22.



## ARTÍCULOS PUBLICADOS DURANTE EL DESARROLLO DE LA TESIS DOCTORAL QUE FORMAN PARTE DE LA MISMA

- MA Mena, J Perucho, **M Fernández-Estévez** and J García de Yébenes (2015). Autophagy pathways in Huntington's Disease. In Jose M. Fuentes (Ed.) Toxicity and autophagy in neurodegenerative disorders. Current topics in neurotoxicity (pp. 79-89). Springer International Publishing.
- **M. Fernandez-Estevez**, M.J. Casarejos, J.L. Sendon, J.G. Caldentey, C. Ruiz, A. Gomez, J. Perucho, J.G.de Yebenés, M.A. Mena. (2014) Trehalose Reverses Cell Malfunction in Fibroblasts from Normal and Huntington's Disease Patients Caused by Proteasome Inhibition. Plos ONE. Feb 25;9(2) e90202

## ARTÍCULOS PUBLICADOS DURANTE EL DESARROLLO DE LA TESIS DOCTORAL QUE NO FORMAN PARTE DE LA MISMA

- Paloma del Reino, Dayanira Alsina-Beauchamp, Alejandra Escós, M Cerezo-Guisado, Ana Risco, Noelia Aparicio, Rafal Zur, **Marian Fernandez-Estevez**, Elena Collantes, Jose Montans, and Ana Cuenda (2014). Pro-oncogenic role of alternative p38 mitogen-activated protein kinases p38 $\gamma$  and p38 $\delta$ , linking inflammation and cancer in colitis-associated colon cancer. *Cancer Res.* Nov 1;74(21)
- Perucho J., Casarejos M.J., Gómez A., Ruíz C., **Fernández-Estévez M.**, Muñoz M.P., García de Yébenes J., Mena M.A. (2013) Striatal Infusion of Glial Conditioned Medium Diminishes Huntingtin Pathology in R6/1 Mice. *PLoS ONE* Sep 12;8(9)
- Casararejos MJ, Perucho J, Gomez A, Muñoz MP, **Fernandez-Estevez M**, Sagredo O, Fernandez Ruiz J, Guzman M, Garcia de Yebenes J and Mena M A. (2013) Natural Cannabinoids Improve Dopamine Neurotransmission and Tau and Amyloid Pathology in a Mouse Model of Tauopathy. *J Alzheimer Dis*; 35(3):525-39.

## COMUNICACIONES A CONGRESOS RELACIONADAS CON LA TESIS

- Glial Conditioned Medium improves huntingtin pathology in vitro and in vivo. García de Yébenes J., Perucho J., Casarejos M J., Gómez A., Ruíz C., **Fernández-Estevez M.**, Muñoz MP., Lopez Sendón JL., and Mena M. A.; SENC: 24-27 de septiembre 2013, Oviedo
- Mechanisms of cell death and neuroprotection in Huntington's disease Humans' skin fibroblasts. **M. Fernandez-Estevez**, M.J. Casarejos, J.L. Sandon, J.G. Caldentey, C. Ruiz, A. Gomez, J.Perucho J.G, de Yebenes, M. Mena; SENC: 24-27 de septiembre 2013, Oviedo
- Glial Conditioned Medium improves huntingtin pathology in vitro and in vivo. García de Yébenes J., Perucho J., Casarejos M J., Gómez A., Ruíz C., **Fernández-Estevez M.**, Muñoz MP., Lopez Sendón JL., and Mena M. A. VII FORO CIBERNED: 23 y 24 de septiembre 2013. Madrid
- Mechanisms of cell death and neuroprotection in Huntington's disease Humans' skin fibroblasts. **M. Fernandez-Estevez**, M.J. Casarejos, J.L. Sandon, J.G. Caldentey, C. Ruiz, A. Gomez, J.Perucho J.G, de Yebenes, M. Mena. VII FORO CIBERNED: 23 y 24 de septiembre 2013. Madrid
- Glial Conditioned Medium administrated into striatum diminishes accumulated mutated huntingtin proteins in a model of Huntington disease. Perucho J., Casarejos M. J., Gómez A., Ruíz C., **Fernández-Estevez M.**, Muñoz M.P., García de Yébenes J., and Mena M. A. VI FORO CIBERNED. 24-25 octubre 2012. Madrid.