

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO *IN VIVO* DEL SISTEMA UBIQUITINA
PROTEASOMA EN MODELOS ANIMALES DE LA
ENFERMEDAD DE HUNTINGTON**

Zaira Ortega Llorente
Madrid, 2010

Memoria de Investigación presentada por

Zaira Ortega Llorente

Para optar al grado de

Doctora en Ciencias

por la Universidad Autónoma de Madrid

Trabajo dirigido por el

Dr. José Javier Lucas Lozano

Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones

Científicas (CSIC)

**La presente tesis ha sido realizada en el
Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”
(CSIC-UAM)**

**El laboratorio del Dr. Lucas también forma parte del
Centro de Investigación Biomédica en Red
para Enfermedades Neurodegenerativas (CiberNed)**





Departamento de Biología Molecular
Universidad Autónoma de Madrid

Madrid, 17 de Diciembre de 2009

José Javier Lucas Lozano, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y del Centro de Investigación en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CiberNed)

INFORMA

Que la presente tesis doctoral titulada “*Estudio in vivo del sistema Ubiquitina Proteasoma en modelos animales de la enfermedad de Huntington*” ha sido realizada bajo mi dirección por *Doña Zaira Ortega Llorente*. Considero que el trabajo reviste las características de originalidad y calidad científica requeridas para ser defendido como Tesis Doctoral para optar al Grado de Doctor.

El director de la tesis.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'José Lucas', with a large, sweeping flourish underneath.

Dr. José Javier Lucas Lozano

INDICE

INDICE	Página
Índice.....	i
Abreviaturas.....	v
I. RESUMEN / SUMMARY.....	1
II.INTRODUCCIÓN.....	7
II.1.La enfermedad de Huntington.....	9
II.2.Sintomatología y neuropatología de la enfermedad de Huntington...	9
II.3.Mutación responsable de la enfermedad de Huntington.....	13
II.4.Función de la proteína Huntingtina.....	19
II.5.El sistema Ubiquitina Proteasoma.....	20
II.6.Implicación del sistema Ubiquitina-Proteasoma en las enfermedades neurodegenerativas.....	24
II.7.Estudios del sistema Ubiquitina-Proteasoma realizados en la enfermedad de Huntington.....	26
II.7.1. Experimentos de actividad <i>in vitro</i> con proteasomas purificado	26
II.7.2.Medidas de la actividad del proteasoma en homogenados e modelos celulares, animales o tejido humano.....	29
II.7.3. Uso de proteínas fluorescentes marcadas para su degradación por el sistema Ubiquitina-Proteasoma.....	31
III. OBJETIVOS.....	35
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
IV.1 Generación y manipulación de los modelos animales.....	41
IV.1.1. Mantenimiento de la cepas de ratones.....	41
IV.1.2. Modelos animales utilizados.....	41
IV.1.2.1.Modelo transgénico condicional de la enfermedad de Huntignton HD94.....	41

IV.1.2.2. Modelos transgénicos de la enfermedad de Huntington R6/1 y R6/2.....	42
IV.1.2.3. Ratón reportero de la actividad del sistema Ubiquitina Proteasoma UbGFP.....	42
IV.1.2.4. Ratón modelo de condicional de la enfermedad de Huntington con expresión de reportero de la actividad sistema Ubiquitina Proteasoma UbGFP:HD94.....	43
IV.1.2.5. Ratones modelo constitutivo de la enfermedad de Huntington con expresión de reportero de la actividad del sistema Ubiquitina Proteasoma UbGFP:R6/1.....	44
IV.1.3. Obtención y manipulación de ácidos nucleicos.....	44
IV.1.3.1. Extracción de ADN genómico.....	44
IV.1.3.2. Extracción de ARN.....	44
IV.1.3.3. Amplificación de ADN mediante PCR.....	45
IV.1.3.4. Cuantificación de ARNm mediante PCR cuantitativa	46
IV.1.3.5. Electroforesis en geles de agarosa.....	47
IV.1.4. Análisis y clasificación fenotípica.....	48
IV.1.4.1. Reacción cromógena de LacZ.....	48
IV.1.4.2. Fluorescencia de la proteína verde fluorescente (GFP).....	48
IV.1.5. Inyección estereotáxica.....	48
IV.1.6. Tratamientos <i>in vivo</i>	49
IV.1.6.1. Tratamiento con doxiciclina.....	49
IV.1.6.2. Tratamiento antiagregante.....	50
IV.2. Análisis proteico de las muestras obtenidas de los ratones (western-blot).....	50
IV.3. Análisis histológico del tejido obtenido de los ratones.....	52
IV.3.1. Disección y preparación del tejido.....	52
IV.3.2. Inmunohistoquímica.....	52
IV.3.3. Inmunofluorescencia.....	53
IV.3.4. Fluorescencia de GFP.....	53
IV.4. Medida de la actividad enzimática del Proteasoma	54
IV.5. Adsorción de agregados en membrana (Filter trap).....	55

IV.5.1 Aislamiento de núcleos.....	55
IV.5.2. Preparación de cuerpos de inclusión.....	55
IV.5.3. Dot-Blot.....	56
IV.6. Purificación de cuerpos de inclusión por selección magnética...	56
IV.7. Cultivos primarios neuronales.....	57
IV.7.1. Cultivos primarios de neuronas corticales y estriatales.....	57
IV.7.2. Transfección de cultivos primarios.....	58
IV.7.3. Tratamiento con fármacos antiagregantes.....	58
IV.8. Técnicas de imagen.....	59
IV.8.1. Filmación de cultivos neuronales transfectados.....	59
IV.8.2. Imágenes fijas.....	60
IV.8.3. Análisis cuantitativo de la fluorescencia.....	60
IV.9. Análisis estadístico.....	61
V. RESULTADOS.....	61
V.1. Caracterización de los ratones que expresan la proteína reportera de inhibición del sistema Ubiquitina Proteasoma Ub-GFP.....	63
V.1.1. Validación de los animales reporteros mediante inyección intraestriatal de lactacistina.....	63
V.1.2. Análisis de la acumulación basal de Ub-GFP en ratones reportero de P0 a 21 meses.....	66
V.2. La proteína reportera Ub-GFP no se acumula en el estriado de distintos modelos animales de la enfermedad de Huntington a edades pre- y sintomáticas.....	68
V.3. La proteína reportera Ub-GFP no se acumula en el estriado de modelos animales de la enfermedad de Huntington viejos con disminución de la actividad del Proteasoma.....	70
V.4. Acumulación transitoria de la proteína reportera Ub-GFP ante la expresión aguda de huntingtina mutada.....	74
V.5. La desaparición de Ub-GFP tras la expresión aguda de huntingtina mutada coincide con la formación de cuerpos de inclusión.....	78

V.5.1. Estudio de muerte neuronal en el estriado de ratones UbGFP:HD94 con expresión aguda de huntingtina mutada.....	78
V.5.2. Incidencia de cuerpos de inclusión en las neuronas que acumulan Ub-GFP en ratones UbGFP:HD94 con expresión aguda de huntingtina mutada.....	79
V.5.3. Análisis del efecto de la formación de cuerpos de inclusión en modelos celulares de la enfermedad de Huntington con expresión de la proteína reportera de la actividad del sistema Ubiquitina Proteasoma.....	81
V.6. Compuestos que previenen la agregación de la huntingtina mutada y la formación de cuerpos de inclusión favorecen la acumulación de Ub-GFP.....	85
V.6.1. Tratamiento con compuestos antiagregantes en un modelo celular de la enfermedad de Huntington con expresión del reportero Ub-YFP.....	85
V.6.2. El tratamiento con riluzol <i>in vivo</i> previene la formación de cuerpos de inclusión y exacerba la acumulación de Ub-GFP...	87
VI. DISCUSIÓN.....	98
VI.1. El sistema Ubiquitina Proteasoma no se encuentre inhibido en modelos animales de la enfermedad de Huntington.....	99
VI.2. La Huntingtina mutada posee la capacidad de inhibir el sistema Ubiquitina Proteasoma.....	102
VI.3. La formación de cuerpos de inclusión favorece la recuperación de la actividad del sistema Ubiquitina Proteasoma.....	104
VII. CONCLUSIONES.....	109
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	115
IX ANEXO.....	133

ABREBIATURAS

Unidades de medida: Sistema internacional / *International system*

ADN: Ácido desoxirribonucleico / *Deoxyribonucleic acid*

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero / *Messenger ribonucleic acid*

ATP: Trifosfato de adenosina / *Adenosine triphosphate*

BSA: Seroalbúmina bovina / *Bovine serum albumin*

Cb: Cerebelo / *Cerebellum*

CFP: Proteína cian fluorescente / *Cyan fluorescent protein*

CI: Cuerpo de inclusión / *Inclusion body*

Cx: Corteza / *Cortex*

DA: Dopamina / *Dopamine*

DAPI: 4',6'-diamino-2-fenilindol / *4',6'-diamino-2-phenilindol*

DIV: Día in vitro / *Day in vitro*

DMSO: Dimetil sulfóxido / *Dimethyl sulfoxide*

DRPLA: Atrofia Dentatorubral-Palidoluisiana / *Dentatorubral-Pallidoluysian atrophy*

DUB: Enzima deubiquitilante / *Deubiquitilating enzyme*

Dyn: Dinorfina / *Dynorphin*

EA: Enfermedad de Alzheimer / *Alzheimer's disease*

EDTA: Ácido Etildiaminotetracético / *Ethylenediaminetetracetic acid*

EGTA: Ácido Etilenglicoltetracético / *Ethylenglycoltetracetic acid*

EH: Enfermedad de Huntington / *Huntington's disease*

ELA: Esclerosis lateral amiotrófica / *Amyotrophic lateral sclerosis*

EP: Enfermedad de Parkinson / *Parkinson's disease*

EPF: Enfermedad de Parkinson familiar / *Familial Parkinson's disease*

FBS: Suero fetal bovino / *Foetal bovine serum*

Fig: Figura / *Figure*

GABA: ácido γ -amino-butírico / *γ -amino-butyric acid*

GFAP: Proteína glial fibrilar / *Glial Fibrillary acidic protein*

GFP: Proteína verde fluorescente / *Green fluorescent protein*

Glu: Glutamato / *Glutamate*

GP: Globo pálido / *Globus pallidus*

GPe: Globo pálido externo / *External globus pallidus*

GPI: Globo pálido interno / *Internal globus pallidus*

Gsu: Unidades de escala de grises / *Grey scale units*

HEPES: Ácido N-(2-hidroxietil)-piperacina-N´-(2-etanosulfónico) / *N-(2-hydroxyethyl)-piperazine-N´-(2-ethanesulfonic) acid*

Hip: Hipocampo / *Hippocampus*

Hsp90: Proteína de choque término 90 / *Heat shock protein 90*

Htt: Huntingtina / *Huntingtin*

htt*: Huntingtina mutada / *Mutant huntingtin*

IF: Inmunofluorescencia / *Immunofluorescence*

IHQ: Inmunohistoquímica / *Immunohistochemistry*

kb: Kilobase / *Kilobase*

kDa: kilodalton / *Kilodalton*

LacZ: β-galactosidasa / *β-galactosidase*

MSSN: Neuronas espinosas de tamaño medio / *Medium-sized spiny neurons*

NES: Señal de exportación nuclear / *Nuclear export signal*

NB: Neurobasal / *Neurobasal*

NLS: Señal de localización nuclear / *Nuclear localization signal*

NST: Núcleo subtalámico / *Subthalamic nucleus*

Oligos: Oligodeoxinucleótidos / *Oligodeoxynucleotides*

O/N: Toda la noche / *Overnight*

pb: Pares de bases / *Pare of bases*

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa / *Polymerase chain reaction*

PFA: Paraformaldehído / *Paraphormaldehyde*

poliQ: Poliglutamina / *Polyglutamine*

PoliUb: Poliubiquitina / *Polyubiquitin*

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa / *Quantitative Polymerase chain reaction*

RE: Retículo endoplásmico / *Endoplasmic reticulum*

RFP: Proteína roja fluorescente / *Red fluorescent protein*

r.p.m.: Revoluciones por minuto / *Revolutions per minute*

RT-PCR: Transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa / *Reverse transcription polymerase chain reaction*

SBMA: Atrofia muscular espinobulbar / *Spinobulbar muscular atrophy*

SCA: Ataxia espinocerebelosa / *Spinocerebellar ataxia*

SDS: Dodecil sulfato sódico / *Sodium dodecyl sulphate*

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico / *SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis*

SN: Sustancia nigra / *Substantia nigra*

SNr: Sustancia nigra reticulata / *Substantia nigra pars reticulata*

SNpc: Sustancia nigra pars compacta / *Substantia nigra pars compacta*

St: Estriado / *Striatum*

Tha: Tálamo / *Thalamus*

Ub: Ubiquitina / *Ubiquitin*

UPS: Sistema Ubiquitina Proteasoma / *Ubiquitin proteasome system*

YFP: Proteína amarilla fluorescente / *Yellow fluorescent protein*

Wb: Western-blot / *Western-blot*

I. RESUMEN / SUMMARY

Una de las principales marcas histopatológicas de la enfermedad de Huntington (EH) es la presencia de agregados proteicos intraneuronales, denominados cuerpos de inclusión (CI), que se detectan con anticuerpos que reconocen la ubiquitina y distintas subunidades del proteasoma. Esto, junto con el hecho de que mutaciones en componentes del sistema Ubiquitina Proteasoma (UPS) dan lugar a distintas enfermedades neurodegenerativas, hace que el UPS sea un buen candidato para encontrarse afectado en la EH y contribuir a su patogénesis. Hasta la fecha, se han realizado múltiples estudios utilizando diferentes abordajes experimentales con la intención de esclarecer esta hipótesis, sin embargo, ninguno de ellos ha obtenido resultados lo suficientemente claros como para poner fin a la controversia existente al respecto (Ortega et al., 2007).

El objetivo de esta tesis consiste en explorar la posible inhibición del UPS *in vivo* en distintos modelos de ratón de la EH (HD94, R6/1 y R6/2) combinados con ratones que expresan GFP modificada con un degrón (Ub-GFP) como reportero de la actividad del UPS, el cual se acumula en la célula en presencia de inhibición del UPS.

El análisis del St de estos ratones no mostró acumulación de la proteína reportera tanto a edades sintomáticas como a edades muy avanzadas en las que ya había tenido lugar la inhibición del UPS debido a la edad, confirmando así la ausencia de inhibición del UPS en modelos animales de la EH.

Además, gracias a la posibilidad de controlar la expresión del transgén de la huntingtina mutada (*htt**) que ofrece el ratón HD94, también se analizó el St de estos ratones combinados con los ratones que expresan Ub-GFP a los 2 meses de edad, después de 1 a 16 semanas de expresión aguda de *htt**, detectándose por primera vez *in vivo* acumulación, aunque de forma transitoria, de la proteína reportera durante las primeras 4 semanas de expresión de *htt**. Aunque en un principio se propuso la muerte celular de las neuronas que estaban acumulando la proteína reportera como el mecanismo responsable de la naturaleza transitoria de dicha acumulación, un análisis más exhaustivo realizado en cultivos primarios de neuronas corticales y estriatales de ratones wild type cotransfectadas con poliQs patogénicas y la construcción reportera, demostró que no era la muerte celular sino la formación de CIs el mecanismo responsable de la naturaleza transitoria de la acumulación de la proteína reportera. Estos resultados confirman la naturaleza beneficiosa de los CIs, poniendo fin a la controversia existente hasta el momento, y apuntan hacia las especies intermedias de agregación como las formas patogénicas de la enfermedad.

Esta hipótesis se confirmó cuando el tratamiento con compuestos que previenen la agregación de la htt* y la formación de cuerpos de inclusión, tanto en los cultivos primarios cotransfectados como *in vivo* en los ratones HD94 y R6/1 combinados con ratones que expresan Ub-GFP, previno la recuperación de la actividad del UPS manteniéndose la acumulación de la proteína reportera en vez de desaparecer con el tiempo.

Estos resultados reconcilian los datos obtenidos en modelos celulares de la EH, que defienden la existencia de inhibición del UPS, con los obtenidos en los modelos animales de la EH en los que dicha inhibición del UPS no está presente. Además, demuestran que la htt* tiene la capacidad de inhibir el UPS *in vivo* aunque sólo de forma transitoria ya que la formación de CIs protege de esta inhibición.

One of the main histopathological hallmarks of Huntington's disease (HD) is the presence of intraneuronal proteinaceous inclusion bodies (IBs) that can be detected with anti-ubiquitin and anti-proteasome antibodies. This, together with the fact that mutations in components of the Ubiquitin Proteasome system (UPS) give rise to some neurodegenerative diseases, suggests that the UPS impairment may be causative of HD. Several studies have been performed, using different experimental approaches, in order to elucidate this hypothesis, however, none of them reached concluding results.

The objective of this thesis consists of the exploration of the possible UPS inhibition *in vivo* in different mouse models of HD (HD94, R6/1 and R6/2) combined with a mouse expressing GFP modified with a degron (Ub-GFP) as UPS activity reporter, which accumulates upon UPS impairment.

The analysis of the St of these mice didn't show accumulation of the reporter protein at symptomatic ages as well as at very old ages when the UPS activity decrease due to age has already taken place. These results confirm the absence of UPS inhibition in mouse models of HD.

Due to the fact that mutant huntingtin (htt*) expression can be controlled in HD94 mouse, we also analyzed the St of this HD mouse model combined with a mouse expressing Ub-GFP at 2 months of age, after 1 to 16 weeks of acute expression of htt*, and we were able to detect transient accumulation of the reporter protein for the first time *in vivo* during the first 4 weeks of htt* expression. At first, we thought that the transient effect of the accumulation was due to the death of those neurons that were accumulating the reporter construction. However, a more detailed analysis performed in primary cortical and striatal wild type neuron cultures cotransfected with pathogenic polyQs and the reporter construction, showed that the IBs formation was the true responsible of the transient nature of the reporter protein accumulation. These results confirm that IBs are beneficial, and point out the intermediate aggregation species as the pathogenic forms.

This hypothesis was confirmed when primary cotransfected cultures, as well as HD94 and R6/1 mice combined with mice expressing Ub-GFP, treated with compounds that prevent htt* aggregation and the formation of IBs, prevented the UPS activity recovery and kept the reporter protein accumulated in the neurons.

These results reconcile the data obtained in cellular models of HD, which defend UPS inhibition in HD, and the data obtained in mouse model of HD which claims no UPS impairment in HD. Moreover, these results prove that htt* can inhibit UPS *in vivo* although transiently since IBs formation prevent UPS inhibition.

II. INTRODUCCIÓN

1. LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

Las primeras referencias que se tienen sobre la existencia de una enfermedad conocida vulgarmente como corea (derivada de la palabra griega *choreios*, baile) son del siglo XIV. Su introducción en el léxico médico se debe a Paracelso (1493-1541), pero no fue hasta la descripción que hizo de ella el doctor George Huntington en el *Medical and Surgical Reporter* (Huntington, 1872), cuando se empezó a conocer formalmente como Enfermedad de Huntington (EH). Fue en esta publicación en la que se establece por primera vez la edad de comienzo (después de los 40 años), la tendencia a la locura y al suicidio, y el carácter hereditario de la enfermedad. En la actualidad la EH se define como un trastorno neurodegenerativo, autosómico dominante (Wexler et al., 1987) que comienza en la edad adulta (40 años aproximadamente) y que termina con la muerte del individuo después de aproximadamente 20 años de enfermedad (Ambrose et al., 1994). La prevalencia es de aproximadamente 1 de cada 10.000 individuos en la mayoría de las poblaciones de origen europeo (Harper, 1992), aunque existen pequeñas áreas de prevalencia particularmente alta o baja relacionadas con los orígenes étnicos de estas poblaciones y con los orígenes de la EH en ese país.

2. SINTOMATOLOGÍA Y NEUROPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

Las manifestaciones clínicas características de la EH consisten en disfunción motora, declive cognitivo o demencia y trastornos psicopatológicos. Aunque la edad media de inicio de la EH suele ser los 40 años, existen casos en los que la enfermedad comienza a manifestarse a edades muy tempranas (formas juveniles), y otros en los que se desarrolla a partir de los 70-80 años (formas tardías o seniles). A pesar de existir estas grandes diferencias en el inicio de la EH, no existen grandes diferencias en la duración de la misma (Roos et al., 1993). Mientras que la duración media de la enfermedad en los casos comunes es de 21,4 años, la duración media en pacientes juveniles es de 20 años, y en pacientes tardíos o seniles es de 20,1 años (Currier et al., 1982; Foroud et al., 1999).

En todos los estudios realizados hasta la fecha está muy bien establecida la edad de aparición de los síntomas motores característicos (Currier et al., 1982; Craufurd and Dodge, 1993; Roos et al., 1993; Foroud et al., 1999), pero resulta mucho más complicado

determinar la edad de inicio de la enfermedad. Se sabe que, hasta 3 años antes de la aparición de los síntomas obvios de disfunción extrapiramidal detectables con exámenes motores o neurológicos, se desarrollan otras anomalías motoras menores (temblor general, movimientos anormales de los ojos, hiperreflexia, movimiento excesivo e inapropiado de los dedos, manos y pies durante estrés emocional, etc.) que pueden pasar inadvertidas (de Boo et al., 1997).

Con respecto a la neuropatología de la EH, ésta se engloba dentro de las enfermedades de los ganglios basales, entre las que también se encuentran otras enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson (Albin et al., 1989; DeLong, 1990; Graybiel, 2000; DeLong and Wichmann, 2007) o trastornos psiquiátricos como el trastorno obsesivo-compulsivo (Aouizerate et al., 2004). Los Ganglios basales son un conjunto de núcleos subcorticales interconectados entre sí, que participan en la regulación de los movimientos, la motivación crítica y algunos tipos de aprendizaje (Graybiel et al., 1994; Hikosaka et al., 2000; Packard and Knowlton, 2002; Nicola, 2007). Los núcleos que forman estos circuitos son: el Estriado (St), el Globo Pálido (GP), la Sustancia Nigra (SN), el Núcleo Subtalámico (NST) y el Tálamo (Tha) (Fig I.1) (Afifi, 1994; Vonsattel and DiFiglia, 1998). La información entra en el circuito desde la Corteza cerebral (Cx), pasa a través de unos núcleos u otros

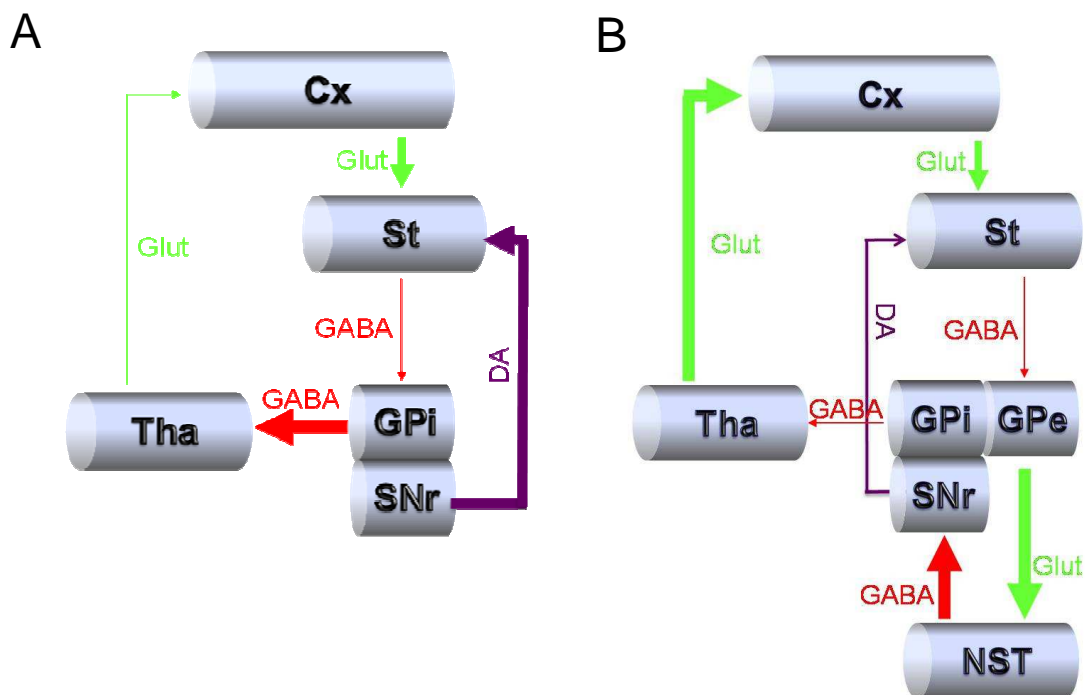


Figura I.1: Cambios producidos en la liberación de neurotransmisores en las rutas directa e indirecta en la EH. Esquema de los neurotransmisores liberados por cada uno de los ganglios basales en un paciente de EH a través de la ruta directa (A) e indirecta (B). Las líneas verdes representan liberación del neurotransmisor excitatorio glutamato (Glut), las líneas rojas representan liberación del neurotransmisor inhibitorio ácido γ -aminobutírico (GABA), y las líneas moradas representan liberación del neurotransmisor dopamina (DA). Las líneas más gruesas representan un aumento en la liberación de este neurotransmisor en los pacientes de EH con respecto a los individuos sanos, mientras que las líneas más finas representan un descenso en la liberación de este neurotransmisor en los pacientes de EH con respecto a los individuos sanos (Silkis, 2001).

dependiendo de la naturaleza de la información, y sale a través del Tha de vuelta a la Cx (Fig I.1). El St juega un papel muy importante dentro de estos circuitos ya que es el principal núcleo de obtención de la información proveniente de las distintas áreas de la Cx. A partir del St, el procesamiento de la información puede seguir dos rutas: 1) puede pasar directamente al Globo Pálido interno (GPi) y de ahí al Tha dando lugar a la ruta directa encargada de activar los movimientos voluntarios (Fig I.1 A); 2) o puede pasar al Globo Pálido externo (GPe), después al NST, y finalmente a la Sustancia Nigra reticulata (SNr) antes de llegar al GPi y al Tha; a esta ruta se le denomina ruta indirecta y es responsable de la inhibición de la aparición de componentes involuntarios del movimiento (Albin et al., 1989; Alexander and Crutcher, 1990) (Fig I.1 B). El equilibrio entre estas dos rutas permite la correcta realización de los movimientos.

La neuropatología de la EH consiste en gliosis y atrofia del St (núcleo caudado y putamen), en menor medida de la Cx, y en estadios muy avanzados de la enfermedad de otras estructuras cerebrales como el GP, NST, Tha, SN e Hipocampo (Hip). La atrofia del St cursa con pérdida específica de las neuronas GABAérgicas espinosas de tamaño medio (MSSNs) que proyectan a la SN y al GP (Graveland et al., 1985) y que comprenden el 95% de la población neuronal estriatal. Normalmente, estas neuronas se encuentran quiescentes y necesitan varias señales simultáneas para activarse. Pueden recibir señales glutamatérgicas de la Cx y del Tha, colinérgicas de las interneuronas colindantes, GABAérgicas de las MSSNs adyacentes y dopaminérgicas procedentes de la Sustancia Nigra pars compacta (SNpc) (Flaherty and Graybiel, 1993). Se pueden distinguir dos tipos de MSSNs: 1) las MSSNs estriatonigrales que expresan el receptor de la dopamina D1 y el receptor muscarínico M4, contienen dinorfina (Dyn) y sustancia P, liberan el neurotransmisor inhibitorio ácido γ -aminobutírico (GABA) y proyectan al GPi y a la SNr; 2) y las MSSNs estriatopalidales que expresan el receptor de la dopamina D2 y el receptor de adenosina A2A, contienen encefalina (Enk), liberan el neurotransmisor inhibitorio GABA y proyectan al GPe (Gerfen, 1988, 1992). Existe cierta controversia acerca de si existen diferencias en el comienzo de la degeneración de ambas poblaciones en el curso de la EH. Trabajos realizados en tejido *post-mortem* de pacientes de EH afirman que las proyecciones GABA/Enk al GPe están más afectadas que las proyecciones GABA/Sustancia P al GPi (Reiner et al., 1988; Deng et al., 2004), llegando incluso a encontrarse disminuidas en individuos presintomáticos (Deng et al., 2004). Esto daría lugar a los movimientos involuntarios presentes en las primeras fases de la EH como resultado de la hipoactividad temprana de la ruta indirecta, y a la aquinesia propia de la EH terminal como consecuencia de la hipoactividad de la ruta directa en estadios tardíos (Deng et al.,

2004). Por el contrario, otros trabajos realizados también en tejidos *post-mortem* de pacientes de EH, aseguran que tanto las neuronas que contienen Enk como las que contienen sustancia P, se encuentran afectadas por igual en los distintos estadios de la EH, o incluso detectan una disfunción más temprana en las proyecciones de las neuronas que contienen sustancia P con respecto a las que contienen Enk (Storey and Beal, 1993). En ambos casos, los receptores D1 y D2 presentes en las MSSNs juegan un papel muy importante en la regulación de la información que reciben el GPi y el GPe de éstas. La dopamina (DA) es liberada por la SN y mientras los receptores D1 estimulan la actividad de la adenilato ciclasa y potencian la salida de la información, y por tanto una mayor activación de la ruta directa, los receptores D2 inhiben la actividad de la adenilato ciclasa activando la ruta indirecta (Fig I.1). La degeneración de cada una de estas poblaciones de MSSNs conlleva una disminución en la inhibición que producen las MSSNs que expresan el receptor D2 sobre las neuronas del GPe. Esto se traduce en una activación de las neuronas promotoras talámicas a través de la ruta indirecta, derivando en un aumento de los movimientos involuntarios (Fig I.1B). A su vez, también produce una disminución en la estimulación cortical a través de la ruta directa, debido a un descenso en la inhibición que producen las MSSNs que expresan D1 en las neuronas del GPi, resultando en movimientos más lentos de lo normal y rigidez (Fig I.1A) (Berardelli et al., 1999). El resultado global de ambos procesos son movimientos involuntarios espasmódicos; tirones de la cabeza, del cuello y de las extremidades; movimientos faciales y muecas.

La progresión en la degeneración hacia otras estructuras cerebrales hace que paulatinamente vayan apareciendo nuevos síntomas tanto motores como cognitivos en los pacientes de EH. En estadios avanzados (estadios 2 y 3), además de la ya presente degeneración del St, se produce la degeneración de la Cx (Vonsattel and DiFiglia, 1998), llegando a ser muy severa en los estadios terminales (estadio 4). En esta estructura, las células afectadas principalmente son las neuronas piramidales de las capas III, V y VI de los lóbulos temporal (involucrado en el lenguaje, la memoria y el oído), prefrontal (involucrado en procesos cognitivos complejos como la habilidad para reconocer consecuencias resultantes de acciones, elección entre lo bueno y lo malo, y supresión de comportamientos inaceptables socialmente) y parietal (implicado en la información sensorial, especialmente en la navegación y la percepción espacial (Heinsen et al., 1994; Vonsattel and DiFiglia, 1998)). Esta degeneración de la Cx produce déficits en la memoria operativa y en la capacidad de iniciar una tarea, así como pasar de una a otra. En cuanto a aspectos emocionales, se producen alteraciones en el estado de ánimo que incluyen

frustración, irritabilidad, agitación, depresión y trastornos obsesivocompulsivos, inhibición de la respuesta y apatía (Paulsen et al., 2001).

En los estadios 3 y 4, a la atrofia estriatal y cortical se suma la atrofia del GP y del NST. Esta degeneración produce la aparición de movimientos mucho más lentos, posturas anormales y dificultad en la relajación de los músculos; síntomas que concuerdan con el progresivo empeoramiento de la rigidez y disminución de la hiperquinesia que sufren los enfermos de EH.

Ya en las últimas fases de la enfermedad (estadio 4), cuando la degeneración es generalizada, también se ven afectados el Tha, la SN, el Hip, la médula espinal y otras estructuras (Vonsattel et al., 1985; Vonsattel and DiFiglia, 1998). Es en estas etapas cuando aparecen movimientos involuntarios de larga duración (hemiballismus) que se parecen a la corea por ser repentinos y aleatorios, pero de mucha mayor amplitud (debidos a la degeneración del NST); movimientos involuntarios de los ojos, bradiquinesia, aquinesia, rigidez muscular, temblor de reposo, y dificultad para prestar atención (debidos a la atrofia de la SN y el Tha).

La gliosis que tiene lugar en la EH se da principalmente en el St y se caracteriza por un incremento en el número de astrocitos reactivos. Estos astrocitos tienen un núcleo más grande de lo normal y poseen un número mayor de haces de filamentos gliales (Vonsattel et al., 1985). La gliosis en la Cx es menor que en el St, pero también aumenta en los individuos afectados.

3. MUTACIÓN RESPONSABLE DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

La mutación responsable de la EH se mapeó en 1983 en el brazo corto del cromosoma 4, en la región 4p_16.3 (Gusella et al., 1983). En 1993 se descubrió el gen exacto responsable de la EH, al cual se denominó IT15 (The Huntington's disease collaborative research group, 1993; Rubinsztein et al., 1994; Gusella et al., 1996). Este gen posee 67 exones (Gissi et al., 2006) que se transcriben dando lugar a dos ARN mensajeros (ARNm), de unas 10,5 y 13.5 kilobases (kb) respectivamente, cuya traducción conformará la proteína de 342 kDa (Li et al., 1993; Strong et al., 1993) denominada huntingtina (htt). La expresión de este gen es muy amplia, produciéndose en todos los tejidos, aunque los niveles más altos se encuentran en el cerebro y los testículos (Li et al., 1993; Strong et al., 1993; Landwehrmeyer et al., 1995). A nivel de proteína, la htt se encuentra en mayores

cantidades en los tipos neuronales más grandes del cerebro como son las neuronas piramidales de la Cx, especialmente en las capas IV y VI; las neuronas del GP, células de Purkinje del Cb y neuronas dopaminérgicas mielinizadas de la SN (Gutekunst et al., 1995; Trottier et al., 1995). Su localización es principalmente citoplásmica aunque también puede detectarse en el núcleo (Hoogeveen et al., 1993; De Rooij et al., 1996; Sapp et al., 1997). También se observa una gran presencia de htt en las dendritas principalmente asociada a microtúbulos, en un muy pequeño porcentaje de espinas dendríticas donde se limita a membranas o densidades postsinápticas, así como en axones y terminales axónicos en las que se encuentra principalmente asociada a microtúbulos y vesículas sinápticas (Gutekunst et al., 1995; Trottier et al., 1995; DiFiglia et al., 1997).

La mutación responsable de la EH consiste en una expansión de los tripletes CAG presentes en el extremo 5' del gen *htt* y que se traduce en una secuencia de poliglutaminas (poliQ) a partir del aminoácido 17 (Andrew et al., 1993; Gusella et al., 1993; 1993). Los individuos sanos tienen entre 11 y 35 repeticiones de CAG, mientras que los

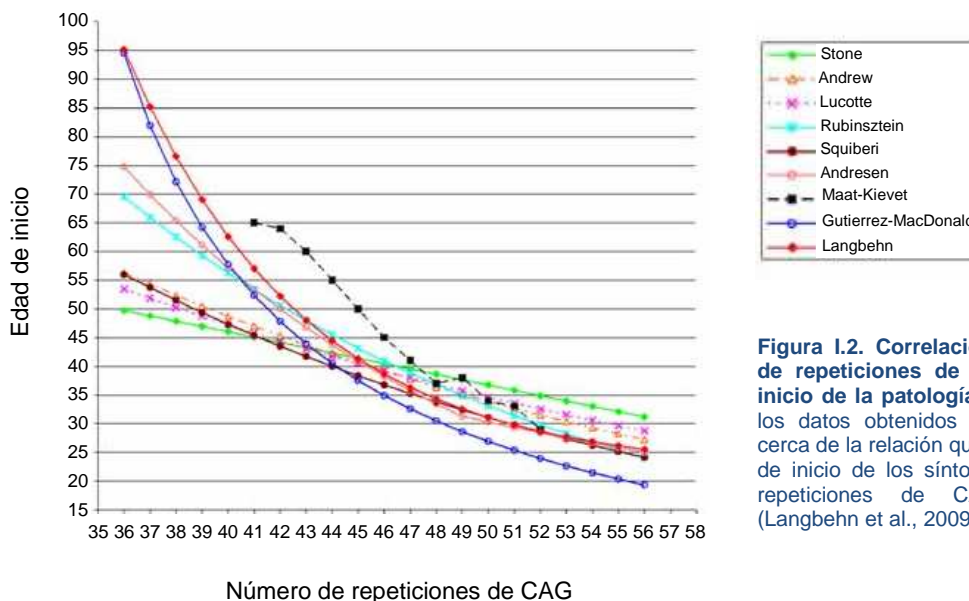


Figura I.2. Correlación entre el número de repeticiones de CAG y la edad de inicio de la patología. Gráfica que integra los datos obtenidos por varios grupos a cerca de la relación que existe entre la edad de inicio de los síntomas y el número de repeticiones de CAG. Adaptado de (Langbehn et al., 2009).

enfermos de EH tienen más de 37 repeticiones. El número de repeticiones de CAG condiciona la edad de inicio y la severidad de la enfermedad, siendo más severa y empezando antes cuanto mayor sea la expansión (Fig I.2). Las formas juveniles y seniles mencionadas al comienzo del apartado 2, también están directamente relacionadas con la longitud de la poliQ. Cuando la poliQ excede las 60 repeticiones el individuo, invariablemente, comienza a manifestar los síntomas antes de los 20 años (Andrew et al., 1993) (hay casos en los que se han visto síntomas en niños de 3 años y medio (Xing et al.,

2008)). Aproximadamente en el 80% de los casos de EH juvenil, los pacientes han heredado la mutación por vía paterna (Srivastava et al., 1999). Se han hecho estudios que demuestran que se producen fenómenos de anticipación génica por expansión de tripletes cuando la transmisión de la mutación es por esta vía (1993). La atrofia que se produce en los cerebros de pacientes con formas juveniles de EH es mucho más severa que la de las formas comunes. También es mucho más severa la sintomatología motora, desarrollando movimientos parkinsonianos, bradiquinesia, rigidez, temblor y existiendo una alta incidencia de epilepsia. La hiperquinesia de las formas adultas contrasta con la hipoquinesia de las formas juveniles (Srivastava et al., 1999). Cuando el número de repeticiones está en torno a las 40, se desarrollan formas seniles de EH que comienzan a partir de los 60 años de edad y son mucho más leves en cuanto a la neuropatología y a la sintomatología.

Existen otras ocho enfermedades neurodegenerativas hereditarias en las que, al igual que en la EH, la causa de la enfermedad es una expansión de tripletes CAG también en regiones codificantes de sus respectivos genes y en una pauta de lectura de los tripletes CAG que codifica por una poliQ. Esta expansión tiene lugar en genes que codifican proteínas distintas no relacionadas entre sí dando lugar las ataxias espinocerebelosas (SCAs) -1, -2, -3 (esta última también llamada enfermedad de Machado-Joshep), -6, -7, y -17; la atrofia dentatorubro- pallidoluysiana (DRPLA) y la atrofia muscular espinobulbar (SBMA) (Zoghbi and Orr, 2000; Ross, 2002) (Tabla I.1.). Todas estas enfermedades son neurológicas a pesar de la diferente naturaleza y la expresión ubicua de las proteínas que llevan la mutación. Esto sugiere una vulnerabilidad selectiva de las neuronas a la expansión de la poliQ. Existen algunos tipos neuronales como las células de Purkinje que, por encontrarse afectadas en casi todas las enfermedades causadas por poliQ, parecen ser especialmente susceptibles a las mismas, de ahí la causa de que existan tantas ataxias entre estas patologías (Lim et al., 2006). Sin embargo, también existen poblaciones afectadas específicamente en cada enfermedad, como es el caso del St en la EH (Graveland et al., 1985). Esto es consecuencia del efecto que tiene la ganancia de función tóxica que confiere la poliQ a la proteína que sufre la mutación y posiblemente también de la pérdida de la función que esta desempeña en la estructura afectada específicamente en la patología.

En todas estas enfermedades causadas por una expansión de poliQ, el límite patogénico de la misma se encuentra alrededor de 40 repeticiones de CAG (excepto en el caso del SCA6 que se encuentra entre 19-20 repeticiones), aumentando la severidad de los síntomas y comenzando antes según aumenta el número de repeticiones (Andrew et

al., 1997). El número mínimo de repeticiones de CAG capaz de agregar *in vitro* es 40 (Scherzinger et al., 1997). Si al hecho de que este dato coincide con el límite patogénico de expansión de poliQs en las enfermedades causadas por poliQ, añadimos la existencia de agregados proteicos intraneuronales, también llamados cuerpos de inclusión (CI), en todas ellas formados por fragmentos de las proteínas que llevan la mutación, encontramos la razón por la que en un principio se pensó que los CIs eran patogénicos y la agregación la ganancia de función tóxica que confería la mutación a las proteínas. Sin embargo, existe controversia en este punto ya que existen varios estudios que demuestran que los CIs no sólo no serían patogénicos, sino que constituirían un mecanismo de protección de la célula en general frente a proteínas mal plegadas y/o extrañas (Anton et al., 1999) y concretamente frente a la toxicidad de la poliQ (Klement et al., 1998; Saudou et al., 1998; Cummings et al., 1999; Arrasate et al., 2004). Por otro lado, hay trabajos que demuestran que serían las especies intermedias presentes en el proceso de agregación (oligómeros en distintos estados de agregación) los responsables de la toxicidad de la poliQ (Yang et al., 2002; Bennett et al., 2005; Diaz-Hernandez et al., 2006; Nagai et al., 2007; Takahashi et al., 2008).

Patología	Gen	Proteína	Nº CAG normal	Nº CAG patogénica	Regiones afectadas	Histopatología	Ref.
EH	4p16.3	Huntingtina	6-35	37-121	St y Cx	INN (a.d.) IC (a.d.)	(Graveland et al., 1985; 1993; Andrew et al., 1993; Gutekunst et al., 1995)
SCA1	6p23	Ataxina 1	6-39	40-82	Células de Purkinje, núcleo dentado, médula espinal, GP	IIN (a.d.) TND IC	(Duyckaerts et al., 1999; Iwabuchi et al., 1999; Uchihara et al., 2006)
SCA2	12q24.1	Ataxina 2	15-24	32-200	Células de Purkinje, tallo cerebral	INN (raras) IC	(Iwabuchi et al., 1999; Koyano et al., 1999; Huynh et al., 2000)
SCA3	14q32.1	Ataxina 3	13-36	61-84	Médula espinal, tallo cerebral, núcleo dentado, GP, STN	INN (a.d.) TND (rara) IC (a.d.)	(Paulson et al., 1997; Schmidt et al., 1998; Iwabuchi et al., 1999; Yamada et al., 2004)
SCA6	19q.13	CACNA1A	4-20	20-29	Células de Purkinje, núcleo dentado, oliva inferior	INN (Células de Purkinje) IC (Células de Purkinje)	(Ikeuchi et al., 1997; Zhuchenko et al., 1997; Ishikawa et al., 2001)
SCA7	3p12-13	Ataxina 7	4-35	37-306	Células de Purkinje, núcleo dentado, oliva inferior, columna vertebral, retina.	IIN (r.a. y Cx) IC	(Martin et al., 1994; Holmberg et al., 1998)
SCA17	6q27	TBP	25-42	47-63	Células de Purkinje, St, Cx	TND (a.d.) IIN (raras)	(Koide et al., 1999; Nakamura et al., 2001; Toyoshima et al., 2004)
DRPLA	12q13.31	Atrofina 1	7-34	49-88	GP, STN, núcleo dentado, sustancia blanca	TND (a.d.) IIN (a.d.) IC (a.d.) IIF	(Naito and Oyanagi, 1982; Hayashi et al., 1998; Yamada et al., 2001; Yamada et al., 2004)
SBMA	Xq13-21	Receptor de andrógenos	9-36	38-62	Cuerno anterior espinal, núcleo facial, núcleo hipoglosal, músculo esquelético	IIN (r.a.)	(Harding et al., 1982; Sobue et al., 1989; Oyanagi et al., 1996; Li et al., 1998)

Tabla I.1: Características principales de las enfermedades causadas por poliQ. PoliQ=poliglutamina; CACNA1A= Subunidad α 1a del canal de calcio dependiente de voltaje; TBP=TATA-box-binding protein; IIN=inclusión intranuclear neuronal; TND=tinción nuclear difusa; IC=inclusión citoplásmica; IIG=inclusión intranuclear glial; a.d.=ampliamente distribuidas; r.a.=regiones afectadas.

En la EH, estos CIs se encuentran representados con distintas densidades en las diversas áreas del cerebro. Son muy numerosos en la Cx, especialmente en las capas V y VI (Gutekunst et al., 1995; DiFiglia et al., 1997), incluso en estadios de la enfermedad en los que la degeneración cortical no se ha producido todavía (Gutekunst et al., 1995; DiFiglia et al., 1997). En el St, a pesar de ser el área más afectada en la EH, la presencia de CI es poco común, encontrándose los pocos que se detectan en las MSSNs (Gutekunst et al., 1995; DiFiglia et al., 1997). En otras estructuras como el GP, el cerebelo (Cb), la SN, el NST o el Hip también son bastante escasos.

Dentro de las neuronas, los CIs se pueden localizar tanto en el núcleo como en el citoplasma, siendo estos últimos los más abundantes (Gutekunst et al., 1999). Los CIs citoplásmicos pueden ser tanto redondos como ovalados o tubulares y tienen un tamaño entre 1,35 μm y 21,38 μm . Estos CIs no se encuentran asociados a membranas ni se encuentran rodeados de orgánulos celulares, su orientación es similar a la de las dendritas apicales en la Cx y curvilíneos en el St (Gutekunst et al., 1999). Los CIs nucleares se localizan de forma variable a lo largo de la superficie del núcleo sin estar separados por membrana del nucleoplasma (DiFiglia et al., 1997; Hazeki et al., 2002). Ocupan del 20% al 45% del volumen nuclear. Lo más común es encontrar un CI por núcleo, aunque en un porcentaje muy bajo de neuronas (5-7%) se pueden encontrar dos o más CIs por núcleo (DiFiglia et al., 1997).

Los CIs son estructuras dinámicas que requieren un continuo aporte de la proteína mutada para su formación y mantenimiento. Si se inhibe el influjo de proteína mutada, los CIs desaparecen a la vez que tiene lugar una mejora en el fenotipo neurológico (Yamamoto et al., 2000; Diaz-Hernandez et al., 2004; Diaz-Hernandez et al., 2005). No son agrupaciones amorfas de fragmentos N-terminales de huntingtina mutada (htt*), sino que están en cierto modo altamente estructurados. Como en la mayoría de los agregados de tipo amiloide presentes en la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas, parece que en su formación aparecen una serie de especies intermedias de agregación con

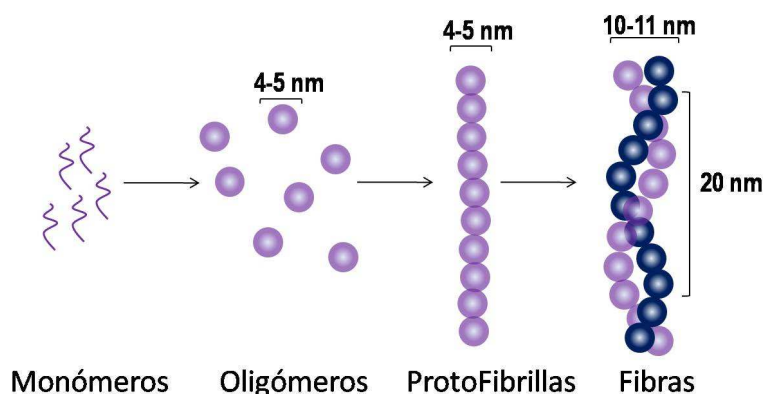


Figura I.3: Especies intermedias de agregación presentes en la formación de los CIs. Estadios intermedios de agregación de los fragmentos N-terminales de la htt* (monómeros) durante la formación de los CIs.

distintos grados de complejidad (Fig I.3). La forma más sencilla y por lo tanto la primera en aparecer en la EH, son los fragmentos N-terminales de htt*, que como ya se mencionó, tienen gran tendencia a agregar cuando poseen una secuencia de poliQ con una longitud superior a 40 residuos de CAG. A estas especies se les denomina monómeros (Wacker et al., 2004; Nagai et al., 2007). La siguiente especie en formarse son los oligómeros, agrupaciones globulares de monómeros de 4-5 nm de diámetro. Según avanza la enfermedad, disminuye el número de monómeros y aumenta el de oligómeros (Poirier et al., 2002; Wacker et al., 2004; Nagai et al., 2007; Takahashi et al., 2007; Takahashi et al., 2008), y estos actúan como semillas de nucleación para especies de agregación más complejas.

La agrupación lineal de oligómeros da lugar a la aparición de protofibrillas de 4-5 nm de grosor y longitud indefinida (Georgalis et al., 1998; Poirier et al., 2002). Por último, estas protofibrillas se unen entre sí como cremalleras polares (o “polar zippers”), uniéndose por puentes de hidrógeno entre sus grupos amida y formando así estructuras de horquillas estables que a su vez forman hojas de β -lámina denominadas fibras (Perutz, 1994; Perutz, 1996). Estas estructuras tienen un grosor de 10-11 nm y una distancia de 20 nm por vuelta (Poirier et al., 2002; Nagai et al., 2007). Existen dos teorías acerca del mecanismo de formación de los CIs a partir de las fibras (Fig I.4A); una teoría sostiene que los CIs son la consecuencia de la agrupación desordenada de las fibras, mientras que otra teoría sostiene que antes de formarse los CIs las fibras interactúan entre sí a través de puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas dando lugar a agregados microscópicos, siendo la agrupación de estos agregados lo que daría lugar a los CIs (Fig I.4B).

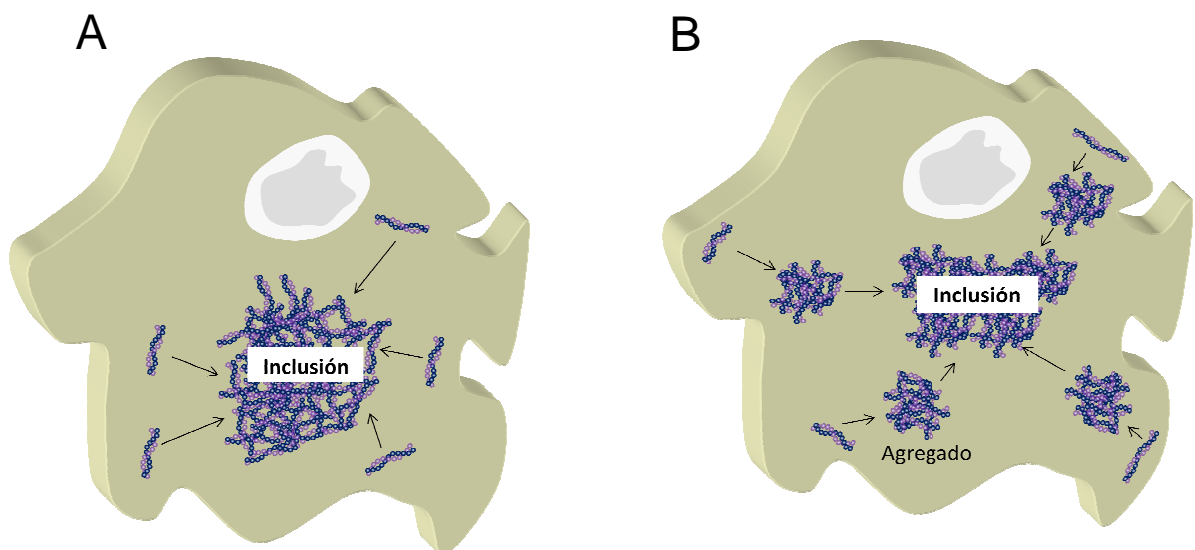


Figura I.4: Mecanismos de formación de CIs en la célula. A: Formación de CI por agregación de fibras. B: Formación de CI por interacción de varios agregados microscópicos formados a su vez por agregación de fibras.

4. FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA HUNTINGTINA

La htt es una proteína muy compleja, por lo que se han propuesto multitud de mecanismos celulares en los que puede estar involucrada, aunque se desconoce la función exacta que desempeña en cada uno de ellos.

Varios estudios demuestran que la htt es una proteína muy importante en el desarrollo embrionario. Ratones a los que se les había inactivado completamente el gen de la htt a través de la interrupción del exón 4 (Duyao et al., 1995), del exón 5 (Nasir et al., 1995) o del promotor (Zeitlin et al., 1995), sufrían letalidad embrionaria. Sin embargo, los pacientes de EH, homocigotos para la mutación, alcanzan la edad adulta. Además, ratones carentes de htt pero que expresaban htt*, no sufren letalidad embrionaria y se desarrollan con normalidad (Duyao et al., 1995; Zeitlin et al., 1995) (Leavitt et al., 2001). De estos resultados se deduce que la función que lleva a cabo la htt durante el desarrollo es independiente de la poliQ y que la htt* puede suplir la función de la htt durante el mismo. También existen algunos trabajos que sugieren que la htt no sólo es necesaria durante el desarrollo, sino también en adultos, ya que en ratones carentes condicionales de la htt, a los que se les suprimía la expresión de htt en cerebro (y testículos) cuando eran adultos, desarrollaban fenotipos motores progresivos, mostraban degeneración del St y de la Cx acompañada de apoptosis y degeneración de axones, y morían prematuramente a los 13 meses de edad (Dragatsis et al., 2000).

Actualmente se conocen unas 200 proteínas con las que la htt puede interaccionar, bien a través de su región rica en prolina (mediante los dominios SH3) o bien a través de sus dominios HEAT. En la mayoría de los casos, estas proteínas interaccionan tanto con la htt normal como con la proteína mutante. El que interaccione con proteínas implicadas en distintos mecanismos celulares tales como regulación transcripcional, transporte vesicular, endocitosis mediada por clatrina, transmisión sináptica, activación de caspasas y apoptosis, funcionamiento mitocondrial y sistema Ubiquitina-Proteasoma (UPS, por sus siglas en inglés) (ver (Harjes and Wanker, 2003; Cattaneo et al., 2005; Browne, 2008) para revisiones), sugiere que la htt puede estar involucrada en todos estos procesos.

5. EL SISTEMA UBIQUITINA-PROTEASOMA.

El sistema Ubiquitina-Proteasoma (UPS) actúa tanto en el citoplasma como en el núcleo de las células y es responsable del reciclaje de la mayoría de las proteínas solubles, desempeñando un papel especialmente importante en la degradación de proteínas dañadas, mal plegadas o de vida media muy corta (Hershko and Ciechanover, 1998). Está involucrado en muchos mecanismos celulares entre los que se encuentran la plasticidad neuronal y la memoria (Krug et al., 1984; Fonseca et al., 2006; Karpova et al., 2006). En la degradación vía UPS pueden diferenciarse claramente dos etapas: 1) Conjugación de varias moléculas de ubiquitina (Ub) al sustrato para formar la señal de degradación, 2) proteólisis del sustrato marcado por el complejo proteolítico 26S y liberación de las moléculas de Ub.

En la conjugación de las moléculas de Ub al sustrato están involucradas varias enzimas. La Ub es una proteína de 76 aa, universalmente distribuida entre los eucariotas y muy conservada. La unión covalente de la Ub a las proteínas constituye la señal de degradación por el proteasoma. En el proceso de unión de la Ub al sustrato intervienen

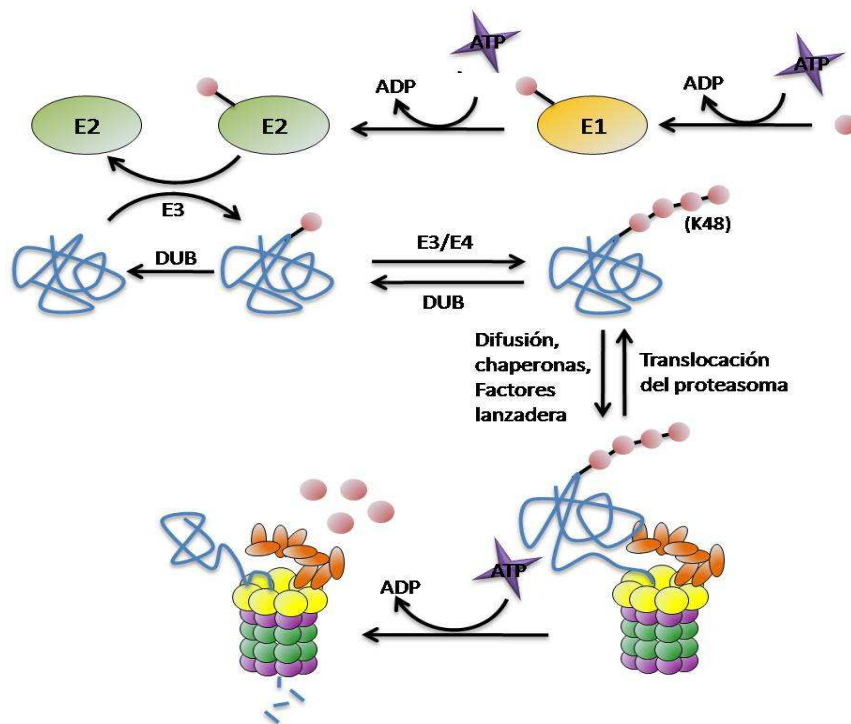


Figura I.5: Marcaje y degradación de proteínas por el UPS. Las enzimas E1, E2, E3 y E4 son las encargadas de transferir las moléculas de Ub (bolas rosas) a los sustratos (azul). Este proceso conlleva un gasto energético en forma de moléculas de ATP. El proteasoma 26S es la proteasa encargada de proteolizar los sustratos a péptidos más pequeños (un máximo de 25 residuos). Este proceso también requiere aporte energético en forma de moléculas de ATP. La cadena de poliUb no es degradada por el 26S sino que es separada del sustrato por las DUBs una vez que este ha sido reconocido por la subunidad 19S del proteasoma 26S.

hasta cuatro tipos de enzimas denominadas E1, E2, E3 y E4 (Fig I.5). Las enzimas E1 o enzimas activadoras de la Ub, se encargan de la activación de la Ub mediante la adenilación y posterior creación de un enlace tiol-éster altamente energético entre un residuo de cisteína del centro activo de la E1 y una glicina del extremo C-terminal de la Ub, con el consiguiente gasto energético (en forma de ATP) (Fig I.5). En el genoma humano sólo existen 16 E1 (Ardley and Robinson, 2005), lo que pone de manifiesto la baja especificidad de este paso. Las enzimas E2 o enzimas conjugadoras de la Ub son las encargadas de transferir la Ub activa de la E1 a la E3, o enzima ligasa, que lleva unida el sustrato específico (Hershko and Ciechanover, 1998). Este paso requiere la formación de otro enlace tiol-éster altamente energético entre la cisteína del centro activo de la E2 y la glicina activada de la Ub, gastando otra molécula de ATP (Fig I.5). En el genoma humano existen 53 E2 (Ardley and Robinson, 2005), lo que demuestra que estas enzimas son más específicas que las E1 aunque cada una de ellas puede seguir actuando en la degradación de varios sustratos. En el caso de las E3, se han descrito 527 E3 (Ardley and Robinson, 2005), un número considerablemente más alto que el de las E1 y E2, y que indica la alta especificidad en el reconocimiento del sustrato que existe en la degradación por el UPS. Dentro de las E3 se distinguen dos grupos cuya principal diferencia es la forma de transferir la Ub al sustrato. Las E3 que contienen dominios homólogos al extremo C-terminal de la E6-AP (HECT), primero transfieren la Ub a un residuo de cisteína en su propio centro activo para crear un tercer enlace tiol-éster, y después la transfieren al sustrato mediante la formación de un enlace isopeptídico entre el extremo C-terminal de la Ub y el grupo ϵ -amino de una lisina interna del sustrato. Las E3 que poseen un dominio "RING-finger" transfieren directamente la Ub de la E2 al sustrato mediante la formación del mismo enlace isopeptídico entre el extremo C-terminal de la Ub y el grupo ϵ -amino de una lisina interna del sustrato, sin formar ningún enlace intermedio. Las enzimas E3 reconocen señales de degradación, conocidas como degrones, que presentan los sustratos que han de ser degradados (Laney and Hochstrasser, 1999; Pickart, 2001) (Fig I.5). Una vez añadido el primer residuo (monoubiquitinación), a veces con participación de un factor de elongación, se elonga la cadena añadiendo nuevas moléculas de Ub sobre la previa hasta formar la señal para degradación. Sin embargo, no todas las cadenas de poliubiquitina (poliUb) sirven como señal de degradación vía UPS. La Ub contiene 7 lisinas en su secuencia (K6, K11, K27, K29, K33, K48 y K63), cada una de ellas susceptible de formar una cadena de poliUb (Peng et al., 2003). La unión de una única molécula de Ub actúa modificando la actividad y localización celular del sustrato (Haglund et al., 2003; Hicke and Dunn, 2003; Krappmann and Scheidereit, 2005), mientras que la señal de degradación por

el UPS requiere la formación de una cadena de poliUb con un mínimo de 4 residuos unidos por sus lisinas 48 (K48) (Hershko and Ciechanover, 1998; Koegl et al., 1999; Imai et al., 2000; Thrower et al., 2000; Pickart, 2001; Kuhlbrodt et al., 2005). Si la cadena, en vez de a través de la K48, se genera a través de la lisina 63 (K63), la señal no será de degradación sino que, como en el caso de la monoubiquitinación, dará lugar a otro tipo de modificaciones en el sustrato entre las que se encuentran activación de la transcripción, activación de proteínas quinasas, reparación y replicación del ácido desoxirribonucleico (ADN), tráfico intracelular y gemación de virus (Hochrainer and Lipp, 2007).

Una vez marcado el sustrato, para que éste sea degradado, debe alcanzar el proteasoma, bien por difusión, por la ayuda de chaperonas u otros factores que actúen de lanzadera, o por la propia translocación del proteasoma al sustrato. El proteasoma, o 26S es una gran proteasa multicatalítica formada por dos complejos: el complejo 20S o núcleo catalítico, y el complejo 19S o subunidad reguladora (Fig 1.6). El complejo 20S está formado a su vez por cuatro anillos apilados en forma de barril. Los dos anillos externos están formados por 7 subunidades α , y los dos internos por 7 subunidades β y poseen las actividades catalíticas, tipo tripsina, tipo quimiotripsina y tipo post-glutamil, que cortan después de residuos básicos, hidrofóbicos y ácidos respectivamente (Fig 1.6) (Groll et al., 1997; DeMartino and Slaughter, 1999). Pero el 20S por sí sólo no es capaz de degradar los sustratos, necesita la ayuda de otra molécula que reconozca los sustratos y los introduzca en su interior para ser degradados. Dicha molécula es el complejo 19S, también llamado PA700. Este está situado en los extremos del complejo 20S y se encarga de abrir el anillo α del 20S, y desplegar las moléculas para que puedan ser introducidas dentro del compartimento catalítico. El complejo 19S está formado por dos estructuras: la "tapa", encargada de reconocer las moléculas marcadas para su degradación a través de las subunidades S5a y S6` gracias a su capacidad de unir poliUb (Hartmann-Petersen et al., 2003), y la "base" que está formada por 6 subunidades con actividad ATPasa (denominadas Rpt1-6) y otras dos subunidades sin función ATPasa (denominadas Rpn1 y 2) (Voges et al., 1999), y que se encarga de abrir el anillo α del 20S y desplegar los sustratos (Fig 1.6). Ambos procesos necesitan energía metabólica para ser llevados a cabo. Esta energía se obtiene a partir de las actividades ATPasa de las subunidades que la conforman.

Además del complejo 19S existen otros como el complejo activador 11S (también conocido como PA28), el signalosoma o COP9 y el PA200 que se pueden unir al 20S, aunque de estos últimos se sabe muy poco (Dahlmann, 2005; Rechsteiner and Hill, 2005). El complejo 11S está presente tanto en el citosol como en el núcleo, aunque su

composición es distinta en cada compartimento. El 11S citosólico es un heteroheptámero de las subunidades PA28 α y PA28 β , mientras que el complejo 11S nuclear es un homoheptámero de la subunidad PA28 γ (Fig I.6). La combinación de los complejos 20S, 19S y 11S da lugar a 6 tipos diferentes de proteasomas (Fig I.6). Gracias a experimentos realizados con extractos citosólicos de células HeLa se sabe que, en el 40% de los casos, el complejo 20S se encuentra unido con el complejo 19S (Tanahashi et al., 2000) y que el complejo 11S es ligeramente más abundante que el 19S y se encuentra unido al 60% de los complejos 20S que llevan unido el 19S y al 30% de los complejos 20S que no llevan unido 19S. Aunque los complejos 11S y 19S pueden cooperar y dar lugar a complejos 11S-19S-20S activos, los complejos 11S-20S no son capaces de degradar proteínas poliubiquitinadas (Tanahashi et al., 2000; Shibatani et al., 2006). Más bien se cree que está involucrado en la degradación de proteínas con daño oxidativo (Poppek and Grune, 2006).

La cadena de poliUb no es degradada por el proteasoma, sino que es desprendida del sustrato por la subunidad 19S. Las enzimas deubiquitilantes (DUBs) se encargan de reducirlas a sus monómeros para que sean reutilizadas en el marcaje de otros sustratos (Kawakami et al., 1999).

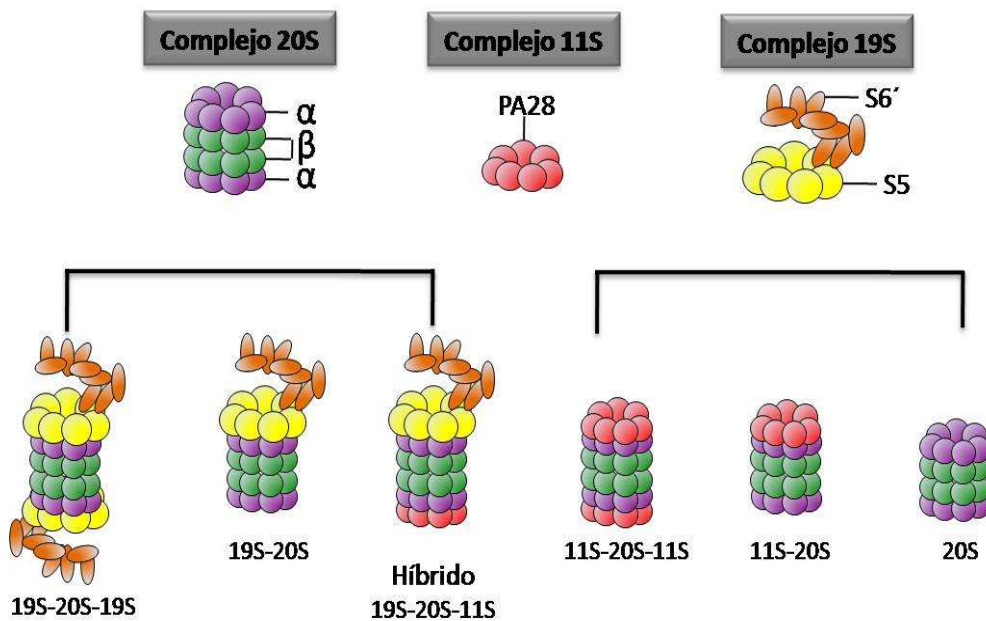


Figura I.6: Tipos de proteasomas presentes en las células como consecuencia de las distintas combinaciones de los complejos 20S, 26S y 11S. En el 40% de los casos, el complejo 20S se encuentra unido con el complejo 19S. El complejo 11S es ligeramente más abundante que el 19S y se encuentra unido al 60% de los complejos 20S que llevan unido el 19S y al 30% de los complejos 20S que no llevan unido 19S. Aunque los complejos 11S y 19S pueden cooperar y dar lugar a complejos 11S-19S-20S activos, los complejos 11S-20S no son capaces de degradar proteínas poliubiquitinadas y se cree que están involucrados en la degradación de proteínas con daño oxidativo.

6. IMPLICACIÓN DEL SISTEMA UBIQUITINA-PROTEASOMA EN LAS ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS.

Existen evidencias tanto celulares como genéticas que apuntan hacia una posible implicación del UPS en las enfermedades neurodegenerativas. Dentro de las evidencias celulares destaca el hecho de que, en la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas, se ha descrito la presencia de agregados proteicos formados por las proteínas que juegan un papel clave en la enfermedad: en Alzheimer, los ovillos neurofibrilares formados por filamentos apareados helicoidales compuestos por la proteína Tau hiperfosforilada (Avila et al., 2004; Avila, 2006; Goedert and Spillantini, 2006); en la enfermedad de Parkinson, los cuerpos de Lewy cuyo componente principal es la α -sinucleína (Gandhi and Wood, 2005); en esclerosis lateral amiotrófica, los cuerpos de Bunina formados por proteínas de los filamentos intermedios (Boillee et al., 2006); en todas las enfermedades causadas por expansión de poliQ, incluyendo la EH, los CIs están formados por la acumulación de la proteína mutada (Lowe et al., 1993; Gomez-Tortosa et al., 2000; Ross and Poirier, 2004). Además, en todos los casos, estos CIs proteicos se tiñen con anticuerpos anti-ubiquitina y anti-proteasoma (DiFiglia et al., 1997; Cummings et al., 1998; Goedert et al., 1998; Sherman and Goldberg, 2001; Schmitt, 2006), lo que sugiere una implicación directa o indirecta.

En cuanto a las evidencias genéticas, existen ejemplos de enfermedades neurodegenerativas causadas por la mutación de elementos del UPS. El caso más claro está en algunas formas familiares de la enfermedad de Parkinson (EPF). La mayoría de los pacientes de EP desarrollan la enfermedad de forma esporádica, aunque existe un pequeño porcentaje que la heredan de forma autosómica dominante o recesiva (EPF). Hasta el momento se conocen 11 genes causantes de la EPF (SNCA, PARK2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, y NR4A2) (Polymeropoulos et al., 1997; Gasser et al., 1998; Kitada et al., 1998; Leroy et al., 1998; Farrer et al., 1999; Hampshire et al., 2001; Valente et al., 2001; Funayama et al., 2002; Hicks et al., 2002; Bonifati et al., 2003; Hattori et al., 2003; Le et al., 2003). La forma autosómica recesiva de parkinsonismo (AR-JP), una de las formas más comunes de EPF, está causada por mutaciones puntuales o deleciones en el gen de la parkina (PARK2) (Kitada et al., 1998). La parkina es una E3 que actúa de forma conjunta con las DUBs (Imai et al., 2000; Shimura et al., 2001), y se asocia con la subunidad S5a del 19S implicada en el reconocimiento del sustrato por el 26S (Sakata et al., 2003). Las mutaciones encontradas en pacientes de AR-PJ producen inactivación de la actividad E3 de la parkina o de su capacidad de asociarse con la subunidad S5a. Esta inactivación da

lugar a la pérdida de las neuronas dopaminérgicas en la SN en ausencia de cuerpos de Lewy (von Coelln et al., 2004). Otra forma esporádica de EPF está causada por mutaciones en el gen que codifica para la enzima Ubiquitina carboxi-terminal hidrolasa UCH-L1 (PARK5). En ratones en los que esta mutación se produce de forma espontánea, da lugar a una ataxia neurodegenerativa llamada distrofia axonal grácil (Ichihara et al., 1995; Saigoh et al., 1999). Estos ratones presentan acumulación de agregados de β -amiloide pero no de α -sinucleína en los axones gráciles que controlan sus extremidades posteriores. La UCH-L1 es específica de cerebro y una de las proteínas más abundantes en él. Puede actuar como DUB cuando se encuentra en forma monomérica, o como E3 generando cadenas de poliUb en K63 cuando se encuentra formando dímeros (Liu et al., 2002). Su mutación no lleva a la completa inactivación de la enzima sino a un descenso en la actividad y por lo tanto a una disminución en la cantidad de Ub libre proveniente del reciclaje de las cadenas de poliUb. Por otro lado, la mutación I93M promueve su dimerización y la poliubiquitinación de la α -sinucleína con cadenas K63. Todas estas enfermedades carecen de agregados, posiblemente esto se deba a que el defecto genético que causa la enfermedad no se produce por mutaciones en una única proteína que le confiera una ganancia de función tóxica, sino por mutaciones en una ruta de degradación que en caso de promover la agregación sería generalizada y no específica de una única proteína.

Dentro de las enfermedades causadas por poliQ, existe el caso de la ataxia espinocerebelosa de tipo 3 causada por la expansión de poliQ en la ataxina 3 (Paulson et al., 1997; Iwabuchi et al., 1999; Yamada et al., 2004). La ataxina 3 es una DUB que también puede estar involucrada en guiar el sustrato hacia el proteasoma (Wang et al., 2006). En este caso, todavía no está claro si la causa de la enfermedad proviene de su mal funcionamiento como DUB, de la agregación producida por la poliQ, o por ambas. Esta enfermedad sí que presenta CIs porque la mutación confiere una ganancia de función tóxica a la proteína portadora facilitando su agregación.

Otras enfermedades neurodegenerativas causadas por mutaciones en moléculas que intervienen en la degradación vía UPS son: el Síndrome de Angelman, una enfermedad asociada a defectos en el desarrollo neuronal y que está causada por mutaciones en la enzima E3 UBE3A (también conocida como E6-AP)(Jiang et al., 1998; Lalande and Calciano, 2007); el Síndrome Johanson-Bilzard causado por mutaciones en la enzima E3 UBR1 (Zenker et al., 2005); la enfermedad de Lafora causada por mutaciones en la E3 NHLRC1 (Ganesh et al., 2006); retardo mental asociado al cromosoma X causado por mutaciones en las enzimas E3 CUL4B (Tarpey et al., 2007), BRWD3 (Field et al., 2007) y

HUWE1 (Froyen et al., 2008); ataxia en ratones por mutaciones espontáneas de la enzima DUB USP14 (Wilson et al., 2002), enzima asociada a la subunidad 19S y cuya mutación resulta en una disminución del 35% de la Ub libre (Anderson et al., 2005) lo que produce defectos en el desarrollo del sistema nervioso central y periférico así como anomalías en la liberación de neurotransmisores (Wilson et al., 2002).

Como ya se vio anteriormente, el mal funcionamiento del UPS se puede deber a mutaciones en distintas moléculas que intervienen en la ruta de degradación impidiendo así el reconocimiento por las E3, la actividad de la DUB y por tanto la disponibilidad de Ub libre, pero también debe tenerse en cuenta que, en los CIs, se ha descrito la presencia de las subunidades 20S y 19S (Davies et al., 1997; DiFiglia et al., 1997; Cummings et al., 1998; Kopito, 2000). Esto abre la posibilidad de que la poliQ expandida esté interaccionando directamente con ellos. Esta interacción puede tener varias consecuencias: puede producir un secuestro de los complejos del proteasoma dando lugar a una depleción en la cantidad celular de 26S libres para efectuar su función, puede interaccionar directamente con el 19S bloqueando el reconocimiento de otros sustratos o su capacidad para abrir al poro del anillo α del complejo 20S, y puede interferir directamente en la actividad del 20S atascándolo de forma que no pueda degradar más sustratos. En todos los casos se produciría un mal funcionamiento del UPS. Esto indica que, de existir inhibición del UPS en la EH, podría darse a cualquier nivel de la ruta UPS.

7. ESTUDIOS DEL SISTEMA UBIQUITINA-PROTEASOMA REALIZADOS EN LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON.

Para comprobar la hipótesis de una posible inhibición del UPS en la EH se han realizado múltiples estudios mediante abordajes experimentales muy diferentes. Estos estudios aportan datos tanto a favor como en contra, pero ninguno de los resultados es concluyente al respecto (Ortega et al., 2007). A continuación se describen los distintos estudios realizados en la EH para determinar la implicación del UPS en la misma, agrupados según la metodología y la naturaleza de los sustratos utilizados.

7.1 Experimentos de actividad *in vitro* con proteasomas purificados.

La presencia de los complejos 20S y 19S en los CIs sugiere la posibilidad de que la poliQ expandida esté interaccionando directamente con las subunidades del proteasoma.

Para confirmar esta implicación, se han realizado distintos experimentos *in vitro* con proteasomas purificados y poliQs. Como se ha mencionado, el proteasoma posee tres actividades catalíticas (tipo tripsina, tipo quimotripsina y tipo post-glutamil) que cortan los péptidos después de residuos básicos, hidrofóbicos o ácidos respectivamente (DeMartino and Slaughter, 1999). La glutamina es un aminoácido polar sin carga y por lo tanto una secuencia de poliQ no sería digerida preferentemente por ninguna de estas actividades. Este dato pone en duda la capacidad del proteasoma de degradar secuencias de poliQ a péptidos más pequeños cortando en el interior de su secuencia. Con la construcción de péptidos sintéticos que contienen de 10 a 30 residuos de glutaminas y que, para aumentar su solubilidad y limitar la tendencia a agregar, están flanqueados por dos residuos de lisinas, así como una proteína de fusión consistente en la proteína mioglobina con una poliQ de 35 glutaminas en su extremo N-terminal (Venkatraman et al., 2004), se intentó responder esta pregunta. Dichos péptidos y proteínas se incubaron con distintas formas de proteasomas eucariotas purificados incluyendo partículas 26S y 20S, y se observó que las poliQs no son degradadas por el proteasoma ya que los únicos cortes que son capaces de hacer se localizan en los residuos básicos flanqueantes en el caso de los péptidos, y en toda la secuencia de la mioglobina exceptuando la poliQ en el caso de la proteína de fusión. Cuando se realizaron los mismos experimentos con proteasomas procariontas (procedentes de *Thermoplasma acidophilum*), se observó que éstos sí son capaces de degradar la secuencia de poliQs por completo.

Posteriormente, y utilizándose como sustratos del proteasoma las construcciones fluoresceína-GGQ₁₀RR y fluoresceína-HPHQ₁₀RR, ambos con una expansión de poliQ de 10 residuos, se observó que dichas construcciones podían ser degradadas por proteasomas eucariotas, incluida las secuencias de poliQ, únicamente en presencia del activador 11S (Pratt and Rechsteiner, 2008).

La conclusión de estos resultados es que en presencia del activador 11S y con expansiones de poliQ con una longitud por debajo de la patogénica, el proteasoma es capaz de degradarla, situación que se da en personas no enfermas de EH. Sin embargo, cuando el proteasoma se enfrenta a proteínas con poliQ patogénicas, es capaz de degradar la proteína pero no la poliQ, que quedaría intacta en el medio y daría lugar a las especies tóxicas y a los CIs. Estas secuencias de poliQ liberadas al citosol, exceden ampliamente la longitud de los fragmentos liberados normalmente por el proteasoma (2-25 residuos), por lo que pueden quedar atrapadas en el interior del mismo incapacitándolo para seguir ejerciendo su función. Para comprobar si este fenómeno de atasco está teniendo lugar, se midió la eficiencia de degradación por el proteasoma con una

construcción expresada en bacterias consistente en la glutatión S-transferasa con un sitio de corte por una proteasa (intervening tobacco etch virus) y una expansión de poliQ de 18 ó 51 residuos en su extremo N-terminal (Bennett et al., 2005), así como de un fragmento de la ciclina B marcado con ^{125}I y ubiquitilada *in vitro* (Ub-Cyclin) que sufriría una degradación dependiente de Ub (Chen and Wetzel, 2001), y del péptido fluorogénico Suc-LLVY-AMC que sufriría una degradación independiente de Ub. Al incubar estos sustratos con proteasomas 26S purificados, y en presencia de poliQ (tanto 18Q como 51Q), no se observó inhibición de la degradación de los mismos. Al realizar el mismo experimento con pequeños agregados oligoméricos solubles y especies fibrilares (ambos sintéticos) (Chen and Wetzel, 2001; Poirier et al., 2002), el resultado fue el mismo. Estos datos refutan la hipótesis de que una interacción directa entre el 26S y los monómeros o agregados de poliQ causen una disminución en la actividad del proteasoma.

Una limitación de la utilización de sustratos con poliQ recombinantes generados en bacterias o *in vitro* es que éstos no sufren el proceso de ubiquitinación necesario para marcar a degradación un sustrato y esto puede influir en el resultado al limitar su interacción con los proteasomas 26S. Con el fin de superar esta limitación se han realizado trabajos en los que la actividad endoproteolítica del proteasoma se medía *in vitro* en presencia de filamentos o CIs compuestos por el exón 1 de la htt humana con 94 repeticiones de CAG, en ambos casos purificados del cerebro de los ratones inducibles Tet/HD94 modelo de EH (Diaz-Hernandez et al., 2006). Se utilizaron tanto sustratos específicos para cada una de las actividades endoproteolíticas dependientes de ATP del proteasoma (Suc-LLVY-AMC para la actividad tipo quimiotripsina, Boc-LSTR-MCA para la actividad tipo tripsina, y Z-LLE- β NAP para la actividad tipo post-glutamil) como el sustrato natural del proteasoma I κ B α ubiquitilado *in vitro*. En todos los casos se observó que los filamentos pero no los CIs, inhibían selectivamente dichas actividades del proteasoma 26S pero no del 20S. Estos resultados sugieren que son las especies intermedias de agregación de poliQs patogénicas ubiquitiladas las que tienen la capacidad de interferir con los proteasomas 26S mediante una interacción directa con la subunidad 19S. Esta capacidad la pierden cuando se encuentran recluidas en los CIs, lo que refuerza la hipótesis de que los CIs son protectores, en este caso neutralizando la inhibición del proteasoma.

7.2. Medidas de la actividad del proteasoma en homogenados de modelos celulares, animales o tejido humano.

Cuando se utilizan lisados de células, homogenados de cerebro de animales modelo de la EH o tejido *post-mortem* de pacientes de EH, se tiene la ventaja de que se incluyen en el ensayo todos los componentes de la ruta de degradación del UPS que pueden verse afectados por la presencia de poliQs expandidas. A pesar de ello, si la inhibición está teniendo lugar sólo en un pequeño porcentaje de células, el efecto se diluirá entre el total de las células analizadas y puede que no se detecte.

Para el análisis de homogenados celulares, se han utilizado líneas neuro2a de ratón (N2a) establemente transfectadas, que expresan de forma inducible el extremo N-terminal de la htt con longitudes normales de poliQ (16Q) o longitudes patogénicas (60Q-150Q) (Jana et al., 2001). La expresión de la poliQ patogénica, pero no la normal, produce un cambio en la localización de los proteasomas, pasando de un patrón difuso a un patrón de agregación, tanto en el núcleo como en el citoplasma. Al analizar los niveles de la actividad tipo quimi tripsina del proteasoma en la fracción soluble y en el precipitado resultantes de la centrifugación de los homogenados de estas células transfectadas, se observó un descenso y un aumento respectivo de dicha actividad. Esto indicaría que la poliQ expandida produce una inhibición del UPS cuando se transfecta en líneas celulares. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la localización de los proteasomas ha pasado de soluble a secuestrados en los CIs, y éstos se encuentran principalmente en el precipitado, por lo que es de esperar que el contenido total de proteasomas en cada una de las fracciones sea distinto, estando enriquecido el precipitado. Al no realizarse una medida de la concentración de proteasomas en cada fracción en este estudio, el resultado obtenido no era concluyente.

Para el primer análisis de la actividad del proteasoma en extractos de cerebro de ratones modelo de la EH, se utilizó el ratón inducible Tet/HD94 (Diaz-Hernandez et al., 2003). Estos ratones expresan el exón 1 de la htt humana con 94 repeticiones de CAG en cerebro anterior de forma regulada por tetraciclina (ver sección 1.2.3. de materiales y métodos) (Yamamoto et al., 2000; Diaz-Hernandez et al., 2005). Al analizar las 3 actividades catalíticas del proteasoma en homogenados de cerebro de estos ratones, no se observó inhibición en ninguna de ellas, sino un aumento en las actividades tipo tripsina y tipo quimi tripsina sin producirse un aumento en el contenido de proteasomas 20S. Estos resultados sugieren un cambio cualitativo en el contenido del proteasoma que se confirmó al detectar un aumento de las subunidades LMP2 y LMP7 del inmunoproteasoma tanto en

estos extractos de cerebro de ratón como en extractos de cerebros de pacientes de EH (Díaz-Hernández et al., 2003). Estudios similares realizados en ratones R6/2 cuyo fenotipo es mucho más agresivo y de comienzo más temprano (Seo et al., 2004; Bett et al., 2006; Seo et al., 2008), confirmaron la no inhibición de la actividad del proteasoma así como el aumento de la actividad tipo tripsina detectado en los ratones Tet/HD94. También detectaron inhibición de las actividades del 26S a edades a las que los ratones presentaban signos avanzados de enfermedad. Sin embargo, en un estudio realizado en ratones YAC72, modelos animales de la EH que expresan la htt completa con una expansión de 72 CAG (Hodgson et al., 1999), no sólo no se detectó este aumento en las actividades tipo tripsina y quimiotripsina del proteasoma sino que se detectó un descenso de las actividades tipo quimiotripsina y post-glutamil en Cx frontal, St y Cb a los 16 meses (estadio crónico de la enfermedad) pero no a edades anteriores, sugiriendo un componente progresivo y dependiente de la edad en el descenso de la actividad del UPS (Seo et al., 2004; Seo et al., 2008). Una posible explicación para los resultados contradictorios obtenidos entre los ratones YAC72 (Seo et al., 2008) y los R6/2 (Bett et al., 2006; Seo et al., 2008) y Tet/HD94 (Díaz-Hernández et al., 2003) reside en la construcción patogénica que expresan dichos ratones. Mientras los ratones YAC72 expresan la htt completa y por tanto reproducen la patología más fielmente aunque en ausencia de CIs, los ratones R6/2 y HD94 expresan el exón 1 de la htt humana con expansiones de CAG patogénicas (94 en el caso del ratón Tet/HD94 y 144 en el caso de los R6/2) con un desarrollo más agresivo de la enfermedad y con presencia de CIs, por lo que el aumento de las actividades del proteasoma puede producirse como respuesta compensatoria del mismo a la excesiva acumulación de proteínas tóxicas.

Esta discrepancia en los resultados también se observó en estudios realizados en homogenados de cerebro de pacientes de EH dependiendo de la longitud de la poliQ que expresaban. Los valores de actividad del proteasoma en homogenados de cerebro de pacientes de EH con longitudes de poliQ más cortas mostraron un descenso de la actividad tipo quimiotripsina únicamente en el St en pacientes de grado 0-1 y 3-4 y en el Cb de pacientes de grado 0-1; y una disminución de la actividad post-glutamil en el St y Cb de pacientes de grado 0-1 y 3-4, en la Cx de pacientes de grado 0-1, y en la SN de pacientes de grado 3-4. Sin embargo, los valores de actividad del proteasoma en el homogenado de cerebro de un paciente de EH con una expansión de poliQ extremadamente larga (de 180 repeticiones) (Seo et al., 2004), no sólo no mostraron un descenso de las actividades del proteasoma, sino que reprodujeron el aumento en las actividades del proteasoma que se observó en extractos de cerebro de los ratones Tet/HD94 y R6/2. En este estudio, al igual

que en el que utilizaban homogenados de líneas celulares transfectadas (Jana et al., 2001), no se analizó la cantidad total de proteasomas presentes en los extractos, por lo que el resultado no resulta concluyente. Además, los valores fueron normalizados por un “índice de atrofia” resultante de la evaluación macroscópica del tamaño del ventrículo, lo que introduce variaciones notables en el valor real del dato. Al igual que en los modelos animales, este aumento de la actividad del proteasoma puede ser un mecanismo compensatorio ante manifestaciones de la EH muy severas o de comienzo muy temprano en las que hay gran cantidad de proteína mutada.

Recientemente se ha establecido una relación directa entre la inhibición del UPS y un aumento de los niveles de cadenas de poliUb unidas por sus lisinas 48 (K48) (específicas de degradación vía UPS) (Bennett et al., 2007). Las cadenas de poliUb presentes en lisados de células N2a transfectadas con el exón 1 de la htt humana con 16 o 150 repeticiones de CAG, en extractos de ratones R6/2 y en extractos de ratones Knock-in Hdh^{150Q/150Q} (Lin et al., 2001), son capturadas y posteriormente digeridas con tripsina y ácido clorhídrico y cuantificadas mediante espectrometría de masas. En todos los casos, los niveles de cadenas de poliUb unidas por K48 se encontraron elevados, hasta 5 veces en el caso de las células N2a, el doble en Cx y St de los ratones R6/2 a 6 y 12 semanas de edad, y ligeramente en los ratones Hdh^{150Q/150Q} en estadios terminales de la enfermedad. El proceso de extracción y digestión de las cadenas de Ub en este estudio es muy agresivo y puede ser capaz de disgregar los CIs, produciendo así un gran aumento del número de cadenas de poliUb unidas por sus K48 que no sería debido a una inhibición del UPS. Estos resultados se suman a la existencia de inhibición del UPS en la EH defendida por algunos de los resultados anteriormente descritos (Jana et al., 2001; Seo et al., 2004; Seo et al., 2008).

7.3. Uso de proteínas fluorescentes marcadas para su degradación por el sistema Ubiquitina-Proteasoma:

Se usan como reporteros de la actividad del UPS proteínas fluorescentes modificadas para añadir a su secuencia señales de degradación por el UPS (degrones) (Lindsten and Dantuma, 2003; Neefjes and Dantuma, 2004). Estos degrones hacen que las proteínas tengan una vida media muy corta y que se acumulen solamente cuando existe inhibición del UPS (Dantuma et al., 2000; Stack et al., 2000; Neefjes and Dantuma, 2004) (Fig 1.7). Una ventaja de estas proteínas reporteras es su resolución celular, superando así la limitación del efecto de dilución que se daba en los extractos celulares y de tejido. La

utilización de estos reporteros de actividad del UPS también tiene limitaciones. Los distintos degrones son reconocidos por distintas E3, lo cual conlleva a una combinación de E1-E2-E3 distinta para cada uno de ellos, lo que significa que si la inhibición del UPS afecta sólo a un grupo determinado de E2 y E3, no todas las proteínas reporteras serán capaces de detectarlo ya que su degradación no se verá afectada (Lindsten and Dantuma, 2003).

Estas proteínas reporteras se han utilizado tanto en modelos celulares como animales de la EH. En células HEK293 establemente transfectadas con el exón 1 de la htt con 103 repeticiones de CAG, y con la proteína reportera consistente en el degrón CL1 fusionado al extremo C-terminal de la proteína verde fluorescente (GFP) se observa una acumulación de la GFP (no presente en los controles) sólo en aquellas células que contienen CIs (Bence et al., 2001). Posteriormente se ha comprobado que esta acumulación también se produce en ausencia de CIs detectables (Bennett et al., 2005).

El uso de estas proteínas reporteras también se ha empezado a aplicar para el estudio de modelos animales de enfermedades neurodegenerativas. Los degrones utilizados son de 2 tipos: una proteína reportera fluorescente (GFP o RFP) con una señal tipo UFD en su extremo N-terminal (Ub^{G76V}-GFP) (Lindsten et al., 2003) y una proteína reportera fluorescente (GFP) con el degrón CL-1 (secuencia específica de 16 aa unida al extremo C-terminal del sustrato, que es reconocida por las E3 como señal de degradación) en su extremo C-terminal (Wang et al., 2008) (Fig I.8).

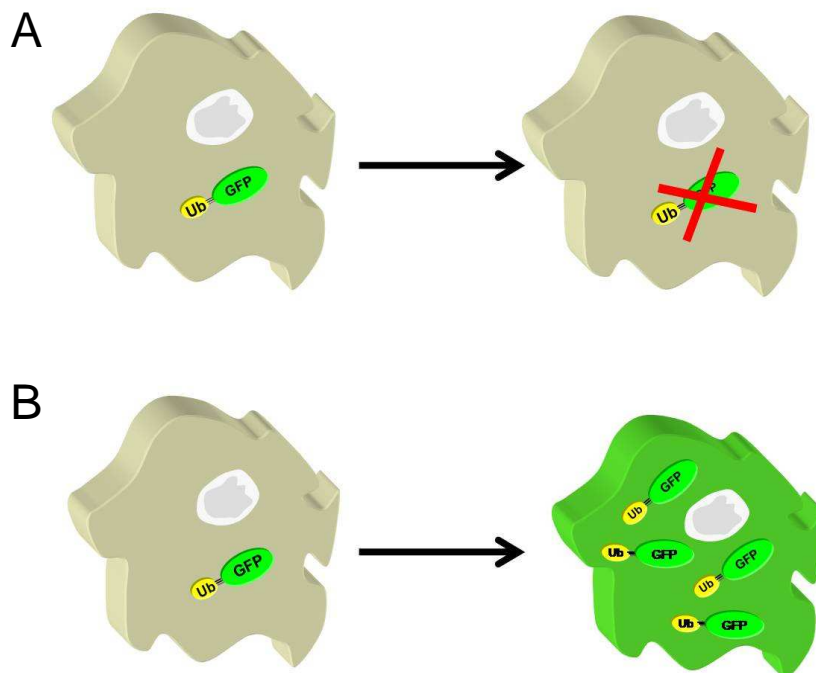


Figura I.7. Funcionamiento de las proteínas reporteras. A: En ausencia de inhibición del UPS las proteínas reporteras son degradadas rápidamente. B: Cuando existe inhibición del UPS las proteínas reporteras se acumulan en la célula haciendo que sea posible detectarlas gracias a la fluorescencia de GFP.

La mayoría de los estudios llevados a cabo con estos reporteros han tenido lugar en modelos animales de otras enfermedades neurodegenerativas causadas por expansión de poliQ y no en la EH. En el caso de SCA7, se analizó un ratón que expresaba la proteína Ataxina 7 con 266 repeticiones de CAG y como proteína reportera la proteína GFP con una señal tipo UFD. En este modelo animal no se detectaron diferencias significativas en la acumulación del reportero entre el ratón mutante y el control (Bowman et al., 2005). En el caso de SCA3, se utilizó un modelo transgénico de *Caenorhabditis elegans* que expresaba como proteína reportera la proteína RFP (proteína roja fluorescente) con una señal tipo UFD y la proteína Ataxina3 con 127 repeticiones de CAG (Khan et al., 2006). En este modelo sí se detectó acumulación de la proteína reportera aunque sólo en aquellas células que contenían CIs. Este aumento no era debido a una inhibición del UPS, sino a un aumento transcripcional del gen de la proteína reportera (Khan et al., 2006).

En la EH en concreto, hasta el momento sólo se ha realizado un trabajo en el que se

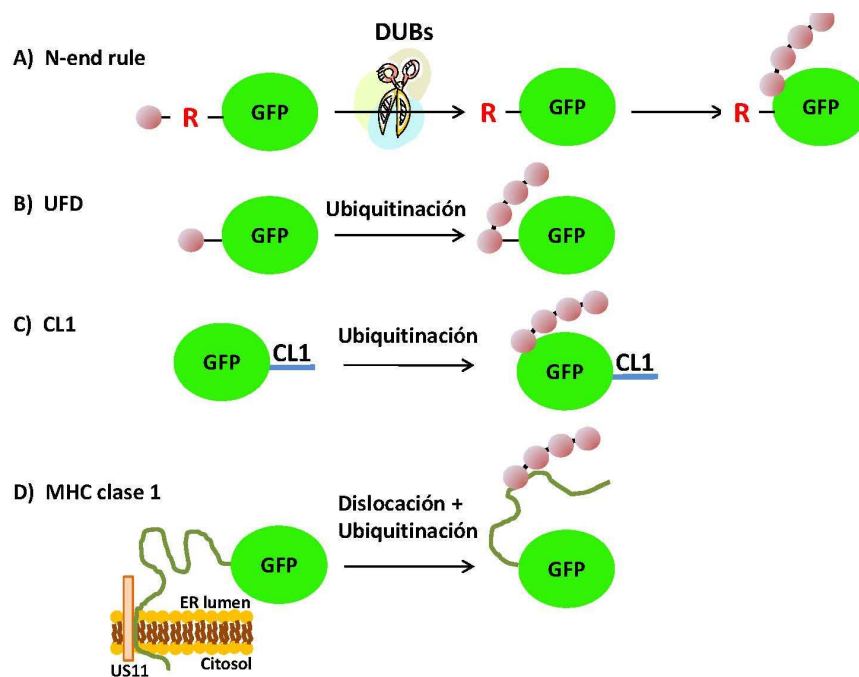


Figura I.8: Distintos tipos de construcciones reporteras de la actividad UPS basados en la proteína GFP. Representación esquemática de los distintos tipos de reporteros de la actividad UPS. A: Señal N-end rule que consiste en una molécula de Ub unida al extremo N-terminal del sustrato a través de una arginina; esta Ub es eliminada por enzimas DUBs, lo que hace que la arginina quede expuesta y sea reconocida por la correspondiente E3 como señal de degradación. B: Señal UFD que consiste en una molécula de Ub unida al extremo N-terminal del sustrato con una mutación en el último aa de la Ub para evitar que sea eliminada por las DUBs; esta Ub sirve como aceptora del árbol de poliUb. C: Señal CL1 que consiste en la adición de una secuencia de 16 aa en el extremo C-terminal del sustrato que es reconocido por las E3 como señal de degradación. D: Señal MHC clase I que consiste en la coexpresión de la proteína viral US11 y el motivo específico para MHC clase I, esto provoca la dislocación de la proteína marcada del retículo endoplásmico (ER) al citosol y su degradación por el UPS.

combinen modelos animales de esta enfermedad y proteínas reporteras de la actividad del UPS. Este trabajo utiliza ratones HdhCAG150 (ratón knock-in con 150 repeticiones de CAG en el gen de la htt murina) a los que les realizan una inyección estereotáxica en el St de adenovirus que transportan distintas construcciones de proteínas reporteras con señales de degradación tipo CL1 (Wang et al., 2008). Este trabajo centra su análisis en el estudio del UPS en las sinapsis ya que, al analizar la actividad tipo quimiotripsina del proteasoma en lisados totales de cerebro de ratón R6/2, no obtienen ningún cambio. La fusión del degrón al extremo N-terminal de la proteína postsináptica PSD95 y de la proteína presináptica SNAP25 permite circunscribir el estudio únicamente a la sinapsis, dirigiendo su localización celular a las densidades pre- y post-sinápticas respectivamente. En este compartimento subcelular se observó una acumulación de las proteínas reporteras que no existe en el cuerpo celular. Dicha acumulación se debe a un descenso en la actividad tipo quimiotripsina del proteasoma. Este trabajo apunta hacia un descenso en la cantidad de ATP por su interacción con htt* como posible causa de la inhibición del UPS.

III. OBJETIVOS

A lo largo de la introducción de esta tesis ha quedado reflejada la controversia existente a cerca de la inhibición de UPS en la EH. Nuestro objetivo principal consiste en explorar la posible inhibición del sistema Ubiquitina Proteasoma *in vivo* en modelos de ratón de la enfermedad de Huntington combinados con ratones reporteros que expresan GFP modificada con un degrón (Ub-GFP).

Los objetivos concretos fueron:

1. Generación de modelos animales de la enfermedad de Huntington que sean a su vez reporteros de la actividad del sistema Ubiquitina-Proteasoma (UbGFP:R6/1, UbGFP:R6/2 y UbGFP:HD94)
2. Análisis de la posible inhibición del sistema Ubiquitina Proteasoma en ratones modelo de la enfermedad de Huntington presintomáticos y sintomáticos
3. Análisis de la posible inhibición del sistema Ubiquitina Proteasoma en ratones modelo de la enfermedad de Huntington sintomáticos y envejecidos para que haya tenido lugar la bajada en la actividad proteasoma cerebral asociada a la edad.
4. Análisis de la posible inhibición del sistema Ubiquitina Proteasoma en ratones modelo de la enfermedad de Huntington con expresión aguda de huntingtina mutada en la vida adulta.
5. Análisis del posible papel protector de la formación de cuerpos de inclusión sobre la inhibición del sistema Ubiquitina Proteasoma.

IV.MATERIALES Y MÉTODOS

1. MANIPULACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANIMALES

1.1. Generación y mantenimiento de los modelos animales

Todos los ratones utilizados en esta tesis se criaron en el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (Madrid). Se mantuvieron de cuatro a cinco ratones por jaula, con comida y agua disponible *ad libitum*, en un ambiente con temperatura controlada y con un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas (encendiéndose la luz a las 7:00 A.M).

1.2. Modelos animales utilizados.

El modelo animal y los controles utilizados para los experimentos de esta tesis se obtuvieron a partir de los ratones modelo de la EH HD94 (Yamamoto et al., 2000) y R6/1 (Mangiarini et al., 1996), y del ratón reportero UbGFP cedido por el Dr. Nico Dantuma del Instituto Karolinska (Estocolmo) (Lindsten et al., 2003).

1.2.1. Modelo transgénico condicional de la enfermedad de Huntington HD94.

Este ratón expresa el exón 1 de la *htt* con una expansión de CAG de 94 repeticiones (Yamamoto et al., 2000). La expresión de esta construcción es condicional y depende del transactivador regulado por tetraciclina (tTA). El tTA es una proteína de fusión que contiene el dominio de unión al ADN del represor de la tetraciclina (Gossen and Bujard, 1992) y el dominio de activación VP16 del Herpes virus simple. Esta proteína se une con gran afinidad a la secuencia del operador BiTetO. La combinación de la secuencia BiTetO con el promotor mínimo de *Citomegalovirus* adyacente permite la expresión continuada de un determinado transgén en ausencia de tetraciclina. La tetraciclina y sus análogos, encargados de la inactivación del transactivador, actúan uniéndose al tTA y produciendo un cambio conformacional que impide la unión del tTA al BiTetO, de modo que la transcripción se inhibe. Los ratones HD94 proceden de los ratones CamKII α -tTA (tTA) y HD94htt-BiTetO-LacZ (BiTetO). En los ratones tTA, el transactivador de tetraciclina se expresa bajo el control del promotor de la Calmodulina-quinasa II α (CamKII α -tTA) (Mayford et al., 1996). Este promotor determina la expresión en el cerebro anterior (Mayford et al., 1996). Para la generación de los ratones BiTet se utilizó un promotor de respuesta TetO bidireccional (Baron et al., 1995) seguido del exón 1 quimérico (humano/ratón) del gen de la *htt* con una expansión de 94 tripletes CAG en un sentido y el gen reportero β -galactosidasa (LacZ) con la NLS en el otro sentido (Fig III.1A).

1.2.2. Modelos transgénicos de la enfermedad de Huntington R6/1 y R6/2.

Los ratones R6/1 y R6/2 contienen insertado al azar en su genoma el exón 1 de la htt humana con una expansión de 116 y 140 tripletes de CAG respectivamente, que se expresa de forma ubicua bajo el promotor de la htt humana. El alto número de repeticiones de CAG hace que la manifestación de la EH se corresponda con la forma juvenil de la enfermedad, teniendo un fenotipo muy agresivo y de rápida evolución, aunque los cambios estructurales que se producen en el estriado se asemejan más a la patología de inicio adulto (Mangiarini et al., 1996).

1.2.3. Ratón reportero de la actividad del sistema Ubiquitina Proteasoma UbGFP.

Este ratón expresa la proteína GFP con la secuencia de la Ub fusionada en su extremo N-terminal con la mutación G76V en su último aa para evitar su eliminación por las enzimas deubiquitilantes (Dantuma et al., 2000; Lindsten et al., 2003). Esta señal de degradación es del tipo UFD en la que la Ub actúa de aceptora de la cadena de poliUb (Fig I.5). Esta construcción está bajo el control del promotor ubicuo de la β -actina y del activador del *Citomegalovirus* "immediate-early" (Fig III.1B). Existen dos líneas de este ratón reportero, las líneas 1 y 2, procedentes de dos fundadores distintos obtenidos de la microinyección de la construcción en oocitos fertilizados.

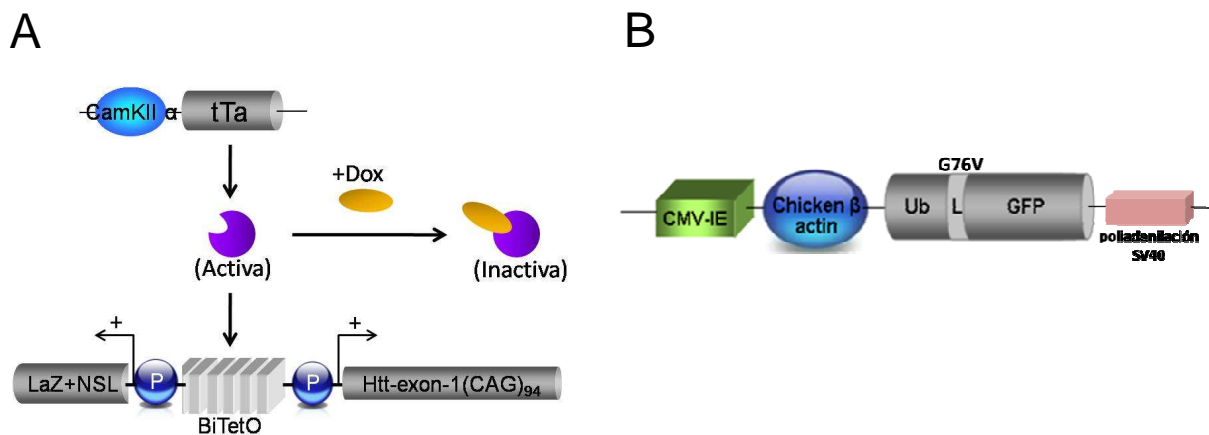


Figura III.1: Construcciones insertadas en los ratones (A) HD94 y (B) UbGFP. A: Construcción bajo el control del promotor propio de neuronas de cerebro anterior $\text{CAMKII}\alpha$. Consiste en el exón 1 quimérico humano/ratón de la htt con 94 repeticiones de CAG. El promotor bidireccional BiTetO permite la regulación simultánea de LacZ como gen reportero, con una secuencia de señalización nuclear (NLS). En su forma activa, tTa se une al promotor BiTetO activando la expresión de ambos transgenes. La Doxiciclina (Dox) inhibe la expresión de los transgenes uniéndose al tTa y evitando su unión al promotor. B: Construcción bajo el control del promotor ubicuo $\text{Chicken } \beta\text{-actin}$. El transgén contiene el enhancer del citomegalovirus (CMV) y la proteína GFP con una molécula de Ub unida a su extremo N-terminal cuyo último aa ha sido mutado (G76V) para evitar que sea eliminada por las enzimas deubiquitilantes del sistema Ubiquitina-Proteasoma.

1.2.4. Ratón modelo condicional de la enfermedad de Huntington con expresión de reportero de la actividad del sistema Ubiquitina Proteasoma UbGFP:HD94.

Este ratón procede del cruce de los ratones HD94 (modelo de la EH) y UbGFP (reportero de la actividad UPS), por lo que expresa el exón 1 quimérico (ratón/humano) del gen de la htt con una expansión de CAG de 94 repeticiones de forma condicional, y la

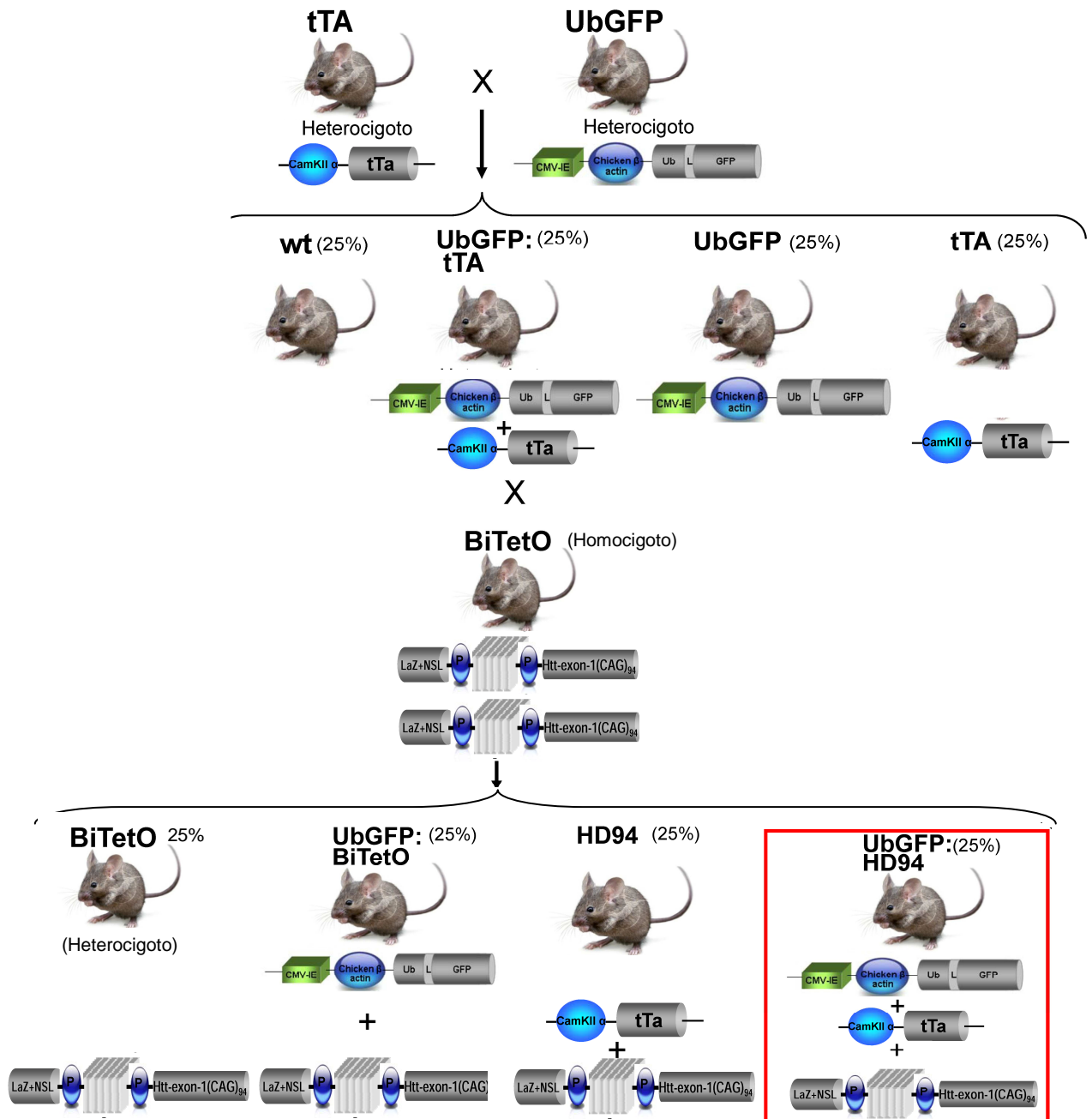


Figura III.2: Cruces de ratones realizados para la obtención del ratón experimental UbGFP:HD94. El primer cruce se realiza con los ratones tTA (expresa el transactivador tTA) y UbGFP (expresa la construcción reportera). De este cruce obtenemos un 25% de ratones UbGFP:tTA que, al cruzarlos por los ratones homocigotos BiTetO (llevan el exón 1 quimérico humano/ratón de la htt con 94 repeticiones de CAG y el gen reportero lacZ), dan lugar al ratón experimental UbGFP:HD94 que lleva los tres transgenes de interés.

proteína GFP con una Ub en su extremo N-terminal con la mutación G76V en su último aa, como reportero de la actividad UPS. La frecuencia de obtención de estos animales es del 6,25% (Fig III.2).

1.2.5. Ratones modelo constitutivo de la enfermedad de Huntington con expresión de reportero de la actividad del sistema Ubiquitina Proteasoma UbGFP:R6/1 y UbGFP:R6/2.

Este ratón procede del cruce de los ratones R6/1 y R6/2 (modelo de la EH) con el ratón UbGFP (reportero de la actividad UPS), por lo que expresan el exón 1 de la htt humana con una expansión de 116 o 140 tripletes de CAG y la proteína GFP con una Ub en su extremo N-terminal con la mutación G76V en su último aa, como reportero de la actividad UPS. La frecuencia de obtención de estos animales es del 25%.

1.3. Obtención y manipulación de Ácidos nucleicos

1.3.1. Extracción de ADN genómico.

El ADN genómico se extrajo de un fragmento de cola de los animales. Las colas se lisaron incubándolas a 60°C con tampón de lisis (Tris HCl 100 mM pH 7,8, EDTA 5 mM pH 8, SDS 0,1%, NaCl 200 mM en H₂O) más 40 µg de proteinasa K (Merck) hasta que se degradase por completo.

El ADN genómico se obtuvo realizando una extracción con fenol para separar el ADN genómico del resto de componentes de la célula, seguida de una extracción con cloroformo para limpiar la muestra de los restos de fenol que puedan quedar. La precipitación del ADN se produjo añadiendo Isopropanol. Una vez precipitado el ADN, se lavó con etanol al 70 % enfriado a -20°C. EL ADN se resuspendió en 200 µl de agua destilada.

1.3.2. Extracción de ARN.

El ARN se extrajo de muestras de Cx y St. Las muestras se obtuvieron mediante disección de los dos hemisferios del cerebro de ratones UBGFP:HD94 sacrificados mediante inhalación de CO₂. La homogenización y la extracción se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del kit comercial "Qiagen RNeasy Protect" de Qiagen. El ARN obtenido se resuspendió en 30 µl de agua destilada.

1.3.3. Amplificación de ADN mediante PCR.

El genotipado de los ratones se realizó mediante amplificaciones de ADN genómico utilizando la técnica de la PCR (Mullis and Faloona, 1987) en la que se utilizaron los oligonucleótidos (oligos) A/B (tabla III.1) para amplificar secuencias codificantes de la enzima β -Galactosidasa (LacZ) dentro del transgén BiTetO dando lugar a un fragmento de 650 pb; los oligos C/F (tabla III.1) para amplificar secuencias codificantes del transactivador tTa, dando lugar a un fragmento de 570 pb; los oligos 0872/1416 (tabla III.1) para amplificar secuencias codificantes de la proteína reportera Ub-GFP, dando lugar a un fragmento de 173 pb, y los oligos 92 y 96 (tabla III.1) para amplificar secuencias codificantes del exón 1 de la htt con 116 repeticiones de CAG, dando lugar a un fragmento de 220 pb (Fig III.3).

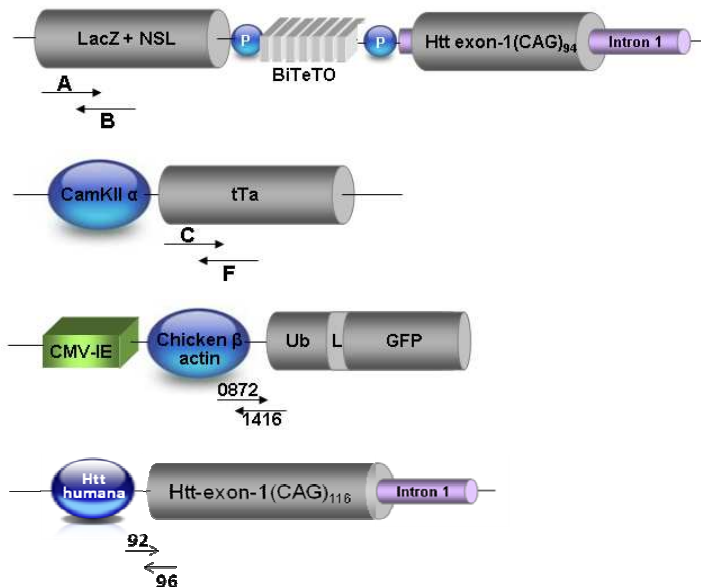


Fig III.3: Esquema de hibridación de los oligos utilizados en la amplificación de ADN mediante PCR de cada uno de los diferentes transgenes. Los oligos A/B amplifican secuencias codificantes del gen reportero LacZ en los ratones BiTetO, dando lugar a un fragmento de 650 pb. Los oligos C/F amplifican secuencias codificantes del transactivador tTa en los ratones tTA, dando lugar a un fragmento de 570 pb. Los oligos 0872/1416 amplifican una secuencia codificante de la proteína reportera Ub-GFP en los ratones UbGFP, dando lugar a un fragmento de 173 pb. Los oligos 92 y 96 amplifican una secuencia presente en el extremo 5' del exón 1 de la htt de los ratones R6, dando lugar a un fragmento de 220 pb.

La amplificación de ADN mediante reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) (Mullis and Faloona, 1987) se realizó en un termociclador de la marca Applied Biosystem. El volumen de reacción fue de 50 μ l en el caso de los oligos A, B, C, F, 0872 y 1416, y de 12 μ l en el caso de los oligos 92 y 96. Se utilizaron 1 U en el caso de los oligos A, B, C, F, 0872 y 1416, y 0,5 U en el caso de los oligos 92 y 96, de polimerasa del juego comercial Go-Taq^R Flexi ADN polymerase (Promega) por mezcla de reacción. Como iniciadores de la elongación se emplearon los diferentes oligos sintéticos descritos en la tabla III.1 a una

concentración final en la mezcla de reacción de 1 µg/µl. El protocolo de amplificación varía dependiendo el par de oligos utilizados.

OLIGO	SECUENCIA	PROTOCOLO DE AMPLIFICACIÓN		
A (f)	5'-CAT GGT CAG GTC ATG GAT GAC C-3'	(1) 94° C 5 min	(30) 94° C 40 seg 62° C 90 seg 72° C 90 seg	(1) 72°C 5min
B (r)	5'-TAA TCA GCC ACT GAT CCA CCC AG-3'			
C(f)	5'-ACT AAG TCA TCG CGA TGG AGC-3'	(1) 94° C 5 min 53° C 1 min 72° C 90 seg	(29) 94° C 1 min 53° C 1 min 72° C 90 seg	(1) 72°C 5min
F (r)	5'-CGA AAT CGT CTA GCG CGT CGG-3'			
0872 (f)	5'-AAG TTC ATC TGC ACC ACC G-3'	(1) 94° C 90 seg	(35) 94° C 90 seg 60° C 1 min 72° C 1 min	(1) 72°C 2min
1416 (r)	5'-TCC TTG AAG AAG ATG GTG CG-3'			
92 (f)	5'-TGG GAC GCA AGG CGC CGT G-3'	(1) 94° C 3 min	(35) 94° C 30 seg 64° C 1 min 72° C 1 min	(1) 72°C 2 min
96 (R)	5'-TGG AAG GAC TTG AGG GAC TC-3'			

Tabla III.1. Secuencias de los oligos utilizados para el genotipado de los ratones y protocolos de amplificación utilizados para cada uno de ellos. La denominación "f" marca aquellos oligos que contienen la secuencia codificante, mientras la denominación "r" marca aquellos oligos que contienen la secuencia complementaria. Los números entre paréntesis indican el número de ciclos. El tiempo de duración de cada paso viene expresado en minutos (min) o segundos (seg).

1.3.4. Cuantificación de ARNm mediante PCR cuantitativa

Se analizaron 7 muestras de St de ratones UbGFP y 6 muestras de St de ratones R6/1. EL ARN fue cuantificado en un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). Todas las muestras presentaron valores del ratio 260/280 alrededor de 2, lo que corresponde a ARN puro. La integridad del ARN se comprobó en un bioanalizador Agilent 2100, obteniéndose valores entre 7,10 y 8,30 que corresponden a una buena integridad. Para la reacción de la retrotranscriptasa se usó la mezcla de reacción High Capacity ARN-to-cADN (Applied Biosystems PN 4390712) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Brevemente: a 1 µg de ARN total de cada muestra se le añadieron 4 µl de mezcla de reacción. La reacción se completó hasta 20 µl con agua destilada libre de ADNsa y ARNsa (Gibco PN 10977). Los condiciones térmicas incluyeron los siguientes pasos: 5 min x 25° C, 30 min x 42° C y 5 min x 85° C. Los oligos utilizados para la detección de los genes problema y los genes 18S, β-actina y GAPDH son los representados en la tabla III.2.

Las reacciones de PCR cuantitativa (qPCR) se realizaron en un volumen final de 10 μ l con una cantidad de cADN equivalente a 5 ng de ARN, 250 nM de cada oligo y 5 μ l de mezcla de reacción Power Sybr Green PCR (Applied Biosystems PN 4367659) que incluía la ADN polimerasa AmpliTaq Gold. Para los genes 18S, GAPDH y β -actina se siguieron los siguientes pasos: desnaturalización durante 10 min a 95 $^{\circ}$ C, y 40 ciclos de 15 min a 95 $^{\circ}$ C y 1 min a 60 $^{\circ}$ C. La fluorescencia se adquirió durante el paso realizado a 60 $^{\circ}$ C. En el caso del gen de la htt*, el segundo paso consistió en 34 ciclos de: 30 min a 94 $^{\circ}$ C, 30 seg a 68 $^{\circ}$ C, 1,30 min a 72 $^{\circ}$ C y 15 min a 82,6 $^{\circ}$ C. En este caso la fluorescencia se adquirió en el paso realizado a 82,6 $^{\circ}$ C.

El programa informático utilizado para el análisis de los datos fue SDS 2.2.1 (Applied Biosystems).

OLIGO	SECUENCIA
β -actina (f)	5'-GACCCAGATCATGTTTGAGAGC-3'
β -actina (r)	5'-CCATCACAATGCCTGTGGTAC-3'
GAPDH (f)	5'-CTCCCACTCTTCCACCTTCG-3'
GAPDH (r)	5'-ATACCAGGAAATGAGCTTGAC-3'
18S (f)	5'-AGAGGGACAAGTGGCGTTCA-3'
18S (r)	5'-CCCGGACATCTAAGGGCAT-3'
GFP (f)	5'-GGGCACAAGCTGGAGTACAAC-3'
GFP (r)	5'-GATGCCGTTCTTCTGCTTGTC-3'
Htt* (f)	5'-CGGCTGAGGCAGCAGCGGCTGT-3'
Htt* (r)	5'-GCAGCAGCAGCAGCAACAGCCGCCACCGCC-3'

Tabla III.2: Secuencias de los oligos utilizados para las reacciones de la PCR cuantitativa para cada uno de los genes analizados. La denominación "f" marca aquellos oligos que contienen la secuencia codificante, mientras la denominación "r" marca aquellos oligos que contienen la secuencia complementaria.

1.3.5. Electroforesis en geles de agarosa

La separación de los fragmentos de ADN amplificados mediante PCR se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% con Bromuro de Etidio 0,5 μ g/ml (Sambrook, 1989a), sumergidos en tampón TAE (Tris-borato 40 mM, ácido acético glacial 20 μ M, EDTA 1 mM pH 8).

1.4. Análisis y clasificación fenotípica.

1.4.1. Reacción cromógena de LacZ.

Para la discriminación fenotípica de los ratones UbGFP:tTA y UbGFP:HD94, se tomaron muestras de Cx durante la disección del cerebro de los ratones y se incubaron en solución X-Gal (0,01% deoxicolato sódico, 0,02% Igepal CA.630, 5 mM hexacianoferrato (II) de potasio, 5 mM hexacianoferrato (III) de potasio, 0,25 mM 5-Bromo-4-cloro-3-inolil- β -D-galactopiranosido) durante 30 min a 37 °C. Pasado este tiempo, sólo los ratones UbGFP:HD94 (contienen tanto el transgen tTa como el BiTetO) presentaban coloración azul debida a la actividad de LacZ.

1.4.2. Fluorescencia de la proteína verde fluorescente (GFP).

Para la caracterización fenotípica de los ratones reportero U se tomaron fragmentos de cola de los mismos, se trocearon y se incubaron en una solución 5 μ M del inhibidor del proteasoma MG-132 (Calbiochem) en medio neurobasal (NB; GIBCO) durante 30 min. Pasado este tiempo se visualizaron bajo una lupa con luz ultravioleta y sólo las colas de aquellos animales que llevaban el transgén Ub^{G76V}-GFP fluorescían debido a la acumulación de la misma por acción del inhibidor del proteasoma.

1.5. Inyección estereotóxica.

Para las inyecciones estereotóxicas se utilizaron ratones U de 3 meses para la línea 2, y de 3 y 18 meses para la línea 1. Los ratones fueron anestesiados con isoflurano (Schering-Pluogh animal health) diluido en una mezcla 50:50 de oxígeno y óxido nitroso. Los animales se colocaron en el aparato estereotóxico y se les realizó una incisión a lo largo de la sutura sagital superior. Se retiró la piel hasta que lambda y bregma fueron visibles. El St se marcó utilizando las siguientes coordenadas relativas a bregma según el atlas de Paxinos y Watson: antero-posterior 0,5 mm, medial-lateral -1,5 mm, y dorso-ventral -2 mm (ver Fig III.4). Con una aguja se realizó un pequeño agujero en el cráneo en las coordenadas descritas y, con una jeringuilla Hamilton de 5 μ l, se inyectaron 2 μ l de lactacistina diluida en H₂O bidestilada a una concentración de 10 mg/ml, con un flujo constante de 1 μ l/min, en el hemisferio derecho. Como control, se inyectó el mismo volumen de H₂O bidestilada (vehículo en el que va diluida la lactacistina), en las mismas coordenadas del hemisferio izquierdo. La jeringuilla se mantuvo durante 2 min en la misma posición antes de sacarla a una velocidad de 1 mm/min. La sutura de la piel se llevó a cabo

con hilo de sutura 6-0. Los ratones se devolvieron a la jaula para que se recuperaran de la anestesia hasta ser sacrificados, 24h después de la inyección, por inhalación de CO₂. El tejido fue extraído y procesado como se describe en el apartado 3.1. de materiales y métodos para su análisis histológico.

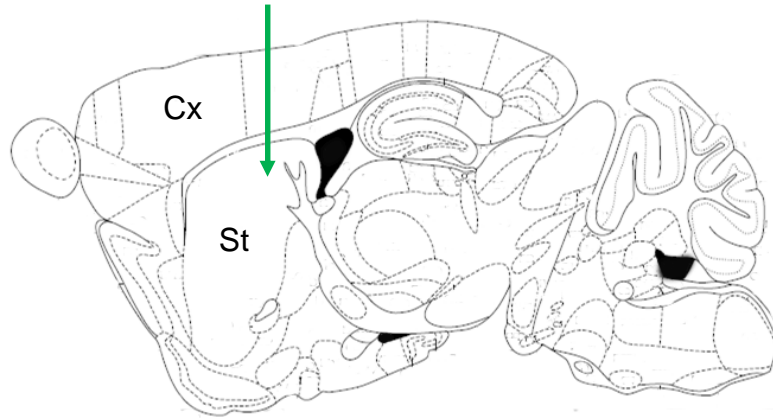


Figura III.4: Inyección intraestriatal del inhibidor del UPS lactacistina. Esquema de una sección sagital del cerebro de un ratón adulto localizada a la misma distancia lateral de bregma que la inyección realizada. La flecha verde indica el recorrido de la aguja Hamilton. La cabeza de la flecha marca el punto en el que se ha introducido el inhibidor.

1.6. Tratamientos *in vivo*

1.6.1. Tratamiento con doxiciclina.

El tratamiento con doxiciclina de los ratones UBGFP:HD94 comienza con administración de doxiciclina (Sigma-Aldrich) a una concentración de 0,5 mg/l a hembras preñadas, de cuya descendencia iban a obtenerse los ratones UBGFP:HD94, a partir del día de gestación E16. Una vez destetadas las crías, se mantuvo su tratamiento hasta los 2-3 meses de edad (Off). Alcanzada esta edad, se eliminó la doxiciclina del agua de bebida y los ratones se analizaron cada semana desde la semana 1 de expresión hasta la semana 16 (On) (Fig III.5).

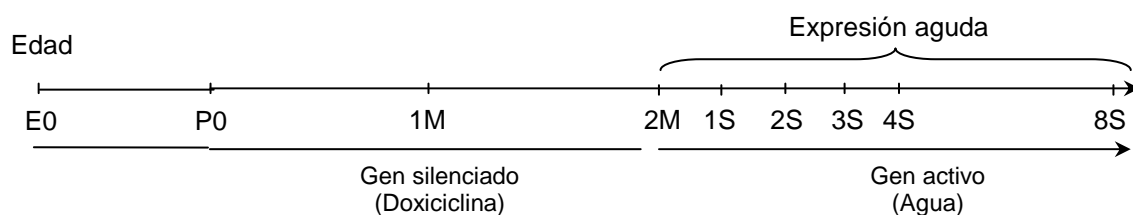
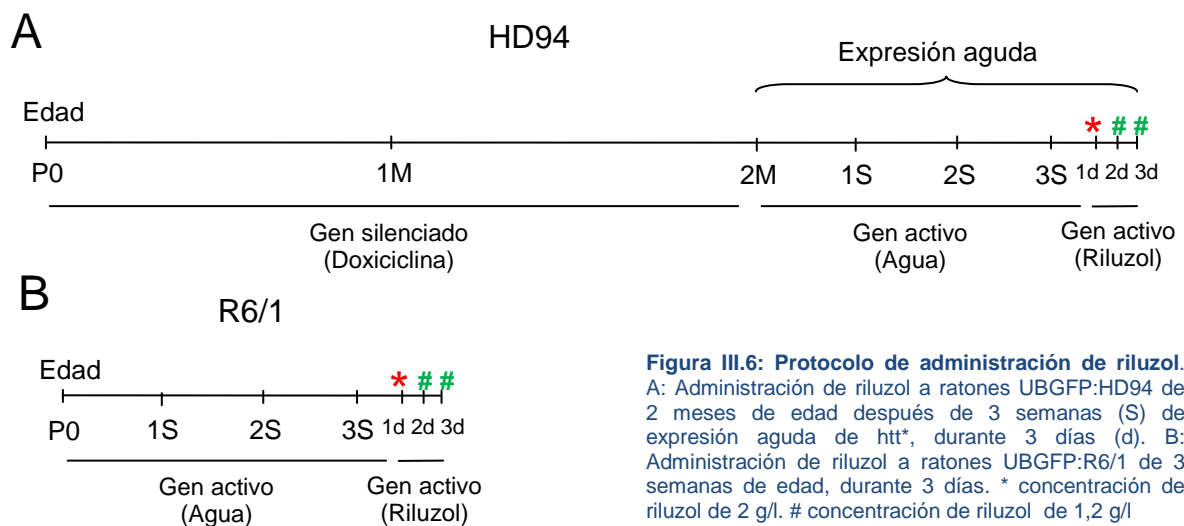


Figura III.5: Diagrama del tratamiento con doxiciclina de los ratones UBGFP:HD94. Administración de doxiciclina a ratones UbGFP:HD94 desde P0 (se administra a la madre gestante) hasta los 2 meses de edad. M meses, S semanas

1.6.2. Tratamiento con compuestos que previenen la agregación de huntingtina mutada y la formación de cuerpos de inclusión.

Para el tratamiento con compuestos antiagregantes se utilizaron ratones UBGFP:R6/1 y UBGFP:HD94. A los ratones UBGFP:R6/1 de 3 semanas de edad se les sustituyó el agua de bebida por una disolución de 2-amino-6-trifluorometoxibenzotiazol (riluzol, Sigma-Aldrich) a una concentración de 2 mg/l en 0,5% 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina (Sigma-Aldrich) durante el primer día, y de 1,2 mg/l durante los dos días siguientes (Fig III.6B). Los ratones se sacrificaron después de 3 días de tratamiento mediante inhalación de CO₂. A los ratones UBGFP:HD94 se les eliminó la doxiciclina del agua de bebida a los 2 o 3 meses de edad. Después de 3 semanas de expresión de htt* (bebiendo agua) se les aplicó el mismo protocolo de administración de riluzol que a los ratones UBGFP:R6/1 (Fig III.6A). La obtención de muestras se realizó según se explica en los apartados 2 y 3 de materiales y métodos.



2. ANÁLISIS PROTEICO DE LAS MUESTRAS OBTENIDAS DE LOS RATONES (western-blot)

Todos los ratones analizados fueron sacrificados mediante inhalación de CO₂. Se les extrajo el cerebro y se prepararon extractos de proteína a partir de disecciones de Cx, St y Cb de un hemisferio del cerebro de ratones control (wt, E, HH y U), HD94 y UBGFP:HD94; el otro hemisferio fue utilizado para el análisis histológico del tejido (ver apartado 3.1 de

materiales y métodos). Los ratones se sacrificaron mediante inhalación de CO₂. El tejido se homogenizó con un homogenizador de teflón/vidrio en tampón de homogenización (20 mM HEPES, pH 7.4, 100 mM NaCl, 10 mM NaF, 1% tritónX-100, 1 mM Ortovanadato sódico, 10 mM EDTA, 1 μM ácido Okadaico, e inhibidores de proteasas (2 mM PMSF, 10 μg/ml Aprotinina, 10 μg/ml Leupeptina, y 10 μg/ml Pepstatina)) a 4°C. Los homogenizados se centrifugaron a 15.000 r.p.m. durante 15 min a 4 °C en una centrífuga Eppendorf. El sobrenadante se guardó en alícuotas de 100 μl a -80 °C.

El contenido proteico de las muestras se determinó por el método de Bradford (Bio Rad) (Bradford, 1976). Posteriormente se añadió a las muestras tampón de carga (250 mM Tris, pH 6,8, 4 % SDS, 10 % glicerol, 2 % β-mercaptoetanol y 0,0006 % bromofenol) y se hirvieron durante 5 min.

La separación electroforética de proteínas se realizó en geles al 10 % y 12 % de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). La electroforesis se llevó a cabo en tampón de electroforesis (Tris-borato 25 mM, Glicina 250 mM, SDS 1 %) a 250 voltios durante 1 h. Posteriormente, fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa (Schliecher y Schuell) en un aparato "Trans-blot" (Biorad) a 150 miliamperios durante 1 h. Para saber la eficacia de la transferencia, las membranas electrotransferidas fueron incubadas con una solución de Rojo Ponceau (ácido 3-hidroxi-4-(2-sulfo-4-(4-sulfofenilazo)-fenilazo)-2,7-naftalendisulfónico) al 0,2 % en ácido acético. Los sitios de unión inespecífica de las membranas se bloquearon incubándolas con leche en polvo desnatada al 5 % en PBS-Tween [PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM y KH₂PO₄ 1,7 mM pH 7,4), Tween 20 0,5 g/l] durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, las membranas se incubaron a 4 °C toda la noche (O/N) con los siguientes anticuerpos primarios diluidos en leche desnatada en polvo al 5 % en PBS-Tween: anti-N-terminal htt (mouse, MAB5374, Chemicon) 1:500, anti-GFP (mouse, Santa Cruz) 1:200, anti-β-actina (mouse, Sigma-Aldrich) 1:10000, y Hsp90 (Stressgen Bioreagents) 1:250. Para la inmunodetección se usaron los anticuerpos secundarios HRP-anti-IgG de ratón y de conejo (Dako), a una concentración 1:1000 durante 1 h. Seguidamente se incubaron con "ECL Chemoluminescence system" (Amersham) y se expusieron sobre películas autoradiográficas. La cuantificación de la inmunoreactividad se llevó a cabo utilizando un escáner densitométrico (Bio-Rad; GS-800 Calibrated imaging densitometer). Los valores de densitometría obtenidos con estos anticuerpos en el rango lineal de detección se normalizaron con respecto a los valores obtenidos con un anticuerpo anti-β-actina (Sigma-Aldrich) y Hsp90 (Stressgen Bioreagents) para corregir cualquier desviación en las cantidades de proteína cargadas.

3. ANÁLISIS HISTOLÓGICO DEL TEJIDO OBTENIDO DE LOS RATONES.

3.1. Disección y preparación del tejido.

Todos los ratones analizados fueron sacrificados mediante inhalación de CO₂. Se les extrajo el cerebro y un hemisferio fue fijado en Paraformaldehído al 4 % (Sigma-Aldrich) en tampón fosfato pH 7,2-7,3 durante 48 h a 4 °C.

Tanto los cerebros de los ratones adultos (de 2,5 meses a 21 meses) como los de los ratones utilizados en los paradigmas Off/On, fueron crioprotegidos en una solución de sacarosa al 30 % en PBS durante al menos 2 días. Después se embebieron en Optimal Cutting Temperature (OCT) (Tissue-Tek) y se cortaron secciones sagitales de 30 µm en un microtomo congelado (Leica, Nussloch, Germany). Las secciones se recogieron en una solución de glicol (30% glicerol, 30% etilen-glicol, 30% H₂O destilada y 10% tampón fosfato pH 7,2) para poder ser almacenados a -20 °C.

Los cerebros de ratones UbGFP inyectados intraestriatalmente con lactacistina fueron incluidos en una solución de agar bacteriológico al 5%. Posteriormente fueron seccionados en un vibratomo y las secciones recogidas en una solución de glicol (30 % glicerol, 30 % etilen-glicol, 30 % H₂O destilada y 10 % tampón fosfato pH 7,2) para poder ser almacenados a -20 °C.

3.2. Inmunohistoquímica

Las secciones obtenidas según el apartado 3.1 de materiales y métodos se pretrataron con una solución al 1% de H₂O₂ en PBS durante 30 min para inactivar la peroxidasa endógena. Después se incubaron con solución de bloqueo (sero albúmina bovina (BSA) 1%, suero fetal bovino (FBS) 5% y Tritón X-100 0,2% en PBS) durante 1 h para bloquear los sitios de unión inespecífica de los anticuerpos. Posteriormente, se incubaron O/N a 4 °C con los siguientes anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo: anti-GFP (rabbit, Molecular Probes) 1:5000, anti-β-galactosidasa (rabbit, ICN Biomed-Cappel) 1:5000, anti-N-terminal htt (mouse, MAB5374, Chemicon) 1:200. Para amplificar la señal del marcaje, las secciones se incubaron con el complejo avidina-biotina usando el kit de Elite Vectastain. La reacción cromógena se realizó incubando la sección con diaminobenzidina (Sigma-Aldrich) y urea en agua bidestilada, durante un máximo de 10 min. Las secciones fueron montadas con Fluorosave™ Reagent (Calbiochem).

3.3. Inmunofluorescencia

Las secciones de tejido fueron obtenidas y almacenadas de la forma descrita en el apartado 3.1. Todo el proceso se realizó en oscuridad. Se lavaron durante 15 min en una solución de Triton X-100 0,1% en PBS para permeabilizar el tejido. Posteriormente se incubaron durante 30 min en una solución de glicina 1 M en PBS para eliminar la fluorescencia del tejido. Los sitios de unión inespecífica de los anticuerpos se bloquearon incubando las secciones con una solución de bloqueo (BSA 1%, TritónX-100 0,1% en PBS) durante 1 h. Después se incubaron durante 2 h con los siguientes anticuerpos primarios diluidos en la solución de bloqueo: anti-GFP (rabbit, Molecular Probes) 1:2000, anti-NeuN (monoclonal, Chemicon) 1:100, anti-GFAP (policlonal, Promega) 1:500, anti-CNPase (policlonal, Abcam) 1:100, anti-iba1 (policlonal, Wako) 1:200, anti- β -galactosidasa (policlonal, ICN Biomed-Cappel) 1:2000, anti-N-terminal htt (monoclonal, MAB5374, Chemicon) 1:100. A continuación se incubaron con los anticuerpos secundarios fluorescentes anti-IgG de conejo y ratón conjugados con "Texas Red" (Molecular Probes, Eugene-OR, USA) y anti-IgG de conejo y ratón conjugados con "Oregon Green" (Molecular Probes, Eugene-OR, USA) a una concentración 1:200 durante 1 h en oscuridad. Por último, las secciones se incubaron con 4',6-diamidino-2-phenylindole (Dapi) (Calbiochem), compuesto fluorescente que tiñe núcleos al unirse fuertemente al ADN preferentemente a secuencias ricas en adenina y timidina, a una dilución 1:5000 durante 10 min. Antes de montar las secciones con Fluorosave™ Reagent se lavaron con H₂O destilada para eliminar los restos de sales que podrían dar fluorescencia.

3.4. Fluorescencia de GFP

Las secciones de tejido fueron obtenidas y almacenadas de la forma descrita en el apartado 3.1 de materiales y métodos. Todo el proceso se realizó en oscuridad. Las secciones se lavaron en PBS durante 10 min y se incubaron con Dapi a una concentración 1:5000 durante 10 min. Para finalizar se lavaron con H₂O destilada para eliminar los restos de sales que podrían dar fluorescencia, y se montaron con Fluorosave™ Reagent.

4. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL PROTEASOMA

Las actividades enzimáticas tipo quimiotripsina y tipo post-glutamil se analizaron en extractos procedentes de todo el St de ratones UbGFP de 1 y 18 meses de edad sacrificados mediante inhalación de CO₂, o en los extractos procedentes de la disección del St en 3 prismas de 1 mm², uno centrado alrededor de la inyección de lactacistina, otro conteniendo la parte central del St y el tercero conteniendo la parte más rostral del St de ratones UbGFP de 18 meses de edad inyectados intraestriatalmente con lactacistina. Estas muestras se homogenizaron en tampón de extracción (10 mM Tris-HCl, pH 7,8, 0,5 mM dithiothreitol, 5 mM ATP, 0,03% Triton X-100, y 5 mM MgCl₂) y se centrifugaron a 13.000 X g a 4 °C durante 20 min. Los sobrenadantes resultantes de la centrifugación se mantuvieron en hielo mientras se determinaba la concentración de proteína total en los mismos por el método de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA). Para la determinación de la actividad del proteasoma, se ajustó la concentración de proteína total de los extractos a 0,5 mg/ml utilizando como diluyente el mismo tampón de extracción. Todos los extractos se ensayaron por triplicado. Para determinar la actividad tipo quimiotripsina se utilizó como sustrato Suc-LLVY-aminomethylcoumarina (AMC; Sigma-Aldrich; 50 µM). Para determinar la actividad tipo post-glutamil se utilizó el sustrato Z-LLE-β-2-naphtylamina (Nap; Sigma-Aldrich; 0,2 mM). La determinación de la actividad del proteasoma se llevó a cabo en un volumen final de 400 µl conteniendo 10 µg de proteína, el sustrato, y 50 mM HEPES-KOH, pH 7,5. Se incubaron durante 30 y 60 min a 37°C. La reacción se paró con 1 ml de SDS al 10 % y se analizó la fluorescencia de las muestras en un fluorímetro (excitación/emisión: 335/410 nm para Nap y 380/40 nm para AMC). La formación del producto fue lineal con el tiempo (por lo menos hasta los 60 min). El nivel de actividad inespecífica (causada por degradación no debida al proteasoma) se obtuvo añadiendo los inhibidores del proteasoma lactacistina (Sigma-Aldrich) o MG-132 (Calbiochem) a unas concentraciones finales de 50 µM y 10 µM respectivamente.

5. ADSORCIÓN DE AGREGADOS EN MEMBRANA (FILTER TRAP)

5.1. Aislamiento de núcleos.

Se extrajeron los cerebros de ratones R6/1 tratados con riluzol a 2 mg/l en 0,5 % 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (Sigma-Aldrich) durante el primer día, y 1,2 mg/l los dos días siguientes, o con el vehículo (n=5). Se analizaron sólo los hemisferios derechos de dichos animales. El tejido se homogeneizó en 0,5 ml de tampón 1 (575 mM sacarosa, 25 mM KCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT y 0,5 mM PMSF) en un homogenizador vidrio-vidrio. Estos homogenados fueron centrifugados a 800 g durante 15 min a 4°C en una centrífuga Hettich Universal 320R (Hettich zentrifuges). Se descartó el sobrenadante, el precipitado se resuspendió con 1 ml de tampón 1 y se volvió a homogeneizar añadiendo 1 ml de tampón 1 (volumen total 2,1 ml). A este homogenado se le añadieron 2 volúmenes (4,2 ml) de tampón 2 (2,3 M sacarosa, 0,025 M KCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT y 0,5 mM PMSF) y se mezcló todo invirtiendo el tubo suavemente hasta que la solución quedó homogénea (volumen final 6,7 ml). En tubos SW41 (Beckman) enfriados en hielo se puso en el fondo 0,5 ml de tampón 2 para que actuaran como colchón de sacarosa. Sobre este colchón de sacarosa se añadieron cuidadosamente los 6,7 ml de muestra y se centrifugaron a 124.000 x g durante 1 h a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 0,5 ml de tampón 1 en hielo. La muestra resuspendida se transfirió a un tubo eppendorff y se centrifugó a 800 x g durante 15 min a 4°C en una centrífuga 5415D (Eppendorff). El precipitado se resuspendió en 100 μ l de tampón 1. La cuantificación del número de núcleos presentes en las muestras se realizó con una cámara Neubauer.

5.2. Preparación de cuerpos de inclusión.

Se usaron 3 x 10⁶ núcleos, obtenidos según se explica en el apartado 5.1 de materiales y métodos, por muestra. Las muestras se llevaron a un volumen final del 100 μ l con tampón A (0,1 M NaCl, 0,01 M MgCl₂, 1 % Tritón X-100, 0,5 mM PMSF y 0,5 mg/ml de ADNsa I (Sigma-Aldrich)), se mezclaron fuertemente y se dejaron reposar durante 20 min a temperatura ambiente. Seguidamente se centrifugaron a 100.000 x g durante 30 min a temperatura ambiente (41.000 r.p.m. en un rotor Beckman TLA-45 para ultracentrífugas). Los precipitados se resuspendieron en 100 μ l de tampón B (2 M NaCl, 0,2 mM MgCl₂ y 0,01 M Tris-HCl pH 7,4) y se añadieron 24 μ l de SDS al 10 % (concentración final 2%

SDS). Se hirvieron durante 3 min y se volvieron a centrifugar en las mismas condiciones que en el paso anterior. Los precipitados se resuspendieron en 100 µl de agua destilada y se volvieron a centrifugar en las mismas condiciones que en el paso anterior. Los precipitados finales se resuspendieron en 25 µl de agua destilada.

5.3 Dot-blot

Tanto un papel 3MM Whatman (Clifton, NJ) como la membrana de acetato de celulosa (0,2 µm, Schleicher & Schuell, Keene, NH) se incubaron en agua durante 1 h antes de montar el Dot-blot. Justo antes de pasar la muestra a través de la membrana, se colocó el papel 3MM sobre la base del aparato de dot-blot y sobre él la membrana y se cerró fuertemente el aparato de Dot-blot para asegurar que se produjera vacío. Se añadieron 200 µl de SDS 0,1% en los pocillos en los que posteriormente se iban a cargar las muestras y se aplicó vacío durante 2 min para que la solución de SDS pasara a través de la membrana. Posteriormente se cargaron los 25 µl de muestra (previamente hervidas durante 5 min) y se volvió a aplicar vacío. A continuación se lavaron los pocillos con 200 µl de SDS al 0,1% 5 veces. Con la membrana se siguió el mismo proceso que en la detección proteica de muestras descrita en el apartado 2 de materiales y métodos. La detección se realizó con el anticuerpo que reconoce el extremo N-terminal de la htt (monoclonal, MAB5374, Chemicon).

6. PURIFICACIÓN DE CUERPOS DE INCLUSIÓN POR SELECCIÓN MAGNÉTICA

Se analizaron 2 ratones R6/1 tratados con riluzol y 2 ratones R6/1 tratados con vehículo. Se prepararon extractos de medio cerebro de estos ratones homogenizando el tejido, con un poter vidrio-vidrio, en 6 ml de tampón 1 frío (10 mM Tris, 1 mM EGTA, 0,15 M NaCl, 10% sacarosa, 0,1% Triton X-100; e inhibidores de proteasas: 2 mM fluoruro de fenilmetilsulfonil; 10 µg/ml aprotinina; 10 µg/ml leupeptina; y 10 µg/ml pepstatina). Durante todo el experimento se llevó en paralelo una muestra en la que el extracto de cerebro fue sustituido por PBS. Los extractos se centrifugaron a 27.000 g en un rotor SS34 durante 20 min a 4°C. Los sobrenadantes (S1), conteniendo el citosol y los orgánulos celulares, se guardaron a -70°C. El precipitado se volvió a homogeneizar con un poter vidrio-vidrio en 5

ml de tampón 2 (10 mM Tris, 1 mM EGTA, 0,15 M NaCl, 10%; e inhibidores de proteasas: 2 mM fluoruro de fenilmetilsulfonil; 10 lg/ml aprotinina; 10 lg/ml leupeptina; and 10 lg/ml pepstatina). Las muestras se volvieron a centrifugar a 27.000 x g en un rotor SS34 durante 20 min a 4°C, se guardó el sobrenadante (S2) a -70°C y el precipitado se resuspendió en 12 ml de tampón 2. Después las muestras se pasaron por un filtro de 30 µm de diámetro. El filtrado se centrifugó a 27.000 g durante 20 min a 4°C y el precipitado se resuspendió en 2 ml de tampón 2. Posteriormente, se incubó con un anticuerpo que reconoce el extremo N-terminal de la htt (mouse, MAB5374, Chemicon) durante 1 h a temperatura ambiente con agitación. Seguidamente, se incubaron con el anticuerpo secundario anti-mouse IgG1 unido a partículas magnéticas (Miltenyi biotec) durante 1 h a 37°C con agitación. Mientras tanto, se colocaron las columnas (columnas para minimacs, Miltenyi Biotec) en los imanes para crear el campo magnético que retendrá las muestras marcadas y se equilibraron con 500 µl de tampón 2. Las muestras se pasaron a través de las columnas, se lavaron con 12 ml de tampón 2 y se eluyeron quitando el iman de sujeción y pasando por la columna 750 µl de tampón 2. 60 µl de las muestras eluidas se llevarón a un volumen final de 100 µl con PBS y se pasaron por un citómetro FACSCanto II High Throughput simple option (Becton Dickinson) para analizar el número de eventos, así como su complejidad y tamaño.

7. CULTIVOS PRIMARIOS NEURONALES

7.1. Cultivos primarios de neuronas corticales y estriatales.

Los cultivos primarios se prepararon a partir de neuronas corticales y estriatales de embriones de ratón C57Bl6 (día embrionario 18), de acuerdo a las modificaciones de procedimientos establecidos (Huettner and Baughman, 1986; Dubinsky, 1989). La hembra gestante se sacrificó mediante inhalación de CO₂. Se extrajeron las crías, se diseccionó el tejido cortical, y se incubó con el sistema de disociación de la Papaína (Worthington, Freehold, NJ, USA). Se plaquearon 120.000 neuronas por pocillo en placas de cultivo especiales para obtener mejor calidad de imagen en microscopios invertidos (Open µ-Slide with 8 wells for high quality microscopy, Ibidi) las cuales habían sido previamente cubiertas con 10 µg/ml de poli-L-lisina y 3 µg/ml de laminina. Los cultivos se mantuvieron en 300 µl de medio NB (GIBCO) suplementado con 1% B-27, 1% piruvato sódico y 0,5 mM glutamina. Las células se mantuvieron en un incubador humidificado al 95% aire-5% CO₂ a 37° C.

7.2. Transfección de cultivos primarios.

La transfección se realizó 24h después del plaqueo de las neuronas (DIV 1). Los plásmidos utilizados para las transfecciones fueron: Ub^{G76V}-YFP (Menendez-Benito et al., 2005) Q94-CFP y Q16-CFP (Maynard et al., 2009) (Fig III.7). La purificación de ADN plasmídico a partir de cultivos de colonias resultantes de transformación de bacterias de la cepa DH5α de *Escherichia coli*, se realizó por el método de lisis alcalina (Sambrook, 1989b). Para preparación a mayor escala, el ADN se purificó a partir de cultivos bacterianos de 400 ml utilizando el juego comercial “QIAGEN Plasmid Maxi” de Qiagen.

Para realizar la transfección se retiraron 100 µl de medio y se añadió la solución de transfección consistente en: 100 µl de medio NB preacondicionado (mantenido a 37 °C durante 2 h antes de la transfección), 3 µl de lipofectamina 2000 (Invitrogen) y 1 µg de los plásmidos necesarios. Los plásmidos se transfectaron en un ratio 1:1 molar usando un total de 2 µg de ADN en cada pocillo. La solución de transfección se dejó un máximo de 2 h. A las 2 h se retiró el medio por completo, se lavó con NB preacondicionado, y se añadió medio NB suplementado con 1 % B-27, 10 % piruvato sódico, 0,5 mM glutamina, 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin. Se mantuvieron en el incubador durante 16 h.

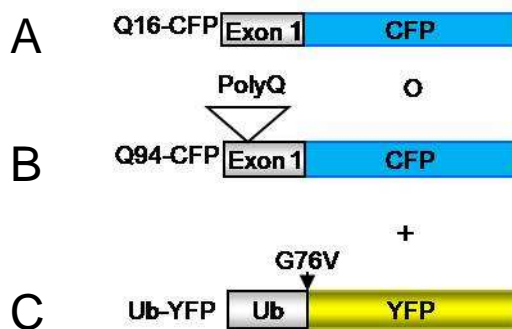


Figura III.7 Construcciones transfectadas en los cultivos primarios. A: Exón 1 de la htt humana con una expansión de 16 repeticiones de CAG con la proteína CFP fusionada a su extremo C-terminal. B: Exón 1 de la htt humana con una expansión de 94 repeticiones de CAG con la proteína CFP fusionada a su extremo C-terminal, la posición de la poliQ viene indicada con un triángulo vacío C: Proteína YFP con una molécula de Ub fusionada a su extremo N-terminal. La mutación G76V producida en el último aa de la Ub viene señalado por un triángulo negro.

7.3. Tratamiento con fármacos antiagregantes.

A los cultivos neuronales se les añadieron PGL-135 (Sigma-Aldrich) y riluzol (Sigma-Aldrich), disueltos en DMSO, hasta una concentración final de 400 µM y 40 µM respectivamente, 1 h después de haber terminado la transfección. Las células control se incubaron con una cantidad equivalente del solvente DMSO (a una concentración final del 3 %). El compuesto se mantuvo en el medio durante todo el experimento

8. TÉCNICAS DE IMAGEN

8.1. Filmación de los cultivos neuronales transfectados.

El sistema utilizado para obtener los videos *in vivo* consiste en un microscopio invertido Axiovert200 (Zeiss) con controlador de temperatura, CO₂ y humedad. Las imágenes se tomaron con una cámara digital C9100-02 (Hamamatsu) acoplada al microscopio. La posibilidad de moverse y enfocar diferentes campos a la vez nos la dio la pletina motorizada (Marzhauser). La fluorescencia la proporciona una lámpara de Xenon XBO 75W/2. Los filtros de fluorescencia de excitación y emisión utilizados fueron CFP (426.446/422-432, 455 DCLP, 460-500), YFP (490-510, 510-560, HQ520LP), GFP y DsRed (S473-498 S552-577 86007bs S500-540 S590-650) y Dapi (359-371, 450LP); montados en una rueda de filtros rápida para emisiones dobles LAMBDA 10 con controlador doble. Todo el sistema se encuentra montado sobre una mesa aislada de vibraciones. Los comandos del ordenador que llevan a cabo y coordinan los movimientos de la pletina motorizado, la rueda de filtros y el enfoque, se generaron con programas de software que utilizan algoritmos disponibles comercialmente.

Las imágenes se tomaron desde 16h post-transfección hasta 24 h post-transfección, cada 2h, con un objetivo 40 X/1.3 oil Plan-Neofluar. Las neuronas se mantuvieron en un incubador a 37 °C y 95% aire-5 % CO₂ entre cada toma. El tiempo de exposición (70 msec) y la sensibilidad de la cámara (30) fueron el mismo para la YFP y la CFP en todos los experimentos para que fuesen comparables entre sí. Las imágenes se tomaron a 16 bit. El análisis posterior de las imágenes se llevó a cabo utilizando los programas informáticos Metaview e Imaje J Launcher.

8.2. Imágenes fijas.

Todas las imágenes se tomaron a temperatura ambiente.

Las fotos en campo claro se tomaron con un microscopio invertido Axiovert200 (Zeiss) acoplado a una cámara ccd monocroma y color SPOT RT Slider (Diagnostic). Las lentes utilizadas fueron 20X/0.5 Plan-Neofluar, 40X/1.3 oil Plan-Neofluar y 63X/1.4 oil Plan-Apochromat. El programa de adquisición de imágenes utilizado fue Metaview.

Las fotos de fluorescencia se tomaron con un microscopio vertical Axioskop2 plus (Zeiss) acoplado a una cámara ccd color Coolsnap FX color (Roper Scientific). Las lentes utilizadas fueron 40X/1.30 oil Plan-Neofluar y 63X/1.4 oil Plan-Apochromat. Los filtros

utilizados fueron FITC (D465-95 505DCLP D515-55), TexasRed (D540-52 Q560LP D600-60) y Dapi/Hoescht (D300-90 400DCLP D435-85).

8.3. Análisis cuantitativo de la fluorescencia.

Las imágenes se cargaron en el programa Imaje J Launcher. Con la herramienta “Threshold” se ajustó el rango de iluminación con el límite inferior a 0 unidades de escala de grises (g.s.u.) y el límite superior a 65536 g.s.u. Se seleccionó el área de la que se quería medir la fluorescencia y con la herramienta “measure” se obtuvo el valor medio de intensidad del área seleccionada. Los valores se expresan en valor medio \pm SE.

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los análisis estadísticos realizados en esta tesis se llevaron a cabo con el programa SPSS 15.0

En los experimentos de análisis histológico se analizaron 3 secciones por ratón y genotipo. En estos estudios, así como en los resultados obtenidos por Western blot, se comprobó la normalidad de las muestras utilizando el test Kolmogorov-Smirnov seguido de la corrección Shapiro-Wilks. EN los csos en los que las muestras eran normales se determinó la igualdad de las medias mediante el test T de Student para muestras independientes. En aquellos casos en los que la hipótesis de normalidad no se cumplía, se aplicó el test U de Mann-Whitney para muestras independientes. Tanto en los resultados histológicos como en los de Wb, los datos se muestran como media \pm sem.

En los cultivos primarios transfectados con Q16-CFP o Q94-CFP se analizaron aproximadamente un total de 300 neuronas (analizadas en varios experimentos independientes) de cada tipo. En los experimentos de tratamientos con compuestos antiagregantes se estudiaron en un total de aproximadamente 200 neuronas (analizadas en varios experimentos independientes). Para la cuantificación de la fluorescencia se analizaron 60 neuronas del total obtenido en todos los experimentos, de cada uno de los grupos En todos los casos se utilizó la prueba de chi-cuadrado para determinar la significancia estadística.

El límite de significancia estadística se estableció en $p < 0,05$

V. RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN DE LOS RATONES QUE EXPRESAN LA PROTEÍNA REPORTERA DE INHIBICIÓN DEL SISTEMA UBIQUITINA PROTEASOMA Ub-GFP

1.1. Validación de los animales reporteros mediante inyección intraestriatal de lactacistina.

De la generación del ratón reportero de la actividad del UPS (UbGFP) llevada a cabo por el Dr. Dantuma en el instituto Karolinska de Estocolmo, se obtuvieron dos líneas distintas denominadas línea 1 y línea 2 (Lindsten et al., 2003). En ambas líneas se había caracterizado la expresión de la construcción reportera en distintos tejidos (pulmones, intestino delgado, músculo esquelético, corazón, cerebro, hígado, riñones, páncreas, testículos y bazo) mediante RT-qPCR, amplificándose su ARNm en todos ellos. El correcto funcionamiento de la construcción reportera (Ub-GFP) en dichos órganos *in vivo*, se comprobó midiendo su acumulación a nivel celular al inyectar intraperitonealmente 3 inhibidores distintos del proteasoma, MG-132, epoxomicina y MG-262. En el análisis de secciones de los distintos órganos se observó que los inhibidores MG-262 y epoxomicina producían acumulación de Ub-GFP, y que esto no sucedía en todos los órganos estudiados sino sólo en pulmones, intestino delgado, hígado, riñones, páncreas y bazo. En el resto de los órganos (músculo esquelético, corazón y cerebro) no se detectaba acumulación del reportero. La posible causa de la ausencia de efecto selectiva de los inhibidores puede deberse al método de administración y a la incapacidad de los mismos

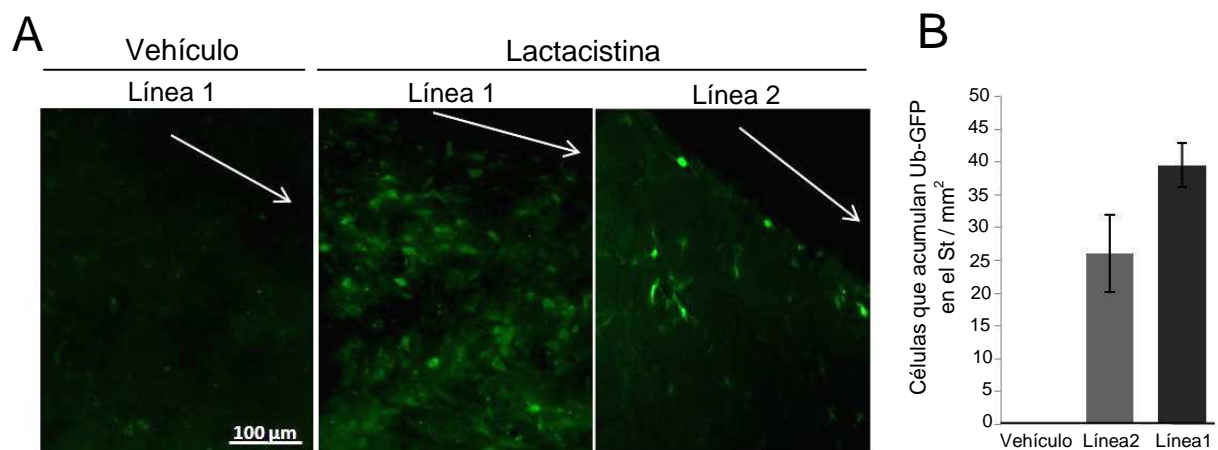


Figura IV.1: Acumulación del reportero Ub-GFP mediante inhibición del UPS *in vivo* en ratones UbGFP de las líneas 1 y 2 de 3 meses de edad. A: Imágenes de detección de la fluorescencia de GFP en secciones de St de ratones UbGFP de las líneas 1 y 2 inyectados intraestriatalmente con 2 µl de vehículo (línea 1) o 2 µl de lactacistina a una concentración de 10 µg/µl (líneas 1 y 2). Las flechas muestran la trayectoria de la aguja. B: Cuantificación del número de células que acumulan Ub-GFP por mm² de St en ratones UbGFP de las líneas 1 y 2 inyectados intraestriatalmente con lactacistina o vehículo.

de llegar a todos los órganos, en concreto en el cerebro, de su incapacidad de atravesar la barrera hematoencefálica (Lindsten et al., 2003),

Con objeto de completar la caracterización de las líneas de ratones reportero y confirmar el correcto funcionamiento del reportero en el cerebro *in vivo*, se realizaron inyecciones intraestriatales del inhibidor irreversible del proteasoma lactacistina, en ambas líneas de ratones UbGFP. Este experimento además permite, en caso de obtener resultados distintos en las diferentes líneas, decidir cuál es la más adecuada para realizar nuestros experimentos.

La inyección intraestriatal se llevó a cabo en ratones de 3 meses de edad, tanto de la línea 1 como de la línea 2. 24 h después de la inyección se analizó la acumulación de Ub-GFP en la zona adyacente al pinchazo y se observó la aparición de células que acumulaban la proteína reportera en ambas líneas de ratones UbGFP inyectados con lactacistina pero no en los ratones inyectados con vehículo (Fig IV.1A). La cuantificación del efecto producido por el inhibidor en cada una de las líneas puso de manifiesto que la acumulación de Ub-GFP causada por la lactacistina era más acusada en la línea 1 que en la línea 2. En la línea 1 el número de células que acumulaban Ub-GFP en secciones de 30 μm era de 40 células por mm^2 de St, encontrándose la mayor densidad de las mismas a lo largo del borde del pinchazo hasta una distancia de 0,5 mm, y disminuyendo a partir de ese punto hasta desaparecer por completo a 2 mm. En la línea 2 esta densidad era de tan sólo 26 células por mm^2 , encontrándose la mayor densidad a lo largo del pinchazo pero sólo hasta una distancia de 0,2 mm, y disminuyendo a partir de ese punto hasta desaparecer por completo a 1 mm (Fig. IV.6). En ambos casos también se detectaba un gradiente en el número de células que acumulaban el reportero en el eje dorso-ventral del St, siendo más abundantes en la zona adyacente al cuerpo caloso y disminuyendo hacia la zona ventral del St.

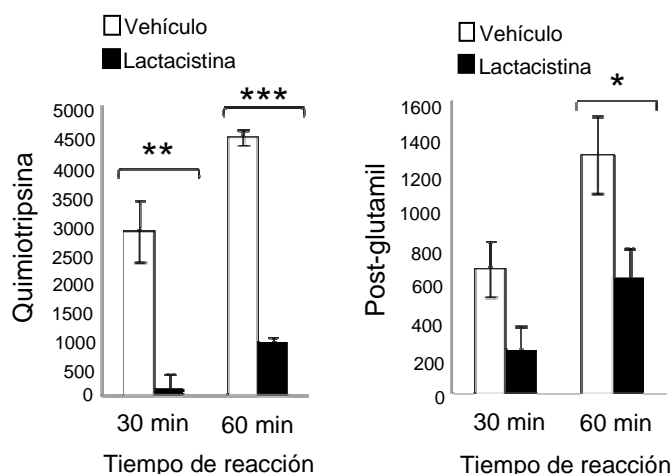


Figura IV.2: Medida de la inhibición de la actividad del proteasoma producida por el inhibidor lactacistina *in vivo*. Actividades tipo quimiotripsina y post-glutamil del Proteasoma en homogenados de St de la zona adyacente al pinchazo, en ratones UbGFP de 4 meses de edad inyectados con lactacistina o con vehículo, medida a los 30 min y a los 60 minutos de reacción. Resultado expresado en unidades arbitrarias. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$.

Para medir el nivel de inhibición de la actividad del proteasoma que producía la inyección intraestriatal de lactacistina en ratones UbGFP de 4 meses de edad (únicamente de la línea 1), después de 24 h los ratones se sacrificaron, se diseccionó el St y se analizaron dos de las tres actividades enzimáticas del proteasoma en homogenados de St inyectados con lactacistina o con su vehículo. Tanto la actividad tipo quimi tripsina como la post-glutamil se encontraban disminuídas en un 80 % y 40 % respectivamente en los St de los ratones inyectados con lactacistina con respecto a sus controles inyectados con vehículo. Dicha inhibición era estadísticamente significativa tanto a los 30 min como a los 60 min de reacción en el caso de la actividad tipo quimi tripsina, y sólo a los 60 min de reacción en el caso de la actividad post-glutamil (Fig IV.2).

La caracterización del tipo celular en el que se produce la acumulación del reportero Ub-GFP en los ratones UbGFP de ambas líneas inyectados con lactacistina se realizó mediante IF de secciones de cerebro de estos ratones, con anticuerpos que detectaban marcadores de distintos tipos celulares presentes en el St. En ambas líneas se encontró colocalización de la fluorescencia de Ub-GFP con todos los marcadores celulares utilizados (neuronas, astrocitos, microglía y oligodendrocitos) (Fig.IV.3A-B). Ordenando de mayor a menor representación en el St los tipos celulares que acumulan Ub-GFP, se

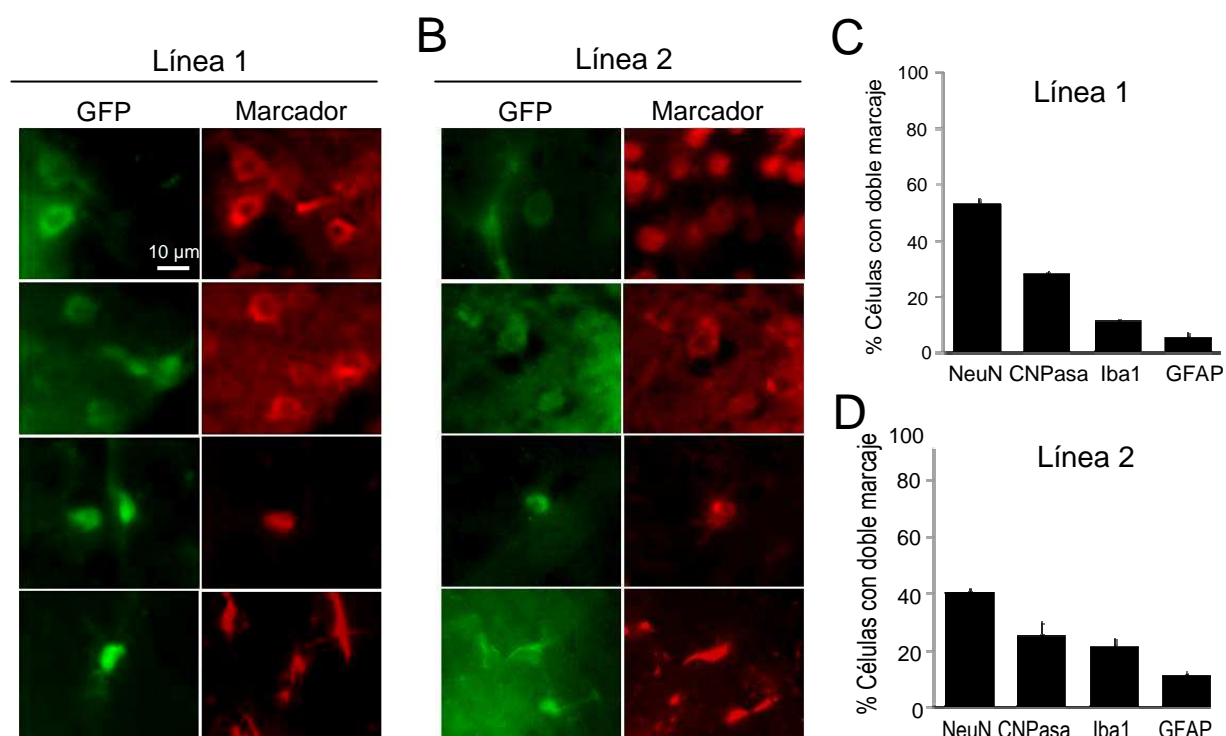


Figura IV.3: Tipos celulares que acumulan Ub-GFP en el St de ratones UbGFP de las líneas 1 y 2 inyectados intraestriatalmente con lactacistina. A-B: Detalles de células estriatales que acumulan Ub-GFP (verde), en ratones UbGFP de las líneas 1 (A) y 2 (B) de 4 meses, que se tiñen mediante inmunofluorescencia con marcadores (rojo) de neuronas (NeuN), oligodendrocitos (CNPase), microglía (Iba1) y astrocitos (GFAP). La barra de escala corresponde a 10 μ m en los paneles A y B. C-D: Cuantificaciones del porcentaje de las células que acumulan Ub-GFP en ratones UbGFP de las líneas 1 (C) y 2 (D) de 4 meses, que corresponden a neuronas (NeuN), oligodendrocitos (CNPase), microglía (Iba1) y astrocitos (GFAP).

obtuvo una distribución similar en ambas líneas, variando ligeramente los porcentajes. El tipo celular que mayoritariamente acumulaba Ub-GFP era el neuronal (aproximadamente el 55% del total de células que acumulan Ub-GFP en la línea 1, y el 35% en la línea 2), seguido de oligodendrocitos (30% en la línea 1 y 20 % en la línea 2), microglía (13 % en la línea 1 y 20 % en la línea 2) y por último astrocitos que representan un porcentaje muy pequeño (6 % en la línea 1 y 10 % en la línea 2) (Fig IV.3C-D).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el análisis de la acumulación a nivel celular de Ub-GFP en ambas líneas de ratones UbGFP tras producir la inhibición farmacológica del UPS, el descenso en las distintas actividades del proteasoma y los tipos celulares que acumulaban Ub-GFP tras dicha inhibición, la línea 1 fue la seleccionada para experimentos futuros.

1.2. Análisis de la acumulación basal de Ub-GFP en ratones reporteros de P0 a 21 meses.

Antes de comenzar el análisis de la actividad del UPS en los ratones modelo de la EH con expresión del reportero de la actividad del UPS, Ub-GFP (UbGFP:R6/1, UbGFP:R6/2 y UbGFP:HD94), consideramos conveniente analizar la ausencia o presencia de acumulación basal del reportero en el ratón UbGFP que pueda dificultar nuestro estudio. Para ello se analizó el St en secciones de 30 μm de cerebro de ratones UbGFP desde P0 hasta los 21 meses de edad mediante fluorescencia de GFP y en ninguna de las edades se encontraron células que estuviesen acumulando la cantidad suficiente del reportero para ser detectada por su fluorescencia (Fig IV.4).

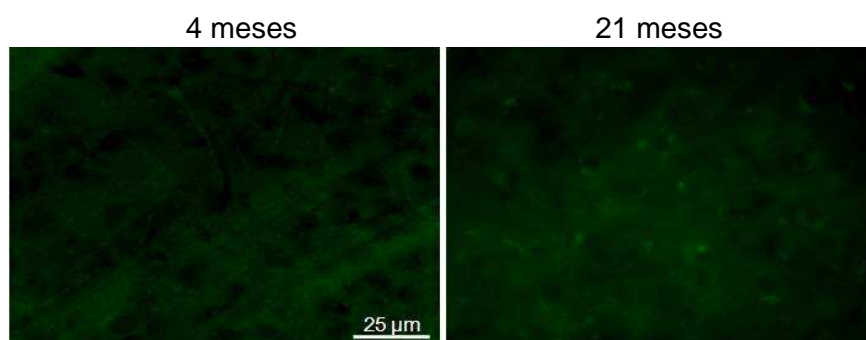


Figura IV.4: Detección de Ub-GFP en ratones UbGFP mediante fluorescencia de GFP. Detección de la fluorescencia de GFP en el St de secciones de cerebro de ratones UbGFP de 4 y 18 meses.

Sin embargo, cuando este análisis se realizó mediante IHQ con anticuerpos que reconocen la proteína GFP, desde la edad más temprana analizada (P0) hasta la más tardía (21 meses), se detectó una tenue tinción citoplásmica difusa específica de GFP en todas las estructuras del cerebro analizadas (Cx, St, Cb), que aumentaba con la edad,

siendo el tipo neuronal que presentaba la tinción más intensa las células de Purkinje del Cb (Fig IV.5). Estos resultados demostrarán la existencia de cierta acumulación basal del reportero no detectable por fluorescencia de GFP pero si por IHQ.

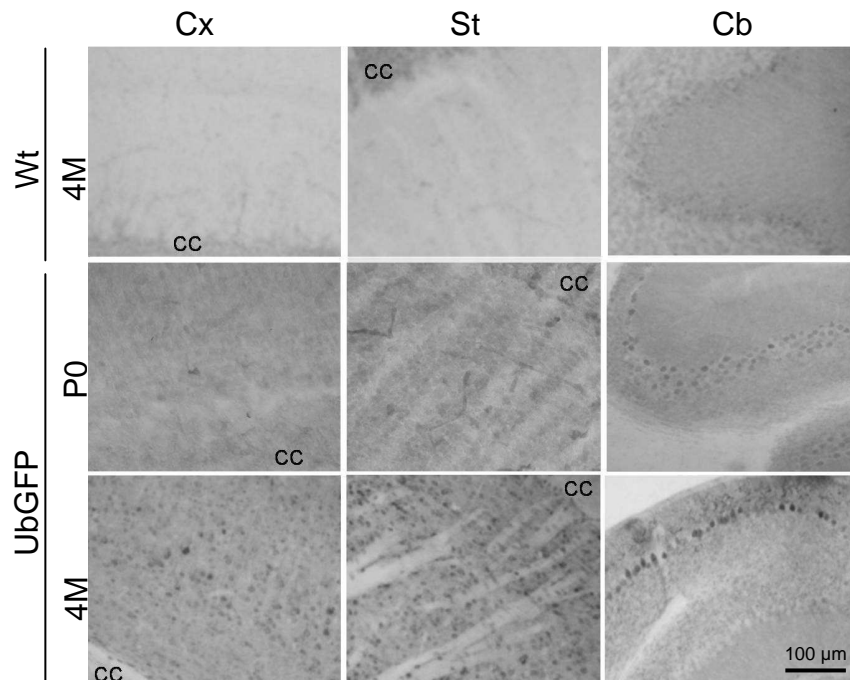


Figura IV.5: Análisis de la acumulación basal del reportero Ub-GFP en ratones UbGFP desde P0 a 21 meses, mediante IHQ. Imágenes de campo claro de la Cx, el St y el Cb de secciones de cerebro de ratones wt a 4 meses de edad y UbGFP a P0 y a 4 meses de edad, teñidas mediante inmunohistoquímica con anticuerpos que reconocen la proteína GFP. Cc cuerpo caloso.

Esta acumulación basal de la construcción reportera se detectó también mediante Wb en extractos de St, Cx y Cb de los ratones UbGFP en todas las edades. Al igual que sucedía en los resultados obtenidos mediante IHQ, esta acumulación basal era más alta en el Cb que en el resto de las estructuras analizadas y aumentaba con la edad. Como ya se ha explicado anteriormente, la construcción del transgen que codifica la proteína reportera (35 kDa de peso molecular) contiene una mutación en el último aa de la Ub unida a la proteína GFP que impide que sea eliminada de la GFP (25 kDa de peso molecular) por las enzimas DUBs y permite su acumulación en la célula. Sin embargo, en los extractos analizados mediante Wb, además de la banda de 35 kDa correspondiente al reportero, se detectaba otra banda de 25 kDa que presumiblemente corresponde a la proteína GFP sin la Ub unida

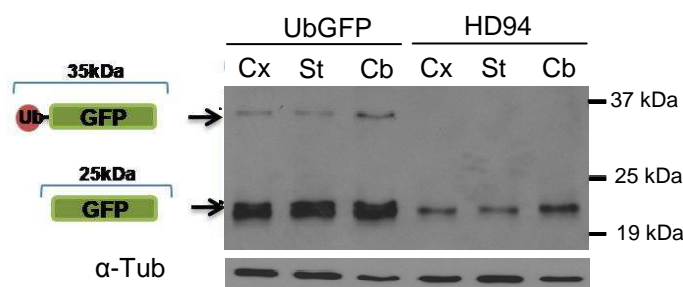


Figura IV.6: Detección mediante wb de la acumulación basal del reportero en ratones UbGFP desde P0 a 21 meses. Bandas de 35 kDa y 25 kDa específicas de la construcción reportera completa (Ub-GFP) o la forma truncada (GFP), detectadas mediante wb en Cx, St y Cb de ratones UbGFP. La banda presente tanto en UbGFP como en HD94 a la altura de 20 kDa es inespecífica.

(Fig IV.6). Esta banda, al igual que sucedía con la del reportero, también aumentaba con la edad.

Estos resultados confirman la existencia de cierta acumulación basal de la proteína reportera, detectable tanto mediante IHQ como mediante wb, pero no mediante la propia fluorescencia de GFP, en los ratones reportero UbGFP. Además sugiere la existencia de proteasas celulares capaces de eliminar la Ub de la proteína GFP en la construcción reportera.

2. LA PROTEÍNA REPORTERA Ub-GFP NO SE ACUMULA EN EL ESTRIADO DE DISTINTOS MODELOS ANIMALES DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON A EDADES PRE- Y SINTOMÁTICAS.

Una vez caracterizado el ratón reportero y conocida la acumulación basal de la proteína Ub-GFP en las neuronas estriatales del mismo, se estudió el estado de la actividad del UPS en tres modelos animales de la EH con expresión del reportero Ub-GFP, los ratones UbGFP:R6/1, UbGFP:R6/2 y UbGFP:HD94. Estos ratones se obtuvieron del cruce de los ratones reportero UbGFP con los ratones modelo de la EH R6/1, R6/2 y HD94. Como ratones control se utilizaron ratones UbGFP hermanos de camada (Fig I.8).

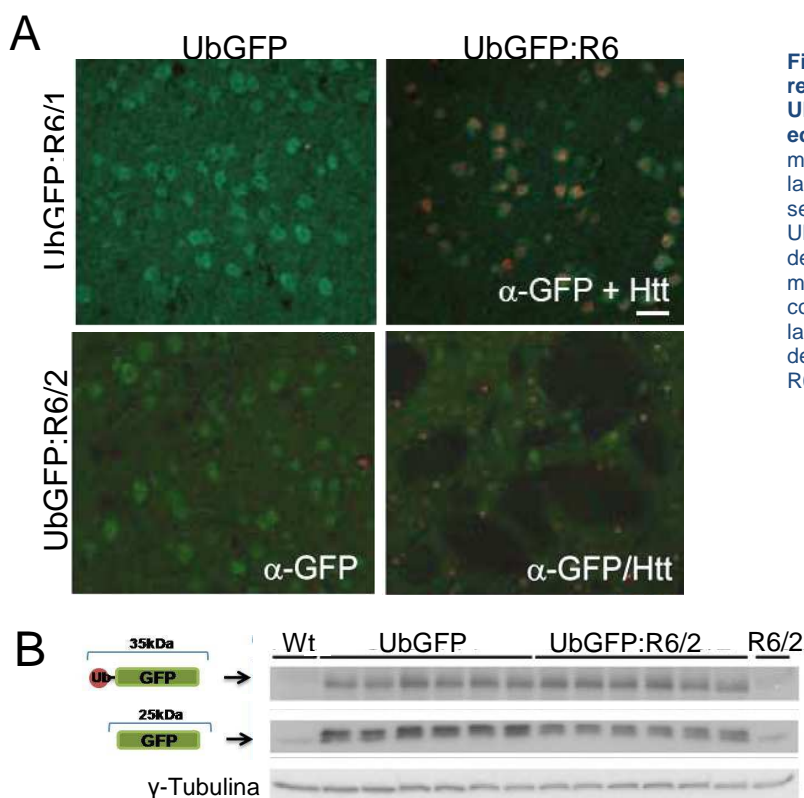


Figura IV.7. Detección de la proteína reportera en ratones UbGFP:R6/1 y UbGFP:R6/2 de 19 y 12 semanas de edad respectivamente. A: Detección mediante IF con anticuerpos que reconocen la proteína GFP y la htt, en el St de secciones de cerebro de ratones UbGFP, UbGFP:R6/1 de 19 semanas y UbGFP:R6/2 de 12 semanas de edad. B: Detección mediante wb de las bandas de 35 y 25 kDa correspondientes a la proteína reportera y a la GFP respectivamente en homogenados de St de ratones wt, UbGFP, UbGFP:R6/2 y R6/2.

Se analizaron ratones UbGFP:R6/1 de 6 a 40 semanas de edad y UbGFP:R6/2 de 6 a 14 semanas de edad a intervalos de 1 semana y se observó que, tanto en el análisis del St en secciones de cerebro de ambos ratones mediante IF con anticuerpos que reconocían la proteína GFP y el extremo N-terminal de la htt (Fig IV.7A), como en el análisis mediante Wb de homogenados de St de los mismos (Fig IV.7B), no existía acumulación de la proteína reportera a ninguna de las edades analizadas. Estos resultados son consistentes con los obtenidos recientemente en ratones R6/2 con expresión del degrón CI1-GFP como proteína reportera de la actividad del UPS, en los que tampoco se detectó acumulación del reportero por encima de la basal a edades sintomáticas (Bett et al., 2009).

Se realizó el mismo análisis que en los ratones UbGFP:R6/1 y UbGFP:R6/2 en ratones UbGFP:HD94 cuyo desarrollo de la patología es más lento y la sintomatología más leve. Estos ratones se analizaron a edades crecientes en intervalos de 2 meses, desde edades presintomáticas (2 meses de edad) hasta edades sintomáticas tempranas (12 meses de edad). Al igual que sucedía en los ratones UbGFP:R6/1 y UbGFP:R6/2, no se detectaron diferencias en la acumulación del reportero Ub-GFP en ninguna de las regiones del cerebro analizadas entre los ratones UbGFP:HD94 y sus controles UbGFP mediante fluorescencia de GFP, IHQ (Fig IV.8A) o wb con anticuerpos que reconocen la proteína GFP (Fig IV.8B) tanto en edades presintomáticas como sintomáticas tempranas.

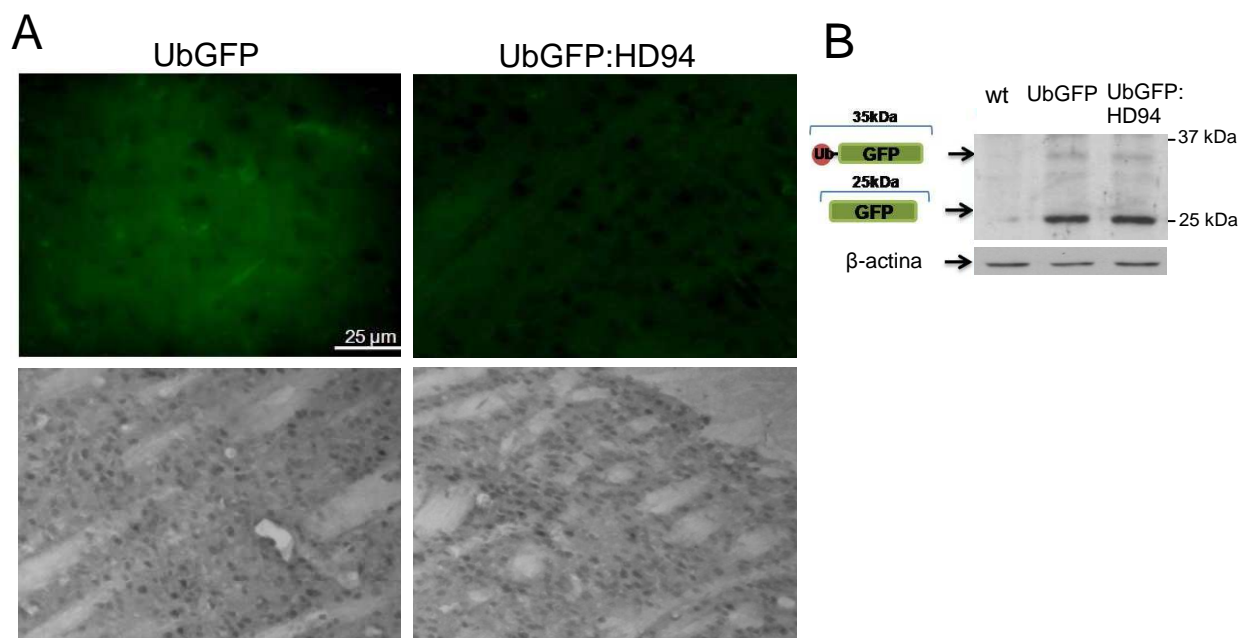


Figura IV.8: Detección de la proteína Ub-GFP en ratones UbGFP:HD94 de 4 meses de edad. A: Detección de la proteína reportera tanto por fluorescencia de GFP como mediante IHQ con anticuerpos que reconocen la proteína GFP, en el St de secciones de cerebro de ratones UbGFP y UbGFP:HD94 de 4 meses. B: Detección mediante Wb de las bandas de 35 y 25 kDa correspondientes a la construcción reportera y a la GFP respectivamente en homogenados de St de ratones wt, UbGFP, UbGFP:HD94 de 4 meses.

3. LA PROTEÍNA REPORTERA Ub-GFP NO SE ACUMULA EN EL ESTRIADO DE MODELOS ANIMALES DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON VIEJOS CON DISMINUCIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL PROTEASOMA.

El fenotipo de los ratones HD94 se agrava desde los 12 meses hasta la muerte de los mismos alrededor de los 2 años de edad (Diaz-Hernandez et al., 2005). Además se sabe que la actividad del proteasoma disminuye con la edad en el cerebro de los ratones (Keller et al., 2000a; Keller et al., 2000b; Zhou et al., 2003), hecho que se ha relacionado con el comienzo tardío de la EH (Zhou et al., 2003), y que los niveles de determinadas chaperonas también descienden con el envejecimiento (Paz Gavilan et al., 2006). Estos datos son importantes ya que apuntan a que podría ser necesario que se diesen procesos asociados al envejecimiento para que el UPS se viese afectado durante la EH. Para corroborar esta hipótesis en primer lugar consideramos necesario confirmar la existencia de un descenso de la actividad del proteasoma con la edad en el cerebro de los ratones reportero. Para ello se midió la actividad del proteasoma en homogenados de St de ratones UbGFP de 1 y 18 meses (Fig IV.9) detectándose un descenso significativo tanto de la actividad tipo quimiotripsina como de la tipo post-glutamil en los ratones de 18 meses con respecto a los ratones de 1 mes. Estos resultados confirman la existencia de un descenso de la actividad del proteasoma en el cerebro de los ratones UbGFP con la edad.

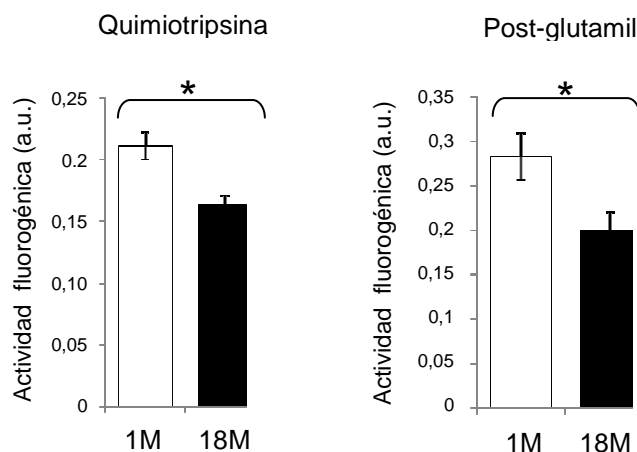


Figura IV.9: Medida de la actividad del proteasoma en ratones UbGFP de 1 y 18 meses. Medida de las actividades tipo chimotripsina y post-glutamil del proteasoma en homogenados de St de ratones UbGFP de 1 y 18 meses de edad medidas a los 30 min de reacción. Resultado expresado en unidades arbitrarias. * $p < 0,05$

Con el fin de estudiar si el empeoramiento progresivo de la EH unido a la disminución en la actividad del proteasoma que tiene lugar con la edad desemboca en una disfunción del mismo se analizaron ratones UbGFP:HD94, desde edades sintomáticas tempranas (12 meses) a edades sintomáticas tardías (21 meses de edad), a intervalos de 3 meses. Al igual que sucedía en edades anteriores, no se detectó acumulación de GFP por encima de

la basal en el St de estos ratones mediante ninguna de las técnicas utilizadas (fluorescencia de GFP, IHQ o Wb con anticuerpos que reconocen la GFP) (Fig IV.10). Estos resultados reafirman los obtenidos en ratones UbGFP:R6/1 y UbGFP:R6/2 sintomáticos, así como en los ratones UbGFP:HD94 a edades pre-sintomáticas y sintomáticas tempranas, en los que no se detectó aumento de la acumulación basal de la proteína reportera y por lo tanto disfunción del UPS.

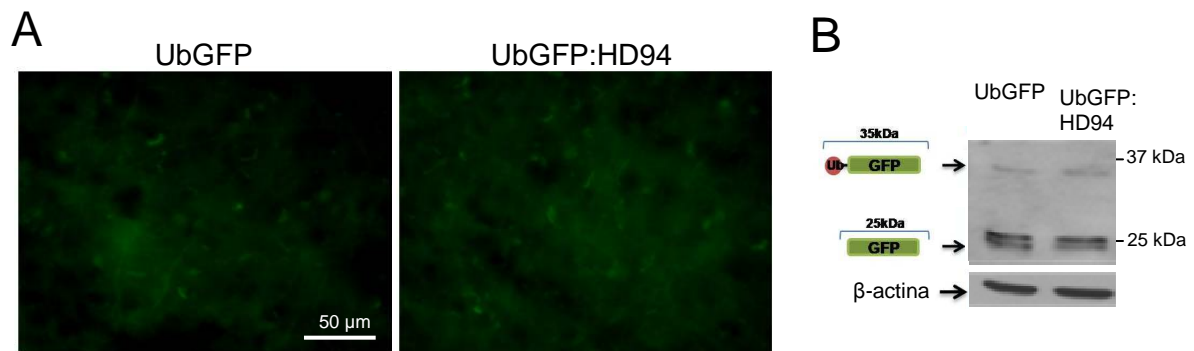


Figura IV.10: Detección de la proteína Ub-GFP en ratones UbGFP:HD94 de 18 meses de edad. A: Detección de la proteína reportera mediante fluorescencia de GFP en el St de secciones de cerebro de ratones UbGFP y UbGFP:HD94 de 18 meses. B: Detección mediante Wb de las bandas de 35 y 25 kDa correspondientes a la proteína reportera y a la GFP respectivamente en homogenados de St de ratones wt, UbGFP, UbGFP:HD94 de 18 meses.

La ausencia de acumulación del reportero por encima de la basal observada en todos los modelos animales de la EH analizados puede deberse a un mal funcionamiento de la construcción reportera a edades avanzadas. Para desacartarlo se realizaron inyecciones intraestriatales de lactacistina (o su vehículo) en ratones UbGFP de 18 meses y se analizó la actividad tipo quimiotripsina del proteasoma en tres regiones distintas del St de 1 mm² de grosor localizadas a distintas distancias del pinchazo: una centrada alrededor de la inyección del inhibidor lactacistina denominada región "0", otra comprendiendo la zona central de St, denominada región "+1"; y la tercera comprendiendo la zona más rostral del St, denominada región "+2" (Fig IV.11).

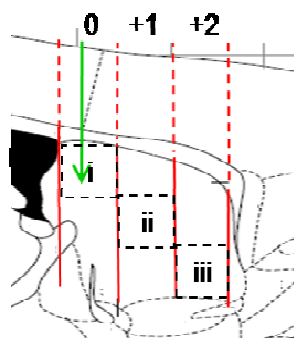


Figura IV.11: Esquema de las zonas en las que se dividió el St para el análisis de la actividad tipo quimiotripsina del proteasoma en ratones UbGFP de 18 meses inyectados con lactacistina o vehículo. La flecha verde marca la trayectoria de la aguja, las líneas rojas marcan la intersección entre las distintas zonas en las que se analizó la actividad del proteasoma (0, +1 y +2), cada una de ellas de 1 mm² de grosor. i, ii, iii: Regiones en las que se analizó el número de neuronas que acumulaban Ub-GFP en ratones UbGFP de 18 meses de edad inyectados intraestriatalmente con lactacistina.

En estos ratones UbGFP de 18 meses, al igual que a los 3 meses (Fig IV.2), se detectó un descenso de la actividad tipo quimi tripsina al inyectar lactacistina intraestriatalmente con respecto a los inyectados con el vehículo. Además se observó una relación directa entre el grado de inhibición del proteasoma en una determinada célula y la distancia a la

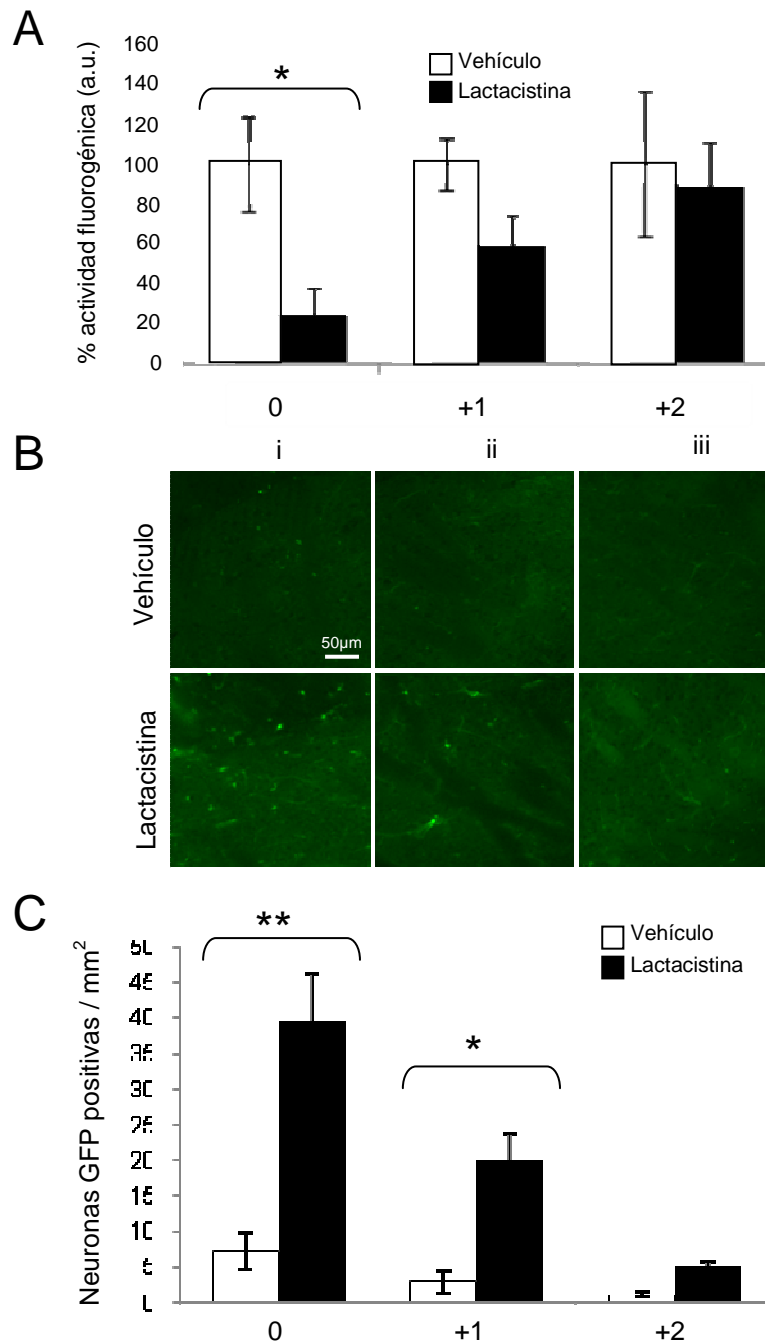


Figura IV.12 Análisis comparativo de la actividad tipo quimi tripsina del proteasoma y la acumulación del reportero en el St de ratones UbGFP de 18 meses de edad. A: Medida de la actividad tipo quimi tripsina del proteasoma, expresada en unidades arbitrarias, en las regiones "0", "+1" y "+2" del St de ratones reportero UbGFP de 18 meses de edad inyectados intraestriatalmente con lactacistina o vehículo. B: Imágenes de fluorescencia de GFP de las regiones i, ii, iii, marcadas en la figura IV.5 del St de ratones UbGFP de 18 meses inyectados con lactacistina o vehículo. C: Número de células que acumulan el reportero Ub-GFP por sección de St en las regiones "0", "+1" y "+2" del mismo, en ratones reportero UbGFP de 18 meses inyectados con lactacistina o vehículo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$

que ésta se encontraba del pinchazo. Esta inhibición era altamente significativa en la región “0”, con un descenso de la actividad de un 70% aproximadamente, disminuía hasta un 40% aproximadamente en la región “+1”, y era tan sólo de un 10% en la región “+2” (Fig IV.12A). Un análisis comparativo de la actividad tipo quimi tripsina del proteasoma y la presencia de células que acumulaban el reportero Ub-GFP en cada una de las regiones analizadas (0, +1, +2), reveló el mismo gradiente dependiente de la distancia en el número de células que acumulaban Ub-GFP que el obtenido en la medida de la actividad tipo quimi tripsina del proteasoma (Fig IV.12B-C).

El análisis mediante IF con anticuerpos que reconocen marcadores celulares de neuronas, microglía, oligodendrocitos y astrocitos, de los distintos tipos celulares que acumulan Ub-GFP en los ratones UbGFP de 18 meses de edad inyectados con lactacistina, reveló acumulación de la construcción reportera en todos los tipos celulares analizados. La distribución entre los distintos tipos celulares de dicha acumulación variaba ligeramente con respecto a los datos obtenidos en ratones UbGFP de 3 meses. El tipo celular que mayoritariamente acumulaba Ub-GFP deja de ser el neuronal y para pasar a ser la microglía (40%), seguido por neuronas (30%), oligodendrocitos (20%) y finalmente astrocitos (7%) (Fig IV.13A-B).

Estos resultados demuestran la ausencia de inhibición del proteasoma en el St incluso a edades sintomáticas tardías en las que ya ha tenido lugar un descenso de la actividad del UPS con la edad *in vivo* en distintos modelos animales de la EH.

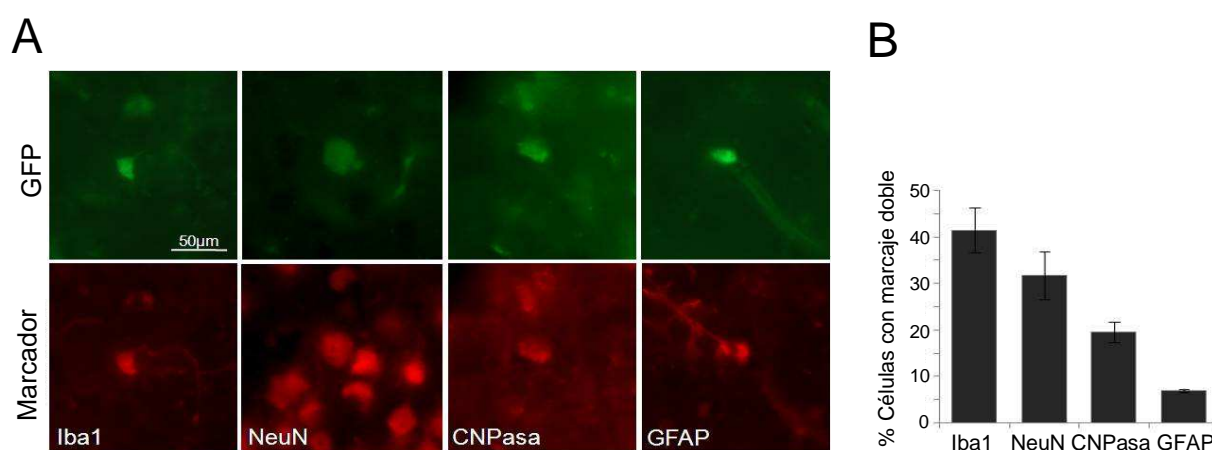


Figura IV.13 Tipos celulares que acumulan Ub-GFP en el St de ratones UbGFP de 18 meses inyectados intraestriatalmente con lactacistina. A: Detalles de células estriatales que acumulan Ub-GFP (verde) en ratones UbGFP de 18 meses, teñidas mediante inmunofluorescencia con marcadores (rojo) de neuronas (NeuN), oligodendrocitos (CNPasa), microglía (Iba1) y astrocitos (GFAP). B: Cuantificación del porcentaje de células que acumulan Ub-GFP que corresponden a neuronas (NeuN), oligodendrocitos (CNPasa), microglía (Iba1) y astrocitos (GFAP).

4. ACUMULACIÓN TRANSITORIA DE LA PROTEÍNA REPORTERA Ub-GFP ANTE LA EXPRESIÓN AGUDA DE HUNTINGTINA MUTADA.

Anteriormente se ha descrito la ausencia de acumulación de la proteína reportera en ratones UbGFP:R6/1, UbGFP:R6/2 y UbGFP:HD94 con expresión constitutiva de *htt**, incluso a edades muy avanzadas y en presencia de gran cantidad de CIs, lo que descarta la existencia de inhibición del UPS en estos ratones. Sin embargo, resultados recientes describen una correlación entre la actividad del UPS y el estado de agregación de la *htt** en un modelo celular de la EH (Mitra et al., 2009). Con el fin de comprobar la veracidad de esta relación *in vivo*, se estudió el efecto que la expresión aguda de *htt** en ratones UbGFP:HD94 adultos provocaba sobre la actividad del UPS en el intervalo de tiempo que precede a la formación de CIs. Gracias al mecanismo condicional de expresión de la *htt** que posee el ratón HD94 que permite el silenciamiento de la expresión del transgén de la *htt** mediante la adición de tetraciclina o su análogo doxiciclina en el agua de bebida, pudimos realizar dicho estudio.

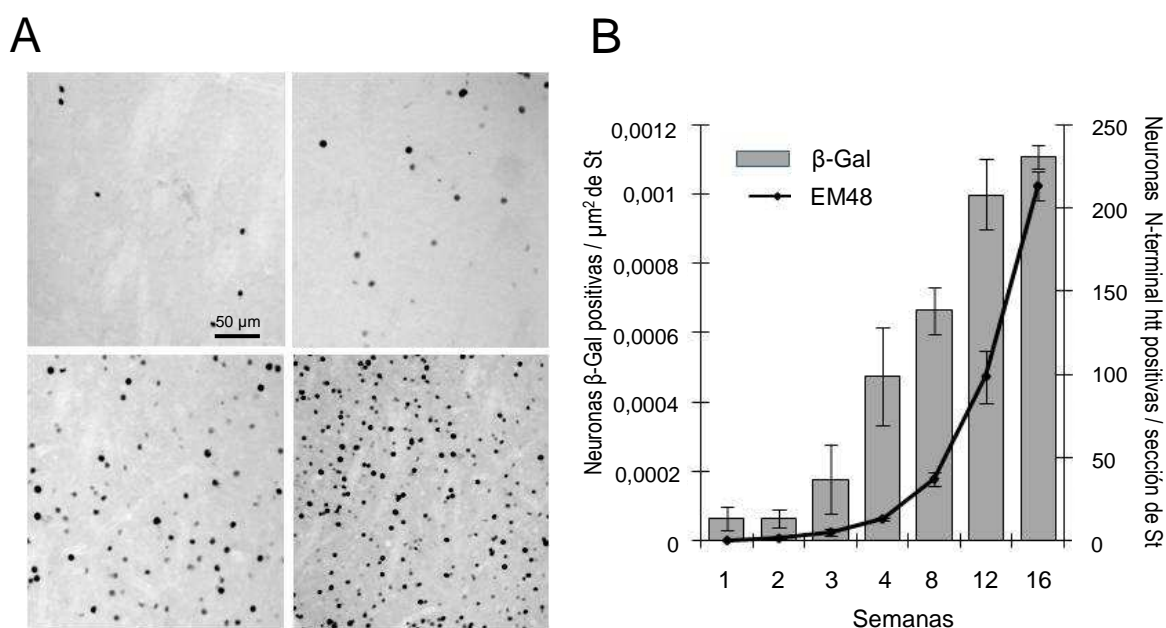


Figura IV.14: Monitorización de la evolución de la expresión de la *htt en los ratones UbGFP:HD94 después del tratamiento con doxiciclina.** A: Imágenes de campo claro del St de ratones UbGFP:HD94 1, 2, 3 y 4 semanas (S) después de haber suspendido el tratamiento, teñidas mediante inmunohistoquímica con un anticuerpo que reconoce β-gal. B: Cuantificación del número de neuronas, detectadas mediante el anticuerpo que reconoce β-gal, por μm² de St (diagrama de barras), y de neuronas positivas para N-terminal htt (EM48, diagrama de líneas) en ratones UbGFP:HD94 de 1 a 16 semanas de expresión de *htt**.

Se trataron ratones UbGFP:HD94, y sus controles UbGFP, con doxiciclina en el agua de bebida a una concentración de 0,5 g/l desde el día embrionario 16 (E16) hasta los 3 meses de edad. A partir del tercer mes se suprimió el tratamiento permitiendo la expresión del transgen que codifica la htt*. Los ratones se analizaron cada semana desde la semana 1 hasta la 24 de expresión de htt* (Fig III.5). El comienzo de la expresión del trasgen y su evolución con el tiempo en el St se monitorizó mediante IHQ con anticuerpos que reconocían β -Gal (producto de la actividad de LacZ cuyo gen se expresa a la vez que la htt* gracias a la actuación del promotor bidireccional BiTetO (Yamamoto et al., 2000; Martín-Aparicio et al., 2001)) (Fig IV.14A-B) y el extremo N-terminal de la htt (Fig IV.14B). Como se muestra en la fig IV.15, la expresión del transgen en el St se detectó desde la primera semana después de la eliminación del tratamiento, creciendo exponencialmente desde la segunda semana de expresión y alcanzando un nivel máximo constante después de 16 semanas de expresión.

El análisis realizado mediante detección de la fluorescencia de GFP en el St de los ratones UbGFP y UbGFP:HD94 tratados con doxiciclina, mostró por primera vez *in vivo* en un modelo de la EH la existencia de células con acumulación generalizada del reportero Ub-GFP. El número de estas células era significativamente más alto en el St de los ratones UbGFP:HD94 que en sus controles UbGFP durante las 4 primeras semanas de expresión

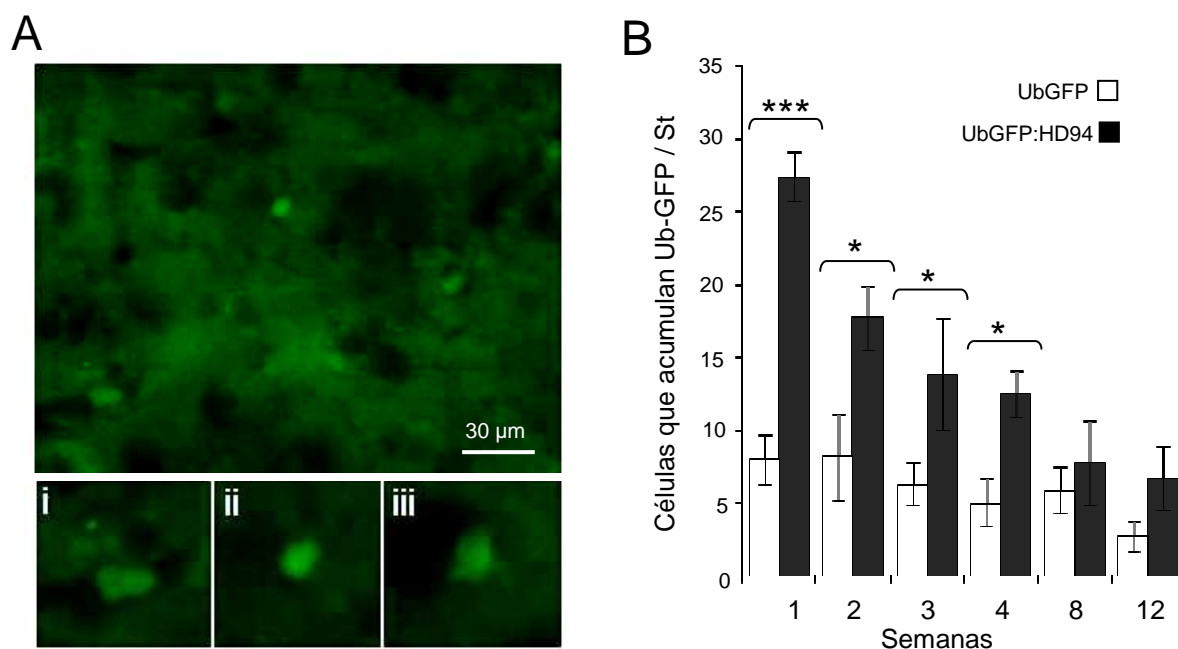


Figura IV.15: Detección de Ub-GFP mediante fluorescencia de GFP en células del St de ratones UbGFP:HD94 con expresión aguda de htt*. A: Detección mediante fluorescencia de GFP de células que acumulan Ub-GFP en el St de secciones de ratón UbGFP:HD94 con 1 semana de expresión de htt*. i, ii, iii: Ampliaciones de las células que acumulan Ub-GFP. B: Cuantificación del número de células que acumulan Ub-GFP en el St de ratones UbGFP y UbGFP:HD94 después de 1 a 12 semanas de expresión de htt*. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$

de htt* (Fig IV.15A). Esta diferencia dejaba de ser significativa a partir de la cuarta semana de expresión de htt* e iba disminuyendo con el tiempo hasta igualarse los niveles con los presentes en los ratones control (Fig IV.15B).

Para comprobar que la acumulación de Ub-GFP detectada durante las cuatro primeras semanas de expresión de htt* en estos ratones UbGFP:HD94 se producía como consecuencia de la expresión de htt* en neuronas, se analizaron dichas células mediante IF con un anticuerpo que reconoce el reportero β -Gal. Como se muestra en la Fig IV.16, todas aquellas células que acumulaban el reportero se teñían con el anticuerpo que reconocía β -Gal, por lo tanto se trata de neuronas que están expresando el transgén de la htt*.

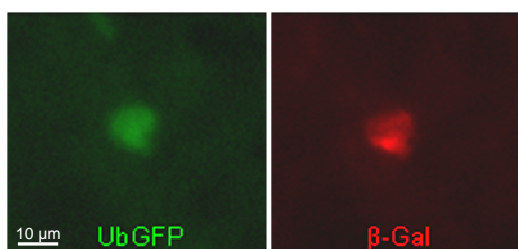


Figura IV.16: Detección de β -Gal en células que acumulan Ub-GFP. Detalle de una célula estriatal que acumula Ub-GFP (verde), en un ratón UbGFP:HD94 después de 2 semanas de expresión de htt*, teñida mediante IF con anticuerpos contra β -Gal (rojo).

Debido al reducido número de neuronas en las que se detectaba acumulación de la proteína reportera en secciones de St de los ratones UbGFP:HD94, en ninguna de las edades en las que se detectó dicha acumulación se observaron diferencias en la acumulación de la proteína reportera entre los ratones UbGFP:HD94 y los UbGFP mediante Wb. (Fig IV.17).

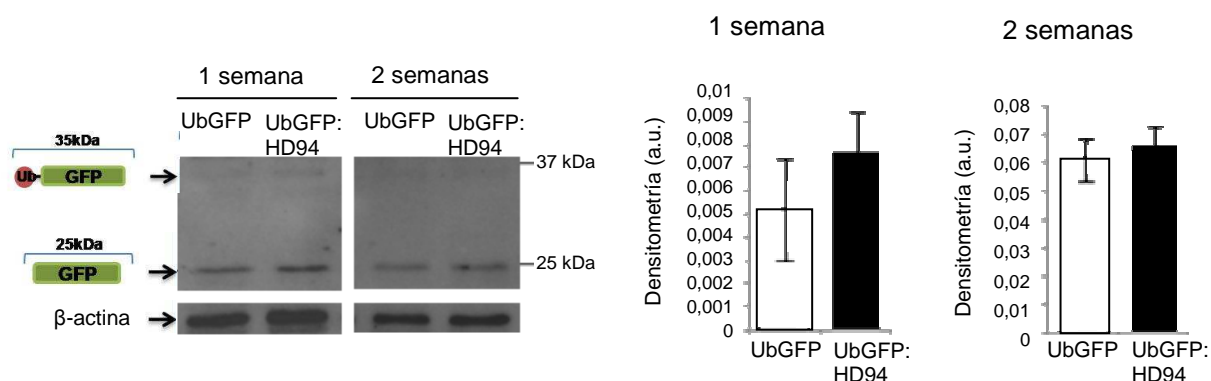


Figura IV.17. Análisis mediante wb de la acumulación de reportero en ratones con expresión aguda de htt*. Detección mediante wb de las bandas de 35 kDa y 25 kDa correspondientes a la forma completa del reportero Ub-GFP y la forma truncada GFP, en el St de ratones UbGFP y UbGFP:HD94 después de 1 o 2 semanas de expresión de htt*. Cuantificación densitométrica de la banda de 35 kDa (Ub-GFP), corregida por β -actina, después de 1 o 2 semanas de expresión de htt* tanto en ratones UbGFP como en UbGFP:HD94

El análisis de las actividades tipo quimiotripsina y post-glutamil del proteasoma los ratones UbGFP:HD94 y UbGFP después de 1 semana de expresión de htt* (por ser la edad en la que se encontraron mayores diferencias en el análisis de secciones de St mediante fluorescencia de GFP) no mostró disminución de ninguna de ellas. Por el contrario se detectó un aumento significativo en la actividad tipo quimiotripsina en los ratones UbGFP:HD94 con respecto a sus controles UbGFP (Fig IV.18). Esto encaja con el aumento de dichas actividades descrito previamente en varios modelos animales con expresión del exón 1 de la htt (Diaz-Hernandez et al., 2003; Bett et al., 2006; Seo et al., 2008)

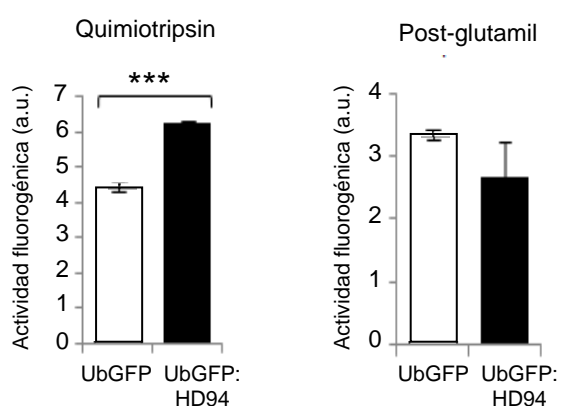


Figura IV.18. Análisis de las actividades tipo quimiotripsina y post-glutamil del proteasoma en ratones UBGFP y UBGFP:HD94 después de 1 semana de expresión aguda de htt*. Valores expresados en unidades arbitrarias de fluorescencia (a.u.). *** p<0,0001

Con el fin de descartar que la acumulación del reportero Ub-GFP detectada en secciones de St de los ratones UbGFP:HD94 con expresión aguda de htt* mediante fluorescencia de GFP se deba a un aumento transcripcional del mismo, se realizó un análisis mediante RT-qPCR de los niveles de ARNm en el St de estos ratones después de 1 o 2 semanas de expresión de htt* (ya que son las edades en las que se detectaron la mayores diferencias en la acumulación de Ub-GFP entre los ratones UbGFP:HD94 y UbGFP). El análisis no mostró diferencias en la expresión de la construcción reportera entre los ratones UbGFP:HD94 y los controles UbGFP, por lo que la acumulación de la proteína reportera no se debe a un aumento transcripcional de la misma (Fig IV.19).

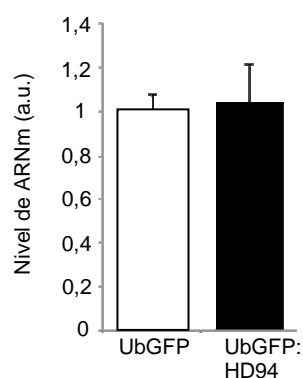


Figura IV.19: RT-qPCR del ARNm del reportero Ub-GFP. Niveles de ARNm en el St de ratones UBGFP y UBGFP:HD94 con 1 semana de expresión aguda de htt*. Los valores están normalizados por los genes 18S, GAPDH y β -actin y mostrados en unidades arbitrarias (a.u.).

5. LA DESAPARICIÓN DE Ub-GFP TRAS LA EXPRESIÓN AGUDA DE HUNTINGTINA MUTADA COINCIDE CON LA FORMACIÓN DE CUERPOS DE INCLUSIÓN.

5.1. Estudio de muerte neuronal en el estriado de ratones UbGFP:HD94 con expresión aguda de huntingtina mutada.

La explicación más simple para la naturaleza transitoria de la detección de células con elevados niveles de la proteína reportera sería la muerte de las mismas debido a la disfunción del UPS. Sin embargo, en el análisis de la morfología nuclear de estas células mediante tinción con Dapi en secciones de St de ratones UbGFP:HD94 con expresión aguda de *htt**, no se detectó ningún signo visible de apoptosis (Fig IV.20).

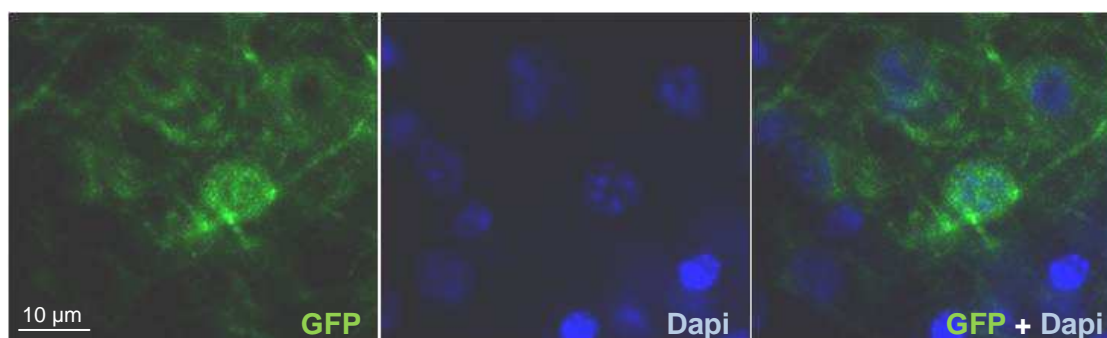


Figura IV.20: Análisis de la morfología nuclear de las neuronas que acumulan Ub-GFP. Detección mediante IF con DAPI del núcleo de una neurona que acumula Ub-GFP en un ratón UbGFP:HD94 después de 3 semanas de expresión de *htt**

También se realizó un análisis de la incidencia de muerte neuronal en el St de ratones UbGFP y UbGFP:HD94 después de 1 a 3 semanas de expresión de *htt**, mediante tinción IHQ del marcador de apoptosis caspasa-3 activada (Fig IV.21A-B) y por TUNEL (Fig IV.21C-D). Ninguna de las técnicas utilizadas reflejó un aumento del número de células apoptóticas en los ratones UbGFP:HD94 respecto a sus controles UbGFP, o co-localización de los marcadores de muerte celular con células que acumulasen el reportero. Estos resultados descartan la muerte celular como mecanismo responsable de la naturaleza transitoria de la detección del reportero Ub-GFP en ratones UbGFP:HD94 con expresión aguda de *htt**.

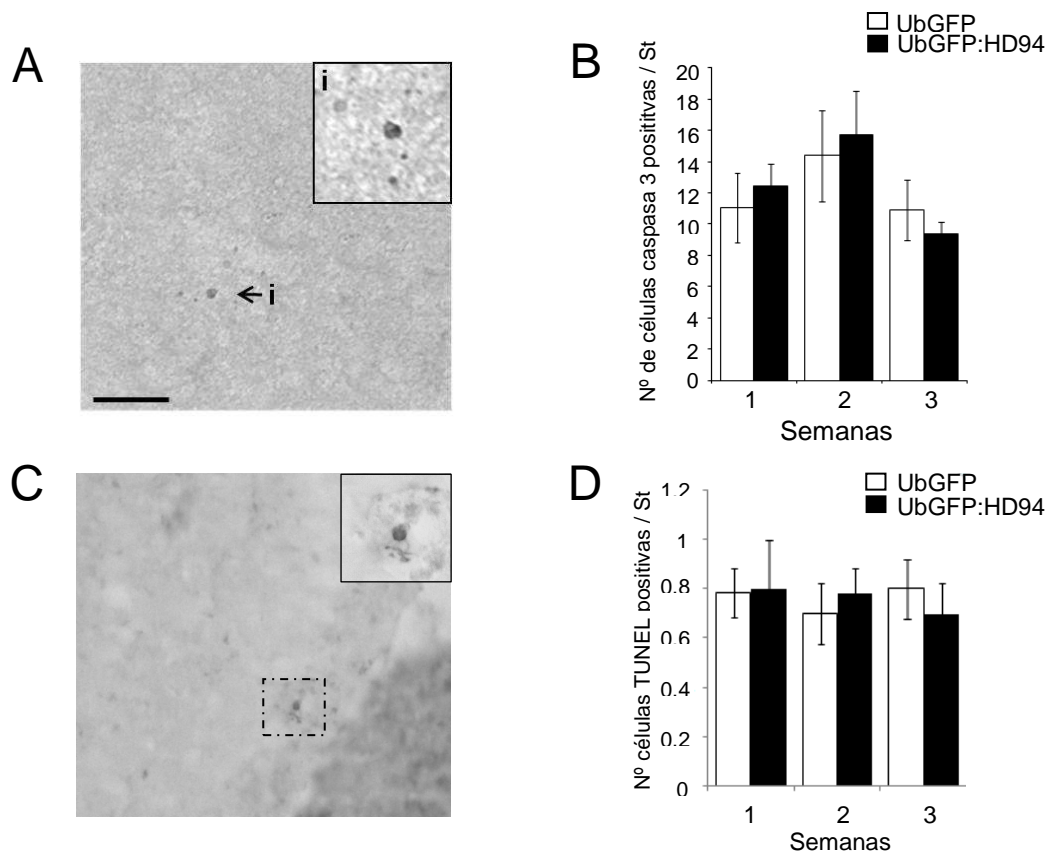


Figura 21: Análisis de muerte neuronal en ratones con expresión aguda de htt*. A: Imagen de campo claro del St de un ratón UbGFP:HD94 después de 2 semanas de expresión de htt*, teñido mediante IHQ con un anticuerpo que reconoce caspasa-3 activada. i: Amplificación de la neurona positiva para caspasa-3 activada mostrada en el apartado A. La barra de escala en el panel A corresponde a 50 μ m en los paneles A y C. B: Cuantificación del número de células marcadas para casapasa-3 activadas presentes en el St de ratones UbGFP y UbGFP:HD94 después de 1, 2 y 3 semanas (S) de expresión de htt*. C: Imagen de campo claro del St de un ratón UbGFP:HD94 después de 2 semanas de expresión de htt*, teñido mediante la técnica de TUNEL. i: Amplificación de la neurona positiva mostrada en el apartado C. D: Cuantificación del número de células TUNEL positivas presentes en el St de ratones UbGFP y UbGFP:HD94 después de 1, 2 y 3 semanas de expresión de htt*.

5.2. Incidencia de cuerpos de inclusión en las neuronas que acumulan Ub-GFP en ratones UbGFP:HD94 con expresión aguda de huntingtina mutada.

En base a estudios recientemente publicados en los que se relaciona la desaparición de la acumulación del reportero de actividad del UPS con la formación de CIs en modelos celulares de la EH (Mitra et al., 2009), se monitorizó, mediante tinción inmunohistoquímica con un anticuerpo que reconoce la htt*, la velocidad de formación de CIs en los ratones UbGFP:HD94 con expresión aguda de htt* después de 1 a 12 semanas de expresión de htt*. Durante las 3 primeras semanas de expresión de la htt* la tinción obtenida era citoplásmica difusa. Los primeros CIs se detectaron después de 3-4 semanas de expresión de htt*, edad que coincide con la desaparición de las células que acumulaban la proteína reportera (Fig IV.22), aumentando exponencialmente a partir de ese momento.

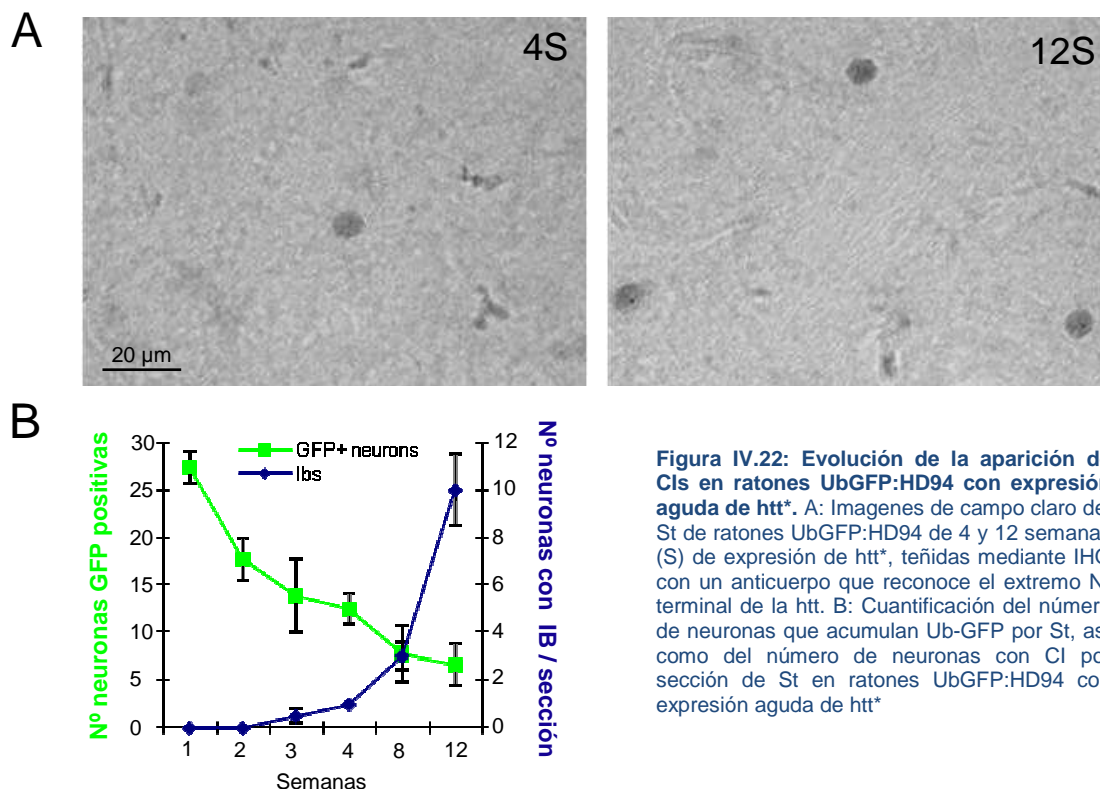


Figura IV.22: Evolución de la aparición de CIs en ratones UbGFP:HD94 con expresión aguda de htt*. A: Imágenes de campo claro del St de ratones UbGFP:HD94 de 4 y 12 semanas (S) de expresión de htt*, teñidas mediante IHQ con un anticuerpo que reconoce el extremo N-terminal de la htt. B: Cuantificación del número de neuronas que acumulan Ub-GFP por St, así como del número de neuronas con CI por sección de St en ratones UbGFP:HD94 con expresión aguda de htt*

La observación de cierta correlación entre la edad de aparición de los primeros CIs y la edad en la que desaparece la detección de la acumulación de la proteína reportera en secciones de St de ratones UbGFP:HD94 con expresión aguda de htt* mediante fluorescencia de GFP, promovió la realización de un análisis individualizado del estado de agregación de la htt* en las células que acumulaban el reportero. Para ello se realizaron IF dobles con anticuerpos que reconocen la proteína GFP y la htt* en secciones de St de ratones UbGFP:HD94 con 1 a 12 semanas de expresión de htt*. Este análisis reveló la ausencia de CIs en aquellas neuronas en las que se acumulaba la proteína reportera, las cuales presentaban una distribución citoplásmica difusa de la htt* (Fig IV.23).

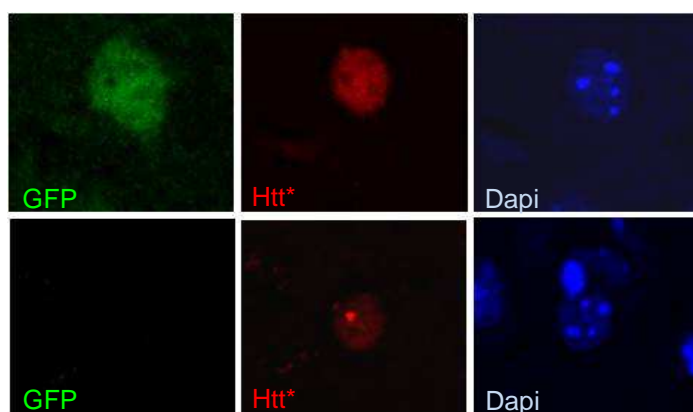


Figura IV.23: Correlación entre el estado de agregación de la htt* y la acumulación de Ub-GFP. Imágenes de neuronas estriales que acumulan el reportero Ub-GFP detectadas mediante fluorescencia de GFP (verde), teñidas mediante IF con anticuerpos que reconocen el extremo N-terminal de la htt (rojo), y el núcleo (azul).

Por el contrario, aquellas neuronas que contenían CIs, no presentaban acumulación de la proteína reportera (Fig IV.23). Estos datos sugieren que el estado de agregación en el que se encuentra la htt* es determinante para que se produzca acumulación del reportero.

5.3. Análisis del efecto de la formación de cuerpos de inclusión en modelos celulares de la enfermedad de Huntington con expresión de la proteína reportera de la actividad del sistema Ubiquitina-Proteasoma.

Con el fin de corroborar los resultados obtenidos en los modelos animales de EH con expresión aguda de htt*, así como comprobar la posible relación existente entre la desaparición de la acumulación del reportero Ub-GFP y la formaón de los CIs de forma más precisa, se analizaron cultivos primarios cotransfectados con una poliQ patogénica y el

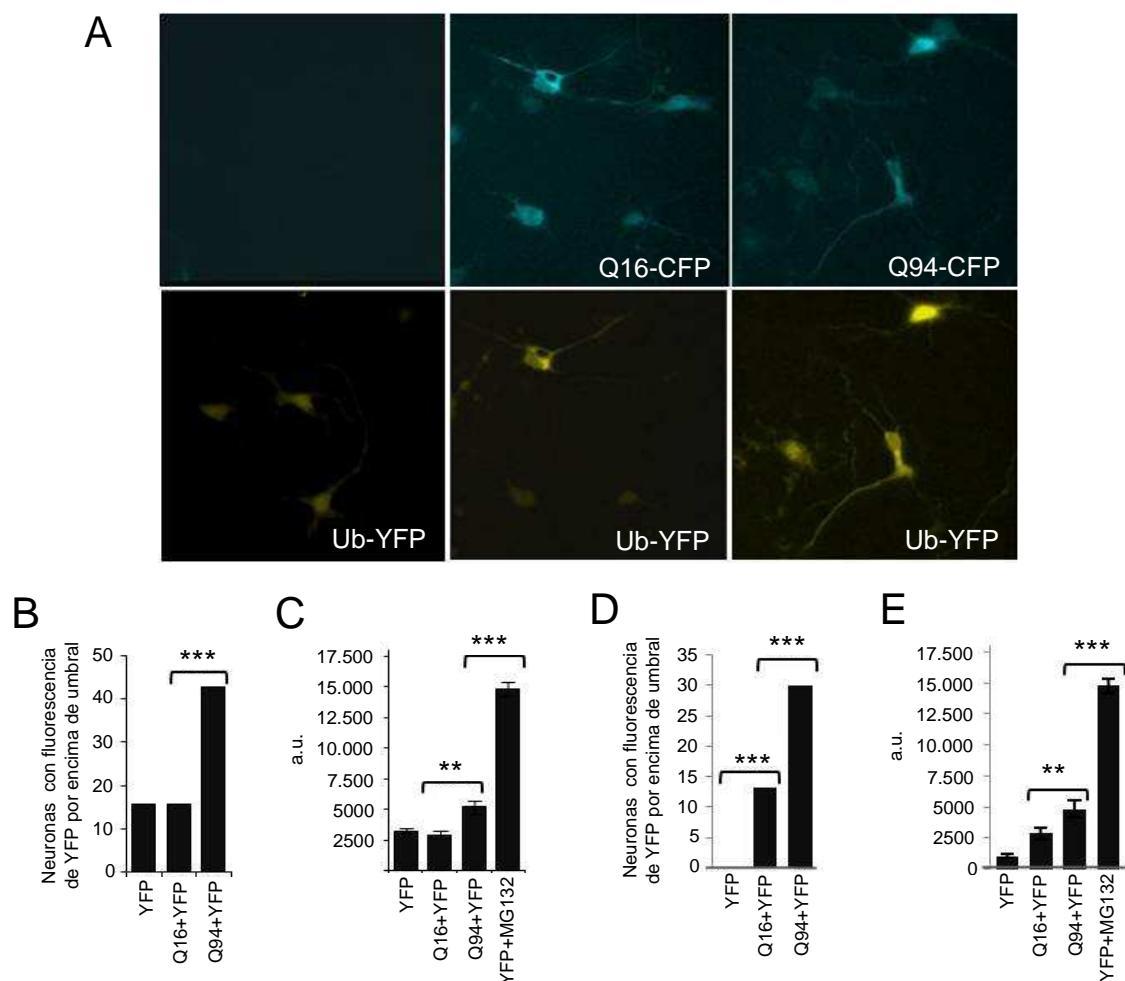


Figura IV.24: Efecto de la transfección de polyQs patogénicas sobre la acumulación del reportero Ub-YFP. A: Neuronas corticales cotransfectadas con Q16-CFP o Q94-CFP (cian) y el reportero Ub-YFP (amarillo). B-E: Cuantificación en cultivos primarios de neuronas estriatales (B-C) o corticales (D-E) del número de neuronas cuya intensidad de YFP está por encima de un valor umbral (B, D), o de la intensidad media de fluorescencia debida a Ub-YFP de las neuronas cotransfectadas con las distintas poliQs (C, E). **p<0,005, ***p<0,0001

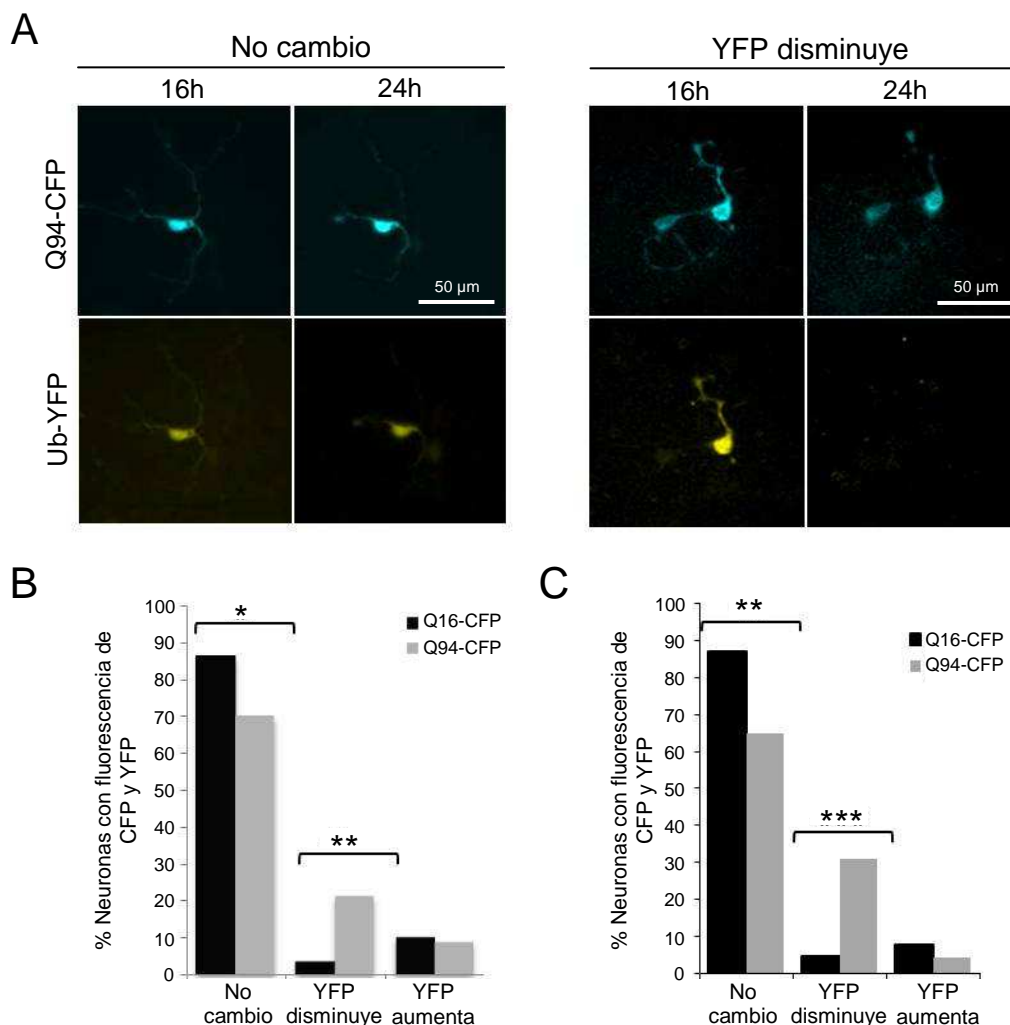


Figura IV.25: Poblaciones neuronales presentes en los cultivos primarios cotransfectados con poliQs y el reportero Ub-YFP en función de la evolución de la intensidad de YFP. A: Imágenes de fluorescencia de CFP y YFP en neuronas corticales transfectadas con poliQs patogénicas (Q94-CFP) y proteína reportera (Ub-YFP) a 16 y 24h post-transfección de las poblaciones en las que no cambia o disminuye la fluorescencia de YFP. B: Cuantificación del porcentaje de neuronas estriatales transfectadas con Q16-CFP o Q94-CFP en las que la fluorescencia de YFP no cambia, disminuye o aumenta. C: Cuantificación del porcentaje de neuronas corticales transfectadas con Q16-CFP o Q94-CFP en las que la fluorescencia de YFP no cambia, disminuye o aumenta. * $p < 0,001$, ** $p < 0,0001$, *** $p < 10^{-7}$

reportero de la actividad del UPS. Las células utilizadas fueron cultivos primarios de neuronas estriatales y corticales de ratones wt, y las construcciones cotransfectadas consistieron en: el exón 1 de la htt humana con 94 repeticiones de CAG y la proteína cian fluorescente (CFP) fusionada a su extremo C-terminal (Q94-CFP), el exón 1 de la htt con 16 repeticiones de CAG y la proteína CFP fusionada a su extremo carboxi-terminal como control no patológico (Q16-CFP) (Fig III.3), y la misma construcción que expresa el ratón UbGFP usado en los experimentos *in vivo*, a la que se le sustituyó la proteína GFP por la proteína amarilla fluorescente (Ub-YFP) (Fig III.3) como proteína reportera. Como se muestra en la figura IV.24, 16 horas después de la transfección, aquellos cultivos

trasfectados con la poliQ patogénica (Q94-CFP), pero no los transfectados con Q16-CFP, mostraron acumulación de la proteína reportera. Este resultado se obtenía tanto si se analizaba el porcentaje de neuronas cuya intensidad de fluorescencia de Ub-YFP se encontraba por encima de un valor umbral (Fig IV.24B-D), como si se cuantificaba la intensidad media de fluorescencia de Ub-YFP de dichas neuronas (Fig IV.24C-E)

La monitorización de los cultivos primarios cotransfectados entre las 16 h y 24 h post-transfección (realizada cada 2 h) puso de manifiesto diferentes comportamientos de las neuronas a lo largo del tiempo. En un 85% de las neuronas estriatales (Fig IV.25B) o un 87% de las neuronas corticales (Fig IV.25C) transfectadas con Q16-CFP, y un 70% de las neuronas estriatales (Fig IV.25B) o un 65% de las neuronas corticales (Fig IV.25C) transfectadas con Q94-CFP, no se detectó ningún cambio en la cantidad de Ub-YFP durante las 8 h de duración del experimento, manteniéndose constante la intensidad de fluorescencia de YFP con el tiempo (Fig IV.25A). Sin embargo, y de acuerdo con los resultados obtenidos *in vivo* en los ratones UbGFP:HD94 con expresión aguda de htt*, en un 25% de las neuronas estriatales (Fig IV.25B) o un 31% de las neuronas corticales (Fig IV.25C) transfectadas con Q94-CFP se produjo una disminución progresiva de la fluorescencia de YFP con el tiempo (en el 69% de los casos llegando a desaparecer por completo)(Fig IV.25A). Este comportamiento sólo se observó un 5% de las neuronas estriatales (Fig IV.25B) o un 4,5% de las neuronas corticales (Fig IV.25C) transfectadas con Q16-CFP. Además, al igual que sucedía en el modelo celular de EH con expresión del reportero CL1-GFP, en el que la recuperación de la función del UPS correlacionaba con la formación de CIs (Mitra et al., 2009), se observó que en un 36% de las neuronas corticales (Fig IV.26A-B) y en un 30% de las neuronas estriatales (Fig IV.26) en las que la intensidad de YFP disminuía con el tiempo se formaban CIs durante las 8 h de observación. Este descenso de la fluorescencia de YFP no se debía al secuestro de la construcción reportera en los CIs ya que no se detectó colocalización de ambas en los CIs.

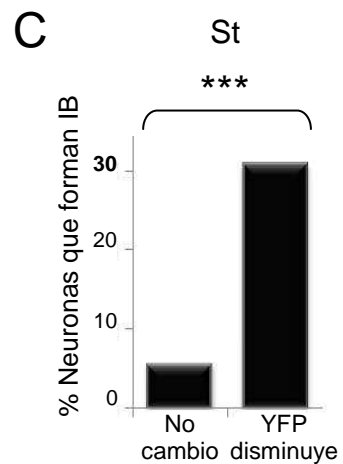
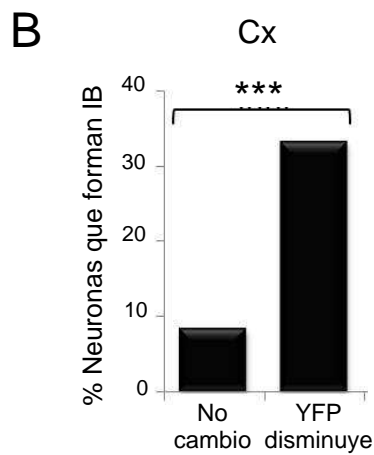
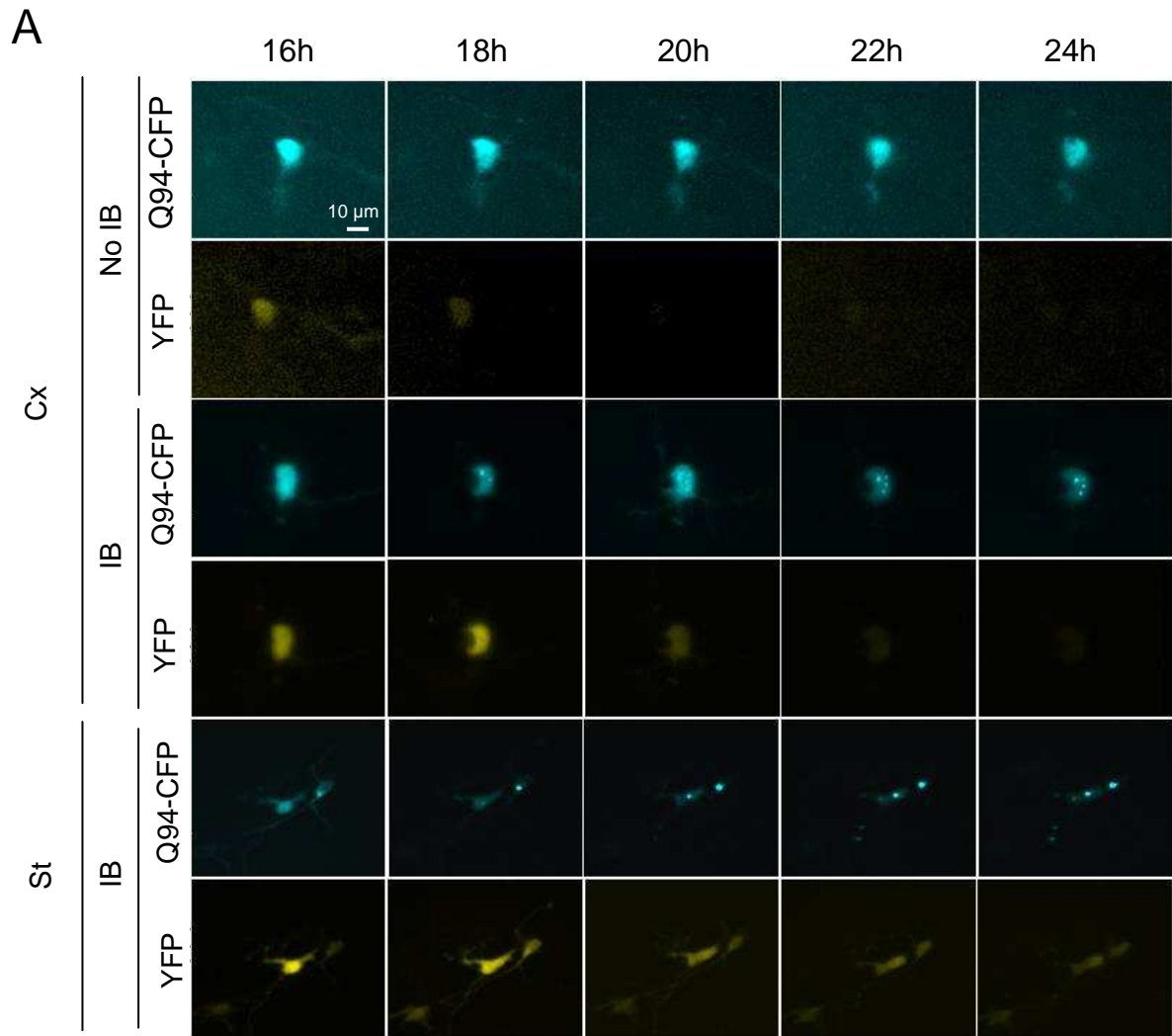


Figura IV.26: Evolución de la aparición de CIs en cultivos primarios cotransfectados con Q94-CFP y el reportero Ub-YFP. A: Imágenes de neuronas corticales y estriatales que expresan el reportero Ub-YFP (amarillo) y Q94-CFP (cian) en las que disminuye la intensidad de la fluorescencia de YFP con el tiempo, tomadas cada 2 h desde 16 h a 24 h post-transfección. B-C: Cuantificación del porcentaje de neuronas tanto corticales (B) como estriatales (C) que forman CIs a lo largo del experimento, dentro de los grupos de neuronas en las que no varía o disminuye la fluorescencia de Ub-YFP. *** $p < 0,0001$.

6. COMPUESTOS QUE PREVIENEN LA AGREGACIÓN DE LA HUNTINGTINA MUTADA Y LA FORMACIÓN DE CUERPOS DE INCLUSIÓN FAVORECEN LA ACUMULACIÓN DE Ub-GFP.

6.1. Tratamiento con compuestos antiagregantes en un modelo celular de la enfermedad de Huntington con expresión del reportero Ub-YFP.

Para comprobar si en verdad la formación de los CIs juega un papel importante en la recuperación de la función del UPS, se analizó el efecto que producía el tratamiento de cultivos primarios corticales cotransfectados con Q94-CFP y Ub-YFP con dos compuestos pertenecientes a la familia de los benzotiazoles: el 2-amino-4,7-dimetilbenzotiazol (PGL-135) y el 2-amino-6-trifluorometoxibenzotiazol (riluzol) que fueron identificados en un screening de moléculas capaces de inhibir la agregación de poliQs (Heiser et al., 2002; Hockly et al., 2006). El tratamiento consistió en añadir dichos compuestos al medio de cultivo (o un volumen equivalente de su vehículo, DMSO al 3%), a las concentraciones de 400 μ M (PGL-135) y 40 μ M (riluzol), 1 h después de terminar la transfección. Los compuestos permanecieron presentes en el medio durante todo el experimento. La cuantificación de la cantidad de neuronas tratadas con los compuestos antiagregantes que contenían CIs, realizada 16 h después de la transfección, confirmó que ambos compuestos disminuían drásticamente el porcentaje de neuronas con CIs en un 10 % el riluzol (Fig. IV.27B-D) y un 20 % el PGL-135 (Fig. IV.27C-D).

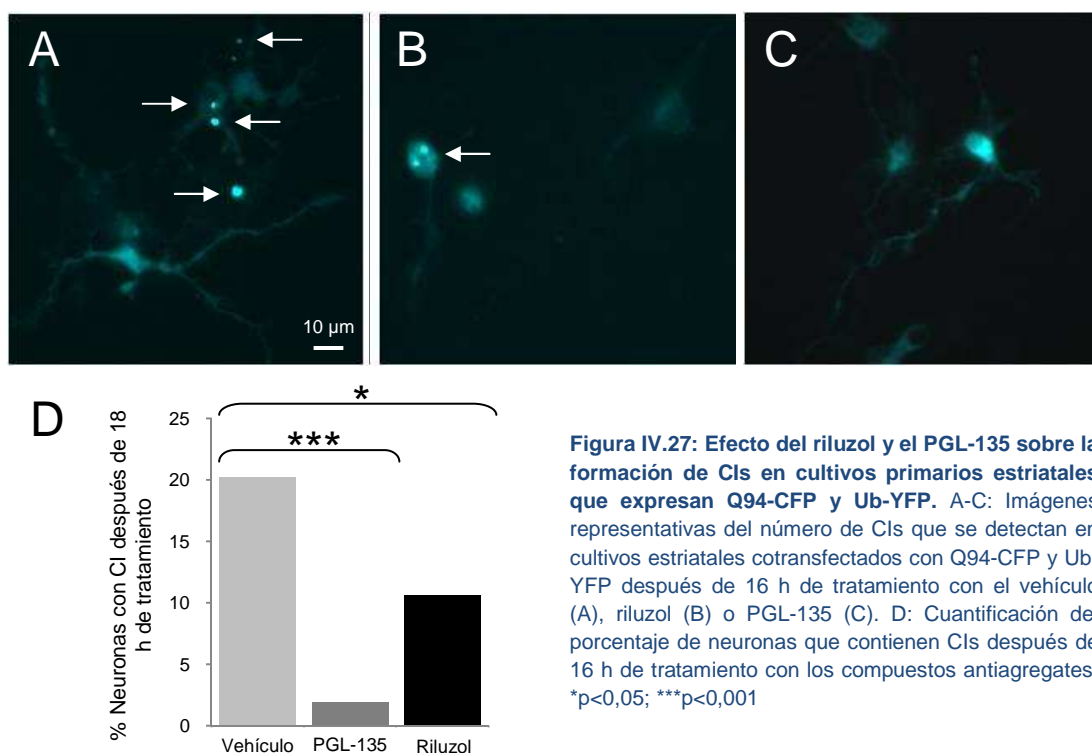


Figura IV.27: Efecto del riluzol y el PGL-135 sobre la formación de CIs en cultivos primarios estriatales que expresan Q94-CFP y Ub-YFP. A-C: Imágenes representativas del número de CIs que se detectan en cultivos estriatales cotransfectados con Q94-CFP y Ub-YFP después de 16 h de tratamiento con el vehículo (A), riluzol (B) o PGL-135 (C). D: Cuantificación del porcentaje de neuronas que contienen CIs después de 16 h de tratamiento con los compuestos antiagregantes. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$

Comprobada la eficacia de los compuestos antiagregantes en cultivos primarios cotransfectados con una poliQ patogénica, se volvió a monitorizar la evolución de la fluorescencia de YFP en estos cultivos primarios de 16h a 24 h después de la transfección, esta vez en presencia de los compuestos antiagregantes. Los resultados mostraron que el porcentaje de neuronas en las que la intensidad de YFP disminuía con el tiempo había disminuído drásticamente en los cultivos tratados con PGL-135 o riluzol, siendo de un 2% y un 4% respectivamente, con respecto a los cultivos tratados con vehículo en los que representaban un 18% (Fig IV.28B). Esta disminución en el número de neuronas en las que disminuía la cantidad de YFP con el tiempo, se veía acompañado de una subida en el número de neuronas en las que aumentaba la cantidad de YFP con el tiempo al tratar los cultivos con PGL-135 o riluzol, pasando a ser un 23% y un 10% respectivamente frente a un 5% de las neuronas tratadas con vehículo (Fig IV.28A-B). Estos resultados ponen de manifiesto la capacidad de los compuestos antiagregantes de impedir la recuperación de la actividad del UPS que tenía lugar en un pequeño porcentaje de neuronas con expresión de poliQ patogénica.

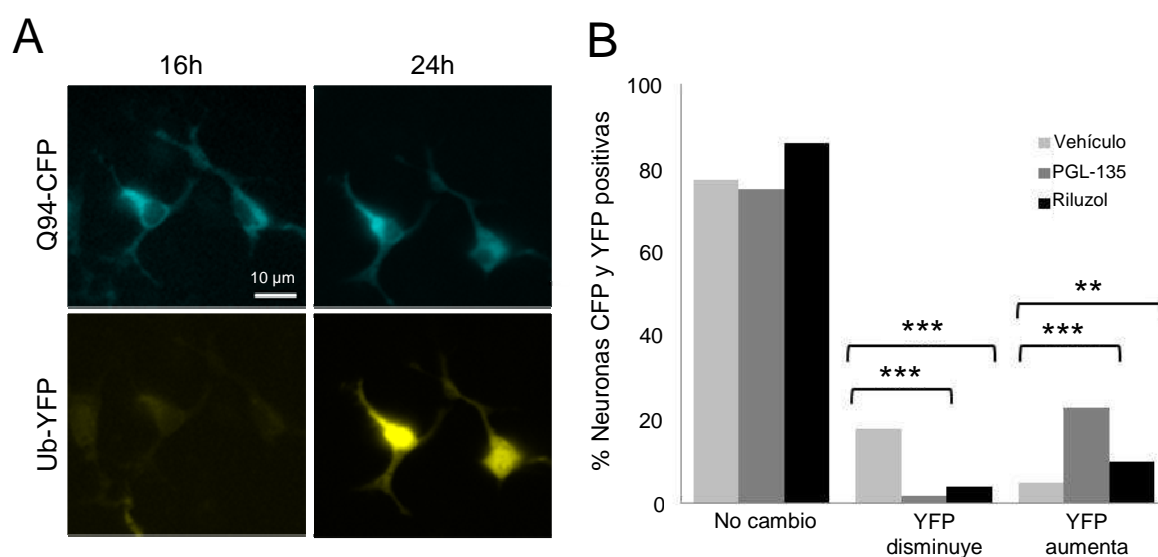


Figura IV.28: Efecto de los compuestos antiagregantes sobre la acumulación de Ub-YFP en cultivos primarios cotransfectados con poliQ patogénicas y el reportero Ub-YFP. A: Imágenes tomadas después de 16 h y 24 h de tratamiento con riluzol (40 μ m) de la fluorescencia de CFP y YFP de neuronas estriatales transfectadas con Q94-CFP y el reportero Ub-YFP. B: Cuantificación del porcentaje de neuronas tratadas con DMSO, PGL-135 y riluzol en las que la fluorescencia de YFP no varía, disminuye o aumenta de las 16 h a las 24 h post-transfección. ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0001$

6.2. El tratamiento con riluzol previene la formación de cuerpos de inclusión y exacerba la acumulación de Ub-GFP.

Existen trabajos que demuestran que el PGL-135 administrado oralmente en ratones se metaboliza muy rápidamente (no se detecta a tiempos posteriores a 40 min después de la administración) (Heiser et al., 2002; Hockly et al., 2006). Sin embargo, la administración oral del riluzol sí que permite su detección en cerebro, en concentraciones similares a las administradas oralmente, facilitando su actuación sobre los CIs presentes en el cerebro de ratones modelo de la EH (Hockly et al., 2006). En vista de estos datos, los experimentos *in vivo* con compuestos antiagregantes se realizaron únicamente con riluzol.

Con el fin de comprobar si los resultados obtenidos en cultivos primarios corticales cotransfectados con Q94-CFP y Ub-YFP tratados con compuestos antiagregantes eran extrapolables a modelos animales de la EH, se trataron con riluzol dos ratones modelo de la EH distintos, HD94 y R6/1, ambos con expresión del reportero de la actividad del UPS Ub-GFP. En primer lugar se analizaron ratones UbGFP:HD94 después de 3 semanas de expresión aguda de htt*, por ser la edad a la que comienzan a aparecer los primeros CIs (Fig IV.22). El tratamiento se administró en el agua de bebida por lo que, para que el riluzol fuese soluble se acompañó con (2-Hidroxipropil)- β -ciclodextrina a una concentración del 5% p/v. El tratamiento consistió en la administración de riluzol a una concentración de 2 g/l durante el primer día y de 1,2 g/l durante los 2 días siguientes (Fig III.6). La cuantificación del número de CIs presentes en el St de estos ratones después del tratamiento reveló un descenso significativo en aquellos ratones tratados con riluzol con respecto a los ratones tratados con vehículo (Fig IV.29). Estos datos confirmaron la eficacia del riluzol *in vivo* en la inhibición de la formación de CIs.

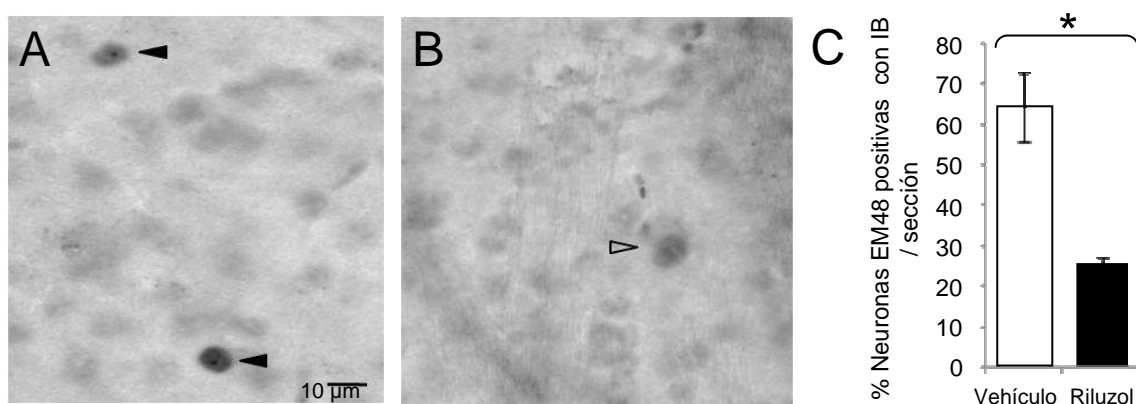


Figura IV.29: Efecto del riluzol sobre la formación de CIs en el St de ratones UbGFP:HD94. A-B: Imágenes de campo claro del St de ratones UbGFP:HD94 tratados con vehículo (A) o riluzol (B), teñidas mediante IHQ con un anticuerpo que reconoce el extremo N-terminal de la htt. Los triángulos negros marcan neuronas con CIs, los triángulos vacíos marcan neuronas con marcaje difuso de htt*. C: Cuantificación del número de neuronas por sección de St detectadas con el anticuerpo que reconoce el extremo N-terminal de la htt* en ratones UbGFP:HD94 tratados con vehículo o riluzol. *p<0,05.

Posteriormente se analizaron los niveles del reportero Ub-GFP mediante fluorescencia de GFP (Fig IV.30A) o IHQ con un anticuerpo que reconoce la proteína GFP (Fig IV.30B), en secciones de cerebro de ratones UbGFP:HD94 tratados con vehículo o riluzol. Ninguna de las técnicas mostró diferencias en la acumulación del mismo en el St entre ambos tratamientos, sin embargo, sí se detectó un grupo de neuronas corticales en las que se producía acumulación del reportero, y que estaban presentes sólo en los ratones UbGFP:HD94 tratados con riluzol (Fig IV.30A-B). Esta diferencia entre el St y la Cx de los ratones UbGFP:HD94 tratados con riluzol o vehículo puede atribuirse a la diferencia en el número de CIs presentes en ambas estructuras. Mientras en el St la presencia de CIs es muy baja después de 3 semanas de expresión de *htt**, en la Cx es mucho más abundante su presencia.

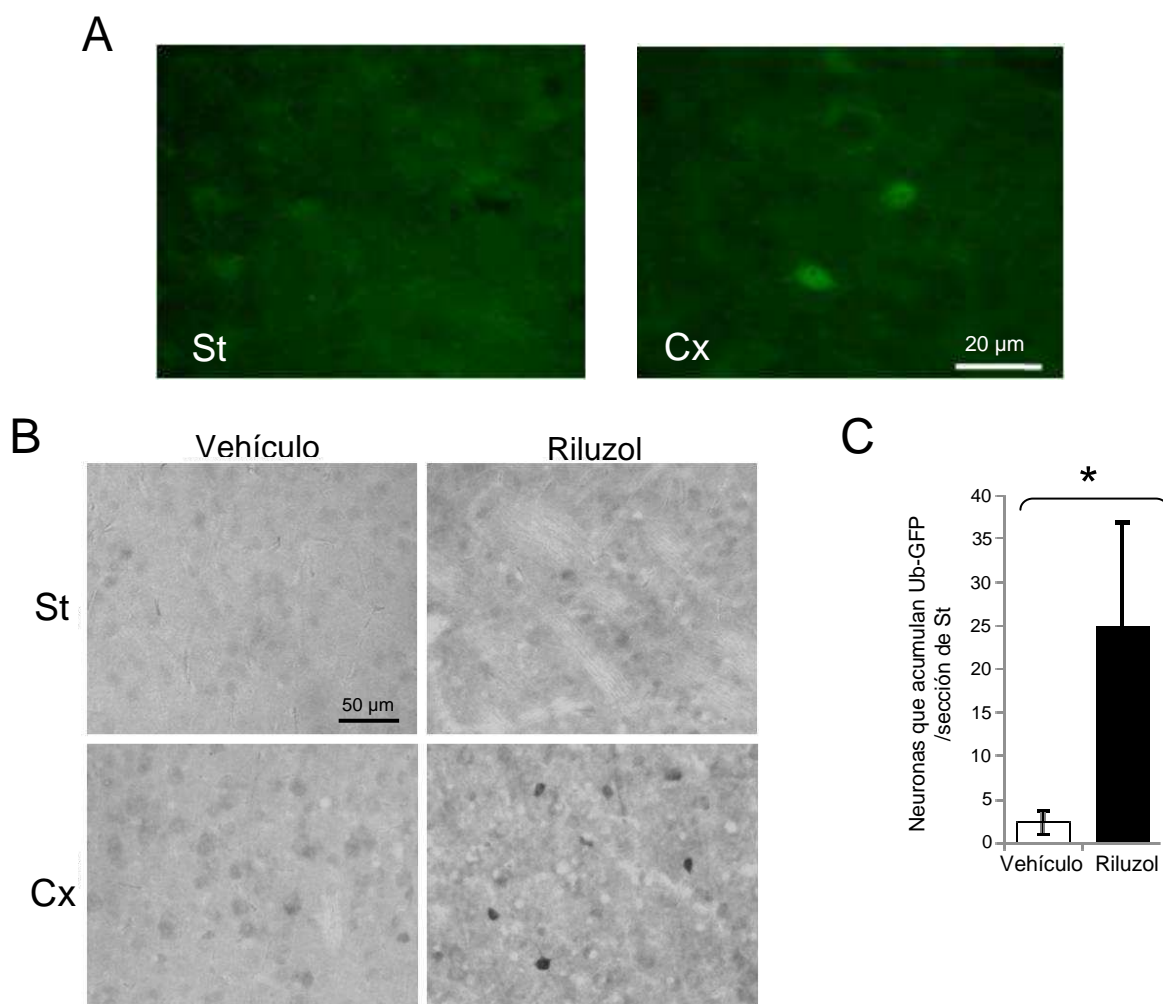


Figura IV.30. Efecto del riluzol sobre la acumulación de Ub-GFP en ratones UbGFP:HD94. A: Imágenes de fluorescencia de GFP del St y la Cx de ratones UbGFP:HD94 con expresión aguda de *htt** tratados con riluzol. B: Imágenes de campo claro del St y la Cx de ratones UbGFP:HD94 tratados con riluzol o vehículo durante 3 días, teñidas mediante IHQ con anticuerpos que reconocen GFP. C: Cuantificación del número de neuronas que acumulan Ub-GFP en la Cx de ratones UbGFP:HD94 tratados con riluzol o vehículo durante 3 días, detectadas mediante IHQ.

Al igual que sucedía en el St de los ratones UbGFP:HD94 con expresión aguda de *htt*^{*}, el número de neuronas corticales en las que se producía la acumulación de la proteína reportera era tan limitada que este aumento en la cantidad de reportero no se detectaba mediante Wb. La cuantificación de las bandas de 35 y 25 kDa obtenidas mediante Wb de extractos de Cx de estos ratones tratados con vehículo o riluzol no mostró diferencias significativas en ninguna de ellas (Fig IV.31 A-B).

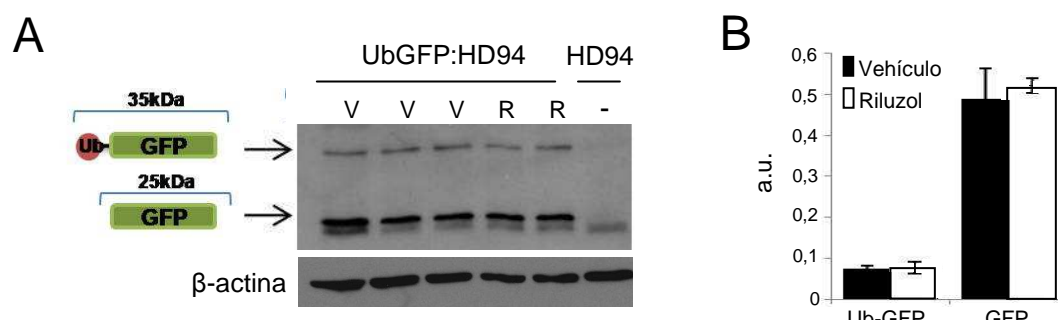


Fig IV.31: Efecto del riluzol en la acumulación de Ub-GFP en ratones UbGFP:HD94 detectado mediante Wb. A: Detección mediante wb de las bandas de 35 kDa y 25 kDa correspondiente a la forma completa del reportero (Ub-GF) y la forma truncada (GFP) en la Cx de ratones UbGFP:HD94 y HD94 tratados con riluzol (R) o vehículo (V). B: Cuantificación de las bandas correspondientes al reportero Ub-GFP y la forma truncada GFP detectadas por wb en la Cx de ratones UbGFP:HD94 tratados con riluzol o vehículo. * $p < 0,05$

Además de en ratones UbGFP:HD94 con expresión aguda de *htt*^{*}, también se analizó el efecto sobre la acumulación del reportero del tratamiento con riluzol en ratones UbGFP:R6/1. El protocolo de administración fue el mismo que el utilizado en los ratones UbGFP:HD94 con expresión aguda de *htt*^{*} pero a distinta edad. En los ratones R6/1, la aparición de CIs y su maduración es mucho más rápida que en los ratones HD94, por lo que en primer lugar era necesario establecer la edad adecuada de los ratones para el

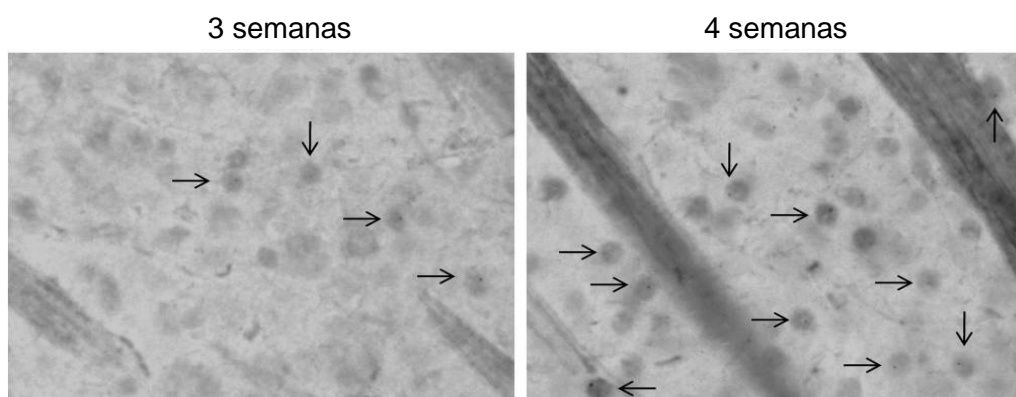


Figura IV.32: Incremento del número de CIs entre las 3 a 4 semanas de edad en el St de ratones UbGFP:R6/1. Imágenes de campo claro del St de ratones UbGFP:R6/1 de 3 y 4 semanas de edad, teñidas mediante IHQ con un anticuerpo que reconoce el extremo N-terminal de la *htt* (N18). Las flechas marcan los CIs presentes en las neuronas.

tratamiento. Se observó que a las 3 semanas de edad ya se detectan neuronas estriatales con CIs y que su número aumentaba drásticamente en la semana siguiente con lo que consideramos que era una edad adecuada para detectar efecto del riluzol sobre la formación de los mismos (Fig IV.32).

Al igual que en los ratones UbGFP:HD94 con expresión aguda de htt*, la administración del riluzol en los ratones UbGFP:R6/1 produjo un descenso en el número de CIs presentes en el St de los mismos de más de un 50 %, pasando de 500 CIs por mm² en el St de ratones tratados con vehículo a tan sólo 200 CIs por mm² en el St de ratones UbGFP:R6/1 tratados con riluzol (Fig IV.33).

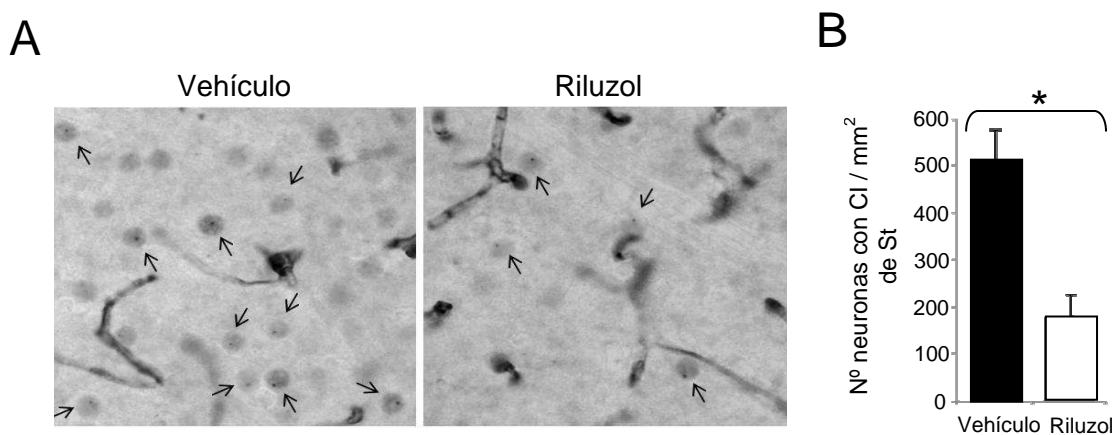
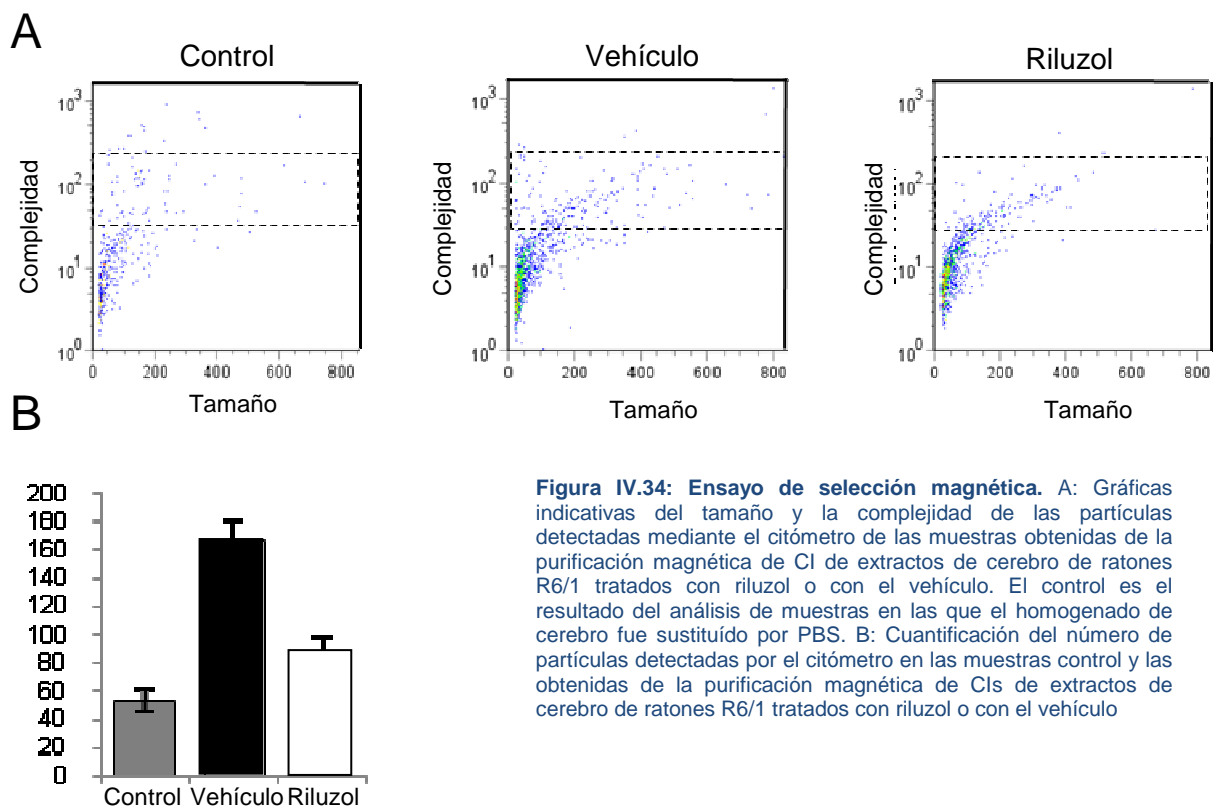


Figura IV.33: Efecto del riluzol sobre los CIs en ratones R6/1. A: Imágenes de campo claro de St de ratones R6/1 de 3 semanas tratados con vehículo o con riluzol, teñidas mediante HQ con un anticuerpo que reconoce el extremo N-terminal de la htt. Las flechas indican los CIs presentes en las neuronas. B: Cuantificación del número de neuronas con CIs intranucleares por mm² de St en ratones R6/1 de 3 semanas tratados con vehículo o con riluzol. *p<0,05

La reducción del número de CIs como consecuencia del tratamiento con riluzol de los ratones UbGFP:R6/1 se confirmó mediante dos técnicas adicionales. En primer lugar se llevó a cabo la cuantificación del número de CIs en fracciones enriquecidas en el contenido en CIs mediante selección magnética según un método previamente descrito (Diaz-Hernandez et al., 2006) obtenidas del cerebro de ratones UbGFP:R6/1 tratados con vehículo o con riluzol (Fig IV.34). Por esta técnica también se observó una clara disminución del número de CIs presentes en las fracciones de cerebro obtenidas de ratones tratados con riluzol.



Por otro lado, la reducción del número de CIs inducida por el riluzol se confirmó por ensayos de adsorción de agregados en membrana (filter trap). Esta técnica, en la que la detección de los CIs procedentes de extractos de cerebro de ratones UbGFP:R6/1 tratados con vehículo o riluzol se realizó mediante detección con un anticuerpo que reconoce el extremo N-terminal de la htt, también se detectó una clara disminución en la intensidad del marcaje de los puntos correspondientes a las muestras de CIs procedentes de los ratones tratados con riluzol con respecto a los tratados con vehículo (fig IV.35).

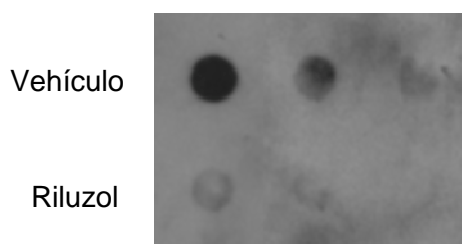


Figura IV.35: Ensayo de Filter trap. Muestras procedentes de 3 ratones R6/1 distintos tratados con riluzol y 3 ratones R6/1 distintos tratados con vehículo.

Confirmada la eficiencia del riluzol en el bloqueo de la formación de CIs en los ratones UbGFP:R6/1, se analizaron los niveles de reportero presentes en las neuronas corticales y estriatales de estos ratones UbGFP:R6/1 de 3 semanas de edad tratados con riluzol o con su vehículo, mediante detección de la fluorescencia de GFP en secciones de cerebro de los mismos. En ambas estructuras se detectaron neuronas que acumulaban Ub-GFP en los ratones tratados con riluzol pero no en los tratados con vehículo. Además se observó, mediante IF con un anticuerpo que reconoce el extremo N-terminal de la htt, que al igual que pasaba en las neuronas que acumulaban Ub-GFP en ratones UbGFP:HD94 con expresión aguda de htt* (Fig IV.23), aquellas neuronas que acumulaban el reportero presentaban una tinción nuclear difusa de htt*, y las neuronas que presentaban CIs no acumulaban Ub-GFP (Fig IV.36).

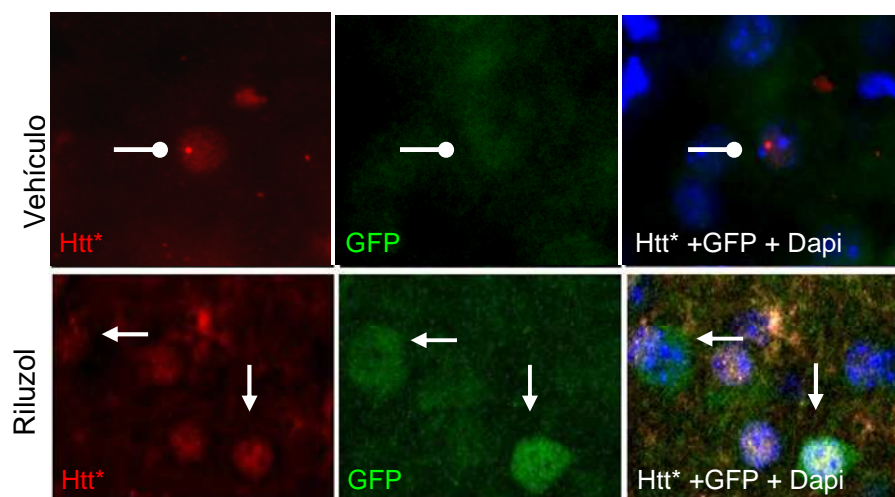


Figura IV.36. Relación entre la acumulación de Ub-GFP y el estado de agregación de la htt*. Detalles de neuronas estriatales que acumulan Ub-GFP en ratones UbGFP:R6/1 tratados con vehículo o con Riluzol, detectadas mediante IF con anticuerpos que reconocen la htt*. Las flechas marcan tinción difusa nuclear de htt*, los círculos marcan CIs

La cuantificación de estas neuronas que acumulaban Ub-GFP mediante IHQ con un anticuerpo que reconoce la proteína GFP, confirmó un aumento significativo las mismas tanto en St (Fig IV.37B) como en Cx (Fig IV.37C).

Al ser el número de neuronas que acumulaban la proteína reportera mucho más elevado que en casos anteriores (ratones UbGFP:HD94 con expresión aguda de htt* con y sin tratamiento antiagregante), esta acumulación también se detectó mediante wb tanto en Cx como en St a través de un aumento de la intensidad de la banda de 35 kDa correspondiente a la construcción reportera completa, mientras que la banda de 25 kDa perteneciente a la GFP no sufrió ninguna variación (Fig IV.38).

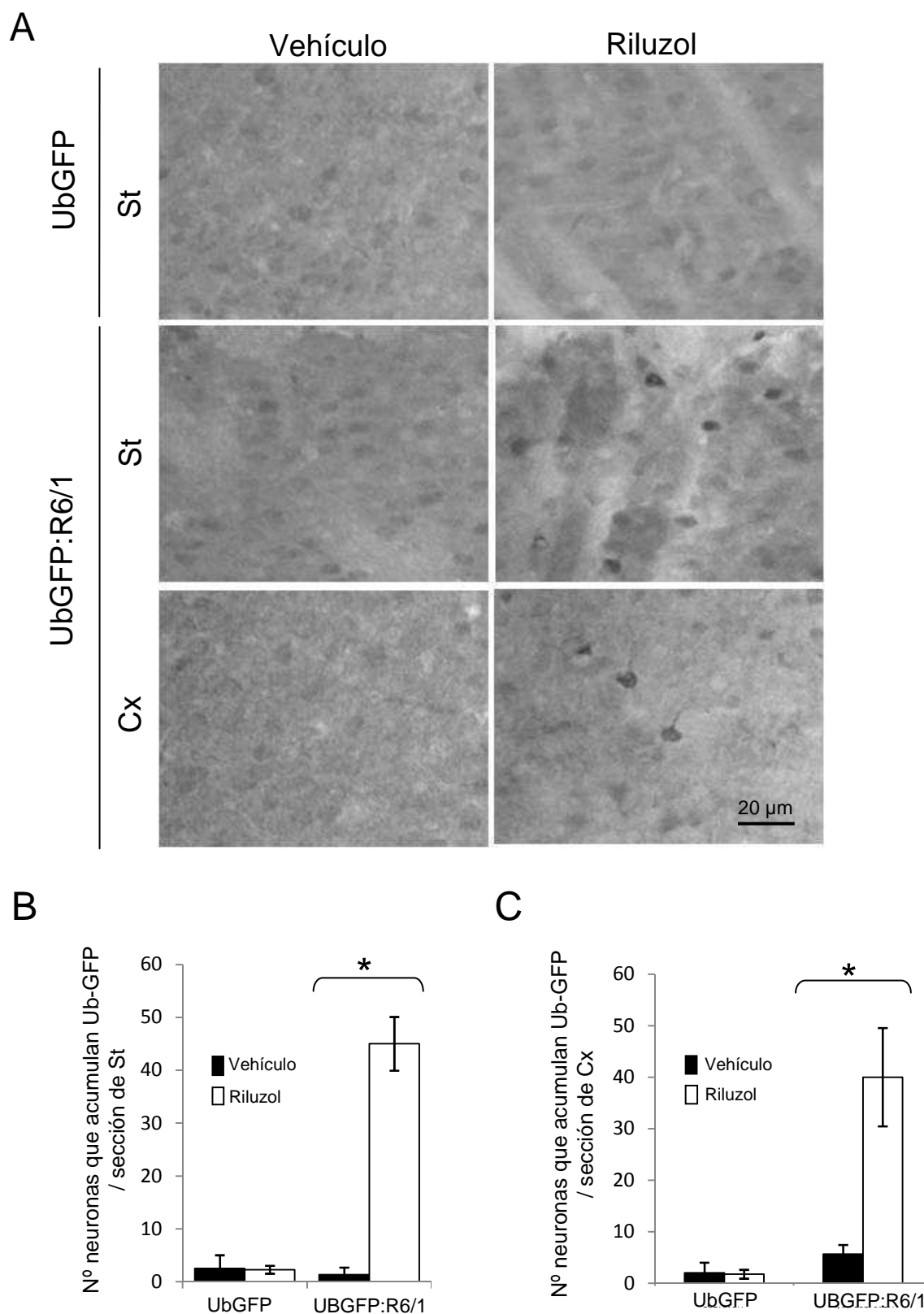


Figura IV.37: Acumulación de Ub-GFP en Cx y St de ratones UbGFP:R6/1 tratados con riluzol. A: Imágenes de campo claro de de Cx o St de ratones UbGFP:R6/1 de 3 semanas de edad tratados con vehículo o riluzol durante 3 días, teñidas mediante IHQ con un anticuerpo que reconoce GFP. B: Cuantificación del número de neuronas que acumulan Ub-GFP en el St (B) y la Cx (C) de ratones UBGFPR6/1 tratados con vehículo o riluzol. * $p < 0,05$

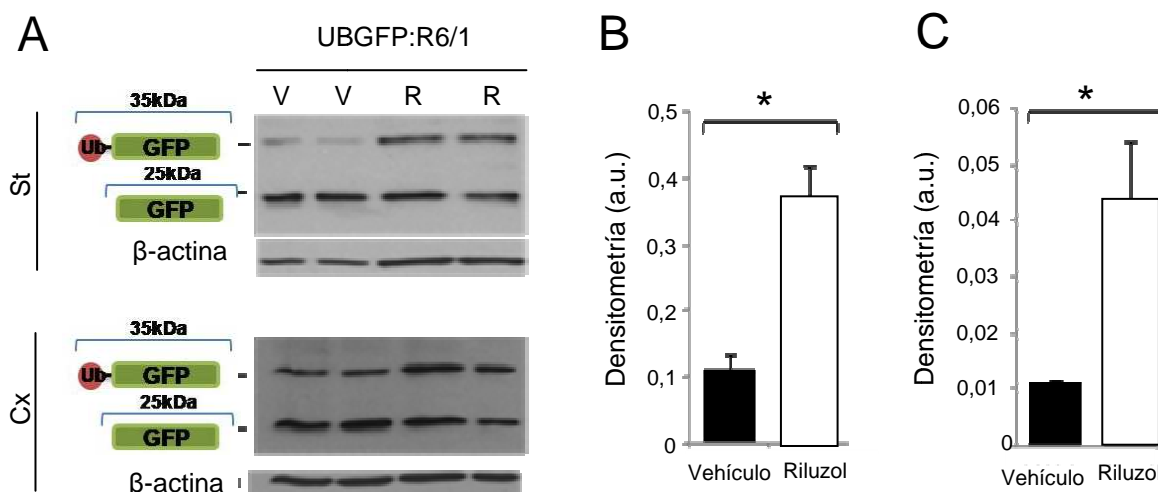


Figura IV.38: Detección de la acumulación de Ub-GFP mediante Wb en Cx y St de ratones UbGFP:R6/1 tratados con riluzol. A: Detección mediante wb de las bandas de 35 kDa y 25 kDa correspondientes a las formas completa y truncada del reportero en St y Cx de ratones UbGFP:R6/1 de 3 semanas de edad tratados con vehículo (V) o riluzol (R). B: Cuantificación de la banda de 35 kDa en St (B) y Cx (C) de ratones UbGFP:R6/1 de 3 semanas tratados con riluzol o con vehículo, mostrado en unidades arbitraria (a.u.). * $p < 0,05$

Sin embargo, el análisis de las actividades tipo quimiotripsina y post-glutamil del proteasoma, aunque sí mostraban una tendencia a estar disminuidas en el St de los ratones UbGFP:R6/1 tratados con riluzol con respecto a los tratados con vehículo, no llegaron a mostrar diferencias significativas (Fig IV.39) entre ambos.

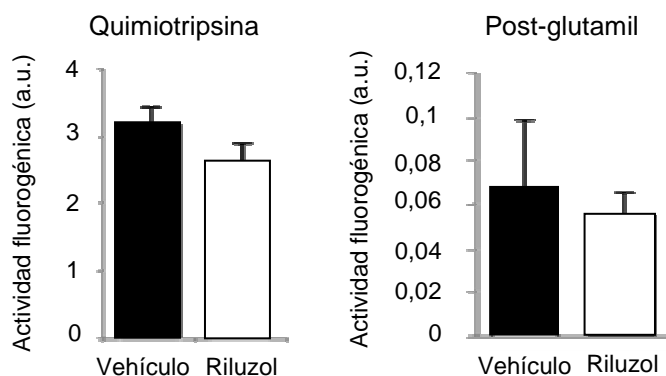


Figura IV.39. Actividades tipo quimiotripsina y post-glutamil del proteasoma en ratones UbGFP:R6/1 de 3 semanas tratados con riluzol o con su vehículo. Expresado en unidades arbitrarias (a.u.).

Por último se comprobó que el tratamiento con riluzol no produjese ningún efecto sobre la htt* o la proteína reportera tanto a nivel transcripcional como de proteína. Para ello se analizaron los niveles de ARNm de ambas construcciones en extractos de St de ratones

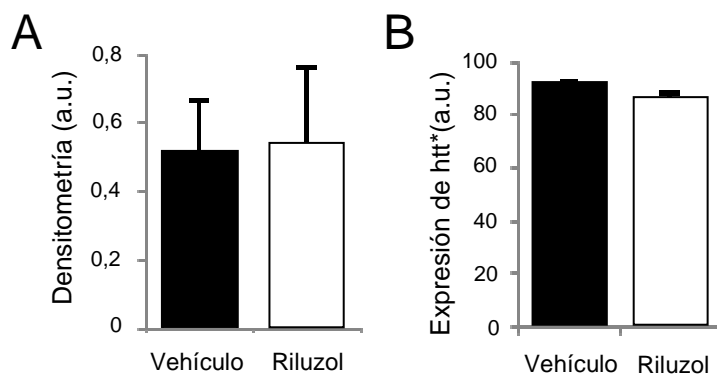


Figura IV.40: Cuantificación de los niveles de Ub-GFP en ratones UbGFP tratados con riluzol o con su vehículo. A: Histograma que muestra (en unidades arbitrarias a.u.) los niveles de ARNm de la htt* detectados mediante RT-qPCR, en el St de ratones R6/1 de 3 semanas de edad tratados con riluzol o con su vehículo. B: Histograma que muestra (en unidades arbitrarias a.u.) los niveles de ARNm del reportero Ub-GFP detectados mediante RT-qPCR, en el St de ratones UbGFP de 3 semanas tratados con riluzol o con su vehículo.

R6/1 o UbGFP de 3 semanas de edad después de ser tratados con riluzol o vehículo durante 3 días. En ninguno de los casos se detectaron cambios entre los ratones tratados con vehículo o con riluzol (Fig IV.40)

En el análisis, realizado mediante wb, de los niveles de proteína de htt* soluble en el St de ratones R6/1 de 3 semanas de edad tratados con riluzol o vehículo, así como de los niveles de la proteína reportera Ub-GFP en el St de ratones UbGFP de 3 semanas de edad tratados con riluzol o vehículo, no se observaron diferencias en ninguno de los casos entre

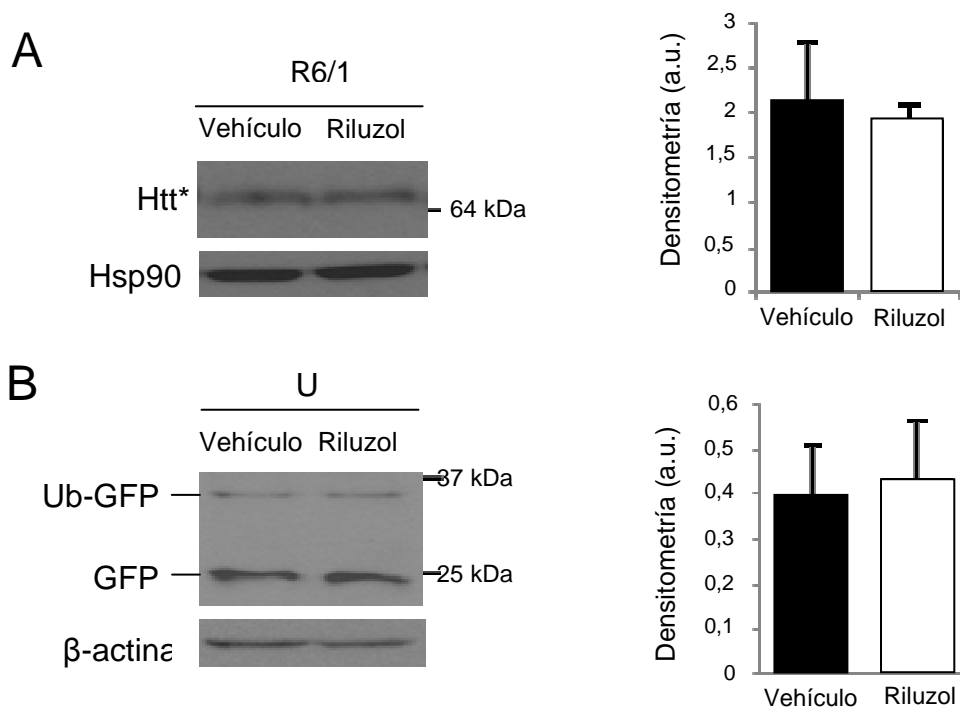


Figura IV.41: Cuantificación de los niveles de reportero y htt* en ratones R6/1 tratados con riluzol o con su vehículo. A: Banda de htt* detectada mediante wb, en el St de ratones R6/1 de 3 semanas de edad tratados con riluzol o con su vehículo, así como la cuantificación densitométrica de dicha banda corregida por Hsp90. B: Banda de la proteína reportera Ub-GFP o la GFP del reportero detectada mediante wb, en extractos de St de ratones UbGFP de 3 semanas tratados con riluzol o con su vehículo, así como la cuantificación densitométrica de la banda de Ub-GFP corregida por beta-actina.

los animales tratados con vehículo o con riluzol. Estos resultados descartan la posibilidad de que la acumulación de la proteína reportera en neuronas estriatales y corticales de ratones UbGFP:R6/1 tratados con riluzol con respecto a los tratados con vehículo se deba a un aumento transcripcional o de niveles de proteína de la proteína reportera o de la htt* (Fig IV.41).

VI. DISCUSIÓN

La EH es una enfermedad neurodegenerativa monogénica en la que tanto la mutación responsable de la misma, la expansión del triplete CAG presente en el extremo 5' del gen que codifica por la proteína htt, como el rango patogénico de dicha expansión, son bien conocidos y están ampliamente caracterizados (Gusella et al., 1983; Andrew et al., 1993; Gusella et al., 1993; The Huntington's disease collaborative research group, 1993). Sin embargo, a pesar de tener un conocimiento tan exhaustivo de la causa genética de dicha enfermedad, todavía se desconoce el mecanismo intracelular que la desencadena. La htt es una proteína muy compleja y con gran capacidad para interactuar con otras proteínas lo que hace que esté involucrada en numerosas rutas metabólicas todas ellas susceptibles de ser responsables de la patogénesis. Entre dichas rutas se encuentra el UPS que es el responsable de la degradación de gran parte de las proteínas celulares y especialmente de las proteínas mal plegadas (Glickman and Ciechanover, 2002), por ello, cualquier acumulación anormal de proteínas en la célula, como es el caso de los agregados proteicos intraneuronales (CIs) presentes en pacientes de enfermedades neurodegenerativas causadas por poliQs (entre las que se encuentra la EH) (DiFiglia et al., 1997; Gutekunst et al., 1999; Bossy-Wetzel et al., 2004), sugiere un mal funcionamiento del mismo. Además, estos agregados son reconocidos por anticuerpos que reconocen la ubiquitina y distintas subunidades del proteasoma (DiFiglia et al., 1997; Cummings et al., 1998; Bossy-Wetzel et al., 2004) lo que implica una interacción entre la htt* responsable de la patología y componentes del UPS. A esto hay que añadir la existencia de enfermedades neurodegenerativas causadas por mutaciones en distintos componentes del sistema ubiquitina proteasoma (Ichihara et al., 1995; Jiang et al., 1998; Kitada et al., 1998; Saigoh et al., 1999; Liu et al., 2002; Wilson et al., 2002; Anderson et al., 2005; Zenker et al., 2005; Ganesh et al., 2006; Wang et al., 2006; Field et al., 2007; Lalande and Calciano, 2007; Tarpey et al., 2007; Froyen et al., 2008). Todos estos datos hacen que el UPS sea un buen candidato para encontrarse afectado en la EH y contribuir a su patogénesis.

1. ESTUDIOS *IN VIVO* CON RATONES CON EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS REPORTERAS INDICAN QUE EL SISTEMA UPS NO SE ENCUENTRA INHIBIDO EN MODELOS ANIMALES DE LA EH.

El estudio de la capacidad de las poliQs de inhibir el UPS ha aportado resultados muy contradictorios obteniéndose las principales discrepancias entre los modelos celulares y

animales utilizados (Ortega et al., 2007). Mientras la mayoría de los estudios realizados en modelos celulares de enfermedades causadas por poliQs corroboran la existencia de inhibición del UPS en éstas (Bence et al., 2001; Jana et al., 2001; Bennett et al., 2005; Duennwald and Lindquist, 2008; Maynard et al., 2009; Mitra et al., 2009), los resultados obtenidos en modelos animales de estas enfermedades refutan dicha hipótesis (Bowman et al., 2005; Diaz-Hernandez et al., 2006; Bett et al., 2009; Maynard et al., 2009; Tokui et al., 2009).

El estudio de la actividad del UPS realizado en esta tesis en los modelos animales de la EH R6/1, R6/2 y HD94 con expresión de la proteína reportera de la actividad del UPS Ub-GFP a edades sintomáticas, muestra la ausencia de acumulación de la misma, y por tanto de inhibición del UPS, en todos ellos cuando expresan de forma constitutiva la htt*. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en modelos animales de otras enfermedades causadas por expansión de poliQs como son la SCA7 (Bowman et al., 2005) y la atrofia muscular espinobulbar (Tokui et al., 2009), ambos con expresión de la misma proteína reportera de la actividad del UPS que expresan los ratones reporteros UbGFP (Lindsten et al., 2003), en los que tampoco se detectó acumulación de la proteína reportera y por tanto inhibición del UPS. También concuerdan con los resultados obtenidos en ratones R6/2 con expresión de una proteína reportera de la actividad del UPS distinta a la que expresan los ratones reportero UbGFP, consistente en el degrón CL1-GFP (Wang et al., 2008), en los que tampoco se detectó inhibición del UPS (Bett et al., 2009). Los resultados obtenidos en los ratones R6/2 tanto con el reportero CL1-GFP como con el reportero Ub-GFP indican que la presencia constitutiva de htt* no sólo no afecta a la actividad del proteasoma propiamente dicho, sino tampoco a otros componentes de la ruta ya que distintos reporteros utilizan combinaciones distintas de enzimas E2 y E3 responsables de la ubiquitinación de los sustratos que deben ser degradados por el UPS y en ninguno de los casos se obtuvo inhibición del UPS. En este sentido, ha sido descrito recientemente que la deficiencia de la E3 parkina, implicada en la patogénesis de la EP no afecta de manera notable al fenotipo de ratones huntingtonianos R6/1 (Rubio et al., 2009).

En vista de la ausencia de acumulación de la proteína reportera Ub-GFP en todos los modelos animales de enfermedades neurodegenerativas causadas por poliQ con expresión de la proteína reportera Ub-GFP analizados, cabría suponer que estos resultados no se deben realmente a ausencia de disfunción del UPS sino a que la proteína Ub-GFP no es buena reportera de la actividad del UPS y no se acumula aun en presencia de inhibición del mismo. Sin embargo, tanto en ratones transgénicos con sobreexpresión de la forma mutante de la superóxido dismutasa 1 (SOD1) responsable de la esclerosis

lateral amiotrófica familiar (Cheroni et al., 2009), como en ratones infectados por priones (Kristiansen et al., 2007), esta misma proteína reportera sí reveló disfunción del UPS al acumularse en las neuronas afectadas. Por lo tanto, la proteína Ub-GFP sí es buena reportera de la actividad del UPS y la ausencia de inhibición del UPS obtenida en los modelos animales de enfermedades neurodegenerativas causadas por poliQ real.

Los ratones R6/1 y R6/2 expresan el exón 1 de la htt humana con expansiones de poliQ muy largas (116 y 144 repeticiones de CAG respectivamente) bajo el control del promotor endógeno de la htt, esto hace que desarrollen la patología rápida y agresivamente, comenzando el déficit motor a los 40 días de edad y reduciendo su esperanza de vida a 7 meses. El análisis de estos ratones proporciona una idea del estado del UPS a edades tempranas debido a su corta esperanza de vida, y en manifestaciones de la enfermedad muy agresivas y de rápida evolución más propias de formas juveniles de la EH. Sin embargo, los ratones HD94, aunque también expresan el exón 1 de la htt humana, expresan una expansión de poliQ mucho más corta (94 repeticiones de CAG) y únicamente en cerebro anterior por estar la construcción bajo el control del promotor de la calcio calmodulina quinasa II. Esto hace que el fenotipo motor de estos ratones sea más leve y que su esperanza de vida pueda llegar a los 2 años de edad. Esta última cualidad de los ratones HD94 nos ha permitido realizar el estudio de la actividad del UPS a edades muy avanzadas, reproduciendo mejor la patología humana cuyos primeros síntomas comienzan en la edad adulta, y por lo tanto averiguar si la disminución de la actividad del proteasoma que tiene lugar en el cerebro con la edad (Keller et al., 2000b; Zhou et al., 2003) es un factor determinante en la EH. Como muestran los resultados obtenidos a la edad de 18 meses en la que se detecta un descenso de la actividad quimi tripsina del 5% y de la actividad post-glutamil del 15% con respecto a edades más tempranas (1 mes), la proteína reportera no se acumula en las neuronas de estos ratones. Por lo tanto en modelos animales de la EH, no sólo no se detecta inhibición del UPS a edades sintomáticas, sino tampoco a edades muy avanzadas en las que ya ha tenido lugar la disminución de la actividad del UPS debido a la edad.

A pesar de haberse demostrado el correcto funcionamiento de la proteína Ub-GFP como reportera de la actividad del UPS, la ausencia de acumulación de la misma en ratones HD94 a edades muy avanzadas con actividad del proteasoma disminuida puede sugerir que la sensibilidad de la proteína reportera no sea lo suficientemente alta como para detectar la inhibición del UPS que está teniendo lugar. Sin embargo, los resultados obtenidos en ratones inyectados intraestriatalmente con lactacistina demuestran que la proteína Ub-GFP es altamente sensible a la inhibición del UPS ya que, no sólo se acumula

en neuronas adyacentes al pinchazo siendo la densidad de éstas inversamente proporcional a la distancia a la que se encuentran del mismo, sino que áreas del St que sólo muestran un 40% de disminución de la actividad quimi tripsina del proteasoma presentan un aumento significativo del número de neuronas que acumulan la proteína reportera.

2. LA HUNTINGTINA MUTADA POSEE LA CAPACIDAD DE INHIBIR EL SISTEMA UBIQUITINA PROTEASOMA

La principal diferencia entre los modelos *in vitro* (celulares) e *in vivo* de la EH reside en que, mientras *in vitro* la expresión de la htt* se realiza de forma aguda con unos niveles de expresión muy altos lejos de los niveles fisiológicos, *in vivo* la exposición a la htt* es crónica y con niveles de expresión más moderados. Es posible que esta exposición crónica de las neuronas a la htt* desencadene respuestas adaptativas que permitan a la célula tolerar los efectos tóxicos de la htt* entre ellos la inhibición del UPS. De hecho, existen trabajos en los que tratamientos crónicos de cultivos celulares con dosis altas de inhibidores del proteasoma promueven la aparición de células adaptadas en las que la inhibición de la actividad del proteasoma se ve compensada a través de la activación de otras proteasas tales como la tripeptidil peptidasa II (Welchman et al., 2005; Anton and Villasevil, 2008), la puromicin-sensitive aminopeptidasa (Bjorkoy et al., 2005) que se ha visto que es capaz de degradar poliglutaminas expandidas, o enzimas deubiquitilantes (Kawaguchi et al., 2003). La formación de CIs que secuestran la proteína tóxica también se había postulado como posible mecanismo de adaptación de las células (Mitra et al., 2009) y aquí se confirma como posible mecanismo que contribuye a la recuperación del UPS. Nuestros trabajos en cultivos primarios neuronales con observación prolongada confirman la capacidad de estas neuronas de recuperación de la actividad del UPS tras una exposición inicial a htt*

Una gran ventaja del ratón HD94 frente a los otros modelos animales de la EH utilizados es la posibilidad de controlar la expresión del transgén de la htt* que éste nos ofrece. Estos ratones expresan la htt* de forma constitutiva, sin embargo, la adición de tetraciclina o análogos como la doxiciclina apagan la expresión del transgén. Gracias a este mecanismo podemos expresar la htt* de forma aguda en ratones a la edad adulta evitando así los procesos de adaptación a la htt* que sufren los animales UbGFP:HD94

con expresión crónica de htt*, reproduciendo parcialmente *in vivo* las condiciones de expresión de la htt* que tienen lugar en los modelos celulares de la EH. Con este abordaje experimental se observó que, efectivamente, la eliminación del proceso de adaptación a la htt* produce *in vivo*, al igual que sucede en los modelos celulares de la EH (Bence et al., 2001; Jana et al., 2001; Bennett et al., 2005; Duennwald and Lindquist, 2008; Mitra et al., 2009), la acumulación de la proteína reportera y por tanto la inhibición del UPS. Estos resultados son los primeros en conciliar los resultados existentes hasta el momento en modelos animales y celulares de la EH al describir *in vivo* inhibición del UPS en un modelo animal de la EH sólo bajo expresión aguda de htt* y no bajo expresión constitutiva de la misma.

Es conveniente remarcar que en estos ratones UbGFP:HD94 con expresión aguda de htt* el número de neuronas estriatales en las que se detecta un aumento de la proteína reportera como consecuencia de la expresión de htt* después de 1 a 4 semanas de expresión de htt* es muy bajo. Este dato sugiere que la acumulación de la proteína reportera no está teniendo lugar en todas las neuronas del St, sino sólo en una pequeña población de neuronas estriatales. Además, la acumulación de la proteína reportera es transitoria, ya que deja de detectarse después de 4 semanas de expresión de htt*. La detección de un descenso paulatino del número de neuronas que acumulan la proteína reportera en lugar de la desaparición de todas a la vez, podría deberse a que la inhibición del UPS dura más en unas neuronas que en otras. Sin embargo, los resultados obtenidos del análisis, mediante la detección con β -gal, del comienzo de la expresión del trasgén tras la eliminación del tratamiento muestran como la expresión no comienza en todas las neuronas a la vez sino que es asincrónica. Si además tenemos en cuenta que se tiene que alcanzar una concentración crítica de htt* difusa en la célula para que tenga lugar la inhibición del UPS y su posterior recuperación, podemos deducir que el descenso paulatino del número de neuronas que acumulan Ub-GFP con el tiempo de expresión de htt* no se debe a la duración del tiempo que el UPS permanece inhibido, sino que, al comenzar la expresión del trasgén en unas neuronas antes que en otras, también existirán diferencias en el tiempo de expresión de htt* al que éstas alcanzan la concentración crítica de htt* necesaria para inhibir el UPS y por lo tanto del tiempo de expresión de htt* al que se produce la recuperación de dicha inhibición.

En resumen, estos datos confirman que la htt* tiene la capacidad de inhibir al UPS de forma transitoria en un subgrupo de neuronas y que éstas son capaces de poner en marcha mecanismos adaptativos que les hacen sobreponerse de dicha inhibición y alcanzar de nuevo niveles normales de actividad del UPS.

3. LA FORMACIÓN DE CUERPOS DE INCLUSIÓN FAVORECE LA RECUPERACIÓN DE LA FUNCIÓN DEL SISTEMA UBIQUITINA PROTEASOMA

Se sabe que la inhibición del UPS es letal para las células (Bhutani et al., 2007) por lo tanto, la muerte de aquellas células que presentan altos niveles de la construcción reportera debido a la inhibición del UPS parecía la hipótesis más plausible para explicar la naturaleza transitoria de la acumulación de la proteína reportera en ratones UbGFP:HD94 con expresión aguda de htt*. Sin embargo, los análisis de muerte neuronal realizados en estos ratones con expresión aguda de htt* no mostraron un aumento en el número de células que están muriendo por ninguno de los métodos utilizados. Estos resultados descartan la muerte celular como mecanismo responsable de la naturaleza transitoria de la acumulación del reportero.

El análisis de la aparición de CIs en los ratones UbGFP:HD94 con expresión aguda de htt* mostró cierta correlación entre la desaparición de la acumulación de la proteína reportera a las 4 semanas y la aparición de los primeros CIs en el St de éstos. Mientras durante las 3 primeras semanas de expresión de la htt*, tiempo en el que se detectaba acumulación de la proteína reportera, ésta se encuentra en forma difusa en el citoplasma y/o núcleo de las neuronas, cuando desaparece la acumulación del reportero, a la cuarta semana de expresión de la htt*, comienzan a aparecer los primeros CIs. Este dato, unido a datos recientemente publicados en los que se ha relaciona la formación de CIs con recuperación de la inhibición del UPS en un modelo celular de la EH (Mitra et al., 2009), sugiere la formación de CIs como posible mecanismo responsable de la naturaleza transitoria de la acumulación de la construcción reportera.

Para confirmar esta hipótesis se analizó un modelo celular de la EH consistente en cultivos primarios neuronales, tanto corticales como estriatales, cotransfectados con poliQ expandidas y el reportero de la actividad del proteasoma. En un elevado porcentaje de las neuronas en las que la acumulación de la proteína reportera era transitoria se pudo detectar la formación de CIs, confirmándose así la hipótesis. Además, este fenómeno, al igual que sucedía *in vivo* en los ratones UbGFP:HD94 con expresión aguda de htt*, tenía lugar en un 20% aproximadamente de las neuronas analizadas, lo que afianza la hipótesis de que la acumulación del reportero tiene lugar en un subgrupo de neuronas. Esta recuperación de la actividad del UPS en las neuronas que forman CIs pone de manifiesto la gran importancia del estado de agregación en el que se encuentra la htt* para la

actividad del UPS y esclarece la duda existente hasta el momento acerca de la naturaleza protectora y perjudicial de los CIs.

En los últimos años ha existido gran controversia acerca del papel que juega la agregación en la toxicidad de las poliQs. Aparte del descubrimiento inicial de que el umbral de agregación de la poliQ *in vitro* coincide con el de la patogenicidad en las enfermedades causadas por poliQ (Scherzinger et al., 1997), también se ha visto que la formación de agregados precede al inicio de los síntomas en un modelo animal de la EH (Davies et al., 1997). Además, estudios realizados en modelos celulares de la EH sugieren que la toxicidad puede ser inducida por los agregados (Waelter et al., 2001). Por otro lado, existen estudios más recientes que apoyan la idea de que los agregados no sólo no son patogénicos sino que pueden ser protectores (Saudou et al., 1998; Kopito, 2000; Arrasate et al., 2004; Bennett et al., 2005; Bowman et al., 2005). Estos estudios se basan en observaciones tales como la presencia de CIs en la Cx de cerebros de EH antes de que se produzca ningún tipo de degeneración (Gutekunst et al., 1999), en el hecho de que muchas de las MSSNs del St de pacientes de EH carecen de CIs a pesar de la existencia de muerte neuronal (Gutekunst et al., 1999), o en la existencia de una correlación inversamente proporcional entre la distribución de los agregados en el cerebro y las estructuras cerebrales y tipos celulares afectados en la EH (Kuemmerle et al., 1999). Además, se sabe que la formación de CIs en cultivos primarios de neuronas transfectadas protege de la toxicidad de la htt* (Arrasate et al., 2004) y existen modelos animales de la EH en los cuales los CIs aparecen únicamente después del inicio de los síntomas (Menalled et al., 2003).

La correlación encontrada en cultivos primario neuronales cotransfectados con poliQs patogénicas y el reportero de la actividad del UPS entre la desaparición de la acumulación de la proteína reportera y la formación de CIs en estas neuronas está a favor de los trabajos que apoyan la hipótesis de la naturaleza protectora de los CIs. Es más, estos resultados ponen de manifiesto la capacidad de la htt* de inhibir la actividad del UPS cuando se encuentra en forma soluble o formando microagregados apuntando hacia las especies intermedias de agregación como las formas patogénicas. Esta hipótesis ya ha sido sugerida en otros estudios en los que también identificaron especies intermedias presentes en el proceso de agregación (oligómeros en distintos estados de agregación) como los responsables de la toxicidad de la poliQ (Yang et al., 2002; Bennett et al., 2005; Diaz-Hernandez et al., 2006; Nagai et al., 2007; Takahashi et al., 2008). Más concretamente, existen trabajos que relacionan directamente el estado de agregación de la htt* con su capacidad de inhibir el proteasoma. En estos trabajos se vio que sólo los

filamentos y no los CIs purificados del cerebro del ratón HD94 eran capaces de inhibir el proteasoma (Diaz-Hernandez et al., 2004; Diaz-Hernandez et al., 2006). Además esta inhibición sólo se producía sobre el 26S y no sobre el 20S, lo que revelaba una interacción directa entre los filamentos de htt* y el 19S (Diaz-Hernandez et al., 2006). Es bien sabido que las partículas 19S son las encargadas de reconocer las cadenas de poliubiquitinas presentes en los sustratos marcados a degradación por el UPS, abrir el poro del 20S y desplegar los sustratos para que estos puedan ser introducidos en él y degradados (Kohler et al., 2001; Smith et al., 2007). Un posible mecanismo por el cual la htt* soluble o los microagregados de htt* inhiben el proteasoma es a través de esta interacción de los sustratos poliubiquitinados con el 19S. Debido a su conformación y/o a su tamaño, al ser reconocidas por el 19S, este puede quedar bloqueado por no ser capaz de desplegarlos e introducirlos en el 20S para su degradación. Este bloqueo de las subunidades 19S conllevaría una disminución del número de subunidades 19S libres para reconocer otros sustratos poliubiquitinados y por tanto una disminución de la actividad del UPS y un aumento la concentración de los sustratos poliubiquitinados en las células. Este aumento de la concentración de sustratos poliubiquitinados podría desencadenar como respuesta la formación del agrosoma (Kopito, 2000; Sherman and Goldberg, 2001) en cuya formación los microagregados ubiquitinados presentes en la célula serán dirigidos a través de la red de microtúbulos hacia el centro organizador de microtúbulos donde tiene lugar la formación del mismo (Johnston et al., 1998; Muchowski et al., 2002). Como consecuencia la concentración de htt* soluble y microagregada presentes en el medio disminuirán, habrá un mayor número de subunidades 19S funcionales, y la inhibición del UPS desaparecerá. Este proceso explicaría los resultados obtenidos en ratones R6/2 con expresión adenoviral del reportero CL1-GFP en los que se detectaba acumulación de la construcción reportera en los terminales sinápticos pero no en el núcleo o el soma de la neurona (Wang et al., 2008). Como el secuestro de la htt* soluble o microagregada para su transporte al CI está mediado por los microtúbulos (Kopito 2000, Muchowski 2008), la menor eficiencia de la red de microtúbulos en los terminales sinápticos puede llevar a una captura menos eficiente de los microagregados en los mismos y por lo tanto a una inhibición del UPS en éstos.

La capacidad de la htt* de causar inhibición del UPS y la naturaleza beneficiosa de la formación de CIs se ha demostrado en cultivos primarios neuronales transfectados con poliQs patogénicas y el reportero de la actividad del proteasoma así como *in vivo* en los ratones UbGFP:R6/1 y UbGFP:HD94, a través de su tratamiento con compuestos antiagregantes. Estos compuestos, al impedir la formación de los CIs, mantienen más tiempo la htt* soluble, los microagregados y las especies intermedias tóxicas en el medio

prolongando la inhibición del proteasoma y retrasando su recuperación. Los dos compuestos utilizados para realizar estos experimentos, el PGL-135 y el riluzol, se eligieron en base a estudios anteriores en los que se comprobó su capacidad antiagregante. El efecto antiagregante del PGL-135 ha sido comprobado *in vitro* e *in vivo* en ratones R6/2 (Hockly et al., 2006), además se ha visto que no muestra toxicidad celular. El riluzol, además de su actividad antiagregante, actúa como antagonista de los receptores de glutamato (He et al., 2002). Como compuesto antiagregante, se ha comprobado su eficacia *in vitro* e *in vivo* en ratones R6/2 (Schiefer et al., 2002; Hockly et al., 2006), aunque *in vitro* su efecto es menos potente que el del PGL-135 (Hockly et al., 2006). Además, también se usa en el tratamiento de pacientes de esclerosis lateral amiotrófica, consiguiendo una mejora en la supervivencia de algunos meses (Tavakoli, 2002).

Mientras el riluzol se utilizó tanto en los experimentos realizados en cultivos primarios cotransfectados como *in vivo* en los ratones modelo de la EH, el PGL-135 sólo se utilizó en cultivos primarios. Esto es debido a que su corta vida media cuando es administrado por vía oral o intraperitonealmente (Hockly et al., 2006) hace imposible su detección en ningún tejido (incluyendo el cerebro) 40 min después de ser administrado. Esto quiere decir que sería metabolizado antes de que alcanzase el cerebro o poco tiempo después de hacerlo, en ambos casos no llegando a producir ningún efecto sobre la formación de CIs.

Los resultados obtenidos en los ratones modelo de la EH, UbGFP:R6/1 y UbGFP:HD94, tratados con riluzol confirman la hipótesis de que es la formación de los CIs lo que contribuye a la recuperación de la actividad del UPS. En ambos casos, después del tratamiento con riluzol, en la Cx de los ratones UbGFP:HD94 y en la Cx y el St de los ratones UbGFP:R6/1, se detectaron neuronas que acumulaban la proteína reportera y por lo tanto inhibición del UPS. Al impedir la formación de CIs en las neuronas con expresión aguda de htt* mediante la adición de un compuesto antiagregante, bloqueamos la ruta de recuperación de la actividad del UPS utilizada por las células consiguiendo prolongar dicha inhibición en el tiempo. La explicación del efecto menos acusado del riluzol en el St de los ratones UbGFP:HD94 reside en el escaso número de CIs que se forman en esta estructura. Mientras en los ratones UbGFP:R6/1 el comienzo de la formación de CIs es mucho más rápido formándose un gran número de CIs en un corto periodo de tiempo en múltiples estructuras cerebrales (principalmente Cx, St e Hip), en los ratones UbGFP:HD94 los CIs se forman más lentamente. Además, al igual que sucede en humanos (Gutekunst et al., 1995; DiFiglia et al., 1997), en los ratones UbGFP:HD94 el St es la estructura cerebral afectada en la EH en la que menos CIs se detectan. Esto hace que, al haber menos neuronas que forman CIs, el riluzol puede actuar sobre un número menor de

neuronas que en el St de los ratones UbGFP:R6/1, lo que se traduce en un menor aumento del número de neuronas que acumulan la construcción reportera.

En conclusión, los resultados presentados en esta tesis reconcilian los datos obtenidos en modelos celulares de la EH, que defienden la existencia de inhibición del UPS, con los obtenidos en los modelos animales de la EH en los que dicha inhibición del UPS no está presente. Además, estos resultados demuestran que la htt* tiene la capacidad de inhibir el UPS *in vivo* aunque sólo de forma transitoria ya que la formación de los CIs protege de esta inhibición, y confirma como formas patogénicas de htt* las formas soluble y/o microagregada.

VII. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Los ratones UbGFP reporteros de disfunción del UPS expresan correctamente la proteína reportera Ub-GFP en el cerebro, como se demuestra al acumularse ésta tras la inyección intraestriatal del inhibidor del proteasoma lactacistina.
2. No se observó acumulación de la proteína reportera en los ratones UbGFP combinados con tres modelos transgénicos de EH con tres grados distintos de severidad (ratones R6/1, R6/2 y HD94), a edades sintomáticas, como consecuencia de la expresión constitutiva de htt*.
3. Ni siquiera se observó acumulación de la proteína reportera en los ratones UbGFP combinados con ratones HD94 con expresión constitutiva de htt* a las edades de 18 o más meses, en las que ya se detecta la bajada en la actividad proteasoma cerebral asociada al envejecimiento.
4. Detectamos por vez primera acumulación de una proteína reportera de disfunción del UPS en un modelo animal de enfermedad causada por poliQ en los ratones UbGFP:HD94 adultos con expresión aguda de htt*, pero la detección de Ub-GFP era transitoria teniendo lugar sólo durante las primeras 4 semanas tras el inicio de la expresión de htt*.
5. La desaparición de la proteína reportera Ub-GFP en los ratones HD94 con expresión aguda de htt* no correlaciona con marcadores de muerte neuronal tales como la detección de caspasa-3 activada o la tinción de TUNEL, mientras que sí correlaciona con la aparición de CIs.
6. En cultivos primarios de neuronas de ratones wild type transfectados con htt* y Ub-YFP, la acumulación de la proteína reportera también era transitoria en un subgrupo de neuronas, su desaparición también correlacionaba en buena medida con la formación de CIs y la incubación con dos compuestos que previenen la formación de CIs, el riluzol y el PGL-135, exacerba su acumulación.
7. La administración de riluzol a altas dosis en ratones UbGFP:HD94 con expresión aguda de htt* y en ratones UbGFP:R6/1 de tres semanas (antes de la aparición masiva de CIs) previene la formación de CIs y provoca la detección generalizada de Ub-GFP en las neuronas que expresan htt*.
8. En resumen, del estudio de ratones reporteros UbGFP combinados con modelos transgénicos de EH podemos concluir que la htt* tiene el potencial de inducir acumulación de la proteína reportera Ub-GFP *in vivo* (expresión aguda de htt* en ratones UbGFP:HD94). Sin embargo, en el estado estacionario el secuestro de la htt* en los CIs permite que el sistema se recupere.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- (1993) A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell* 72:971-983.
- Afifi AK (1994) Basal ganglia: functional anatomy and physiology. Part 1. *J Child Neurol* 9:249-260.
- Albin RL, Young AB, Penney JB (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 12:366-375.
- Alexander GE, Crutcher MD (1990) Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci* 13:266-271.
- Ambrose CM, Duyao MP, Barnes G, Bates GP, Lin CS, Srinidhi J, Baxendale S, Hummerich H, Lehrach H, Altherr M, et al. (1994) Structure and expression of the Huntington's disease gene: evidence against simple inactivation due to an expanded CAG repeat. *Somat Cell Mol Genet* 20:27-38.
- Anderson C, Crimmins S, Wilson JA, Korbel GA, Ploegh HL, Wilson SM (2005) Loss of Usp14 results in reduced levels of ubiquitin in ataxia mice. *J Neurochem* 95:724-731.
- Andrew SE, Goldberg YP, Hayden MR (1997) Rethinking genotype and phenotype correlations in polyglutamine expansion disorders. *Hum Mol Genet* 6:2005-2010.
- Andrew SE, Goldberg YP, Kremer B, Telenius H, Theilmann J, Adam S, Starr E, Squitieri F, Lin B, Kalchman MA, et al. (1993) The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. *Nat Genet* 4:398-403.
- Anton LC, Villasevil EM (2008) Is there an alternative to the proteasome in cytosolic protein degradation? *Biochem Soc Trans* 36:839-842.
- Anton LC, Schubert U, Bacik I, Princiotta MF, Wearsch PA, Gibbs J, Day PM, Realini C, Rechsteiner MC, Bennink JR, Yewdell JW (1999) Intracellular localization of proteasomal degradation of a viral antigen. *J Cell Biol* 146:113-124.
- Aouizerate B, Guehl D, Cuny E, Rougier A, Bioulac B, Tignol J, Burbaud P (2004) Pathophysiology of obsessive-compulsive disorder: a necessary link between phenomenology, neuropsychology, imagery and physiology. *Prog Neurobiol* 72:195-221.
- Ardley HC, Robinson PA (2005) E3 ubiquitin ligases. *Essays Biochem* 41:15-30.
- Arrasate M, Mitra S, Schweitzer ES, Segal MR, Finkbeiner S (2004) Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature* 431:805-810.
- Avila J (2006) Tau protein, the main component of paired helical filaments. *J Alzheimers Dis* 9:171-175.
- Avila J, Lucas JJ, Perez M, Hernandez F (2004) Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev* 84:361-384.
- Baron U, Freundlieb S, Gossen M, Bujard H (1995) Co-regulation of two gene activities by tetracycline via a bidirectional promoter. *Nucleic Acids Res* 23:3605-3606.
- Bence NF, Sampat RM, Kopito RR (2001) Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science* 292:1552-1555.
- Bennett EJ, Bence NF, Jayakumar R, Kopito RR (2005) Global impairment of the ubiquitin-proteasome system by nuclear or cytoplasmic protein aggregates precedes inclusion body formation. *Mol Cell* 17:351-365.
- Bennett EJ, Shaler TA, Woodman B, Ryu KY, Zaitseva TS, Becker CH, Bates GP, Schulman H, Kopito RR (2007) Global changes to the ubiquitin system in Huntington's disease. *Nature* 448:704-708.

- Berardelli A, Noth J, Thompson PD, Bollen EL, Curra A, Deuschl G, van Dijk JG, Topper R, Schwarz M, Roos RA (1999) Pathophysiology of chorea and bradykinesia in Huntington's disease. *Mov Disord* 14:398-403.
- Bett JS, Cook C, Petrucelli L, Bates GP (2009) The ubiquitin-proteasome reporter GFPu does not accumulate in neurons of the R6/2 transgenic mouse model of Huntington's disease. *PLoS One* 4:e5128.
- Bett JS, Goellner GM, Woodman B, Pratt G, Rechsteiner M, Bates GP (2006) Proteasome impairment does not contribute to pathogenesis in R6/2 Huntington's disease mice: exclusion of proteasome activator REGgamma as a therapeutic target. *Hum Mol Genet* 15:33-44.
- Bhutani N, Venkatraman P, Goldberg AL (2007) Puromycin-sensitive aminopeptidase is the major peptidase responsible for digesting polyglutamine sequences released by proteasomes during protein degradation. *EMBO J* 26:1385-1396.
- Bjorkoy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A, Stenmark H, Johansen T (2005) p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol* 171:603-614.
- Boillee S, Vande Velde C, Cleveland DW (2006) ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron* 52:39-59.
- Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, Dekker MC, Squitieri F, Ibanez P, Joosse M, van Dongen JW, Vanacore N, van Swieten JC, Brice A, Meco G, van Duijn CM, Oostra BA, Heutink P (2003) Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 299:256-259.
- Bossy-Wetzel E, Schwarzenbacher R, Lipton SA (2004) Molecular pathways to neurodegeneration. *Nat Med* 10 Suppl:S2-9.
- Bowman AB, Yoo SY, Dantuma NP, Zoghbi HY (2005) Neuronal dysfunction in a polyglutamine disease model occurs in the absence of ubiquitin-proteasome system impairment and inversely correlates with the degree of nuclear inclusion formation. *Hum Mol Genet* 14:679-691.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Browne SE (2008) Mitochondria and Huntington's disease pathogenesis: insight from genetic and chemical models. *Ann N Y Acad Sci* 1147:358-382.
- Cattaneo E, Zuccato C, Tartari M (2005) Normal huntingtin function: an alternative approach to Huntington's disease. *Nat Rev Neurosci* 6:919-930.
- Craufurd D, Dodge A (1993) Mutation size and age at onset in Huntington's disease. *J Med Genet* 30:1008-1011.
- Cummings CJ, Mancini MA, Antalffy B, DeFranco DB, Orr HT, Zoghbi HY (1998) Chaperone suppression of aggregation and altered subcellular proteasome localization imply protein misfolding in SCA1. *Nat Genet* 19:148-154.
- Cummings CJ, Reinstein E, Sun Y, Antalffy B, Jiang Y, Ciechanover A, Orr HT, Beaudet AL, Zoghbi HY (1999) Mutation of the E6-AP ubiquitin ligase reduces nuclear inclusion frequency while accelerating polyglutamine-induced pathology in SCA1 mice. *Neuron* 24:879-892.
- Currier RD, Jackson JF, Meydreich EF (1982) Progression rate and age at onset are related in autosomal dominant neurologic diseases. *Neurology* 32:907-909.
- Chen S, Wetzel R (2001) Solubilization and disaggregation of polyglutamine peptides. *Protein Sci* 10:887-891.

- Cheroni C, Marino M, Tortarolo M, Veglianese P, De Biasi S, Fontana E, Zuccarello LV, Maynard CJ, Dantuma NP, Bendotti C (2009) Functional alterations of the ubiquitin-proteasome system in motor neurons of a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* 18:82-96.
- Dahlmann B (2005) Proteasomes. *Essays Biochem* 41:31-48.
- Dantuma NP, Lindsten K, Glas R, Jellne M, Masucci MG (2000) Short-lived green fluorescent proteins for quantifying ubiquitin/proteasome-dependent proteolysis in living cells. *Nat Biotechnol* 18:538-543.
- Davies SW, Turmaine M, Cozens BA, DiFiglia M, Sharp AH, Ross CA, Scherzinger E, Wanker EE, Mangiarini L, Bates GP (1997) Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* 90:537-548.
- de Boo GM, Tibben A, Lanser JB, Jennekens-Schinkel A, Hermans J, Maat-Kievit A, Roos RA (1997) Early cognitive and motor symptoms in identified carriers of the gene for Huntington disease. *Arch Neurol* 54:1353-1357.
- De Rooij KE, Dorsman JC, Smoor MA, Den Dunnen JT, Van Ommen GJ (1996) Subcellular localization of the Huntington's disease gene product in cell lines by immunofluorescence and biochemical subcellular fractionation. *Hum Mol Genet* 5:1093-1099.
- DeLong MR (1990) Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci* 13:281-285.
- DeLong MR, Wichmann T (2007) Circuits and circuit disorders of the basal ganglia. *Arch Neurol* 64:20-24.
- DeMartino GN, Slaughter CA (1999) The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms. *J Biol Chem* 274:22123-22126.
- Deng YP, Albin RL, Penney JB, Young AB, Anderson KD, Reiner A (2004) Differential loss of striatal projection systems in Huntington's disease: a quantitative immunohistochemical study. *J Chem Neuroanat* 27:143-164.
- Diaz-Hernandez M, Torres-Peraza J, Salvatori-Abarca A, Moran MA, Gomez-Ramos P, Alberch J, Lucas JJ (2005) Full motor recovery despite striatal neuron loss and formation of irreversible amyloid-like inclusions in a conditional mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci* 25:9773-9781.
- Diaz-Hernandez M, Valera AG, Moran MA, Gomez-Ramos P, Alvarez-Castelao B, Castano JG, Hernandez F, Lucas JJ (2006) Inhibition of 26S proteasome activity by huntingtin filaments but not inclusion bodies isolated from mouse and human brain. *J Neurochem* 98:1585-1596.
- Diaz-Hernandez M, Hernandez F, Martin-Aparicio E, Gomez-Ramos P, Moran MA, Castano JG, Ferrer I, Avila J, Lucas JJ (2003) Neuronal induction of the immunoproteasome in Huntington's disease. *J Neurosci* 23:11653-11661.
- Diaz-Hernandez M, Moreno-Herrero F, Gomez-Ramos P, Moran MA, Ferrer I, Baro AM, Avila J, Hernandez F, Lucas JJ (2004) Biochemical, ultrastructural, and reversibility studies on huntingtin filaments isolated from mouse and human brain. *J Neurosci* 24:9361-9371.
- DiFiglia M, Sapp E, Chase KO, Davies SW, Bates GP, Vonsattel JP, Aronin N (1997) Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* 277:1990-1993.
- Dragatsis I, Levine MS, Zeitlin S (2000) Inactivation of *Hdh* in the brain and testis results in progressive neurodegeneration and sterility in mice. *Nat Genet* 26:300-306.

- Dubinsky JM (1989) Development of inhibitory synapses among striatal neurons in vitro. *J Neurosci* 9:3955-3965.
- Duennwald ML, Lindquist S (2008) Impaired ERAD and ER stress are early and specific events in polyglutamine toxicity. *Genes Dev* 22:3308-3319.
- Duyao MP, Auerbach AB, Ryan A, Persichetti F, Barnes GT, McNeil SM, Ge P, Vonsattel JP, Gusella JF, Joyner AL, et al. (1995) Inactivation of the mouse Huntington's disease gene homolog Hdh. *Science* 269:407-410.
- Duyckaerts C, Durr A, Cancel G, Brice A (1999) Nuclear inclusions in spinocerebellar ataxia type 1. *Acta Neuropathol* 97:201-207.
- Farrer M, Gwinn-Hardy K, Muentner M, DeVrieze FW, Crook R, Perez-Tur J, Lincoln S, Maraganore D, Adler C, Newman S, MacElwee K, McCarthy P, Miller C, Waters C, Hardy J (1999) A chromosome 4p haplotype segregating with Parkinson's disease and postural tremor. *Hum Mol Genet* 8:81-85.
- Field M, Tarpey PS, Smith R, Edkins S, O'Meara S, Stevens C, Tofts C, Teague J, Butler A, Dicks E, Barthorpe S, Buck G, Cole J, Gray K, Halliday K, Hills K, Jenkinson A, Jones D, Menzies A, Mironenko T, Perry J, Raine K, Richardson D, Shepherd R, Small A, Varian J, West S, Widaa S, Mallya U, Wooster R, Moon J, Luo Y, Hughes H, Shaw M, Friend KL, Corbett M, Turner G, Partington M, Mulley J, Bobrow M, Schwartz C, Stevenson R, Gecz J, Stratton MR, Futreal PA, Raymond FL (2007) Mutations in the BRWD3 gene cause X-linked mental retardation associated with macrocephaly. *Am J Hum Genet* 81:367-374.
- Flaherty AW, Graybiel AM (1993) Output architecture of the primate putamen. *J Neurosci* 13:3222-3237.
- Fonseca R, Vabulas RM, Hartl FU, Bonhoeffer T, Nagerl UV (2006) A balance of protein synthesis and proteasome-dependent degradation determines the maintenance of LTP. *Neuron* 52:239-245.
- Foroud T, Gray J, Ivashina J, Conneally PM (1999) Differences in duration of Huntington's disease based on age at onset. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 66:52-56.
- Froyen G, Corbett M, Vandewalle J, Jarvela I, Lawrence O, Meldrum C, Bauters M, Govaerts K, Vandeleur L, Van Esch H, Chelly J, Sanlaville D, van Bokhoven H, Ropers HH, Laumonnier F, Ranieri E, Schwartz CE, Abidi F, Tarpey PS, Futreal PA, Whibley A, Raymond FL, Stratton MR, Fryns JP, Scott R, Peippo M, Sipponen M, Partington M, Mowat D, Field M, Hackett A, Marynen P, Turner G, Gecz J (2008) Submicroscopic duplications of the hydroxysteroid dehydrogenase HSD17B10 and the E3 ubiquitin ligase HUWE1 are associated with mental retardation. *Am J Hum Genet* 82:432-443.
- Funayama M, Hasegawa K, Kowa H, Saito M, Tsuji S, Obata F (2002) A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11.2-q13.1. *Ann Neurol* 51:296-301.
- Gandhi S, Wood NW (2005) Molecular pathogenesis of Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 14:2749-2755.
- Ganesh S, Puri R, Singh S, Mittal S, Dubey D (2006) Recent advances in the molecular basis of Lafora's progressive myoclonus epilepsy. *J Hum Genet* 51:1-8.
- Gasser T, Muller-Myhsok B, Wszolek ZK, Oehlmann R, Calne DB, Bonifati V, Bereznaï B, Fabrizio E, Vieregge P, Horstmann RD (1998) A susceptibility locus for Parkinson's disease maps to chromosome 2p13. *Nat Genet* 18:262-265.
- Georgalis Y, Starikov EB, Hollenbach B, Lurz R, Scherzinger E, Saenger W, Lehrach H, Wanker EE (1998) Huntingtin aggregation monitored by dynamic light scattering. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:6118-6121.

- Gerfen CR (1988) Synaptic organization of the striatum. *J Electron Microscop Tech* 10:265-281.
- Gerfen CR (1992) The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization. *J Neural Transm Suppl* 36:43-59.
- Gissi C, Pesole G, Cattaneo E, Tartari M (2006) Huntingtin gene evolution in Chordata and its peculiar features in the ascidian *Ciona* genus. *BMC Genomics* 7:288.
- Glickman MH, Ciechanover A (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 82:373-428.
- Goedert M, Spillantini MG (2006) A century of Alzheimer's disease. *Science* 314:777-781.
- Goedert M, Spillantini MG, Davies SW (1998) Filamentous nerve cell inclusions in neurodegenerative diseases. *Curr Opin Neurobiol* 8:619-632.
- Gomez-Tortosa E, Irizarry MC, Gomez-Isla T, Hyman BT (2000) Clinical and neuropathological correlates of dementia with Lewy bodies. *Ann N Y Acad Sci* 920:9-15.
- Gossen M, Bujard H (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:5547-5551.
- Graveland GA, Williams RS, DiFiglia M (1985) Evidence for degenerative and regenerative changes in neostriatal spiny neurons in Huntington's disease. *Science* 227:770-773.
- Graybiel AM (2000) The basal ganglia. *Curr Biol* 10:R509-511.
- Graybiel AM, Aosaki T, Flaherty AW, Kimura M (1994) The basal ganglia and adaptive motor control. *Science* 265:1826-1831.
- Groll M, Ditzel L, Lowe J, Stock D, Bochtler M, Bartunik HD, Huber R (1997) Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* 386:463-471.
- Gusella JF, MacDonald ME, Ambrose CM, Duyao MP (1993) Molecular genetics of Huntington's disease. *Arch Neurol* 50:1157-1163.
- Gusella JF, McNeil S, Persichetti F, Srinidhi J, Novelletto A, Bird E, Faber P, Vonsattel JP, Myers RH, MacDonald ME (1996) Huntington's disease. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 61:615-626.
- Gusella JF, Wexler NS, Conneally PM, Naylor SL, Anderson MA, Tanzi RE, Watkins PC, Ottina K, Wallace MR, Sakaguchi AY, et al. (1983) A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature* 306:234-238.
- Gutkunst CA, Levey AI, Heilman CJ, Whaley WL, Yi H, Nash NR, Rees HD, Madden JJ, Hersch SM (1995) Identification and localization of huntingtin in brain and human lymphoblastoid cell lines with anti-fusion protein antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:8710-8714.
- Gutkunst CA, Li SH, Yi H, Mulroy JS, Kuemmerle S, Jones R, Rye D, Ferrante RJ, Hersch SM, Li XJ (1999) Nuclear and neuropil aggregates in Huntington's disease: relationship to neuropathology. *J Neurosci* 19:2522-2534.
- Haglund K, Di Fiore PP, Dikic I (2003) Distinct monoubiquitin signals in receptor endocytosis. *Trends Biochem Sci* 28:598-603.
- Hampshire DJ, Roberts E, Crow Y, Bond J, Mubaidin A, Wriekat AL, Al-Din A, Woods CG (2001) Kufor-Rakeb syndrome, pallido-pyramidal degeneration with supranuclear upgaze paresis and dementia, maps to 1p36. *J Med Genet* 38:680-682.
- Harding AE, Thomas PK, Baraitser M, Bradbury PG, Morgan-Hughes JA, Ponsford JR (1982) X-linked recessive bulbospinal neuronopathy: a report of ten cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 45:1012-1019.
- Harjes P, Wanker EE (2003) The hunt for huntingtin function: interaction partners tell many different stories. *Trends Biochem Sci* 28:425-433.
- Harper PS (1992) The epidemiology of Huntington's disease. *Hum Genet* 89:365-376.

- Hartmann-Petersen R, Seeger M, Gordon C (2003) Transferring substrates to the 26S proteasome. *Trends Biochem Sci* 28:26-31.
- Hattori N, Kobayashi H, Sasaki-Hatano Y, Sato K, Mizuno Y (2003) Familial Parkinson's disease: a hint to elucidate the mechanisms of nigral degeneration. *J Neurol* 250 Suppl 3:III2-10.
- Hayashi Y, Kakita A, Yamada M, Koide R, Igarashi S, Takano H, Ikeuchi T, Wakabayashi K, Egawa S, Tsuji S, Takahashi H (1998) Hereditary dentatorubral-pallidoluysian atrophy: detection of widespread ubiquitinated neuronal and glial intranuclear inclusions in the brain. *Acta Neuropathol* 96:547-552.
- Hazeki N, Tsukamoto T, Yazawa I, Koyama M, Hattori S, Someki I, Iwatsubo T, Nakamura K, Goto J, Kanazawa I (2002) Ultrastructure of nuclear aggregates formed by expressing an expanded polyglutamine. *Biochem Biophys Res Commun* 294:429-440.
- Heinsen H, Strik M, Bauer M, Luther K, Ulmar G, Gangnus D, Jungkunz G, Eisenmenger W, Gotz M (1994) Cortical and striatal neurone number in Huntington's disease. *Acta Neuropathol* 88:320-333.
- Heiser V, Engemann S, Brocker W, Dunkel I, Boeddrich A, Waelter S, Nordhoff E, Lurz R, Schugardt N, Rautenberg S, Herhaus C, Barnickel G, Bottcher H, Lehrach H, Wanker EE (2002) Identification of benzothiazoles as potential polyglutamine aggregation inhibitors of Huntington's disease by using an automated filter retardation assay. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 Suppl 4:16400-16406.
- Hershko A, Ciechanover A (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67:425-479.
- Hicke L, Dunn R (2003) Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19:141-172.
- Hicks AA, Petursson H, Jonsson T, Stefansson H, Johannsdottir HS, Sainz J, Frigge ML, Kong A, Gulcher JR, Stefansson K, Sveinbjornsdottir S (2002) A susceptibility gene for late-onset idiopathic Parkinson's disease. *Ann Neurol* 52:549-555.
- Hikosaka O, Takikawa Y, Kawagoe R (2000) Role of the basal ganglia in the control of purposive saccadic eye movements. *Physiol Rev* 80:953-978.
- Hockly E, Tse J, Barker AL, Moolman DL, Beunard JL, Revington AP, Holt K, Sunshine S, Moffitt H, Sathasivam K, Woodman B, Wanker EE, Lowden PA, Bates GP (2006) Evaluation of the benzothiazole aggregation inhibitors riluzole and PGL-135 as therapeutics for Huntington's disease. *Neurobiol Dis* 21:228-236.
- Hochrainer K, Lipp J (2007) Ubiquitylation within signaling pathways in- and outside of inflammation. *Thromb Haemost* 97:370-377.
- Hodgson JG, Agopyan N, Gutekunst CA, Leavitt BR, LePiane F, Singaraja R, Smith DJ, Bissada N, McCutcheon K, Nasir J, Jamot L, Li XJ, Stevens ME, Rosemond E, Roder JC, Phillips AG, Rubin EM, Hersch SM, Hayden MR (1999) A YAC mouse model for Huntington's disease with full-length mutant huntingtin, cytoplasmic toxicity, and selective striatal neurodegeneration. *Neuron* 23:181-192.
- Holmberg M, Duyckaerts C, Durr A, Cancel G, Gourfinkel-An I, Damier P, Faucheux B, Trottier Y, Hirsch EC, Agid Y, Brice A (1998) Spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7): a neurodegenerative disorder with neuronal intranuclear inclusions. *Hum Mol Genet* 7:913-918.
- Hoogeveen AT, Willemsen R, Meyer N, de Rooij KE, Roos RA, van Ommen GJ, Galjaard H (1993) Characterization and localization of the Huntington disease gene product. *Hum Mol Genet* 2:2069-2073.
- Huettner JE, Baughman RW (1986) Primary culture of identified neurons from the visual cortex of postnatal rats. *J Neurosci* 6:3044-3060.

- Huntington G (1872) On Chorea. *Medical and Surgical Reporter* 26:320-321.
- Huynh DP, Figueroa K, Hoang N, Pulst SM (2000) Nuclear localization or inclusion body formation of ataxin-2 are not necessary for SCA2 pathogenesis in mouse or human. *Nat Genet* 26:44-50.
- Ichihara N, Wu J, Chui DH, Yamazaki K, Wakabayashi T, Kikuchi T (1995) Axonal degeneration promotes abnormal accumulation of amyloid beta-protein in ascending gracile tract of gracile axonal dystrophy (GAD) mouse. *Brain Res* 695:173-178.
- Ikeuchi T, Takano H, Koide R, Horikawa Y, Honma Y, Onishi Y, Igarashi S, Tanaka H, Nakao N, Sahashi K, Tsukagoshi H, Inoue K, Takahashi H, Tsuji S (1997) Spinocerebellar ataxia type 6: CAG repeat expansion in alpha1A voltage-dependent calcium channel gene and clinical variations in Japanese population. *Ann Neurol* 42:879-884.
- Imai Y, Soda M, Takahashi R (2000) Parkin suppresses unfolded protein stress-induced cell death through its E3 ubiquitin-protein ligase activity. *J Biol Chem* 275:35661-35664.
- Ishikawa K, Owada K, Ishida K, Fujigasaki H, Shun Li M, Tsunemi T, Ohkoshi N, Toru S, Mizutani T, Hayashi M, Arai N, Hasegawa K, Kawanami T, Kato T, Makifuchi T, Shoji S, Tanabe T, Mizusawa H (2001) Cytoplasmic and nuclear polyglutamine aggregates in SCA6 Purkinje cells. *Neurology* 56:1753-1756.
- Iwabuchi K, Tsuchiya K, Uchihara T, Yagishita S (1999) Autosomal dominant spinocerebellar degenerations. Clinical, pathological, and genetic correlations. *Rev Neurol (Paris)* 155:255-270.
- Jana NR, Zemskov EA, Wang G, Nukina N (2001) Altered proteasomal function due to the expression of polyglutamine-expanded truncated N-terminal huntingtin induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release. *Hum Mol Genet* 10:1049-1059.
- Jiang YH, Armstrong D, Albrecht U, Atkins CM, Noebels JL, Eichele G, Sweatt JD, Beaudet AL (1998) Mutation of the Angelman ubiquitin ligase in mice causes increased cytoplasmic p53 and deficits of contextual learning and long-term potentiation. *Neuron* 21:799-811.
- Johnston JA, Ward CL, Kopito RR (1998) Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol* 143:1883-1898.
- Karpova A, Mikhaylova M, Thomas U, Knopfel T, Behnisch T (2006) Involvement of protein synthesis and degradation in long-term potentiation of Schaffer collateral CA1 synapses. *J Neurosci* 26:4949-4955.
- Kawaguchi Y, Kovacs JJ, McLaurin A, Vance JM, Ito A, Yao TP (2003) The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell* 115:727-738.
- Kawakami T, Suzuki T, Baek SH, Chung CH, Kawasaki H, Hirano H, Ichiyama A, Omata M, Tanaka K (1999) Isolation and characterization of cytosolic and membrane-bound deubiquitinating enzymes from bovine brain. *J Biochem (Tokyo)* 126:612-623.
- Keller JN, Hanni KB, Markesbery WR (2000a) Possible involvement of proteasome inhibition in aging: implications for oxidative stress. *Mech Ageing Dev* 113:61-70.
- Keller JN, Huang FF, Markesbery WR (2000b) Decreased levels of proteasome activity and proteasome expression in aging spinal cord. *Neuroscience* 98:149-156.
- Khan LA, Bauer PO, Miyazaki H, Lindenberg KS, Landwehrmeyer BG, Nukina N (2006) Expanded polyglutamines impair synaptic transmission and ubiquitin-proteasome system in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurochem* 98:576-587.

- Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N (1998) Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392:605-608.
- Klement IA, Skinner PJ, Kaytor MD, Yi H, Hersch SM, Clark HB, Zoghbi HY, Orr HT (1998) Ataxin-1 nuclear localization and aggregation: role in polyglutamine-induced disease in SCA1 transgenic mice. *Cell* 95:41-53.
- Koegl M, Hoppe T, Schlenker S, Ulrich HD, Mayer TU, Jentsch S (1999) A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* 96:635-644.
- Kohler A, Cascio P, Leggett DS, Woo KM, Goldberg AL, Finley D (2001) The axial channel of the proteasome core particle is gated by the Rpt2 ATPase and controls both substrate entry and product release. *Mol Cell* 7:1143-1152.
- Koide R, Kobayashi S, Shimohata T, Ikeuchi T, Maruyama M, Saito M, Yamada M, Takahashi H, Tsuji S (1999) A neurological disease caused by an expanded CAG trinucleotide repeat in the TATA-binding protein gene: a new polyglutamine disease? *Hum Mol Genet* 8:2047-2053.
- Kopito RR (2000) Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol* 10:524-530.
- Koyano S, Uchihara T, Fujigasaki H, Nakamura A, Yagishita S, Iwabuchi K (1999) Neuronal intranuclear inclusions in spinocerebellar ataxia type 2: triple-labeling immunofluorescent study. *Neurosci Lett* 273:117-120.
- Krappmann D, Scheidereit C (2005) A pervasive role of ubiquitin conjugation in activation and termination of IkappaB kinase pathways. *EMBO Rep* 6:321-326.
- Kristiansen M, Deriziotis P, Dimcheff DE, Jackson GS, Ovaas H, Naumann H, Clarke AR, van Leeuwen FW, Menendez-Benito V, Dantuma NP, Portis JL, Collinge J, Tabrizi SJ (2007) Disease-associated prion protein oligomers inhibit the 26S proteasome. *Mol Cell* 26:175-188.
- Krug M, Lossner B, Ott T (1984) Anisomycin blocks the late phase of long-term potentiation in the dentate gyrus of freely moving rats. *Brain Res Bull* 13:39-42.
- Kuemmerle S, Gutekunst CA, Klein AM, Li XJ, Li SH, Beal MF, Hersch SM, Ferrante RJ (1999) Huntington aggregates may not predict neuronal death in Huntington's disease. *Ann Neurol* 46:842-849.
- Kuhlbrodt K, Mouysset J, Hoppe T (2005) Orchestra for assembly and fate of polyubiquitin chains. *Essays Biochem* 41:1-14.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lalande M, Calciano MA (2007) Molecular epigenetics of Angelman syndrome. *Cell Mol Life Sci* 64:947-960.
- Landwehrmeyer GB, McNeil SM, Dure LS, Ge P, Aizawa H, Huang Q, Ambrose CM, Duyao MP, Bird ED, Bonilla E, et al. (1995) Huntington's disease gene: regional and cellular expression in brain of normal and affected individuals. *Ann Neurol* 37:218-230.
- Laney JD, Hochstrasser M (1999) Substrate targeting in the ubiquitin system. *Cell* 97:427-430.
- Langbehn DR, Hayden MR, Paulsen JS (2009) CAG-repeat length and the age of onset in Huntington disease (HD): A review and validation study of statistical approaches. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*.

- Le WD, Xu P, Jankovic J, Jiang H, Appel SH, Smith RG, Vassilatis DK (2003) Mutations in NR4A2 associated with familial Parkinson disease. *Nat Genet* 33:85-89.
- Leavitt BR, Guttman JA, Hodgson JG, Kimel GH, Singaraja R, Vogl AW, Hayden MR (2001) Wild-type huntingtin reduces the cellular toxicity of mutant huntingtin in vivo. *Am J Hum Genet* 68:313-324.
- Leroy E, Boyer R, Auburger G, Leube B, Ulm G, Mezey E, Harta G, Brownstein MJ, Jonnalagada S, Chernova T, Dehejia A, Lavedan C, Gasser T, Steinbach PJ, Wilkinson KD, Polymeropoulos MH (1998) The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* 395:451-452.
- Li M, Miwa S, Kobayashi Y, Merry DE, Yamamoto M, Tanaka F, Doyu M, Hashizume Y, Fischbeck KH, Sobue G (1998) Nuclear inclusions of the androgen receptor protein in spinal and bulbar muscular atrophy. *Ann Neurol* 44:249-254.
- Li SH, Schilling G, Young WS, 3rd, Li XJ, Margolis RL, Stine OC, Wagster MV, Abbott MH, Franz ML, Ranen NG, et al. (1993) Huntington's disease gene (IT15) is widely expressed in human and rat tissues. *Neuron* 11:985-993.
- Lim J, Hao T, Shaw C, Patel AJ, Szabo G, Rual JF, Fisk CJ, Li N, Smolyar A, Hill DE, Barabasi AL, Vidal M, Zoghbi HY (2006) A protein-protein interaction network for human inherited ataxias and disorders of Purkinje cell degeneration. *Cell* 125:801-814.
- Lin CH, Tallaksen-Greene S, Chien WM, Cearley JA, Jackson WS, Crouse AB, Ren S, Li XJ, Albin RL, Detloff PJ (2001) Neurological abnormalities in a knock-in mouse model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 10:137-144.
- Lindsten K, Dantuma NP (2003) Monitoring the ubiquitin/proteasome system in conformational diseases. *Ageing Res Rev* 2:433-449.
- Lindsten K, Menendez-Benito V, Masucci MG, Dantuma NP (2003) A transgenic mouse model of the ubiquitin/proteasome system. *Nat Biotechnol* 21:897-902.
- Liu Y, Fallon L, Lashuel HA, Liu Z, Lansbury PT, Jr. (2002) The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. *Cell* 111:209-218.
- Lowe J, Mayer RJ, Landon M (1993) Ubiquitin in neurodegenerative diseases. *Brain Pathol* 3:55-65.
- Mangiarini L, Sathasivam K, Seller M, Cozens B, Harper A, Hetherington C, Lawton M, Trottier Y, Lehrach H, Davies SW, Bates GP (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.
- Martin-Aparicio E, Yamamoto A, Hernandez F, Hen R, Avila J, Lucas JJ (2001) Proteasomal-dependent aggregate reversal and absence of cell death in a conditional mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci* 21:8772-8781.
- Martin JJ, Van Regemorter N, Krols L, Brucher JM, de Barsey T, Szliwowski H, Evrard P, Ceuterick C, Tassinon MJ, Smet-Dieleman H, et al. (1994) On an autosomal dominant form of retinal-cerebellar degeneration: an autopsy study of five patients in one family. *Acta Neuropathol* 88:277-286.
- Mayford M, Bach ME, Huang YY, Wang L, Hawkins RD, Kandel ER (1996) Control of memory formation through regulated expression of a CaMKII transgene. *Science* 274:1678-1683.
- Maynard CJ, Bottcher C, Ortega Z, Smith R, Florea BI, Diaz-Hernandez M, Brundin P, Overkleeft HS, Li JY, Lucas JJ, Dantuma NP (2009) Accumulation of ubiquitin conjugates in a polyglutamine disease model occurs without global

- ubiquitin/proteasome system impairment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:13986-13991.
- Menalled LB, Sison JD, Dragatsis I, Zeitlin S, Chesselet MF (2003) Time course of early motor and neuropathological anomalies in a knock-in mouse model of Huntington's disease with 140 CAG repeats. *J Comp Neurol* 465:11-26.
- Menendez-Benito V, Verhoef LG, Masucci MG, Dantuma NP (2005) Endoplasmic reticulum stress compromises the ubiquitin-proteasome system. *Hum Mol Genet* 14:2787-2799.
- Mitra S, Tsvetkov AS, Finkbeiner S (2009) Single neuron ubiquitin-proteasome dynamics accompanying inclusion body formation in huntington disease. *J Biol Chem* 284:4398-4403.
- Muchowski PJ, Ning K, D'Souza-Schorey C, Fields S (2002) Requirement of an intact microtubule cytoskeleton for aggregation and inclusion body formation by a mutant huntingtin fragment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:727-732.
- Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335-350.
- Nagai Y, Inui T, Popiel HA, Fujikake N, Hasegawa K, Urade Y, Goto Y, Naiki H, Toda T (2007) A toxic monomeric conformer of the polyglutamine protein. *Nat Struct Mol Biol* 14:332-340.
- Naito H, Oyanagi S (1982) Familial myoclonus epilepsy and choreoathetosis: hereditary dentatorubral-pallidolusian atrophy. *Neurology* 32:798-807.
- Nakamura K, Jeong SY, Uchihara T, Anno M, Nagashima K, Nagashima T, Ikeda S, Tsuji S, Kanazawa I (2001) SCA17, a novel autosomal dominant cerebellar ataxia caused by an expanded polyglutamine in TATA-binding protein. *Hum Mol Genet* 10:1441-1448.
- Nasir J, Floresco SB, O'Kusky JR, Diewert VM, Richman JM, Zeisler J, Borowski A, Marth JD, Phillips AG, Hayden MR (1995) Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes. *Cell* 81:811-823.
- Neefjes J, Dantuma NP (2004) Fluorescent probes for proteolysis: tools for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 3:58-69.
- Nicola SM (2007) The nucleus accumbens as part of a basal ganglia action selection circuit. *Psychopharmacology (Berl)* 191:521-550.
- Ortega Z, Diaz-Hernandez M, Lucas JJ (2007) Is the ubiquitin-proteasome system impaired in Huntington's disease? *Cell Mol Life Sci* 64:2245-2257.
- Oyanagi K, Aoki K, Morita T, Igarashi S, Inuzuka T, Horikawa Y (1996) Disaggregation of polyribosomes in the spinal anterior horn cells in a patient with X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Acta Neuropathol* 91:444-447.
- Packard MG, Knowlton BJ (2002) Learning and memory functions of the Basal Ganglia. *Annu Rev Neurosci* 25:563-593.
- Paulsen JS, Ready RE, Hamilton JM, Mega MS, Cummings JL (2001) Neuropsychiatric aspects of Huntington's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 71:310-314.
- Paulson HL, Perez MK, Trotter Y, Trojanowski JQ, Subramony SH, Das SS, Vig P, Mandel JL, Fischbeck KH, Pittman RN (1997) Intranuclear inclusions of expanded polyglutamine protein in spinocerebellar ataxia type 3. *Neuron* 19:333-344.
- Paz Gavilan M, Vela J, Castano A, Ramos B, del Rio JC, Vitorica J, Ruano D (2006) Cellular environment facilitates protein accumulation in aged rat hippocampus. *Neurobiol Aging* 27:973-982.

- Peng J, Schwartz D, Elias JE, Thoreen CC, Cheng D, Marsischky G, Roelofs J, Finley D, Gygi SP (2003) A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotechnol* 21:921-926.
- Perutz M (1994) Polar zippers: their role in human disease. *Protein Sci* 3:1629-1637.
- Perutz MF (1996) Glutamine repeats and inherited neurodegenerative diseases: molecular aspects. *Curr Opin Struct Biol* 6:848-858.
- Pickart CM (2001) Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 70:503-533.
- Poirier MA, Li H, Macosko J, Cai S, Amzel M, Ross CA (2002) Huntingtin spheroids and protofibrils as precursors in polyglutamine fibrilization. *J Biol Chem* 277:41032-41037.
- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL (1997) Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276:2045-2047.
- Poppek D, Grune T (2006) Proteasomal defense of oxidative protein modifications. *Antioxid Redox Signal* 8:173-184.
- Pratt G, Rechsteiner M (2008) Proteasomes cleave at multiple sites within polyglutamine tracts: activation by PA28gamma(K188E). *J Biol Chem* 283:12919-12925.
- Rechsteiner M, Hill CP (2005) Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors. *Trends Cell Biol* 15:27-33.
- Reiner A, Albin RL, Anderson KD, D'Amato CJ, Penney JB, Young AB (1988) Differential loss of striatal projection neurons in Huntington disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:5733-5737.
- Roos RA, Hermans J, Vegter-van der Vlis M, van Ommen GJ, Bruyn GW (1993) Duration of illness in Huntington's disease is not related to age at onset. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 56:98-100.
- Ross CA (2002) Polyglutamine pathogenesis: emergence of unifying mechanisms for Huntington's disease and related disorders. *Neuron* 35:819-822.
- Ross CA, Poirier MA (2004) Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med* 10 Suppl:S10-17.
- Rubinsztein DC, Amos W, Leggo J, Goodburn S, Ramesar RS, Old J, Bontrop R, McMahon R, Barton DE, Ferguson-Smith MA (1994) Mutational bias provides a model for the evolution of Huntington's disease and predicts a general increase in disease prevalence. *Nat Genet* 7:525-530.
- Rubio I, Rodriguez-Navarro JA, Tomas-Zapico C, Ruiz C, Casarejos MJ, Perucho J, Gomez A, Rodal I, Lucas JJ, Mena MA, de Yébenes JG (2009) Effects of partial suppression of parkin on huntingtin mutant R6/1 mice. *Brain Res* 1281:91-100.
- Saigoh K, Wang YL, Suh JG, Yamanishi T, Sakai Y, Kiyosawa H, Harada T, Ichihara N, Wakana S, Kikuchi T, Wada K (1999) Intragenic deletion in the gene encoding ubiquitin carboxy-terminal hydrolase in gad mice. *Nat Genet* 23:47-51.
- Sakata E, Yamaguchi Y, Kurimoto E, Kikuchi J, Yokoyama S, Yamada S, Kawahara H, Yokosawa H, Hattori N, Mizuno Y, Tanaka K, Kato K (2003) Parkin binds the Rpn10 subunit of 26S proteasomes through its ubiquitin-like domain. *EMBO Rep* 4:301-306.
- Sambrook J, Fritsch, E. f., y Maniatis, T. (1989a) *Molecular cloning: a laboratory manual*. (Editor, eds) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sambrook J, Fritsch, E.F., y Maniatis, T. (1989b) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

- Sapp E, Schwarz C, Chase K, Bhide PG, Young AB, Penney J, Vonsattel JP, Aronin N, DiFiglia M (1997) Huntingtin localization in brains of normal and Huntington's disease patients. *Ann Neurol* 42:604-612.
- Saudou F, Finkbeiner S, Devys D, Greenberg ME (1998) Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell* 95:55-66.
- Scherzinger E, Lurz R, Turmaine M, Mangiarini L, Hollenbach B, Hasenbank R, Bates GP, Davies SW, Lehrach H, Wanker EE (1997) Huntingtin-encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates in vitro and in vivo. *Cell* 90:549-558.
- Schiefer J, Landwehrmeyer GB, Luesse HG, Sprunken A, Puls C, Milkereit A, Milkereit E, Kosinski CM (2002) Riluzole prolongs survival time and alters nuclear inclusion formation in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Mov Disord* 17:748-757.
- Schmidt T, Landwehrmeyer GB, Schmitt I, Trottier Y, Auburger G, Laccone F, Klockgether T, Volpel M, Epplen JT, Schols L, Riess O (1998) An isoform of ataxin-3 accumulates in the nucleus of neuronal cells in affected brain regions of SCA3 patients. *Brain Pathol* 8:669-679.
- Schmitt HP (2006) Protein ubiquitination, degradation and the proteasome in neurodegenerative disorders: no clear evidence for a significant pathogenetic role of proteasome failure in Alzheimer disease and related disorders. *Med Hypotheses* 67:311-317.
- Seo H, Sonntag KC, Isacson O (2004) Generalized brain and skin proteasome inhibition in Huntington's disease. *Ann Neurol* 56:319-328.
- Seo H, Kim W, Isacson O (2008) Compensatory changes in the ubiquitin-proteasome system, brain-derived neurotrophic factor and mitochondrial complex II/III in YAC72 and R6/2 transgenic mice partially model Huntington's disease patients. *Hum Mol Genet* 17:3144-3153.
- Sherman MY, Goldberg AL (2001) Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. *Neuron* 29:15-32.
- Shibatani T, Carlson EJ, Larabee F, McCormack AL, Fruh K, Skach WR (2006) Global organization and function of mammalian cytosolic proteasome pools: Implications for PA28 and 19S regulatory complexes. *Mol Biol Cell* 17:4962-4971.
- Shimura H, Schlossmacher MG, Hattori N, Frosch MP, Trockenbacher A, Schneider R, Mizuno Y, Kosik KS, Selkoe DJ (2001) Ubiquitination of a new form of alpha-synuclein by parkin from human brain: implications for Parkinson's disease. *Science* 293:263-269.
- Silkis I (2001) The cortico-basal ganglia-thalamocortical circuit with synaptic plasticity. II. Mechanism of synergistic modulation of thalamic activity via the direct and indirect pathways through the basal ganglia. *Biosystems* 59:7-14.
- Smith DM, Chang SC, Park S, Finley D, Cheng Y, Goldberg AL (2007) Docking of the proteasomal ATPases' carboxyl termini in the 20S proteasome's alpha ring opens the gate for substrate entry. *Mol Cell* 27:731-744.
- Sobue G, Hashizume Y, Mukai E, Hirayama M, Mitsuma T, Takahashi A (1989) X-linked recessive bulbospinal neuronopathy. A clinicopathological study. *Brain* 112 (Pt 1):209-232.
- Srivastava T, Lal V, Prabhakar S (1999) Juvenile Huntington's disease. *Neurol India* 47:340-341.

- Stack JH, Whitney M, Rodems SM, Pollok BA (2000) A ubiquitin-based tagging system for controlled modulation of protein stability. *Nat Biotechnol* 18:1298-1302.
- Storey E, Beal MF (1993) Neurochemical substrates of rigidity and chorea in Huntington's disease. *Brain* 116 (Pt 5):1201-1222.
- Strong TV, Tagle DA, Valdes JM, Elmer LW, Boehm K, Swaroop M, Kaatz KW, Collins FS, Albin RL (1993) Widespread expression of the human and rat Huntington's disease gene in brain and nonneural tissues. *Nat Genet* 5:259-265.
- Takahashi T, Kikuchi S, Katada S, Nagai Y, Nishizawa M, Onodera O (2008) Soluble polyglutamine oligomers formed prior to inclusion body formation are cytotoxic. *Hum Mol Genet* 17:345-356.
- Takahashi Y, Okamoto Y, Popiel HA, Fujikake N, Toda T, Kinjo M, Nagai Y (2007) Detection of polyglutamine protein oligomers in cells by fluorescence correlation spectroscopy. *J Biol Chem* 282:24039-24048.
- Tanahashi N, Murakami Y, Minami Y, Shimbara N, Hendil KB, Tanaka K (2000) Hybrid proteasomes. Induction by interferon-gamma and contribution to ATP-dependent proteolysis. *J Biol Chem* 275:14336-14345.
- Tarpey PS, Raymond FL, O'Meara S, Edkins S, Teague J, Butler A, Dicks E, Stevens C, Tofts C, Avis T, Barthorpe S, Buck G, Cole J, Gray K, Halliday K, Harrison R, Hills K, Jenkinson A, Jones D, Menzies A, Mironenko T, Perry J, Raine K, Richardson D, Shepherd R, Small A, Varian J, West S, Widaa S, Mallya U, Moon J, Luo Y, Holder S, Smithson SF, Hurst JA, Clayton-Smith J, Kerr B, Boyle J, Shaw M, Vandeleur L, Rodriguez J, Slauch R, Easton DF, Wooster R, Bobrow M, Srivastava AK, Stevenson RE, Schwartz CE, Turner G, Gecz J, Futreal PA, Stratton MR, Partington M (2007) Mutations in CUL4B, which encodes a ubiquitin E3 ligase subunit, cause an X-linked mental retardation syndrome associated with aggressive outbursts, seizures, relative macrocephaly, central obesity, hypogonadism, pes cavus, and tremor. *Am J Hum Genet* 80:345-352.
- Tavakoli M (2002) Disease progression in amyotrophic lateral sclerosis. Identifying the cost-utility of riluzole by disease stage. *Eur J Health Econ* 3:156-165.
- The Huntington's disease collaborative research group (1993) A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell* 72:971-983.
- Thrower JS, Hoffman L, Rechsteiner M, Pickart CM (2000) Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J* 19:94-102.
- Tokui K, Adachi H, Waza M, Katsuno M, Minamiyama M, Doi H, Tanaka K, Hamazaki J, Murata S, Tanaka F, Sobue G (2009) 17-DMAG ameliorates polyglutamine-mediated motor neuron degeneration through well-preserved proteasome function in an SBMA model mouse. *Hum Mol Genet* 18:898-910.
- Toyoshima Y, Yamada M, Onodera O, Shimohata M, Inenaga C, Fujita N, Morita M, Tsuji S, Takahashi H (2004) SCA17 homozygote showing Huntington's disease-like phenotype. *Ann Neurol* 55:281-286.
- Trottier Y, Lutz Y, Stevanin G, Imbert G, Devys D, Cancel G, Saudou F, Weber C, David G, Tora L, et al. (1995) Polyglutamine expansion as a pathological epitope in Huntington's disease and four dominant cerebellar ataxias. *Nature* 378:403-406.
- Uchihara T, Takeda Y, Kobayashi T, Kasuga T, Ishikawa K, Kirei K, Mizusawa H, Endo T, Hirokawa K, Kuroiwa T (2006) Unexpected clinicopathological phenotype linked to small elongation of CAG repeat in SCA1 gene. *J Neurol* 253:396-398.

- Valente EM, Bentivoglio AR, Dixon PH, Ferraris A, Ialongo T, Frontali M, Albanese A, Wood NW (2001) Localization of a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, PARK6, on human chromosome 1p35-p36. *Am J Hum Genet* 68:895-900.
- Venkatraman P, Wetzel R, Tanaka M, Nukina N, Goldberg AL (2004) Eukaryotic proteasomes cannot digest polyglutamine sequences and release them during degradation of polyglutamine-containing proteins. *Mol Cell* 14:95-104.
- Voges D, Zwickl P, Baumeister W (1999) The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem* 68:1015-1068.
- von Coelln R, Dawson VL, Dawson TM (2004) Parkin-associated Parkinson's disease. *Cell Tissue Res* 318:175-184.
- Vonsattel JP, DiFiglia M (1998) Huntington disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 57:369-384.
- Vonsattel JP, Myers RH, Stevens TJ, Ferrante RJ, Bird ED, Richardson EP, Jr. (1985) Neuropathological classification of Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 44:559-577.
- Wacker JL, Zareie MH, Fong H, Sarikaya M, Muchowski PJ (2004) Hsp70 and Hsp40 attenuate formation of spherical and annular polyglutamine oligomers by partitioning monomer. *Nat Struct Mol Biol* 11:1215-1222.
- Waelter S, Boeddrich A, Lurz R, Scherzinger E, Lueder G, Lehrach H, Wanker EE (2001) Accumulation of mutant huntingtin fragments in aggresome-like inclusion bodies as a result of insufficient protein degradation. *Mol Biol Cell* 12:1393-1407.
- Wang J, Wang CE, Orr A, Tydlacka S, Li SH, Li XJ (2008) Impaired ubiquitin-proteasome system activity in the synapses of Huntington's disease mice. *J Cell Biol* 180:1177-1189.
- Wang Q, Li L, Ye Y (2006) Regulation of retrotranslocation by p97-associated deubiquitinating enzyme ataxin-3. *J Cell Biol* 174:963-971.
- Welchman RL, Gordon C, Mayer RJ (2005) Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:599-609.
- Wexler NS, Young AB, Tanzi RE, Travers H, Starosta-Rubinstein S, Penney JB, Snodgrass SR, Shoulson I, Gomez F, Ramos Arroyo MA, et al. (1987) Homozygotes for Huntington's disease. *Nature* 326:194-197.
- Wilson SM, Bhattacharyya B, Rachel RA, Coppola V, Tessarollo L, Householder DB, Fletcher CF, Miller RJ, Copeland NG, Jenkins NA (2002) Synaptic defects in ataxia mice result from a mutation in *Usp14*, encoding a ubiquitin-specific protease. *Nat Genet* 32:420-425.
- Xing S, Chen L, Chen X, Pei Z, Zeng J, Li J (2008) Excessive blinking as an initial manifestation of juvenile Huntington's disease. *Neurol Sci* 29:275-277.
- Yamada M, Tan CF, Inenaga C, Tsuji S, Takahashi H (2004) Sharing of polyglutamine localization by the neuronal nucleus and cytoplasm in CAG-repeat diseases. *Neuropathol Appl Neurobiol* 30:665-675.
- Yamada M, Wood JD, Shimohata T, Hayashi S, Tsuji S, Ross CA, Takahashi H (2001) Widespread occurrence of intranuclear atrophin-1 accumulation in the central nervous system neurons of patients with dentatorubral-pallidoluysian atrophy. *Ann Neurol* 49:14-23.
- Yamamoto A, Lucas JJ, Hen R (2000) Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a conditional model of Huntington's disease. *Cell* 101:57-66.
- Yang W, Dunlap JR, Andrews RB, Wetzel R (2002) Aggregated polyglutamine peptides delivered to nuclei are toxic to mammalian cells. *Hum Mol Genet* 11:2905-2917.

- Zeitlin S, Liu JP, Chapman DL, Papaioannou VE, Efstratiadis A (1995) Increased apoptosis and early embryonic lethality in mice nullizygous for the Huntington's disease gene homologue. *Nat Genet* 11:155-163.
- Zenker M, Mayerle J, Lerch MM, Tagariello A, Zerres K, Durie PR, Beier M, Hulskamp G, Guzman C, Rehder H, Beemer FA, Hamel B, Vanlieferinghen P, Gershoni-Baruch R, Vieira MW, Domic M, Auslender R, Gil-da-Silva-Lopes VL, Steinlicht S, Rauh M, Shalev SA, Thiel C, Ekici AB, Winterpacht A, Kwon YT, Varshavsky A, Reis A (2005) Deficiency of UBR1, a ubiquitin ligase of the N-end rule pathway, causes pancreatic dysfunction, malformations and mental retardation (Johanson-Blizzard syndrome). *Nat Genet* 37:1345-1350.
- Zhou H, Cao F, Wang Z, Yu ZX, Nguyen HP, Evans J, Li SH, Li XJ (2003) Huntingtin forms toxic NH₂-terminal fragment complexes that are promoted by the age-dependent decrease in proteasome activity. *J Cell Biol* 163:109-118.
- Zhuchenko O, Bailey J, Bonnen P, Ashizawa T, Stockton DW, Amos C, Dobyns WB, Subramony SH, Zoghbi HY, Lee CC (1997) Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the alpha 1A-voltage-dependent calcium channel. *Nat Genet* 15:62-69.
- Zoghbi HY, Orr HT (2000) Glutamine repeats and neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci* 23:217-247.

IX. ANEXO

RELACIÓN DE PUBLICACIONES DE LA DOCTORANDA

Artículos (se adjunta copia de cada uno en el Anexo):

Valera, A.G., Díaz-Hernández, M., **Ortega, Z.**, Hernández, F., and Lucas, J.J. (2005). The ubiquitin-proteasome System in Huntington´s disease. *The Neuroscientist* 11:583-94

Ortega, Z., Díaz-Hernández, M., Lucas, JJ. (2007). Is the ubiquitin-proteasome system impaired in Huntington´s disease?. *Cellular and Molecular Life Science* 64 (17):2245-57

Maynard, C.J.; Böttcher, C.; **Ortega,Z.**; Smith, R.; Florea, B.I.; Brundin, P.; Overkleeft, H.S.; Li, Y., Lucas, J.J.; Dantuma, N.P.(2009). Accumulation of Polyubiquitylated Proteins in Huntington´s disease mice is not a consequence of global impairment of the ubiquitin-proteasome system. *PNAS* 106(33):13986-91.

Ortega, Z., Díaz-Hernández, M., Maynard, C.J., Hernández, F., Dantuma, NP., and Lucas, JJ. Acute polyglutamine expression in inducible mouse model unravels ubiquitin/proteasome system impairment and permanent recovery due to aggregate formation”. *The Journal of Neuroscience*. (Aceptado a falta de pequeñas modificaciones)

Capítulos de libro:

Lucas, JJ.,**Ortega, Z.** (2009). Modelos animals de enfermedades neurodegenerativas: ejemplo de la enfermedad de Huntington. In: *Monografía Avances en neuronciencia: Neurotransmisores y patologías nerviosas*. M^a Teresa Miras Portugal and Antonio Rodriguez Artalejo Eds. Real Academia Nacional de Farmacia INSDE. pp:237-72

Ortega, Z., Gabandé, E., Lucas, JJ. In press Modelos animales de la EH. In: *Enfermedad de Huntington. Claves y respuestas para un desafío singular*. Dres. López del Val y Burguera Eds. Editorial Médica Panamericana.

