

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

TESIS DOCTORAL

**NEUROPROTECCIÓN FRENTE A LA
DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL MEDIANTE
TRANSFERENCIA GÉNICA CON VECTORES
HERPESVIRALES**

Alfredo Giménez-Cassina Sendón
Madrid, 2006

Memoria de Investigación presentada por
Alfredo Giménez-Cassina Sendón
Para optar al grado de
Doctor en Ciencias
por la Universidad Autónoma de Madrid

Trabajo dirigido por el
Dr. Javier Díaz Nido
Profesor Titular del Departamento de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la
Universidad Autónoma de Madrid



Javier Díaz Nido, Profesor Titular del Departamento de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid

INFORMA:

Que la presente Tesis Doctoral, titulada “*Neuroprotección frente a la disfunción mitocondrial mediante transferencia génica con vectores herpesvirales*” ha sido realizada bajo mi dirección por Alfredo Giménez-Cassina Sendón, estimando que se encuentra concluida y en condiciones de ser presentada y defendida públicamente para optar al grado de Doctor.

Y para que conste, firmo la presente autorización en Madrid a 1 de Junio de 2006

Departamento de Biología Molecular
Universidad Autónoma de Madrid
Campus de Cantoblanco
Madrid E-28049 - SPAIN

Tlf: +34 91 497 8710
Fax: +34 91 497 4799

e-mail: javier.diaznido@uam.es

Alfredo Giménez-Cassina ha recibido financiación del Ministerio de Educación y Ciencia dentro del programa de Formación de Personal Universitario (FPU AP2002-2446). Parte del trabajo presentado ha sido realizado durante una estancia en el laboratorio del Dr. Richard Wade-Martins, en *The Wellcome Trust Centre for Human Genetics* (Universidad de Oxford, Oxford, Reino Unido). El trabajo del laboratorio ha sido financiado en parte por el Ministerio de Educación y Ciencia (SAF 2003-06782) y el Ministerio de Sanidad (Red Española de Ataxias G03/056 y Fondo de Investigación Sanitaria PI051167).

A mi familia

Es mucha la gente que de alguna forma u otra ha contribuido a esta tesis; no hay palabras suficientes para expresarlo, en cualquier caso espero no dejar a nadie fuera...

En primer lugar, mi más profundo agradecimiento a Javier, por acogerme en su grupo cuando era aún estudiante, y por su confianza y apoyo constantes desde el primer momento en que puse un pie en el laboratorio, enseñándome con paciencia. Todo este tiempo ha sido, y sigue siendo, un auténtico lujo poder aprender de alguien así, un gran científico y, sobre todo, una gran persona. Por todo esto y mucho más, ¡gracias!

Gracias a Paco Moreno, por compartir su espacio con nosotros y por tener siempre buena cara y una palabra amable. También he tenido la suerte de tener cerca a alguien como Paco Wandosell, con quien puedes tener conversaciones de todo tipo, tanto científicas como de cualquier otra índole.

A lo largo de estos años he ido haciendo grandes amigos. Con Marta y Érika, aunque ya no estén en el laboratorio, he pasado y sigo pasando muy buenos momentos. En cierto modo han sido como mis "hermanas mayores" en el laboratorio, enseñando, ayudando y, sobre todo, cuidándome. Chus es una persona muy especial, echando una mano siempre que puede, enseñándome día a día y aguantándome con la mejor de sus sonrisas. Con Gloria sabes que puedes contar para cualquier cosa. Isma y Miguel han sido también un apoyo constante, junto con Fiti, con una paciencia heroica y con un sentido del humor inigualable; además de ser, junto con Gloria y Alberto, los mejores compañeros de cañas.

Y mucha más gente... Algunos han estado desde el principio, como Mayte, con quien siempre es un placer y un privilegio trabajar; Filip, cuya ayuda ha sido fundamental de principio a fin; o Diana, con quien siempre es agradable poder tener una conversación. Otros han ido llegando más tarde al laboratorio. He tenido la suerte de conocer a Inés, que siempre está dispuesta a escucharte y a dar buenos consejos sin importar cómo seamos de pesados o escandalosos. Y Lara, mi compañera de adicciones, que aunque entró tarde en el labo, en realidad siempre estuvo desde el principio. Y también Ana, Maite, Christina, Toñi...

Con la gente del laboratorio de Jesús Ávila también ha habido una relación muy estrecha, y muy buena. Mar, Elena, Alberto, Raquel G., Raquel C., Paloma, Ali, Santi, Félix, José... Y también con la gente de otros laboratorios, en especial el 201, con Ali, Sandra, Carlota, Helena, Antonio... ¡y las "jefas", claro! Y más gente: Vega, Ricardo, Esteban, Álvaro, Ruth...

En definitiva, que hay mucha gente del CBM que, en mayor o menor medida, me ha ayudado mucho a lo largo de estos años. También hay gente de otros centros que ha contribuido, como Mayte y Raúl, "culpables" en parte de todo esto (¡gracias!), o la gente de los grupos de Richard Wade-Martins y Anthony Monaco, en cuyos laboratorios pasé siete meses inolvidables.

Como también hay vida fuera del laboratorio, también tengo mucho que agradecer a mis amigos. Quico y María han sido un pilar fundamental todo este tiempo, grandes amigos con los que contar en todo momento. Como también lo han sido Pepe, María, Ignacio, Javi, Rafa, Santi, Elisa, Rosa, Bea, María...

Y por último, pero no por ello menos importante, un agradecimiento muy especial a mi familia. En especial a mis padres, Luis y Maite, por su apoyo y generosidad en todo momento, y a quienes he tenido la suerte de tener como ejemplo. Y mis hermanos, Luis y Marta (y mis hermanos "adoptivos", Cristina y Javier, también, ¡claro!). Y a mis sobrinos, que ayudan mucho a olvidarse de todo lo malo. Y a todos los demás... (¡pero somos muchos, no os puedo poner a todos!)

En definitiva,

Gracias

Índice

I. ABREVIATURAS	12
II. SUMMARY	15
III. INTRODUCCIÓN	17
1. Introducción a las enfermedades neurodegenerativas	18
1.1. Factores que afectan a la aparición de enfermedades neurodegenerativas	19
<i>Envejecimiento</i>	19
<i>Factores ambientales</i>	19
<i>Factores genéticos</i>	20
1.2. Dos ejemplos de enfermedades neurodegenerativas	21
<i>Enfermedad de Parkinson</i>	21
<i>Ataxia de Friedreich. Frataxina</i>	23
2. Mecanismos de muerte celular	26
<i>Muerte celular</i>	26
<i>La mitocondria en la muerte celular programada</i>	27
<i>La superfamilia de proteínas Bcl-2 y la permeabilidad mitocondrial</i>	29
<i>El comienzo de la cascada de muerte celular: señalización pro-apoptótica. El papel de la enzima glucógeno sintasa quinasa-3 (GSK-3)</i>	31
<i>Modelos de toxicidad mitocondrial. El modelo de rotenona</i>	35
3. Estrategias de Neuroprotección	36
<i>Bloqueo de eventos generales durante la neurodegeneración</i>	36
<i>Estimulación de la supervivencia</i>	38
<i>Tratamientos específicos</i>	39
4. Transferencia génica. Terapia genica	39
<i>Transferencia génica. Empleo de vectores virales</i>	39
<i>Vectores herpesvirales derivados del virus Herpes Simplex tipo 1 (HSV-1)</i>	41
IV. OBJETIVOS	45
V. MATERIALES Y MÉTODOS	47
1. Materiales y reactivos	48
2. Cultivos celulares	48
2.1. Cultivos de líneas celulares	48
2.2. Diferenciación del neuroblastoma humano SH-SY5Y	48
2.3. Cultivos primarios	49
<i>Neuronas de bulbo raquídeo de ratón</i>	49
<i>Neuronas de corteza cerebral de ratón</i>	49
<i>Cultivos mixtos de neuronas de cerebelo de ratón enriquecidos en células de Purkinje</i>	49
2.4. Empaquetamiento y titulación de vectores derivados de HSV-1	50
<i>Sistema dependiente de virus auxiliar</i>	50
<i>Sistema libre de virus auxiliar</i>	50
<i>Titulación</i>	51
2.5. Tratamientos	51

3. Análisis de proteínas por electrotransferencia e inmunodetección (<i>western-blot</i>)	51
4. Fraccionamiento subcelular	53
5. Tinción inmunocitoquímica	53
6. Ensayos de actividad β-galactosidasa	55
<i>Tinción X-Gal</i>	55
<i>Actividad β-galactosidasa</i>	55
7. Ensayos de viabilidad celular	55
<i>Incorporación de calceína y yoduro de propidio</i>	55
<i>Análisis de la fragmentación del DNA nuclear (TUNEL)</i>	56
8. Medida del potencial de membrana mitocondrial	56
9. Ensayo enzimático de inmunoadsorción (ELISA)	56
10. Determinación de lactato en medio de cultivo	57
11. Diseño y construcción de vectores de expresión	57
<i>Preparación de células electrocompetentes y electroporación</i>	58
<i>Clonaje de pHG/pEHHG-FRDA</i>	59
<i>Clonaje de los cassettes Luc/Kan y LacZ/Kan</i>	59
<i>Generación de brazos de homología y recombinación homóloga</i>	59
12. Extracción de RNA de células en cultivo	61
<i>Extracción con TriZOL</i>	61
<i>Extracción en columna</i>	61
13. Retrotranscripción y PCR	61
<i>Retrotranscripción – Síntesis de primera cadena</i>	61
<i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i>	61
<i>RT-PCR a tiempo real</i>	62
14. Análisis transcriptómico a gran escala: <i>Microarrays</i>	62
VI. RESULTADOS	64
1. Establecimiento y caracterización de modelos celulares	65
1.1. Cultivos de células similares a neuronas humanas obtenidas mediante la diferenciación del neuroblastoma SH-SY5Y	65
<i>Adquisición de fenotipo neuronal</i>	65
<i>Transducción génica con vectores de HSV-1: estudios de toxicidad</i>	67
<i>Eficiencia de transducción génica con vectores de HSV-1. Mecanismos moleculares subyacentes</i>	68
<i>Persistencia de la expresión génica en las células transducidas con vectores de HSV-1</i>	72
1.2. Cultivos primarios de ratón	72
1.2.1. Cultivos primarios de neuronas de bulbo raquídeo murino	73
<i>Caracterización fenotípica</i>	73
<i>Eficiencia de transducción con vectores de HSV-1. Persistencia</i>	74
1.2.2. Cultivos primarios de células de cerebelo enriquecidos en neuronas de Purkinje	75
<i>Caracterización fenotípica</i>	76
<i>Eficiencia de transducción con vectores de HSV-1. Persistencia</i>	76
2. Efecto neuroprotector de la inhibición crónica de la glucógeno sintasa quinasa-3 (GSK-3) frente a la disfunción mitocondrial	79
2.1. Caracterización de la expresión de vectores de HSV-1 de GSK-3	79

<i>Caracterización bioquímica e inmunocitoquímica de la expresión del mutante dominante negativo de GSK-3β</i>	79
<i>Validación funcional del dominante negativo K85R de GSK-3β: Protección frente a inhibición de PI3-K</i>	81
2.2. Efecto neuroprotector de la inhibición crónica de GSK-3 sobre la muerte celular inducida por disfunción mitocondrial	83
<i>Efecto protector de los fármacos inhibidores de la GSK-3 frente a la muerte celular inducida por rotenona</i>	84
<i>Efecto neuroprotector de la expresión del dominante negativo de GSK-3β, K85R, frente a la disfunción mitocondrial</i>	84
<i>La inhibición de GSK-3 bloquea parcialmente la apoptosis inducida por rotenona en células SH-SY5Y diferenciadas</i>	88
2.3. Mecanismos moleculares de neuroprotección por inhibición crónica de GSK-3	91
<i>Ausencia de implicación de la pentraxina neuronal en la muerte celular inducida por rotenona</i>	91
<i>Ausencia de cambios significativos en los niveles de proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2</i>	92
<i>Aumento en la producción de lactato tras la inhibición crónica de GSK-3</i>	93
<i>La inhibición de glucólisis abroga la protección frente a rotenona por inhibición crónica de la GSK-3</i>	94
<i>Aumento en la localización en la membrana plasmática de los transportadores de glucosa tras la inhibición crónica de la GSK-3</i>	94
<i>Cambios en la distribución subcelular de la Hexoquinasa II (HKII) tras inhibición crónica de GSK-3: translocación a la mitocondria</i>	97
<i>La inhibición crónica de GSK-3 conduce a un aumento en la secreción de BDNF al medio extracelular</i>	100
<i>El efecto neuroprotector de la inhibición crónica de GSK-3 está parcialmente mediado por BDNF</i>	101
<i>Análisis de cambios en la expresión génica tras la inhibición crónica de GSK-3</i>	103
3. Efecto neuroprotector de la frataxina frente a la disfunción mitocondrial	105
3.1. Generación y validación funcional de vectores genómicos de frataxina	105
<i>Estrategia de clonaje</i>	105
<i>Identificación del clon. Reajuste de tamaño del inserto</i>	107
<i>“Retrofitting” – Recombinación específica de sitios LoxP mediada por la recombinasa CRE</i>	108
<i>Expresión de frataxina humana en células de ratón transducidas con pHG-FRDA y pEHHG-FRDA</i>	109
<i>Protección frente a rotenona por expresión de frataxina</i>	110
3.2. Generación y validación funcional de vectores reporteros de expresión de frataxina	111
<i>Diseño y construcción de un vector reportero de expresión de frataxina</i>	111
<i>Aplicaciones de los vectores reporteros: estudios de cinética de expresión y de compuestos que afectan a la actividad del promotor</i>	114
VII. DISCUSIÓN	117
<i>Desarrollo de modelos celulares</i>	118

<i>Disfunción mitocondrial inducida por rotenona</i>	119
<i>Protección por inhibición de GSK-3: buscando mecanismos neuroprotectores</i>	120
Proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2	
Metabolismo glucolítico	
Acción del BDNF	
Análisis de la expresión génica. Estudios de transcriptómica	
Modelo integrado hipotético de neuroprotección	
<i>Neuroprotección frente a la disfunción mitocondrial por expresión de frataxina</i>	129
Construcción de vectores genómicos	
Protección frente a rotenona por expresión de frataxina	
<i>Generación y aplicaciones de vectores genómicos reporteros</i>	132
<i>Concluyendo...</i>	133
VIII. CONCLUSIONES	134
IX. BIBLIOGRAFÍA	136
X. ANEXO I. Material suplementario	162
XI. ANEXO II. Publicaciones	168

Abreviaturas

2-DGlc: 2-Desoxiglucosa
AAV: *Adeno-associated Virus* / Virus adenoasociado
AIF: *Apoptosis Inducing Factor* / Factor inductor de apoptosis
Ara-C: 1- β -D-arabinofuranosilcitosina
 β -Gal: β -Galactosidasa
BAC: *Bacterial Artificial Chromosome* / Cromosoma artificial de bacteria
BDNF: *Brain-Derived Neurotrophic Factor* / Factor neurotrófico
BrdU: Bromodesoxiuridina
BSA: *Bovine Serum Albumin* / Albúmina de suero bovino
Cdk: *Cyclin-dependent kinase* / Quinasa dependiente de ciclina
cDNA: *Complementary DNA* / DNA complementario
dbcAMP: Dibutiril-adenosina monofosfato cíclico
DIV: Días *in vitro*
DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium* / Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO: Dimetilsulfóxido
DNA: *Deoxyribonucleic acid* / Ácido desoxirribonucleico
ELISA: *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* / Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima
FBS: *Fetal Bovine Serum* / Suero bovino fetal
GAPDH: *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* / Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GDNF: *Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor* / Factor neurotrófico derivado de línea celular glial
GFAP: *Glial Fibrillary Acidic Protein* / Proteína fibrilar ácida de la glía
GFP: *Green Fluorescent Protein* / Proteína fluorescente verde
GLUT(1-3): *Glucose Transporter (1-3)* / Transportador de glucosa (1-3)
GSK-3: *Glycogen Synthase Kinase-3* / Glucógeno sintasa quinasa-3
HBSS: *Hank's Balanced Salt Solution* / Solución salina equilibrada de Hank
hEPO: Eritropoyetina humana
HK(I-II): *Hexokinase (I-II)* / Hexoquinasa (I-II)
HSV-1: *Herpes Simplex Virus type 1* / Virus Herpes Simple tipo 1
HVEM: *Herpes Virus-Entry Mediator* / Mediador de entrada de herpesvirus
ICP(0-27): *Infected Cell Polypeptide (0-27)* / Polipéptido de la célula infectada (0-27)
IE(2-3): *Immediate Early gene (2-3)* / Gen inmediatamente temprano (2-3)
IGF-1: *Insulin-like Growth Factor-1* / Factor de crecimiento similar a la insulina-1
ISC: *Iron-Sulfur Cluster* / Complejos de hierro-azufre
MAP: *Microtubule-associated protein* / proteína asociada a microtúbulos
MAPK: *Mitogen-activated protein kinase* / Proteína quinasa activada por mitógenos
MEM: *Minimal Essential Medium* / Medio mínimo esencial
MOI: *Multiplicity Of Infection* / Multiplicidad de infección
MPP⁺: *1-methyl-4-phenylpyridinium* / 1-metil-4-fenilpiridinio
MPTP: *1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine* / 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropirina
NGF: *Nerve Growth Factor* / Factor de crecimiento nervioso
Nrf-2: *Nuclear factor E2-Related Factor-2* / Factor relacionado con factor nuclear E2-2
NP-1: *Neuronal Pentraxin 1* / Pentraxina neuronal 1
PAC: *P1-Derived Artificial Chromosome* / Cromosoma artificial derivado del plásmido P1
PBS: *Phosphate-buffered saline* / Solución salina de fosfato tamponada
PCR: *Polymerase Chain Reaction* / Reacción en cadena de la polimerasa
PI3-K: *Phosphatidyl-Inositol-3-kinase* / Quinasa de fosfatidil-inositol-3

PKB: *Protein Kinase B* / Proteína quinasa B

RNA: *Ribonucleic acid* / Ácido ribonucleico

ROS: *Reactive Oxygen Species* / Especies reactivas de oxígeno

TrkB: *Tropomyosin related kinase B* / Quinasa B similar a la tropomiosina

TUNEL: *Terminal deoxyribonucleotidyl transferase mediated dUTP Nick End Labeling* / Marcaje de los extremos de las roturas con dUTP por medio de la desoxirribonucleotidil transferasa terminal

VDAC: *Voltage-Dependent Anion Channel* / Canal de aniones dependiente de voltaje

Summary

Mitochondrial dysfunction is typical of most neurodegenerative disorders and is considered a major contributor to neuronal cell degeneration although the ultimate causes for neurological diseases and mitochondrial dysfunction are diverse. In this work we have tried to counteract mitochondrial dysfunction through different approaches based upon gene transfer by HSV-1 vectors as a possible way to ameliorate neurodegeneration.

First, we have established neuronal cell culture model systems to perform functional studies on neurodegeneration and neuroprotection. Thus, we have employed rotenone to elicit mitochondrial dysfunction. Rotenone triggers apoptosis in cultured mammalian neurons through inhibition of mitochondrial complex I and constitutes an interesting experimental model system to monitor the influence of mitochondrial dysfunction on neurodegeneration.

Second, we have studied the effect of modulating Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3) activity on rotenone toxicity, since GSK-3 is a kinase involved in the modulation of several cell processes including apoptosis. We have demonstrated that chronic, but not acute, inhibition of GSK-3 by either the expression of a dominant-negative mutant (K85R) form of GSK-3 β or the treatment with chemical inhibitors of GSK-3 protects against rotenone-induced apoptosis both in human neuron-like cells and mouse brainstem primary neurons. In order to gain insight into the molecular mechanisms underlying this neuroprotective effect, we have tested for different possibilities. We have shown that GSK-3 inhibition results in increased glucose consumption by glycolysis. Moreover, neuroprotection induced by GSK-3 inhibition is abolished by blockade of glycolysis. Interestingly, chronic inhibition of GSK-3 elicited changes in subcellular localisation of some glycolytic-related proteins. After chronic inhibition of GSK-3, Hexokinase II (HKII) localizes to mitochondria, and Glucose Transporter-3 (GLUT-3) translocates to the plasma membrane. Thus, chronic inhibition of GSK-3 appears to protect neurons against mitochondrial dysfunction-induced cell death by eliciting changes in cell metabolism which include an increase in glycolytic rate to overcome the energetic depletion. Moreover, the translocation of HKII to mitochondria might additionally have an anti-apoptotic role by modulating the permeability of the mitochondrial membrane. Additionally, our results also demonstrate that chronic inhibition of GSK-3 may result in a significant increase in Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) production and subsequent secretion to the extracellular environment. Interfering with BDNF receptor TrkB signaling partially abrogated neuroprotection against rotenone-induced cell death evoked by chronic inhibition of GSK-3.

Third, we have set out to develop another approach of neuroprotection against rotenone-triggered mitochondrial dysfunction by expressing frataxin, a mitochondrial protein involved in the regulation of iron metabolism and oxidative phosphorylation, among other functions. We have designed and generated frataxin genomic loci-encoding vectors and have tested for their expression in different cell types. Furthermore, we have studied frataxin expression effects on rotenone-elicited neurotoxicity, demonstrating that frataxin expression may protect neuronal cells against mitochondrial dysfunction-induced neuronal death.

Finally, we have also designed viral vectors that may report changes in frataxin promoter activity upon different conditions or throughout time. We show that erythropoietin treatment robustly increases frataxin promoter activity in human neuron-like cells.

In summary, this work demonstrates the feasibility of gene transfer into neuronal cells by HSV-1 vectors to develop novel neuroprotective strategies against mitochondrial dysfunction-induced cell death.

Introducción

1. INTRODUCCIÓN A LAS ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

Existen numerosas enfermedades neurodegenerativas, caracterizadas por la progresiva atrofia o muerte selectiva de determinadas poblaciones neuronales, lo cual lleva a la interrupción de circuitos neuronales específicos y, en consecuencia, a la aparición de distintos déficits neurológicos, manifestándose a través de diversos síntomas (Przedborski *et al.*, 2003).

Se han buscado elementos comunes, a nivel molecular y celular, entre las distintas patologías neurodegenerativas, como pueden ser la acumulación progresiva de daños en la célula (Barnham *et al.*, 2004; Grune *et al.*, 2004), la pérdida selectiva de determinadas poblaciones neuronales por distintos mecanismos de muerte celular (Mattson, 2000; Assuncao Guimaraes y Linden, 2004; Barnham *et al.*, 2004; Danial y Korsmeyer, 2004; Melino *et al.*, 2005) o la agregación de proteínas aberrantes mal plegadas (Mattson y Sherman, 2003; Forman *et al.*, 2004; Grune *et al.*, 2004), entre otras. Sin embargo, además de todos estos rasgos que comparten numerosas alteraciones neurodegenerativas, una de las características comunes a la inmensa mayoría de enfermedades neurodegenerativas está constituida por las alteraciones mitocondriales (**Figura 1**), tema en el que profundizaremos más adelante (revisado en Kroemer *et al.*, 1997; Mattson, 2000; Newmeyer y Ferguson-Miller, 2003; Sastre *et al.*, 2003; Duchen, 2004).

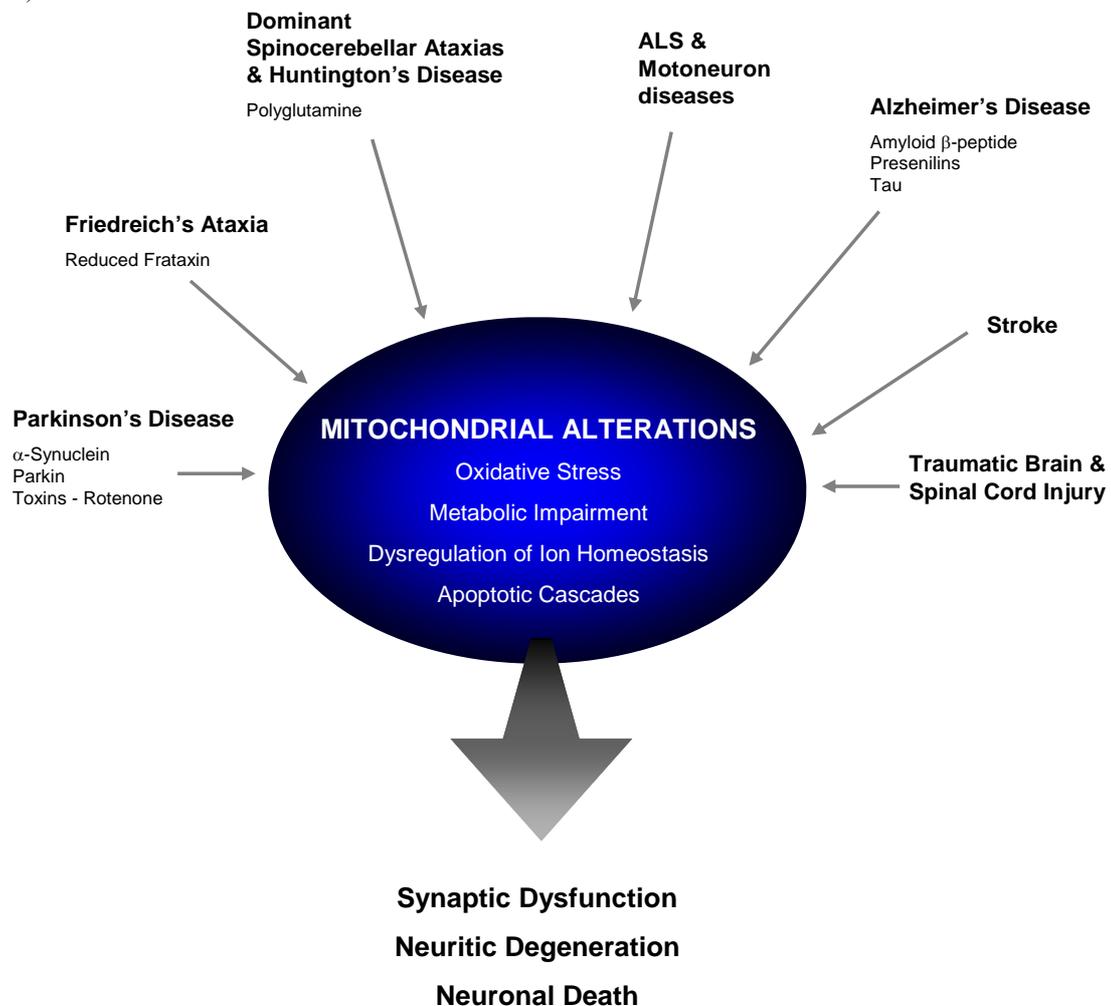


Figura 1. Papel central de la mitocondria en las enfermedades neurodegenerativas. En este esquema se representa a grandes rasgos el papel central que juegan las alteraciones mitocondriales en diversas patologías neurodegenerativas.

Por otro lado, si bien actualmente es frecuente considerar que la incidencia creciente de este tipo de enfermedades se debe a un envejecimiento progresivo de la población en el primer mundo como consecuencia de la mejora en las condiciones sanitarias que han llevado a un aumento en la esperanza de vida media (Hedden y Gabrieli, 2004), no debemos perder de vista que el origen de muchos procesos neurodegenerativos es mucho más diverso. Entre los factores que afectan a la aparición de enfermedades neurodegenerativas, aparte del ya mencionado envejecimiento, se encuentran distintos factores genéticos (tanto predeterminantes como de riesgo), ambientales, episodios traumáticos puntuales o la combinación de algunos de los anteriores. A continuación se profundiza algo más en algunos de estos aspectos.

1.1. Factores que afectan a la aparición de enfermedades neurodegenerativas

Envejecimiento

El envejecimiento es quizá la primera causa de neurodegeneración en la que se piensa de manera más intuitiva, ya que la demencia que resulta de un proceso neurodegenerativo en la corteza cerebral se asocia instintivamente a la senectud (Ritchie y Lovestone, 2002). Las primeras definiciones que se aplicaron al envejecimiento referido a organismos vivos consideran que éste es un proceso inevitable asociado a la acumulación de daños oxidativos en la biomoléculas que constituyen las células y tejidos de un organismo (Harman, 1956). A diferencia del constante recambio celular en la mayoría de los tejidos, las neuronas sobreviven durante toda la vida del organismo, cualidad necesaria para poder mantener la funcionalidad de los circuitos neuronales (revisado en Mattson, 2000). El paso del tiempo conlleva la acumulación progresiva de daños en la célula originados como consecuencia del metabolismo oxidativo, el deterioro paulatino en la eficiencia de la maquinaria celular básica o diversos episodios traumáticos, entre otros eventos (Beal, 1995; Kelly *et al.*, 2006). Así, y debido a procesos de envejecimiento, la aparición constante de especies reactivas de oxígeno (ROS; *Reactive Oxygen Species*) y la agregación paulatina de desechos celulares en forma de gránulos de lipofuscina conducen a fenómenos de estrés oxidativo que dañan las proteínas y el DNA celulares (Barnham *et al.*, 2004; Mariani *et al.*, 2005). En ocasiones, las neuronas no pueden asumir esta conjunción de daños en su estructura que se traducen en fallos en su fisiología, por lo que acaban muriendo (Berlett y Stadtman, 1997; Stadtman y Berlett, 1997).

Factores ambientales

Está ampliamente aceptado que el entorno que nos rodea puede condicionar la muerte selectiva de determinadas poblaciones neuronales, propiciando así la aparición de una patología neurodegenerativa concreta (Brown *et al.*, 2005). Incluso hay autores que advierten que la aparición de una enfermedad neurodegenerativa a edades avanzadas podría estar en parte originada por la exposición a un(os) agente(s) potencialmente patogénico(s) durante un periodo de tiempo delimitado a temprana edad (Landrigan *et al.*, 2005). Estos factores ambientales abarcan un amplio abanico de posibilidades, ya que en ellos se incluye un heterogéneo grupo de posibles causas a las que nos vemos expuestos, a saber: dieta y estilo de vida (hábitos de alimentación, consumo de alcohol, tabaco, drogas), exposición a determinados metales y contaminación ambiental, exposición a pesticidas, insecticidas, herbicidas u otros compuestos empleados a gran escala en agricultura... (Brown *et al.*, 2005). En definitiva, la lista es inmensa; aunque en ocasiones es realmente complicado establecer una relación causal sólida y consistente de un factor ambiental concreto y una enfermedad neurodegenerativa.

Hay evidencias de factores ambientales para la enfermedad de Parkinson, fundamentalmente relacionados con la exposición a pesticidas y otras sustancias químicas, tema en el que profundizaremos más adelante.

Factores genéticos

Por otro lado, no hay que olvidar que los factores genéticos también juegan un papel importante en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Finch y Tanzi, 1997; Bertram y Tanzi, 2005). De hecho, se han encontrado mutaciones responsables de la aparición de formas hereditarias de enfermedades neurodegenerativas. Por ejemplo, para el caso del mal de Alzheimer se han descrito algunas mutaciones en los genes que codifican APP, presenilina-1 (PS-1) y presenilina-2 (PS-2) que intervienen en la denominada “forma familiar” de la enfermedad de Alzheimer (FAD; *Familial Alzheimer’s Disease*) (Selkoe, 1997; Price *et al.*, 1998; Selkoe, 1998, 2001). Otros polimorfismos, como los encontrados en el alelo $\epsilon 4$ de la apolipoproteína E4 (ApoE4) o en su región reguladora constituyen factores de riesgo que confieren a sus portadores susceptibilidad a padecer la enfermedad (Strittmatter *et al.*, 1993; Bullido *et al.*, 1998). También otras “taupatías” tienen su origen en mutaciones en el gen de la proteína tau (Lee y Trojanowski, 1999).

Para la ALS también se ha descrito un posible origen genético en algunos casos, con mutaciones dominantes en el gen de la superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc (Cu/Zn SOD; *Cu/Zn superoxide dismutase*) que conducen a una ganancia de función tóxica de la proteína (revisado en Manfredi y Xu, 2005; Gros-Louis *et al.*, 2006).

Asimismo se han visto mutaciones puntuales relacionadas con la patología en un pequeño porcentaje de casos de la enfermedad de Parkinson; en este tema profundizaremos más adelante.

Si bien todas las patologías neurodegenerativas que hemos comentado hasta ahora pueden tener un componente genético responsable de la enfermedad en un reducido porcentaje de los casos, existen otros trastornos neurológicos en el que el origen genético prevalece en la gran mayoría, si no totalidad, de los casos. Es el caso, por ejemplo, de las enfermedades producidas por una expansión de poliglutamina en una proteína determinada (Morfini *et al.*, 2005). Existen genes que normalmente poseen una serie de repeticiones del triplete CAG en su región codificante, lo que se traduce en una región en la proteína correspondiente rica en glutaminas. Lo que ocurre en los trastornos causados por poliglutaminas es que alguno de estos genes presenta un número anómalamente elevado de repeticiones (por encima de lo que se considera umbral patológico), con lo que la proteína sufre alteraciones en su estructura que puedan conducir bien a una pérdida de función, bien a una ganancia en toxicidad o bien a una combinación de ambos factores (Morfini *et al.*, 2005).

Una de estas patologías es la enfermedad de Huntington, caracterizada por una expansión anormal de poliglutamina en la proteína huntingtina, de función desconocida, que afecta fundamentalmente a las neuronas presentes en el estriado y, en estadios más avanzados, a algunas poblaciones de neuronas de la corteza (Cattaneo *et al.*, 2001; Cattaneo, 2003). También dentro de este grupo de enfermedades causadas por expansiones de poliglutaminas destacan algunas ataxias (= “falta de coordinación”) espinocerebelosas dominantes (SCA; *Spino-Cerebellar Ataxia*), patologías caracterizadas por pérdidas de poblaciones neuronales del cerebelo, del bulbo raquídeo y de la médula espinal que se manifiestan, por tanto, en falta de coordinación motora, con dificultades en la marcha, en la articulación de palabras o en el mantenimiento del equilibrio (De Michele *et al.*, 2004; Taroni y DiDonato, 2004). Algunas de estas ataxias son la ataxia espinocerebelosa tipo 1 (SCA1), SCA2, SCA3 (también llamada enfermedad de Machado-Joseph), SCA6, SCA7, SCA12 o SCA17, entre otras (Taroni y DiDonato, 2004), todas con el denominador común de la expansión de poliglutaminas en alguna proteína que

conduce a la ataxia como rasgo fundamental, aparte de afectaciones de otra índole específicas de cada uno de los distintos tipos de ataxia.

Sin embargo, las ataxias constituyen un heterogéneo grupo de enfermedades, en muchos casos de origen genético, que comparten la falta de coordinación motora como síntoma general (Harding, 1984; De Michele *et al.*, 2004). Así, aparte de las ataxias producidas por expansión de poliglutaminas con un patrón de herencia dominante, existen otras ataxias de carácter recesivo debidas a mutaciones en otros genes, como la ataxia de Friedreich, la ataxia Telangiectasia o las ataxias con apraxia oculomotora (Taroni y DiDonato, 2004). Sobre la ataxia de Friedreich nos extenderemos en profundidad más adelante.

En cualquier caso, todos estos ejemplos dan cuenta de cómo distintos tipos de mutaciones genéticas pueden conducir a la aparición de una enfermedad neurodegenerativa

1.2. Dos ejemplos de enfermedades neurodegenerativas: Enfermedad de Parkinson y Ataxia de Friedreich

Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson es un trastorno neurodegenerativo que afecta fundamentalmente a las habilidades motoras, caracterizándose sintomatológicamente por lentitud en el movimiento, temblores involuntarios, rigidez y problemas para mantener el equilibrio. A nivel histopatológico y molecular, se caracteriza por una pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra del cerebro acompañada por inclusiones intracelulares de agregados proteicos enriquecidos en la proteína α -sinucleína (llamados cuerpos de Lewy) (revisado en Dauer y Przedborski, 2003; Dawson y Dawson, 2003; Schapira, 2004), además de una significativa deficiencia generalizada en la actividad enzimática del complejo I mitocondrial (Greenamyre *et al.*, 2001). De hecho, se cree que una de las causas que conducen a una degeneración preferente de las neuronas dopaminérgicas es que precisamente el metabolismo del neurotransmisor que producen, la dopamina, desemboca en la generación de radicales libres y especies reactivas de oxígeno que acentúan el estrés oxidativo en esta población (Barzilay y Melamed, 2003; Dauer y Przedborski, 2003).

Si bien es mayoritariamente una enfermedad esporádica asociada al envejecimiento (Dawson y Dawson, 2003; Schapira, 2004), también se han encontrado mutaciones responsables de un cierto número de casos de la enfermedad de Parkinson en los genes que codifican la α -sinucleína, parkina, DJ-1 o Nurr-1, entre otros, que propician el desarrollo de la enfermedad (Dawson y Dawson, 2003; Huang *et al.*, 2004). Además, se han detectado algunas mutaciones en el DNA mitocondrial que podrían ser responsables de la aparición de la enfermedad en algunos casos (Simon *et al.*, 2004; Smigrodzki *et al.*, 2004).

En cuanto a factores ambientales, se han descrito cuadros clínicos asociados al mal de Parkinson o síndromes parkinsonianos en grupos poblacionales que consumían heroína adulterada con 1-metil-4-fenil-1, 2, 3, 6-tetrahidropiridina (MPTP) (Langston *et al.*, 1983; Langston y Ballard, 1983). Este compuesto puede atravesar la barrera hematocefálica y ser oxidado por células que expresan la enzima Monoamin-oxidasa-B (MAO-B) a 1-metil-4-fenil-2, 3-dihidropiridinio (MPDP⁺), que por oxidación espontánea produce 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP⁺), que puede ser incorporado selectivamente por neuronas dopaminérgicas a través del transportador de dopamina, ejerciendo allí su acción neurotóxica a través de la inhibición del complejo I mitocondrial (revisado en Przedborski y Vila, 2003; Vila y Przedborski, 2003; Eriksen *et al.*, 2005).

De hecho, el MPTP se ha utilizado para inducir una degeneración selectiva de neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra, generando así modelos murinos y de primates de Parkinson (Tatton

et al., 1992; Forno *et al.*, 1993; Muthane *et al.*, 1994). Sin embargo, una de las limitaciones que presentaron inicialmente estos modelos fue la ausencia de las inclusiones típicas de la enfermedad de Parkinson: los cuerpos de Lewy (Forno *et al.*, 1993), si bien recientemente se ha visto que la infusión continuada de dosis más bajas de MPTP durante un largo período sí podría reproducir de una manera más fiel las marcas histopatológicas de la enfermedad de Parkinson (Fornai *et al.*, 2005).

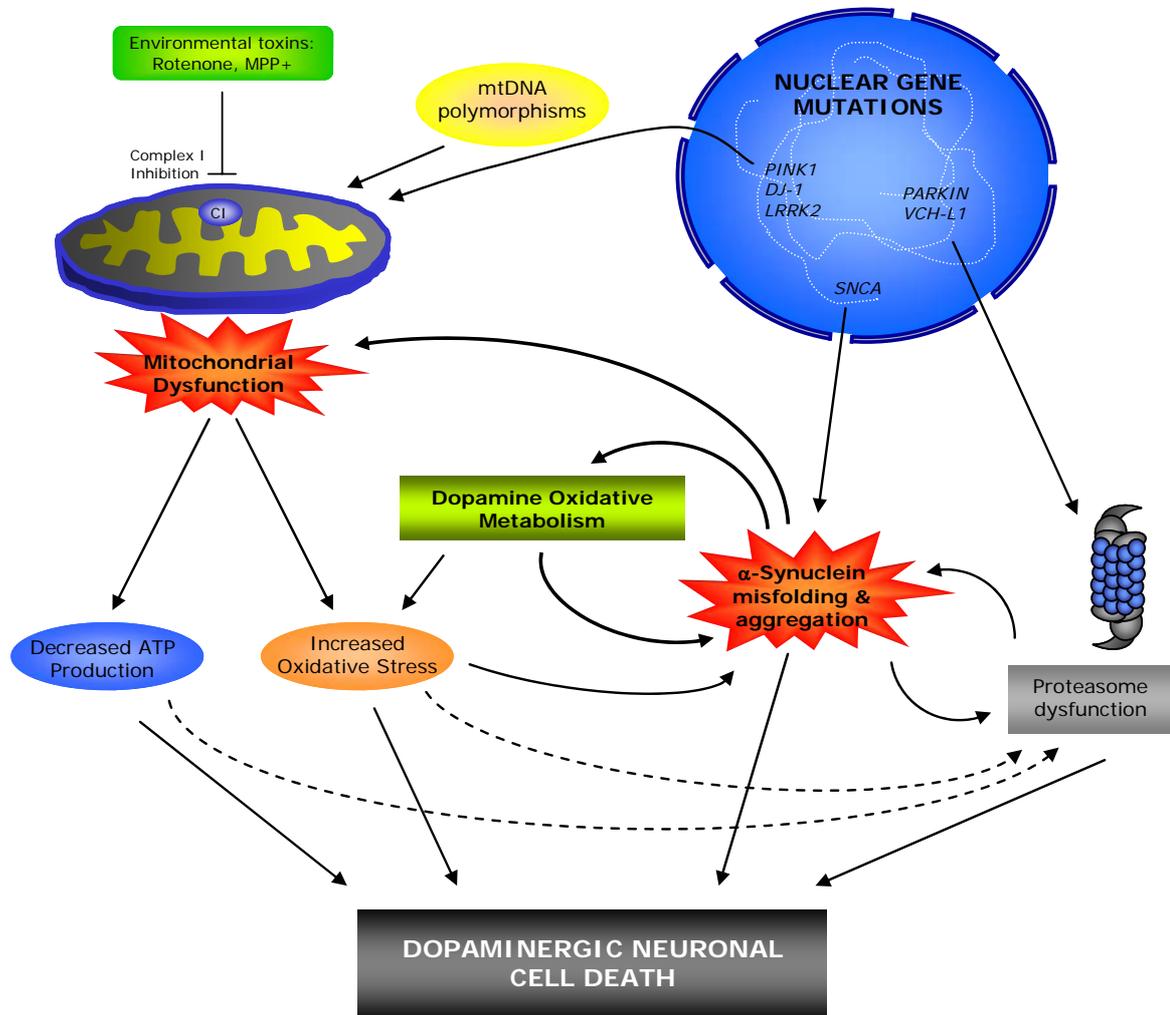


Figura 2. Etiopatogénesis de la enfermedad de Parkinson. Numerosas causas pueden conducir a la muerte celular de las neuronas dopaminérgicas. Algunas mutaciones (tanto en el genoma nuclear como en el mitocondrial) así como la exposición a determinadas toxinas ambientales pueden contribuir de manera notable a la generación de estrés oxidativo o la aparición de agregados de la proteína α -sinucleína mal plegada. Además, el metabolismo específico que presenta esta población neuronal para el procesamiento del neurotransmisor dopamina propicia de manera especial la aparición de especies reactivas de oxígeno, haciendo a estas neuronas más vulnerables a fenómenos de estrés oxidativo y a los daños acumulados como consecuencia de éste.

En relación con el ya mencionado defecto sistémico en el complejo I mitocondrial observado en la enfermedad de Parkinson, en las dos últimas décadas se ha invertido mucho esfuerzo en desarrollar modelos animales de Parkinson utilizando agentes tóxicos que inhiban el complejo I y que puedan reproducir dicha enfermedad, como la 6-hidroxidopamina (6-OHDA), el paraquat o, más frecuentemente, la rotenona o el ya mencionado MPTP (revisado en Sherer *et al.*, 2001; Dauer y Przedborski, 2003; Greenamyre *et al.*, 2003; Schapira, 2004; Schober, 2004), si bien es cierto que estos modelos presentan sus limitaciones. De hecho, algunos estudios epidemiológicos han asociado la exposición a algunos de estos compuestos, comúnmente utilizados como pesticidas, como la rotenona o el paraquat, con la

aparición de síndromes parkinsonianos (Butterfield *et al.*, 1993; Gorell *et al.*, 1998; Menegon *et al.*, 1998; Giasson y Lee, 2000).

Un modelo de Parkinson muy interesante es el de la rotenona. La rotenona, un inhibidor establecido del complejo I mitocondrial, es un isoflavonoide de origen vegetal que ha sido tradicionalmente empleado como pesticida y para controlar poblaciones de peces en lagos y reservas naturales (Lindahl y Oberg, 1961). Como ya se ha mencionado, estudios previos relacionaban la exposición a rotenona con el desarrollo de la enfermedad de Parkinson (Butterfield *et al.*, 1993; Gorell *et al.*, 1998; Menegon *et al.*, 1998), y recientemente se ha desarrollado un modelo murino en el que la exposición a rotenona reproduce con una cierta fidelidad las características neuroquímicas, histopatológicas y conductuales de la enfermedad de Parkinson, con degeneración preferente de la zona nigro-estriatal, inclusión de cuerpos de Lewy y deficiencias motoras, como hipokinesia, rigidez con postura encorvada y temblores en uno o más miembros (Betarbet *et al.*, 2000; Sherer *et al.*, 2003b), resultado que ha sido reproducido por otros grupos, tanto en ratas (Saravanan *et al.*, 2005) como en *Drosophila melanogaster* (Coulom y Birman, 2004), si bien otros grupos ponen en duda la neurotoxicidad específica de la rotenona cuando es administrada de forma sistémica (Lapointe *et al.*, 2004). En cualquier caso, no hay que perder de vista que en estos trabajos el modo de administración de rotenona varía notablemente, lo cual podría explicar en gran parte las significativas diferencias observadas de un modelo a otro (Fleming *et al.*, 2004).

En la **figura 2** se resumen de forma esquemática los rasgos más sobresalientes de la etiopatología de la enfermedad de Parkinson. Distintos factores genéticos o ambientales pueden contribuir a la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra, responsable de la aparición de la enfermedad de Parkinson. Por ejemplo, algunas mutaciones en el gen SNCA dan lugar a variantes de α -sinucleína mal plegadas que tienden a agregarse. Otras mutaciones incrementan la expresión de α -sinucleína, lo cual también conduce a agregados de dicha proteína. La agregación de α -sinucleína podría aumentar la concentración citosólica de dopamina e interferir con la función mitocondrial, aumentando así el estrés oxidativo. Por otra parte, mutaciones en genes moduladores de la degradación de proteínas por la vía del proteosoma, pueden aumentar los niveles de α -sinucleína y así favorecer su agregación. Finalmente, mutaciones en genes asociados con la función mitocondrial pueden llevar a una disfunción de la misma así como a la aparición de estrés oxidativo. La oxidación de α -sinucleína que resulta de la acumulación de ROS también puede conducir a su agregación. Además, el incremento de la oxidación de proteínas puede llegar a saturar la maquinaria del proteosoma. La presencia de toxinas ambientales que afectan a las mitocondrias puede actuar de manera similar. Finalmente, el envejecimiento llevaría a una progresiva acumulación de ROS que, conforme se superan ciertos umbrales, podría desembocar en la degeneración de las neuronas dopaminérgicas (Dauer y Przedborski, 2003; Schapira, 2004).

Ataxia de Friedreich. Frataxina

Dentro de las ataxias recesivas, la de mayor prevalencia es la ataxia de Friedreich, que presenta un origen genético muy particular: una mutación intrónica (no en una región codificante) en el gen *FRDA* que codifica la proteína mitocondrial frataxina (Campuzano *et al.*, 1996). Esta mutación consiste en una expansión anormal del triplete GAA que conduce a una estructura de triple hélice en el DNA que dificulta el avance de las polimerasas de RNA para su transcripción, lo que se traduce en una disminución en los niveles de RNA mensajero (mRNA) que a su vez conlleva una notable reducción en los niveles de frataxina, que quedan por debajo del 25-30%; así pues se trata de una pérdida de función de esta proteína (revisado en Palau, 2001; Pandolfo, 2001, 2002a, 2002b; Taroni y DiDonato, 2004).

La ataxia de Friedreich se caracteriza por la pérdida progresiva de ciertas poblaciones neuronales de la médula espinal y del cerebelo. La enfermedad normalmente aparece entre los 7 y los 15 años, aunque se han registrado edades de inicio de la enfermedad más precoces y más tardías. El primer síntoma en aparecer es la ataxia (falta de coordinación motora). Puede presentar otros síntomas tales como la pérdida de reflejos, pérdida de sensibilidad en las extremidades, nistagmus, disartria, escoliosis, deformidades en los pies, debilidad y atrofia muscular. La ataxia, a menudo, va acompañada de afecciones cardíacas como la cardiomiopatía hipertrófica, pudiendo llegar al fallo cardíaco. Algunos enfermos también desarrollan diabetes (Palau, 2001; Pandolfo, 2002b).

La frataxina es una proteína mitocondrial de 17 KDa (Campuzano *et al.*, 1997) que podría estar implicada en fenómenos de homeostasis del hierro, biosíntesis de complejos hierro-azufre o estimulación de la fosforilación oxidativa, entre otras funciones (Babcock *et al.*, 1997; Ristow *et al.*, 2000; Bulteau *et al.*, 2004; Yoon y Cowan, 2004; Gonzalez-Cabo *et al.*, 2005) (**Figura 3**).

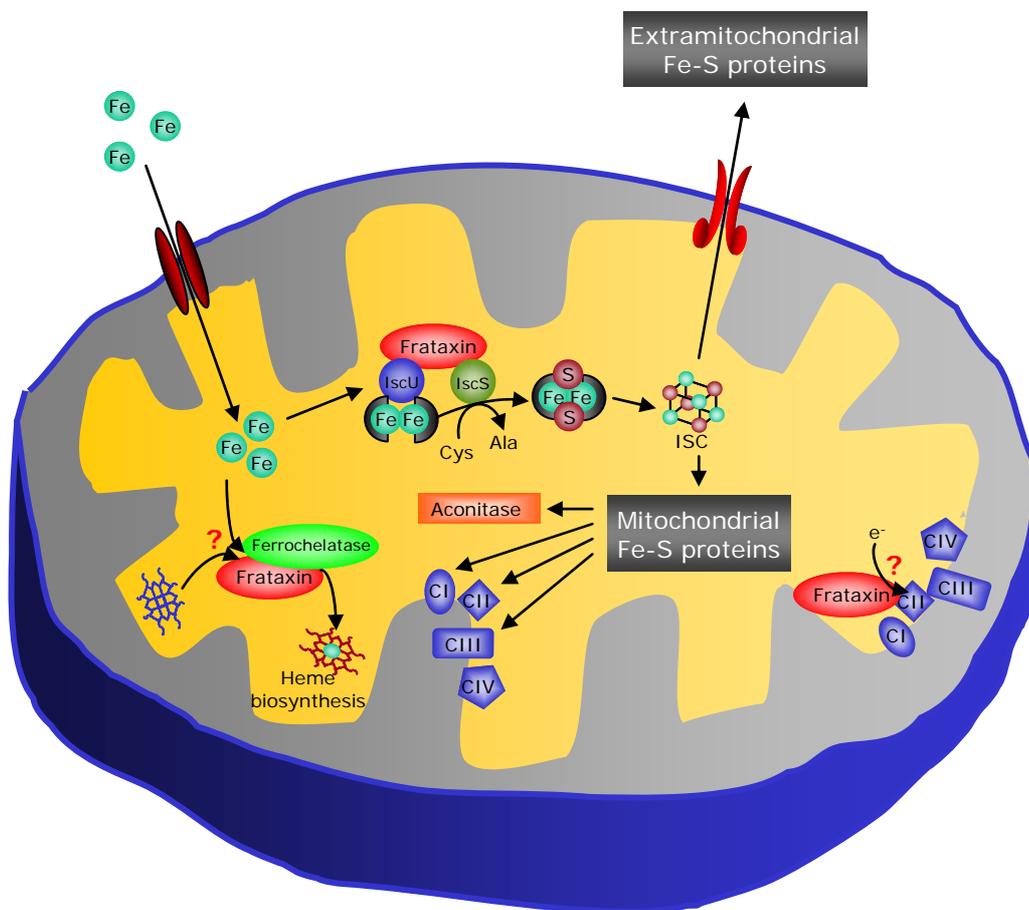


Figura 3. Funciones de la frataxina. Algunas de las funciones que se han postulado para la frataxina incluyen la de cooperar como chaperona en la formación de complejos Fe-S (ISC; *Iron-Sulfur Clusters*), necesarios para algunas actividades enzimáticas de la célula, como la aconitasa y los complejos I-III de la cadena transportadora de electrones. Además, también podría colaborar con la ferroquelatasa en la provisión de hierro durante la biosíntesis del grupo hemo. Por último, también se ha visto que interacciona con el complejo II (succinato deshidrogenasa), posiblemente facilitando la entrada de electrones a través del mismo en la cadena de transporte.

Además, la frataxina se expresa de manera diferencial según el tipo celular (Koutnikova *et al.*, 1997), siendo particularmente abundante en sistema nervioso, corazón, músculo esquelético, hígado y páncreas –si bien sólo los tejidos nervioso, cardíaco y, en menor medida, pancreático, parecen afectados en la enfermedad-, además de presentar distintas isoformas resultantes de un procesamiento alternativo de su mRNA (Campuzano *et al.*, 1996; Pianese *et al.*, 2002).

Una de las primeras funciones que se propuso para la frataxina, deducida a partir de datos obtenidos en levadura, fue la de intervenir en procesos de homeostasis del hierro actuando de transportador de éste a través de las membranas mitocondriales (Babcock *et al.*, 1997; Foury y Cazzalini, 1997; Radisky *et al.*, 1999). Estos datos se vieron apoyados al encontrar acúmulos de hierro intramitocondrial fibroblastos de pacientes de ataxia de Friedreich (Delatycki *et al.*, 1999). Sin embargo, esta hipótesis está cada vez menos sustentada por evidencias en modelos animales. Un modelo de ratón *knock-out* de frataxina es letal embrionario entre los días 6 y 7 de desarrollo, y no hay evidencias de acumulación de hierro (Cossee *et al.*, 2000), y en otro modelo consistente en un ratón *knock-out* condicional de frataxina, que presenta un cuadro sintomatológico bastante similar al de un paciente de ataxia de Friedreich, mostró que la acumulación de hierro es un evento tardío, y desde luego posterior a la aparición de la enfermedad y a las deficiencias en las actividades enzimáticas dependientes de complejos Fe-S (Puccio *et al.*, 2001). Se planteó también un modelo *knock-in* de frataxina, en el que se incluían 230 repeticiones del triplete GAA en el intrón 1, pero se observó un fenotipo absolutamente normal, a pesar de que los niveles de frataxina se encontraban entre un 25% y un 36% con respecto a los controles (Miranda *et al.*, 2002).

Precisamente como consecuencia de esta hipótesis, y dado que se observó la acumulación de daños producidos por estrés oxidativo en levaduras (Foury y Cazzalini, 1997; Rotig *et al.*, 1997; Karthikeyan *et al.*, 2003) y pacientes (Schulz *et al.*, 2000), así como una elevada sensibilidad al estrés oxidativo en fibroblastos de pacientes (Wong *et al.*, 1999), se planteó la posibilidad de desarrollar terapias con antioxidantes, concretamente con idebenona, un análogo de cadena corta de la coenzima Q (Rustin *et al.*, 1999; Rotig *et al.*, 2002), la cual se vio que era capaz de aliviar en parte la hipertrofia cardíaca, pero no la condición neurológica. Estos datos fueron confirmados en el modelo murino del *knock-out* condicional de frataxina, observándose que si bien la idebenona era capaz de atenuar la hipertrofia cardíaca, no tenía ningún efecto beneficioso sobre la deficiencia en actividades enzimáticas dependientes de complejos Fe-S (Seznec *et al.*, 2004). Posteriormente, se ha sugerido que la frataxina no tiene efecto antioxidante *per se*, aunque podría estar mediando indirectamente una respuesta antioxidante (Chantrel-Groussard *et al.*, 2001; Shoichet *et al.*, 2002). Todo esto es, sin embargo, controvertido, ya que un trabajo reciente propone que el estrés oxidativo no juega un papel relevante en el inicio de la enfermedad, sino que podría aparecer circunstancialmente como consecuencia de la disfunción mitocondrial (Seznec *et al.*, 2005).

Parece claro que la frataxina actúa como una chaperona, participando en el ensamblaje de los centros Fe-S, necesarios para el correcto funcionamiento de algunas enzimas mitocondriales, como la aconitasa o los complejos I-III de la cadena transportadora de electrones. En primer lugar se vio que los pacientes de ataxia de Friedreich presentaban precisamente deficiencias en las actividades enzimáticas mencionadas (Rotig *et al.*, 1997), hecho que se reprodujo posteriormente en el *knock-out* condicional de frataxina (Puccio *et al.*, 2001). Recientemente se ha descrito el papel de la frataxina como chaperona que facilita el ensamblaje de la aconitasa con sus centros Fe-S (Bulteau *et al.*, 2004). Estos datos se han visto apoyados por unos trabajos realizados con RNA de interferencia en los que el silenciamiento de frataxina conduce a una disminución en las actividades enzimáticas dependientes de centros Fe-S, tanto en células humanas (Stehling *et al.*, 2004) como en *Drosophila melanogaster* (Anderson *et al.*, 2005). Además, también hay evidencias que extienden este papel en el ensamblaje de complejos Fe-S al ámbito extramitocondrial (Acquaviva *et al.*, 2005). Esta hipótesis no está en absoluto reñida con otra que se postuló y que ya se ha mencionado en el texto, que es la que propone un papel para la frataxina como estimulador de la fosforilación oxidativa (Ristow *et al.*, 2000), pues un trabajo reciente describe la asociación física entre frataxina y la succinato deshidrogenasa y otros componentes del complejo II

mitocondrial (Gonzalez-Cabo *et al.*, 2005), proponiendo que esta interacción podría facilitar la entrada de electrones a través del complejo II.

Por último y en esta misma línea que propone un papel de la frataxina como chaperona de proteínas que necesitan hierro en su estructura, se ha visto también que la frataxina podría estar contribuyendo a la provisión de hierro durante la biosíntesis del grupo hemo (Yoon y Cowan, 2004; Schoenfeld *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005), también necesario para la correcta fisiología mitocondrial.

Todas estas evidencias demuestran cómo una mutación en el gen nuclear *FRDA* se traduce en una deficiencia en la proteína frataxina, causando así una disfunción mitocondrial crónica que conduce a la aparición de una enfermedad.

Así pues, y en definitiva, la complejidad que acaece en los distintos procesos neurodegenerativos es sólo comparable a la heterogeneidad de su origen. Éstos comparten la muerte masiva de poblaciones específicas de neuronas; divergen en muchos otros aspectos. Además, no se puede hablar de un único origen para una misma patología; a la luz de lo expuesto, parece evidente que las interacciones entre diversos factores de distinta naturaleza pueden concurrir en mayor o menor medida de manera no excluyente para dar lugar a un trastorno neurodegenerativo.

2. MECANISMOS DE MUERTE CELULAR

Muerte celular

La muerte celular es un proceso natural que tiene lugar a lo largo de la vida de un individuo por distintos motivos, como la renovación de tejidos o durante el desarrollo, situaciones en las que muchas células han de morir para dar paso a otras (Baehrecke, 2002; Fadeel y Orrenius, 2005). La muerte celular programada es un proceso fisiológico altamente conservado que responde, como su propio nombre indica, a un programa genético que poseen las células eucariotas y que acontece de manera natural y ordenada en numerosos procesos en el organismo, tanto durante el desarrollo como en la vida adulta. Sin embargo, cuando por diversos motivos se pierde el control sobre este programa, pueden darse situaciones patológicas, como el cáncer (cuando la muerte celular no se puede ejecutar correctamente y las células proliferan sin control) o diversos procesos neurodegenerativos (cuando los procesos de muerte se disparan en las células nerviosas y éstas mueren de forma masiva) (Mattson, 2000; Vila y Przedborski, 2003; Ekshyyan y Aw, 2004; Emerit *et al.*, 2004; Forman *et al.*, 2004; Fadeel y Orrenius, 2005; Krantic *et al.*, 2005).

Ya en la segunda mitad del siglo XIX, Virchow describió dos tipos de muerte celular en función de las morfologías observadas en los tejidos muertos (Virchow y Chance, 1860). En la actualidad, los criterios para definir la muerte celular son puramente morfológicos. En términos generales, durante los últimos años se ha hablado de “apoptosis”, “necrosis” y “autofagia” (Edinger y Thompson, 2004). Se considera que la apoptosis sigue un programa establecido que transcurre con condensación del núcleo, fragmentación controlada del DNA celular así como de numerosas proteínas y, finalmente, atomización de la célula en pequeños cuerpos apoptóticos que son eliminados por células fagocíticas (Assuncao Guimaraes y Linden, 2004; Danial y Korsmeyer, 2004; Polster y Fiskum, 2004). La necrosis es contemplada como una muerte pasiva, un accidente o catástrofe celular demasiado fuerte como para que la célula pueda seguir un programa ordenado, por lo que se vacuoliza y las membranas celulares se

rompen, liberando al exterior de manera incontrolada todo el contenido celular, provocando una respuesta inflamatoria en los tejidos adyacentes (Proskuryakov *et al.*, 2002; Proskuryakov *et al.*, 2003). Finalmente, la autofagia se reveló como una vía de muerte celular programada alternativa a la apoptosis, en la que se formaban unos autofagosomas intracelulares de doble membrana que englobaban gran parte del contenido citosólico y orgánulos que posteriormente eran digeridos por la propia maquinaria lisosomal (Levine y Klionsky, 2004; Levine y Yuan, 2005). Esto mostró un nuevo papel para la autofagia, ya que se consideró que era un proceso que emprendía la célula para obtener energía cuando faltaban nutrientes del medio extracelular (Baehrecke, 2005).

La realidad es que no es tan sencillo delimitar tanto los terrenos, ya que no se puede hablar de apoptosis, necrosis o autofagia en un sentido tan estricto. De hecho, cada vez se emplean nuevos nombres para definir nuevos tipos de muerte celular, desde apoptosis atípica a anoikis, pasando por paraptosis; en definitiva, existen multitud de caminos que una célula puede tomar para morir (Melino *et al.*, 2005). Existen además varias evidencias demostrando que la muerte celular no es un camino lineal. El mismo estímulo de muerte puede disparar distintas vías según el tipo celular; y dentro del mismo tipo celular la vía escogida puede variar en función del estímulo, del estado de la célula... (para ver algunos ejemplos en células neuronales consultar Lang-Rollin *et al.*, 2003; Galas *et al.*, 2004; Lum *et al.*, 2005; Zimmermann *et al.*, 2005).

La muerte celular es un proceso dinámico que puede progresar por distintos caminos. Es por esto que actualmente hay un llamamiento para no utilizar categóricamente un término general que defina un tipo de muerte concreto, sino para describir minuciosamente qué parámetros que indican muerte (del tipo que sea) pueden estar teniendo lugar (Kroemer *et al.*, 2005), sin entrar en clasificaciones difíciles de aplicar por lo difuso de los límites entre un modo y otro.

La mitocondria en la muerte celular programada

Dentro de los procesos de muerte celular programada, no cabe ninguna duda sobre el papel central que desempeña la mitocondria (**Figura 4**). Inicialmente y durante mucho tiempo, únicamente se consideró que la mitocondria constituía la “planta de producción de energía” de la célula, por su intervención en multitud de reacciones enzimáticas catabólicas que convergían en la fosforilación oxidativa de los sustratos a través de la cadena transportadora de electrones, constituyendo así una de las principales fuentes de producción de energía en forma de ATP con las que contaba la célula. Sin embargo, durante los últimos años se han ido acumulando evidencias que señalan a la mitocondria como un orgánulo clave en la regulación de los procesos de muerte celular programada (Newmeyer y Ferguson-Miller, 2003). Así, se sabe que multitud de estímulos proapoptóticos pueden inducir una señalización intracelular que discurre a través de la mitocondria para culminar con la ejecución de un programa ordenado de muerte celular (revisado en Kroemer *et al.*, 1998; Afford y Randhawa, 2000; Jordan *et al.*, 2003; Newmeyer y Ferguson-Miller, 2003; Danial y Korsmeyer, 2004; Ekshyyan y Aw, 2004; Green y Kroemer, 2004).

Uno de los procesos que pueden tener lugar durante la muerte celular programada es la activación de una serie de proteasas que median el procesamiento proteolítico de numerosas proteínas intracelulares desmantelando así toda la maquinaria celular. Estas proteínas, conocidas como cisteil-aspartil proteasas o caspasas, se sintetizan en forma de zimógenos inactivos, aguardando una señal proteolítica que las active de forma irreversible. Además, los sustratos de algunas caspasas son otras procaspasas, estableciéndose así una cascada ordenada de activación de distintas caspasas. De esta manera se pueden distinguir dos tipos de caspasas: iniciadoras y ejecutoras. Las primeras son las activadas por señales de muerte y se encargan de proteolizar y por tanto activar al segundo tipo de

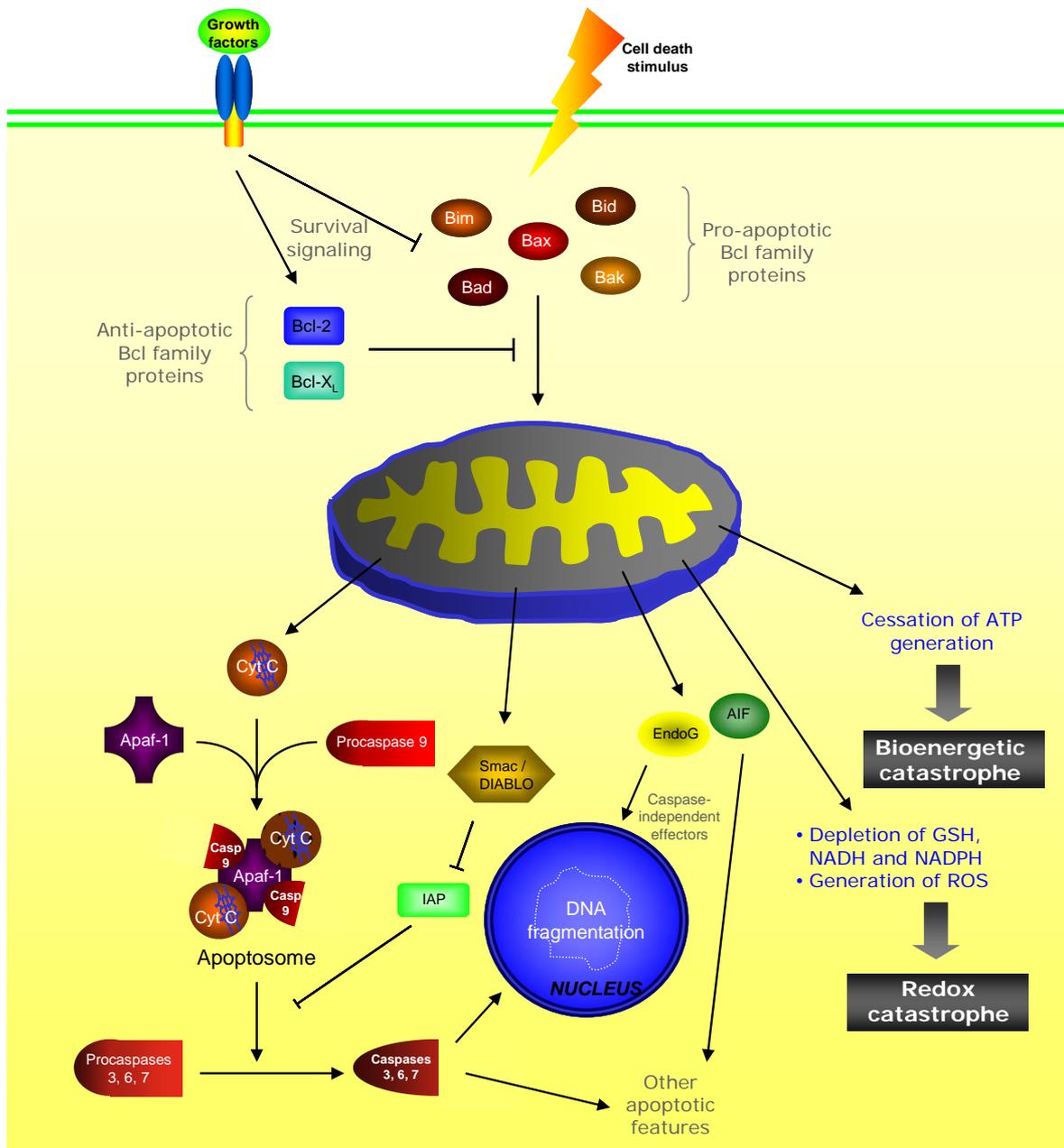


Figura 4. Papel central de la mitocondria en la muerte celular programada. De manera simplificada se esquematiza el papel que juega la mitocondria en la muerte celular programada, en la que se comporta como un centro de integración de señales, mediada en parte por proteínas pro- y anti-apoptóticas de la familia Bcl-2, que regulan la permeabilidad mitocondrial. Durante la permeabilidad mitocondrial transitoria, se liberan al citosol factores que llevan a cabo el proceso de muerte de manera dependiente e independiente de caspasas.

caspasas, las ejecutoras, encargadas de llevar a cabo el programa de muerte, en el que se proteolizan multitud de proteínas y se fragmenta el DNA nuclear (a través de la nucleasa activada por caspasas o CAD; *Caspase-Activated DNase*) (revisado en Chan y Mattson, 1999; Degterev *et al.*, 2003; Stefanis, 2005). Existen también otras vías de muerte celular programada independientes de la activación de caspasas (Kroemer y Martin, 2005; Stefanis, 2005), como las que incluyen el factor inductor de apoptosis (AIF; *Apoptosis-Inducing Factor*) (Susin *et al.*, 1999) o la activación de otras proteasas celulares, las calpaínas (Chan y Mattson, 1999), aunque aquí nos vamos a centrar fundamentalmente en las vías de muerte dependientes de caspasas, sin olvidar que todas estas vías no son en absoluto excluyentes, sino que pueden solaparse.

Existen distintos caminos que conducen a la activación de caspasas. Uno de ellos, conocido como vía extrínseca, se da por la activación de receptores de muerte presentes en la superficie celular, que

se activan por señales específicas extracelulares y que promueven directamente el reclutamiento y activación de caspasas (Ashkenazi y Dixit, 1998). Otro de ellos, también llamado ruta intrínseca, implica una serie de modificaciones en la permeabilidad mitocondrial que confluyen en la liberación por parte de la mitocondria de una serie de factores, que llevan a cabo el programa de muerte (Kroemer *et al.*, 1997; Kroemer *et al.*, 1998; Newmeyer y Ferguson-Miller, 2003; Spierings *et al.*, 2005). Entre estos factores se encontraría el citocromo c, responsable de la activación de la procaspasa 9 a través de la formación de un complejo macromolecular conocido como apoptosoma, una estructura que constituye un auténtico motor celular para la activación de distintas caspasas ejecutoras (Adams y Cory, 2002). También se encontraría el ya mencionado AIF, que entre otros efectos puede promover la fragmentación del DNA nuclear observada durante la apoptosis a través de la activación de la endonucleasa EndoG (Wang *et al.*, 2002).

A la luz de lo expuesto, parece claro que un evento clave en el control que ejerce la mitocondria sobre los programas de muerte celular es la permeabilidad de sus membranas. Pero, ¿quién regula esta permeabilidad?

La superfamilia de proteínas Bcl-2 y la permeabilidad mitocondrial

La familia de proteínas Bcl-2 está involucrada en numerosos procesos relacionados con la entrada de las células en apoptosis, modulando en gran parte la permeabilidad de la membrana mitocondrial y la liberación, o no, a través de ésta de factores implicados en el proceso de muerte que en situaciones normales se encuentran alojados en el interior de la mitocondria (Adams y Cory, 1998; Cory y Adams, 2002; Borner, 2003). Una de las primeras evidencias de la importancia de esta familia de proteínas en la regulación de la muerte celular programada surgió al identificar tras una translocación cromosómica el gen Bcl-2 (*B-cell lymphoma-2*) como uno de los responsable de inhibir la apoptosis en un linfoma folicular (Vaux *et al.*, 1988). Posteriormente se vio que Bcl-2 puede bloquear la liberación de citocromo c, impidiendo así la activación de caspasas (Kluck *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1997). Desde entonces y hasta la fecha se han identificado hasta 20 miembros de la familia Bcl-2, divididos en anti-apoptóticos y pro-apoptóticos, que comparten un cierto grado de redundancia estructural y funcional. Los anti-apoptóticos, como Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Mcl-1 o A1, se caracterizan por tener 4 dominios BH (denominados así por su homología con Bcl-2), BH1 a BH4; mientras que los pro-apoptóticos se pueden subdividir entre los que tienen los dominios BH1, BH2 y BH3 (familia de tipo Bax, como Bax y Bak), los que tienen sólo el dominio BH3 (como Bid, Bim, Bad, Bik, Noxa o PUMA) y los que tienen dominios BH3 y BH4, como Bcl-X_S (revisado en Cory y Adams, 2002; Borner, 2003).

Los mecanismos de cómo esta familia de proteínas determina si una célula va a vivir o morir no están del todo claros. Parece que el balance entre miembros pro-apoptóticos y miembros anti-apoptóticos es fundamental a la hora de tomar esta decisión. Así, algunas evidencias sugieren que Bcl-2 podría estar titulando Bax, de manera que formaría heterodímeros que previenen su activación (Oltvai *et al.*, 1993); esto podría significar que el delicado balance entre los miembros pro-apoptóticos y los anti-apoptóticos define el umbral de la muerte celular programada (Oltvai *et al.*, 1993; Adams y Cory, 1998). También se propone que los componentes anti-apoptóticos de la familia Bcl-2 podrían estar promoviendo la supervivencia anclándose a la membrana externa mitocondrial e impidiendo así el acceso a ésta por parte de los miembros pro-apoptóticos (revisado en Borner, 2003). Además, se piensa que el efecto promotor de supervivencia de Bcl-2 o Bcl-X_L podría ir más allá de la mera preservación de la integridad de la membrana mitocondrial externa u otros orgánulos (Zamzami *et al.*, 1998), actuando a otros niveles que incluyan eventos en la cascada de activación de caspasas por debajo del cambio de permeabilidad en la membrana mitocondrial, como la inhibición de la formación del apoptosoma (Chinnaiyan *et al.*, 1997; Green y Reed, 1998; Pan *et al.*, 1998).

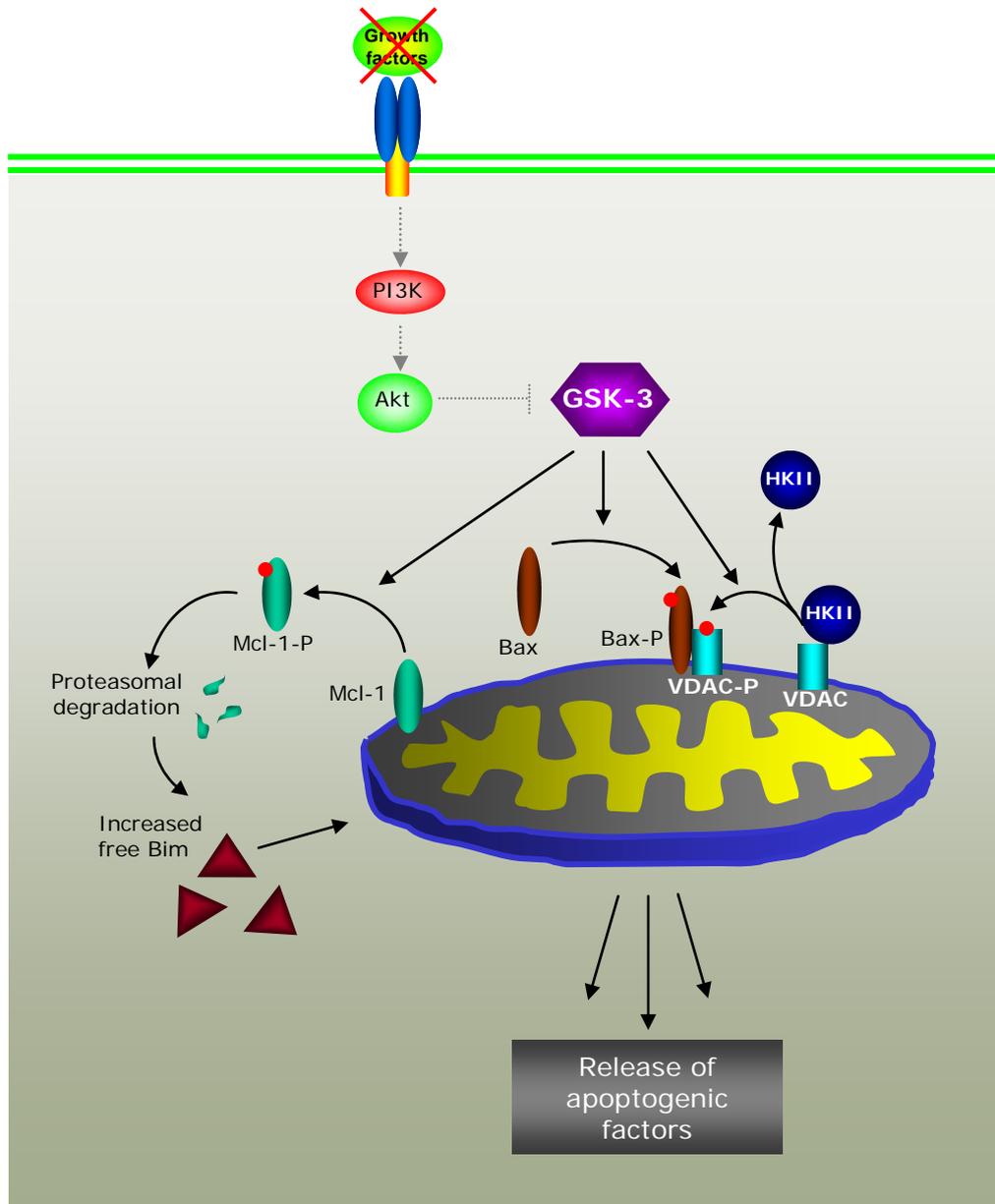


Figura 5. Relación de GSK-3 y mitocondria durante la muerte celular. Algunas de las más recientes evidencias experimentales sugieren que la intervención de la GSK-3 en la cascada de muerte celular programada se situaría por encima de la mitocondria. De esta forma, en ausencia de factores tróficos se bloquea la señalización a través de PI3K y Akt, por lo que la GSK-3 podría fosforilar la proteína anti-apoptótica Mcl-1, marcándola para su degradación proteolítica por la vía del proteosoma. Además, la fosforilación de la proteína pro-apoptótica Bax induciría la translocación de ésta a la mitocondria, lo que se vería facilitado a su vez por la fosforilación de VDAC, que provoca la disociación de la Hexoquinasa II (HKII), quedando así VDAC accesible para fortalecer su asociación con Bax.

Así pues, existen distintas evidencias que muestran que las proteínas pro-apoptóticas pueden actuar como sensores de señales de muerte, desequilibrando la balanza a favor de la muerte celular programada. Pero ¿qué mecanismos tienen lugar para que estas proteínas puedan alterar la integridad de la membrana mitocondrial? No está excesivamente claro de qué manera los miembros pro-apoptóticos, como Bax o Bak, pueden promover los cambios en la permeabilidad transitoria de la mitocondria para que ésta libere los factores apoptogénicos. Se barajan tres mecanismos no excluyentes (revisados en Newmeyer y Ferguson-Miller, 2003). En primer lugar, las proteínas pro-apoptóticas podrían estar insertándose en la membrana externa mitocondrial interaccionando con sus lípidos y permitiendo la apertura de canales en su estructura. Por otro lado, estas mismas proteínas podrían estar, junto con proteínas propias de la estructura de la mitocondria, orquestando la formación de un “megacanal” o “poro de permeabilidad transitoria” (PTP; *Permeability Transition Pore*) entre las membranas mitocondriales externa e interna

con ayuda de movilización de Ca^{2+} desde el retículo endoplásmico. Un tercer mecanismo sugiere la posibilidad de que Bax, a través de su interacción con las proteínas Drp1 y Mfn2, implicadas en dinámica mitocondrial, esté estimulando la fisión de las mitocondrias, desestabilizando así su membrana externa.

Finalmente, si bien no se han mencionado, existen muchas otras moléculas y familias de proteínas implicadas en la modulación de la muerte celular programada. Se puede por tanto concluir que existen multitud de proteínas y factores que constituyen una compleja e intrincada red de interacciones moleculares (**Figura 4**) en la que una alteración en la señalización puede decidir el destino celular.

El comienzo de la cascada de muerte celular: señalización pro-apoptótica. El papel de la enzima glucógeno sintasa quinasa-3 (GSK-3)

En principio, y en situación fisiológica, los miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2 previenen la muerte celular por algunos de los procesos anteriormente descritos. Sin embargo, los estímulos de muerte son detectados de distintas maneras de forma que, llegado el caso, la maquinaria pro-apoptótica pueda ponerse en marcha. Por ejemplo la proteína pro-apoptótica Bad es fosforilada por la proteína quinasa B (PKB o Akt) en respuesta a factores tróficos, uniéndose a la proteína 14-3-3 y quedando retenida en el citosol, sin poder unirse a la mitocondria ejerciendo su efecto sobre la permeabilidad transitoria mitocondrial (Zha *et al.*, 1996), de manera que la ausencia de factores tróficos puede transducirse en parte a través de la defosforilación y consiguiente liberación de Bad hacia la mitocondria. Otro ejemplo es el del factor de transcripción p53, que puede ser activado en respuesta a daños en el DNA celular provocados por radiaciones UV o algunas drogas; aunque también otros estímulos apoptóticos, como la ausencia de factores tróficos, la hipoxia o el choque térmico pueden activar p53 (para revisión, consultar Evan y Littlewood, 1998; Sionov y Haupt, 1999; Vousden, 2000; Culmsee y Mattson, 2005). Algunos de los genes que se inducen por la activación de p53 son los genes pro-apoptóticos Bax (Miyashita y Reed, 1995), Noxa (Oda *et al.*, 2000) o PUMA (Nakano y Vousden, 2001), aunque también hay evidencias de que p53 es capaz de localizarse en la mitocondria y activar directamente Bax *per se*, independientemente de su capacidad transcripcional (Chipuk *et al.*, 2004).

Dentro de todas las proteínas que forman parte de las cascadas de señalización intracelular que regulan los distintos procesos fisiológicos, una enzima que ha cobrado especial protagonismo en los últimos años por su papel en procesos de muerte celular y su posible implicación en diversas patologías es la glucógeno sintasa quinasa-3 (GSK-3) (Cohen y Frame, 2001; Frame y Cohen, 2001). De hecho, recientes evidencias experimentales recientes la sitúan por encima de la mitocondria en la ruta de señalización de muerte celular (Bijur y Jope, 2003; Linseman *et al.*, 2004; Pastorino *et al.*, 2005; Maurer *et al.*, 2006) (**Figura 5**).

Inicialmente identificada como una de las quinasas que fosforilaban y por tanto modulaban la actividad de la glucógeno sintasa, la GSK-3 ha pasado a ocupar un papel central en la regulación de numerosos procesos celulares (revisado en Cohen y Frame, 2001; Frame y Cohen, 2001; Grimes y Jope, 2001; Doble y Woodgett, 2003). La GSK-3 es una serina-treonina quinasa multifuncional con un amplio espectro de sustratos y de expresión ubicua, siendo particularmente abundante en cerebro. Consta de dos isoformas, α (52 KDa) y β (47 KDa), codificadas por distintos genes y que, si bien comparten algunas funciones, no son redundantes, como demuestra el hecho de que un *knock-out* para GSK-3 β es letal embrionario (Hoefflich *et al.*, 2000). La GSK-3 regula multitud de procesos celulares muy variados, como la supervivencia, el metabolismo, la expresión génica, la síntesis de proteínas, el ciclo celular o la dinámica del citoesqueleto, entre otros (revisado en Frame y Cohen, 2001; Grimes y Jope, 2001). Además, presenta una regulación muy compleja a nivel de fosfo/defosforilación y formación de complejos macromoleculares. Así, algunas vías celulares, como la vía de supervivencia de PI3K/Akt o

algunas vías en las que está implicada PKC convergen en la fosforilación inhibitoria de GSK-3 en serina (21 en GSK-3 α y 9 en GSK-3 β) (revisado extensamente en Grimes y Jope, 2001). Otras rutas de señalización, sin embargo, culminan con la fosforilación activadora en tirosina (276 en GSK-3 α y 219 en GSK-3 β) por medio de kinasas de la familia Src como ZAK1 o Fyn (Grimes y Jope, 2001), o, más recientemente, Pyk2 (Sayas *et al.*, 2006). Finalmente la formación de complejos con otras proteínas (como axina y APC) y la localización subcelular de GSK-3 también modulan su actividad (Grimes y Jope, 2001) (**Figura 6A**).

El litio, un potente inhibidor de GSK-3 (Klein y Melton, 1996), demostró eficazmente su capacidad para inhibir la fosforilación de tau (Munoz-Montano *et al.*, 1997), y el empleo de litio o de oligonucleótidos antisentido para GSK-3 β demostraron proteger eficientemente frente a la muerte de neuronas primarias de rata en cultivo inducida por el péptido β -amiloide (Takashima *et al.*, 1998; Alvarez *et al.*, 1999). Esto, junto con la evidencia de que ratones transgénicos que sobreexpresan GSK-3 presentan acúmulos de tau hiperfosforilado y neurodegeneración (Lucas *et al.*, 2001; Hernandez *et al.*, 2002), condujo a pensar que la GSK-3 podría estar implicada en la enfermedad de Alzheimer, y ser por tanto una posible diana terapéutica para el tratamiento de esta enfermedad (revisado en Alvarez *et al.*, 2002; Bhat y Budd, 2002). De hecho, son muchos los estudios que muestran que la inhibición de GSK-3 puede proporcionar protección frente a multitud de estímulos pro-apoptóticos (ver tabla 1 y **Figura 6B**), además de muchos otros trabajos, tanto *in vitro* como *in vivo*, que describen protección por litio, sin entrar en los mecanismos moleculares subyacentes, frente a estímulos de muerte muy dispares, como ouabaína, excitotoxicidad por glutamato, isquemia, retirada de potasio, ácido quinolínico (modelo de enfermedad de Huntington), ceramida, la glicoproteína 120 (gp120) del virus VIH o la β -bungarotoxina (Li *et al.*, 1994; Chalecka-Franaszek y Chuang, 1999; Bhat *et al.*, 2000; Mora *et al.*, 2001; Wei *et al.*, 2001; Everall *et al.*, 2002; Mora *et al.*, 2002; Tseng y Lin-Shiau, 2002; Ren *et al.*, 2003). Es por esto que no es de extrañar el interés en desarrollar nuevos y más específicos inhibidores de GSK-3 como posibles fármacos (Cross *et al.*, 2001; Bhat *et al.*, 2003; Doble y Woodgett, 2003).

Se sabe poco acerca de los mecanismos por los que GSK-3 induce muerte neuronal. Recientemente se ha visto que en respuesta a estímulos apoptóticos, la GSK-3 se puede acumular en el núcleo y en la mitocondria permaneciendo allí en estado activado, mucho más que en el citosol (Bijur y Jope, 2001, 2003), lo que sugiere fuertemente que es ahí donde ejerce gran parte de su efecto desencadenante de muerte celular. Un estudio demostró la interacción física entre la proteína p53 y la GSK-3 β , resultando en activación de GSK-3 β independiente de fosforilación (Watcharasi *et al.*, 2002), lo que es consistente con la regulación de GSK-3 por formación de complejos moleculares (Grimes y Jope, 2001). Más aún, trabajos posteriores de ese mismo grupo postulan que la asociación GSK-3 β /p53 también podría estar contribuyendo a la activación y por tanto mediación de algunos de los efectos conocidos promovidos por p53, como aumentos en la expresión de Bax o p21, sugiriendo así una cooperación entre p53 y GSK-3 β en la fase iniciadora de apoptosis (Watcharasi *et al.*, 2003).

Tabla 1. Descripción de algunos de los estímulos pro-apoptóticos frente a los que la inhibición de GSK-3 resulta neuroprotectora

Estímulo pro-apoptótico	Sistema Modelo	Agente protector	Referencia
LY-294002 (Inhibición de PI3K)	PC12 Rat-1	GSK3 β -K85R	(Pap y Cooper, 1998)
β -Amiloide	Neuronas de hipocampo (rata)	Oligonucleótidos antisentido GSK-3 β	(Takashima <i>et al.</i> , 1998)
β -Amiloide	Neuronas de corteza (rata)	LiCl	(Alvarez <i>et al.</i> , 1999)

Estaurosporina Choque térmico	SH-SY5Y	LiCl (pre-tratamiento)	(Bijur <i>et al.</i> , 2000)
Retirada de factores tróficos + LY-294002 + Antagonistas NMDA-R	Neuronas de corteza (rata)	GSK3 β -K85R GBP (GSK3 <i>Binding Protein</i>)	(Hetman <i>et al.</i> , 2000)
Retirada de NGF Estaurosporina	PC12 SH-SY5Y	LiCl GSK3 β -K85R	(Bhat <i>et al.</i> , 2000)
LY-294002 Wortmannina	Neuronas de ganglios de la raíz dorsal (pollo)	SB-415286 SB-216763	(Cross <i>et al.</i> , 2001)
LY-294002	PC12	AdFRAT1 SB-216763 SB-415286	(Culbert <i>et al.</i> , 2001)
Retirada de factores tróficos	Progenitores eritroides (humano)	LiCl	(Somervaille <i>et al.</i> , 2001)
MPP+, Rotenona (inhibición de Complejo I mitocondrial)	SH-SY5Y	LiCl (pre-tratamiento)	(King <i>et al.</i> , 2001)
Poliglutamina	COS-7 SK-N-SH	LiCl, SB-216763 (pre- tratamiento) GSK3 β -K85R	(Carmichael <i>et al.</i> , 2002)
Hipoxia	A7r5 COS-7	LiCl, SB-216763 (pre- tratamiento) Sobreexpresión de GLUT1 Incremento en el flujo glucolítico	(Loberg <i>et al.</i> , 2002)
Daño al DNA (camptothecina, etopósido)	SH-SY5Y	LiCl, valproato (pre- tratamiento)	(Watcharasit <i>et al.</i> , 2002)
Desensamblaje del Golgi (brefeldina A, ácido nordihidroguaiarético)	Neuronas de corteza (rata)	LiCl (pre-tratamiento)	(Elyaman <i>et al.</i> , 2002)
Estrés de retículo (thapsigargina, tunicamicina, brefeldina A)	SH-SY5Y Progenitores inmortalizados de hipocampo (ratón)	GSK3 β -K85R LiCl (IGF-1, ácido okadaico, caliculina A)	(Song <i>et al.</i> , 2002)
PrP 106-126	Neuronas de corteza (ratón) N2a	LiCl – Insulina GSK3 β -K85R	(Perez <i>et al.</i> , 2003)
Excitotoxicidad (glutamato y kainato)	Neuronas de cerebelo e hipocampo (rata)	SB-216763 SB-415286	(Facci <i>et al.</i> , 2003)
LY-294002 β -Amiloide	N2a Cultivos organotípicos de secciones de hipocampo (rata)	AR-A014418	(Bhat <i>et al.</i> , 2003)
Etanol	Neuronas de corteza (rata)	SB-216763 Alsteropaulona	(Takadera y Ohyashiki, 2004)
Kainato	Cultivos organotípicos de secciones de hipocampo (rata)	LiCl (pre-tratamiento)	(Goodenough <i>et al.</i> , 2004)

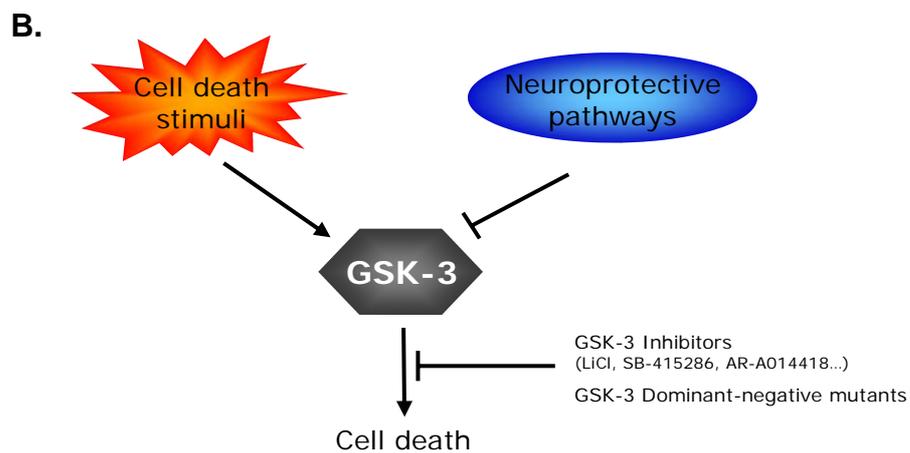
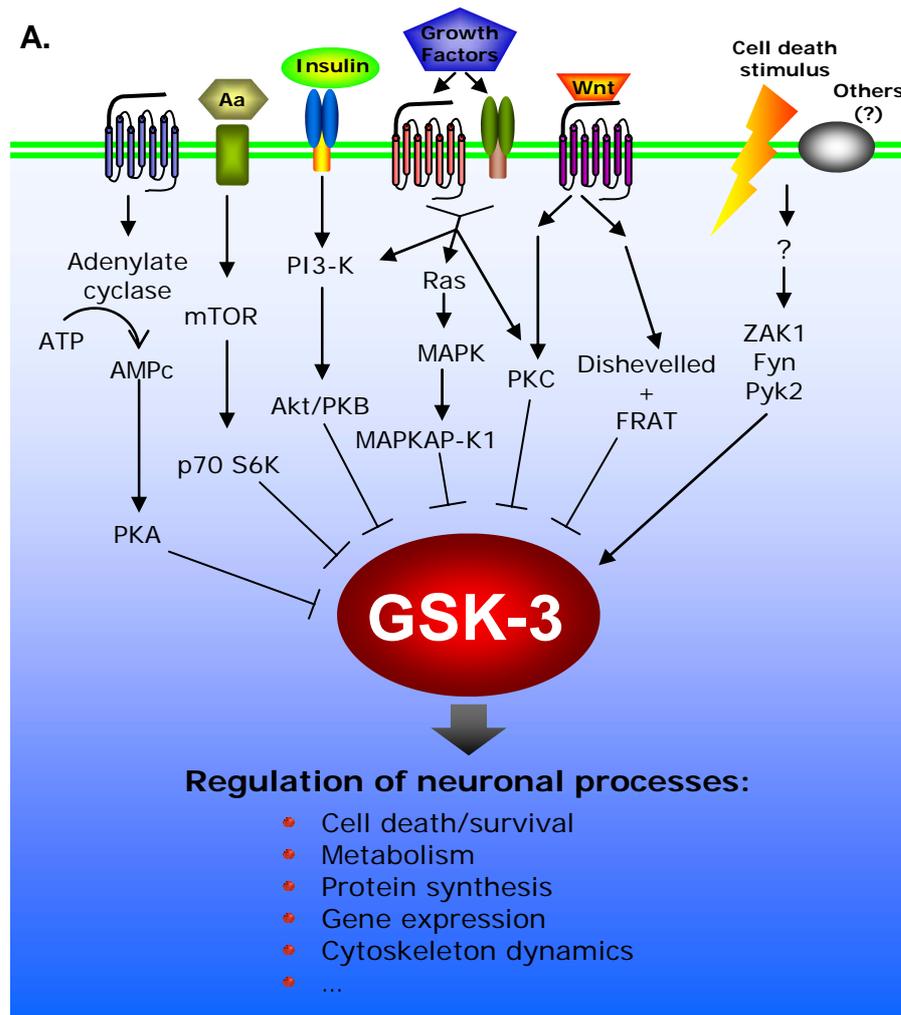


Figura 6. Regulación de GSK-3. **A.** Esquema simplificado que refleja la complejidad de la modulación de la actividad de GSK-3 por distintas vías de señalización celular en respuesta a distintos factores extracelulares resultando en la regulación de diversos procesos celulares. **B.** Esquema que recoge el papel de la GSK-3 en la muerte celular, y cómo éste puede ser evitado por la activación de vías de señalización de supervivencia o por inhibición de GSK-3, ya sea por inhibidores farmacológicos o por la expresión de mutantes de carácter dominante negativo.

Por otra parte, y en relación con lo mencionado anteriormente acerca de la activación de GSK-3 asociada a la mitocondria en respuesta a estímulos apoptóticos (**Figura 5**), se ha visto que GSK-3 puede fosforilar directamente Bax, promoviendo así su translocación a la mitocondria durante la apoptosis neuronal (Linseman *et al.*, 2004), si bien se desconoce el mecanismo de cómo esta fosforilación afecta a la localización subcelular de Bax. Además, otros estudios apuntan a la fosforilación por parte de GSK-3 del canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC; *Voltage-Dependent Anion Channel*), una proteína localizada en la membrana externa mitocondrial promoviendo de esta manera la disociación de la proteína glucolítica hexoquinasa II (HKII) de la mitocondria (Pastorino *et al.*, 2005). Precisamente, se ha asociado esta unión a la mitocondria de HKII a una mayor resistencia a apoptosis, ya que su actividad enzimática aumenta y a la vez impide la unión de Bax a la mitocondria, bloqueando así parcialmente sus efectos pro-apoptóticos (Pastorino *et al.*, 2002). A la luz de lo expuesto, parece que la GSK-3 intervendría de dos formas, directa e indirecta, para promover la translocación de Bax a la mitocondria. Recientemente se ha visto que otro de los sustratos de GSK-3 es la proteína anti-apoptótica de la familia Bcl-2 Mcl-1, la cual, una vez fosforilada por GSK-3 es dirigida a su degradación por el sistema de la ubiquitina-proteosoma (Maurer *et al.*, 2006), añadiendo así más consistencia al papel de GSK-3 como un modulador de la permeabilidad mitocondrial (**Figura 5**).

Otros trabajos recientes apuntan al factor 2 relacionado con el factor nuclear E2 (Nrf2; *Nuclear factor E2-related factor 2*) como un sustrato de GSK-3. GSK-3 podría estar fosforilando Nrf2, marcándolo así para su exclusión del núcleo; de esta forma impediría que Nrf2 transcribiese sus genes diana, relacionados con respuesta antioxidante y por tanto neuroprotectora (Salazar *et al.*, 2006).

Finalmente, también se ha propuesto otro mecanismo por el que GSK-3 podría estar favoreciendo la muerte neuronal, y es el incremento en la expresión de la pentraxina neuronal-1 (Enguita *et al.*, 2005). La pentraxina neuronal-1 (NP-1; *Neuronal Pentraxin-1*) es una proteína expresada exclusivamente en el sistema nervioso que podría estar actuando como interruptor para determinar la supervivencia o muerte celulares en función de la actividad sináptica, pues su silenciamiento con oligonucleótidos antisentido es capaz de atenuar la muerte de neuronas granulares de cerebelo en condiciones de bajo potasio (DeGregorio-Rocasolano *et al.*, 2001).

Así, lentamente se van desentrañando algunos de los mecanismos que podrían explicar los efectos de la GSK-3 sobre la muerte neuronal; sin embargo, aún queda mucho camino por recorrer.

Modelos de toxicidad mitocondrial. El modelo de rotenona

Existen distintos modelos experimentales de inducción de muerte neuronal para estudiar los mecanismos moleculares que tienen lugar en una célula durante una enfermedad neurodegenerativa, por ejemplo la retirada de factores tróficos del medio, la limitación en el oxígeno disponible, el tratamiento con agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno o la administración de agentes tóxicos que interfieren específicamente con un determinado proceso biológico y que, en algunos casos, son capaces de reproducir con una cierta fidelidad algunos de los eventos que acontecen en determinadas patologías.

No cabe ninguna duda sobre la utilidad de la rotenona como un agente tóxico perfectamente apto para inducir disfunción mitocondrial a través de la inhibición del complejo I y estudiar por tanto los distintos mecanismos moleculares subyacentes a la muerte celular así originada. De esta manera, y por citar sólo algunos ejemplos de trabajos llevados a cabo en cultivos celulares, se han evaluado los efectos de la disfunción mitocondrial inducida por rotenona en la producción de estrés oxidativo y sus implicaciones en muerte celular (Li *et al.*, 2003; Sherer *et al.*, 2003a; Kweon *et al.*, 2004) así como en la depleción energética por interrupción de la cadena respiratoria (Sherer *et al.*, 2003a; Kweon *et al.*, 2004).

Además, estos modelos han colaborado a dilucidar algunos de los mecanismos moleculares relacionados con la agregación aberrante de algunas proteínas que se observa tras el tratamiento con rotenona, como α -sinucleína (implicada en la formación de los cuerpos de Lewy) (Lee *et al.*, 2002; Sherer *et al.*, 2002), Tau (Hoglinger *et al.*, 2005) o γ -tubulina (Diaz-Corrales *et al.*, 2005). Se ha postulado que esta agregación podría deberse a una combinación de los daños oxidativos que se producen en estas proteínas y de la inhibición de la maquinaria que conforma el sistema de recambio de la ubiquitina-proteosoma (Shamoto-Nagai *et al.*, 2003). Por otro lado, y en esta misma línea, se han observado también procesos de estrés de retículo provocado como una respuesta de proteínas mal plegadas (UPR; *Unfolded-protein Response*) (Kitamura *et al.*, 2002; Ryu *et al.*, 2002). Los autores de estos trabajos sugieren que es precisamente esta agregación aberrante de proteínas lo que podría estar disparando esta respuesta.

Por supuesto, la disfunción mitocondrial inducida por rotenona se ha empleado para estudiar las vías de muerte que se disparan en una célula. Así, por ejemplo, se ha visto que uno de los mecanismos posibles de inducción de muerte podría estar mediado por la defosforilación y posterior activación de la proteína pro-apoptótica Bad (Watabe y Nakaki, 2004), que, como ya se ha mencionado anteriormente, se translocaría a la mitocondria para modificar su permeabilidad. Este mecanismo se activaría, según plantean los autores de este trabajo, como respuesta a la acumulación de α -sinucleína, que podría estar uniéndose a las proteínas 14-3-3, bloqueando su función y liberando Bad al citosol. También se han realizado estudios sobre el curso temporal de los eventos que tienen lugar durante la muerte celular programada en su etapa post-mitocondrial, como la liberación de citocromo c o AIF y la activación de caspasas (Pei *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2005).

En definitiva, el empleo de agentes tóxicos como la rotenona, que inhibe una función mitocondrial, puede desencadenar multitud de eventos que confluyen hacia la muerte celular. Todos estos datos, junto con las implicaciones patológicas anteriormente descritas, apoyan fuertemente el uso de la rotenona como agente inductor de disfunción mitocondrial en células neuronales para el establecimiento de modelos útiles y válidos para el estudio de la inducción y posible prevención de los mecanismos de muerte celular activados.

3. ESTRATEGIAS DE NEUROPROTECCIÓN

En los últimos años se ha producido un enorme avance en el conocimiento de los mecanismos moleculares básicos que conducen al desarrollo de una enfermedad neurodegenerativa, si bien todavía queda mucho trabajo por delante. Es precisamente por estos avances que se han ido pudiendo desarrollar estrategias terapéuticas y protectoras para atajar en parte la progresión del proceso neurodegenerativo (Forman *et al.*, 2004; Yakovlev y Faden, 2004) (**Figura 7**). Así, se han desarrollado estrategias más generales, que intentan neutralizar de alguna manera algunos de los eventos observados en las enfermedades neurodegenerativas, y otras más dirigidas a atacar puntos clave en el mecanismo molecular concreto de una enfermedad. En este apartado revisaremos de manera general algunas de estas estrategias desarrolladas.

Bloqueo de eventos generales durante la neurodegeneración

Como ya se ha mencionado anteriormente, el estrés oxidativo derivado de distintos eventos que acaecen en una célula neuronal en degeneración es un rasgo bastante extendido en muchas enfermedades. Así, existen numerosos ejemplos en la literatura que reportan protección frente al estrés oxidativo inducido por distintos agentes mediante la administración de moléculas de distinta naturaleza, pero con el

denominador común de su capacidad antioxidante, ya sean de origen sintético, animal o vegetal. Baste como ejemplo el mencionado anteriormente de la idebenona como tratamiento para la ataxia de Friedreich (Rustin *et al.*, 1999), aunque la literatura está poblada de ejemplos (Hinerfeld *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2004; Molina-Jimenez *et al.*, 2004; Moreira *et al.*, 2004; Zaidi y Banu, 2004; Somayajulu *et al.*, 2005). Algunos de estos compuestos pueden incluso ser modificados químicamente para dirigirlos específicamente a la mitocondria (Smith *et al.*, 2003; James *et al.*, 2005). También se han utilizado compuestos que, de manera indirecta, estimulan las defensas antioxidantes de la célula (Scapagnini *et al.*, 2002; Calabrese *et al.*, 2005), o incluso sobreexpresado en las células algunas de estas proteínas con capacidad antioxidante (Wang *et al.*, 2003; Schriener *et al.*, 2005; Shih *et al.*, 2005). Otra aproximación ha sido el uso de quelantes de algunos metales que, por acumulación, podrían estar causando daños oxidativos en la célula (Zaman *et al.*, 1999; Gum *et al.*, 2004).

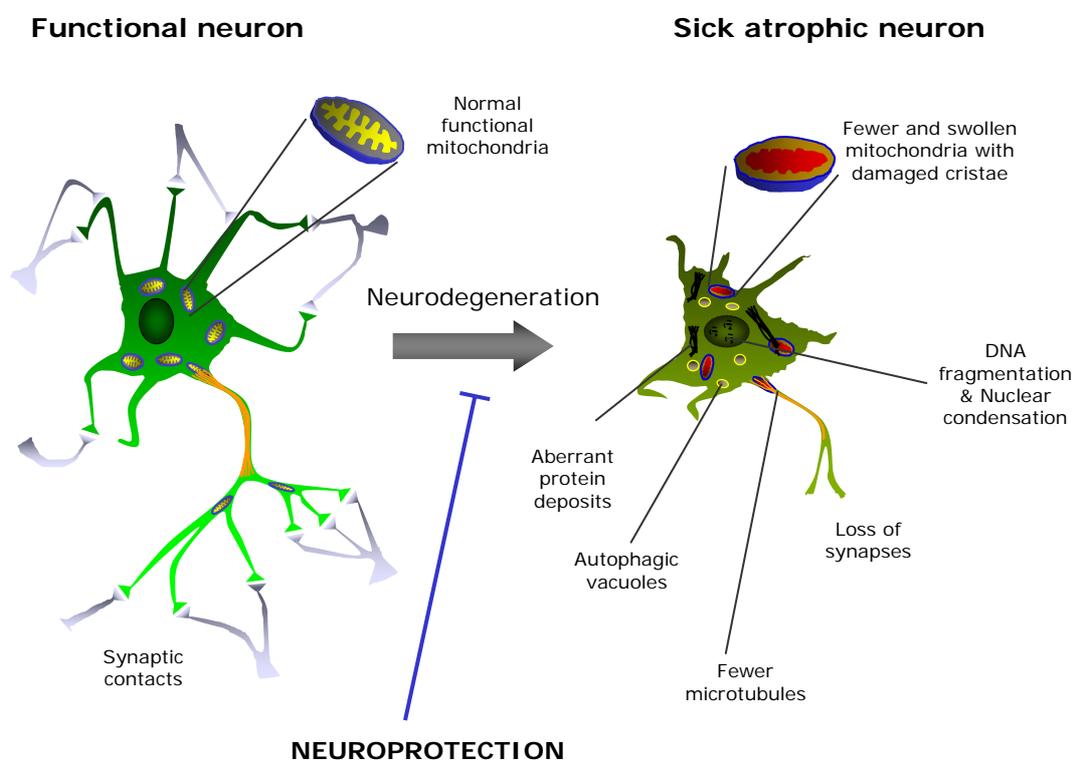


Figura 7. Neuroprotección. En este esquema se simplifica el objetivo fundamental que se persigue con la neuroprotección: impedir el proceso de degeneración neuronal, haciendo que las neuronas conserven, si no totalmente, al menos parcialmente, su actividad y funciones normales.

En esta misma línea de bloquear procesos de muerte celular durante la neurodegeneración se encuentra la aplicación de tratamientos que puedan interferir en algún paso de la apoptosis (revisado en Alam, 2003; Waldmeier y Tatton, 2004). Así, se ha visto que la sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas de la familia de Bcl-2, como Bcl-2 (Linnik *et al.*, 1995; Jia *et al.*, 1996; Lawrence *et al.*, 1996) o Bcl-X_L (Blomer *et al.*, 1998; Matsuoka *et al.*, 1999), resulta protectora frente a distintos estímulos pro-apoptóticos. De esta manera, se podrían modular distintas vías de señalización que condujesen a desencadenar o bloquear procesos de muerte celular con fines terapéuticos, para lo cual es fundamental la búsqueda de posibles dianas terapéuticas. A este respecto, y como ya se ha mencionado anteriormente, la GSK-3 podría ser una diana terapéutica perfectamente válida en una estrategia neuroprotectora (Li *et al.*, 2002; Woodgett, 2003).

También se han probado inhibidores de caspasas para proteger frente a algunos estímulos de muerte celular; sin embargo, cuanto más tarde se interfiere en el proceso de muerte, más difícil es pararlo (revisado en Waldmeier y Tatton, 2004). Es por esto que quizá sea más recomendable dejar los inhibidores de caspasas y otras drogas de efectos similares para estudios básicos a la hora de diseccionar mecanismos moleculares más que para las aplicaciones clínicas, y centrarse en eventos más tempranos de la cascada de señalización de muerte.

Estimulación de la supervivencia

Un abordaje que se ha planteado es el de sobreexpresar chaperonas, proteínas que contribuyen al correcto plegamiento de otras proteínas, entre las que destacan las proteínas del choque térmico (Hsp; *Heat shock proteins*), ya que se trata de proteínas que de manera natural se inducen en respuesta a distintas situaciones estresantes para intentar gestionar la crisis (Beere *et al.*, 2000; Beere, 2001; Chan *et al.*, 2004; Donaire *et al.*, 2005).

También se ha invertido mucho trabajo en desarrollar estrategias de neuroprotección y reparación neuronal basadas en la aplicación, ya sea por infusión directa o por medio de vectores de expresión, de factores tróficos. Los factores tróficos son unas moléculas de naturaleza peptídica que, unidas a sus receptores en la superficie celular, ejercen diversos efectos en las células, como supervivencia, proliferación, diferenciación o migración, entre otros (Weisenhorn *et al.*, 1999). Estos factores suelen actuar activando cascadas de fosforilación de las vías de PI3-K/Akt, MAPK o PKC, entre otras. De ahí el interés de estos factores como posibles agentes terapéuticos, por la posibilidad de salvar neuronas estimulando vías de supervivencia. Un caso especial dentro de estos factores lo constituyen las neurotrofinas o factores neurotróficos, entre los que se encuentran el factor de crecimiento nervioso (NGF; *Nerve Growth Factor*), el factor de crecimiento derivado de cerebro (BDNF; *Brain-Derived Neurotrophic Factor*), o las neurotrofinas 3 y 4 (NT-3, NT-4). Estos factores, específicos del sistema nervioso, tienen sistemas parecidos de señalización a través de unos receptores específicos con actividad tirosina-quinasa, los receptores TrkA, TrkB y TrkC (Huang y Reichardt, 2001; Chao, 2003).

El BDNF se ha utilizado con éxito en modelos de muerte inducida en neuronas corticospinales por axotomía (Hammond *et al.*, 1999), y se postula que podría proteger frente a distintos tipos de patologías neurodegenerativas, como el Alzheimer o el Parkinson (Fumagalli *et al.*, 2006a, 2006b) o la demencia producida por el virus VIH (Nosheny *et al.*, 2005), pues trabajos previos demuestran que es capaz de bloquear la muerte inducida en el estriado por excitotoxicidad (Perez-Navarro *et al.*, 2005).

Hace ya algunos años se vio que el tratamiento con NGF podía prevenir la degeneración de neuronas colinérgicas en primates (Koliatsos *et al.*, 1990; Tuszynski *et al.*, 1990), lo que ha conducido, años más tarde, a la puesta en marcha de estudios en fase clínica para la enfermedad de Alzheimer (Tuszynski *et al.*, 2005). En este caso, la estrategia seguida ha sido el autotransplante con fibroblastos del propio paciente modificados genéticamente para expresar NGF, aunque actualmente se están ensayando estrategias de terapia génica con vectores virales.

El NGF también se ha probado con éxito en modelos murinos de la enfermedad de Parkinson (Chaturvedi *et al.*, 2006). Sin embargo, para esta enfermedad ha tenido mucho más éxito el factor neurotrófico derivado de líneas celulares gliales (GDNF; *Glial-cell line-Derived Neurotrophic Factor*), que se ha probado en modelos murinos (Tomic *et al.*, 1995), de primate (Gash *et al.*, 1996; Eslamboli *et al.*, 2005) y, finalmente, se encuentra en fase clínica I, mediante la infusión directa, para el tratamiento de esta enfermedad (Gill *et al.*, 2003).

Otros factores, como el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1; *Insulin-like Growth Factor*) también han sido probados en fase clínica, en este caso para la esclerosis lateral amiotrófica, con

resultados no demasiado alentadores (Lai *et al.*, 1997; Borasio *et al.*, 1998). En cualquier caso, estudios posteriores demuestran que IGF-1 es capaz de proteger en un modelo de hipoxia/isquemia (Brywe *et al.*, 2005), y también se ha sugerido que podría constituir una eficaz herramienta para tratar algunas ataxias (Fernandez *et al.*, 1998; Fernandez *et al.*, 2005).

Además, algunos trabajos proponen el uso combinado de distintos factores tróficos, intentando aprovechar el sinergismo en su señalización. Así, se ha visto que la combinación de GDNF e IGF-1 puede retrasar el progreso de la patología en un modelo de ataxia hereditaria de degeneración de neuronas de Purkinje (Tolbert y Clark, 2003), mientras que la combinación de eritropoyetina (EPO) e IGF-1 resulta neuroprotectora en un modelo celular de excitotoxicidad (Digicaylioglu *et al.*, 2004).

Tratamientos específicos para una enfermedad concreta

Hasta ahora hemos hablado de estrategias generales que podrían, con mayor o menor eficacia, aplicarse a distintas enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, también se han desarrollado tratamientos dirigidos al origen o a la sintomatología específica de una determinada enfermedad.

Por citar únicamente algún ejemplo representativo, en el caso de la enfermedad de Parkinson, como ya se ha mencionado anteriormente, hay una pérdida generalizada de neuronas dopaminérgicas. Así, existe en estos pacientes una deficiencia en el sistema de neurotransmisión mediada por dopamina, lo que se intentó paliar administrando un análogo de este neurotransmisor, la L-dihidroxifenil-alanina, más conocido como levodopa (Yahr *et al.*, 1969; McDowell *et al.*, 1970). Desafortunadamente, el tratamiento demostró ser eficaz sólo de manera transitoria; en la actualidad existen proyectos para desarrollar nuevas estrategias contra el Parkinson e incluso medicamentos que puedan paliar estos efectos secundarios derivados de la levodopa (Tolosa, 2003).

4. TRANSFERENCIA GÉNICA. TERAPIA GÉNICA

Transferencia génica. Empleo de vectores virales

Hasta ahora hemos hablado de estrategias de neuroprotección en términos de dianas terapéuticas. Sin embargo, hay otro factor crucial a la hora de diseñar una estrategia terapéutica: el modo de administración. En el caso de la terapia génica, y de acuerdo a la definición que da la Agencia de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA; *Food and Drug Administration*), la terapia génica consiste en “el uso de genes normales o material genético que de alguna manera pueda sustituir o anular los efectos de genes defectuosos o mutados de carácter patogénico que son responsables de una enfermedad o problema médico”.

Así, existen numerosas aproximaciones de terapia génica, en función de la naturaleza de la enfermedad a tratar, como la introducción de copias normales de genes que se encuentran defectuosos en las células y que no pueden por tanto llevar a cabo su función de manera adecuada, el empleo de genes que codifiquen factores de supervivencia (como el caso anteriormente descrito de los factores tróficos) o factores de muerte (para matar células, como en el caso del cáncer) o material genético que sea capaz de alguna manera de silenciar o atenuar la expresión de un gen que por su actividad esté causando una enfermedad (como el uso de dominantes negativos o RNAi) (revisado en Kresina, 2001; Hsich *et al.*, 2002; Kootstra y Verma, 2003; Sapolsky, 2003). Además, es preciso que la estrategia terapéutica que se diseñe sea capaz de preservar, al menos en parte, la funcionalidad de los tejidos/órganos tratados, ya que, por ejemplo en el caso del sistema nervioso, de nada sirve una población neuronal que se ha rescatado de

una muerte segura en un proceso neurodegenerativo pero que no es capaz de llevar a cabo su función correctamente (Dumas y Sapolsky, 2001).

Uno de los primeros puntos a tratar en cuestiones de terapia génica es la transferencia génica, y para ello hay que escoger el vector adecuado. Además, el sistema nervioso, por sus características estructurales y funcionales, ofrece especiales dificultades a la hora de diseñar estrategias viables para la transferencia génica (Hsich *et al.*, 2002; Sapolsky, 2003). Así, tenemos vectores virales (Davidson y Breakefield, 2003; Kootstra y Verma, 2003; Lundstrom, 2003; Lundstrom y Boulikas, 2003) y vectores sintéticos o no virales (Lundstrom y Boulikas, 2003). Dada la poca eficiencia *in vivo* de los segundos, nos vamos a centrar en los primeros, los vectores virales.

Los vectores virales se obtienen por manipulación en el laboratorio de virus comúnmente patogénicos para el ser humano, o por otros virus que puedan presentar algún tropismo por células humanas, de forma que se aprovechan sus cualidades innatas para introducir material genético en las células (Davidson y Breakefield, 2003).

Existen algunas consideraciones previas que han de ser tenidas en cuenta para el desarrollo y aplicación de vectores virales (revisado en Hsich *et al.*, 2002). En primer lugar, una cuestión clave es la seguridad del vector. En este apartado se incluye la toxicidad del vector, que puede provenir tanto de proteínas virales del propio virión como de la expresión de algunos genes virales que permanezcan en el vector si éste es recombinante o de virus auxiliares necesarios para la producción y empaquetamiento de vectores que estén contaminando el stock. Además, el riesgo de mutagénesis insercional, la respuesta inmunológica del huésped o la posibilidad de reconstitución de partículas virales infectivas son también puntos importantes a considerar (Hsich *et al.*, 2002; Thomas *et al.*, 2003).

El control de la expresión génica también es importante en términos de regulación en el tiempo y el espacio (Hsich *et al.*, 2002; Davidson y Breakefield, 2003). En ocasiones puede interesar expresar un gen protector de manera transitoria, para tratar un trastorno neurológico agudo puntual (Sapolsky, 2003), pero en un proceso neurodegenerativo lento es preferible una expresión más sostenida (Hsich *et al.*, 2002), por lo que es necesario un profundo estudio de los promotores que se van a emplear en la construcción del vector en función de lo que se requiera.

Existen en la actualidad distintos tipos de vectores virales que se han ido desarrollando, entre los que destacan los adenovirus, los retrovirus, los lentivirus, los adeno-asociados (AAV; *adeno-associated virus*) y los herpes virus, y cuyas características más sobresalientes se resumen en la tabla 2.

De todos estos vectores, para el sistema nervioso resultan de escaso interés los basados en adenovirus, por su bajo tropismo en neuronas, o los retrovirus, ya que sólo infectan células en división (y las neuronas son células post-mitóticas) (Lundstrom, 2003). Los adeno-asociados son parvovirus humanos no patogénicos que requieren la co-infección con otro virus para replicarse. Es precisamente ésta su característica más atractiva como vehículo de transferencia génica. Los vectores AAV además se integran en el genoma celular, lo cual puede proporcionar una expresión estable y duradera, aunque conlleva el riesgo de mutagénesis insercional (Mandel *et al.*, 2006). Su capacidad de acomodar fragmentos no superiores a 4,5 kb y su ineficiente producción (Lundstrom, 2003) suponen una gran limitación de estos vectores, aunque muchos grupos tienen puestas grandes esperanzas en estos vectores para tratar enfermedades neurológicas (Mandel *et al.*, 2006).

Los lentivirus, en su mayoría basados en virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), constituyen otra plataforma válida para la transferencia génica en neuronas (Wong *et al.*, 2006). Su tropismo por las neuronas es razonablemente bueno, y su capacidad de acomodar DNA exógeno hasta 8 kb es claramente superior a la de los vectores AAV si bien sigue siendo limitada (Mandel *et al.*, 2006; Wong *et al.*, 2006). La dificultad de obtener altos títulos y la integración en el genoma del hospedador cuestionan su utilidad como vectores en terapia génica, si bien estudios recientes demuestran que es

posible utilizar *in vivo* lentivirus deficientes en integración, con lo que desaparece el riesgo de mutagénesis insercional (Yanez-Munoz *et al.*, 2006).

Tabla 2. Resumen de las características más destacadas de los vectores virales más habituales (basada en Lundstrom, 2003).

Vector	Capacidad	Rango de hospedador	Otras características
Retrovirus	7-8 Kb	Restringido. Sólo células en división	Integración en el genoma Expresión duradera
Lentivirus	7-8 Kb	Amplio. Células en división y quiescentes	Integración en el genoma Expresión duradera Eficiencia de producción variable
Adenovirus (recombinante)	20 Kb	Amplio. Poco eficiente en neuronas	No se integran Inmunogénicos Expresión transitoria
Adenovirus (“gutless”)	Hasta 36 Kb		
AAV	4,5 Kb	Amplio. Células en división y quiescentes	Cinética de expresión lenta Integración en el genoma Producción ineficiente
HSV-1 (recombinante)	30-50 Kb	Amplio. Neuronas, células madre, células musculares	Latencia (posibilidad de formar episomas) Expresión duradera
HSV-1 (amplificón)	Hasta 155 Kb		No se integran Baja toxicidad

Vectores herpesvirales derivados del virus Herpes Simplex tipo 1 (HSV-1)

Hemos centrado nuestro interés en los vectores de HSV-1 por diversas razones. Algunas de sus características fundamentales son su tropismo natural por el sistema nervioso, lo que los convierte en vehículos ideales para la transferencia génica en neuronas; su alta capacidad de acomodación de DNA exógeno de hasta 150 kb; su baja citotoxicidad; y, finalmente, no se integran en el genoma, reduciendo así el riesgo de mutagénesis insercional, pero pueden persistir en la célula de manera estable como episomas extracromosómicos estables (revisado en Fink y Glorioso, 1997; Burton *et al.*, 2002; Mata *et al.*, 2002; Glorioso *et al.*, 2003; Glorioso y Fink, 2004; Goins *et al.*, 2004; Goss *et al.*, 2004; Oehmig *et al.*, 2004; Epstein, 2005).

Otra de las cualidades de los virus HSV-1 es su capacidad de llevar a cabo “saltos” trans-sinápticos, de manera que el vector no se queda únicamente en la región donde se ha inyectado, sino que es capaz de viajar retrógradamente por el axón de una neurona hacia el cuerpo celular y de ahí pasar a la siguiente sinapsis (Lilley *et al.*, 2001; Douglas *et al.*, 2004; Frampton *et al.*, 2005). Así, estudios previos de nuestro laboratorio demostraron la transferencia génica eficiente a neuronas de Purkinje de la corteza cerebelar inyectando un vector de HSV-1 en la oliva inferior (Agudo *et al.*, 2002). Otros trabajos han descrito expresión mediada en la corteza en lugares distantes al sitio de inyección (Tabbaa *et al.*, 2005) o, como los estudios realizados en el laboratorio de J. Glorioso, en los que inyectan vectores de HSV-1 de forma subcutánea en la región plantar del miembro posterior de la rata y detectan la expresión transgénica en los ganglios de la raíz dorsal, con el objetivo de tratar el dolor neuropático mediante la administración de distintos factores tróficos (Chattopadhyay *et al.*, 2002; Chattopadhyay *et al.*, 2003; Hao *et al.*, 2003).

Los virus HSV están compuestos por un DNA lineal de doble cadena (circularizado una vez que se introduce en la célula) alojado en una cápsida icosaédrica que a su vez está recubierta por una envuelta lipídica (procedente de membranas celulares) con glicoproteínas encargadas de mediar la entrada en la célula; entre la envuelta y la cápsida está el tegumento, en el cual se encuentran distintas proteínas y

factores implicados en promover la expresión de los genes virales y silenciar la expresión de genes de la célula hospedadora. El genoma, de unos 150 kb, codifica aproximadamente unos 80 genes que siguen un programa temporal de expresión muy regulado (revisado en Glorioso y Fink, 2004; Oehmig *et al.*, 2004).

Existen dos tipos de vectores de HSV-1, los recombinantes y los amplicones (revisado en Glorioso y Fink, 2004; Epstein, 2005; Epstein *et al.*, 2005). Los recombinantes se generan por eliminación de algunos genes necesarios para la replicación viral y posterior sustitución por el gen o genes de interés, mientras que los amplicones no contienen ningún gen viral, únicamente incluyen en su secuencia la señal “*a*” (también llamada “*pac*”) de empaquetamiento viral y el origen de replicación viral “*Orig*”, ambos elementos necesarios para empaquetar el vector en una cápsida de HSV-1. La ventaja principal de los amplicones sobre los vectores de HSV recombinantes es a nivel de manipulación, ya que el gran tamaño del genoma del herpes dificulta su manejo. Por otra parte, el vector recombinante permite una capacidad de acomodar DNA exógeno de hasta 50 kb, pero los amplicones permiten acomodar hasta 150 kb, lo cual posibilita la construcción de vectores que porten un locus genómico completo (Wade-Martins *et al.*, 2001; Senior y Wade-Martins, 2005). La posibilidad de introducir un locus genómico completo abre un abanico de posibilidades enorme en la terapia génica, ya que con estos vectores se espera conseguir una regulación de la expresión génica muy precisa a nivel de tejido y tipo celular, con unos niveles de expresión fisiológicos y sostenidos en el tiempo (Wade-Martins *et al.*, 2001; Wade-Martins *et al.*, 2003; Inoue *et al.*, 2004; Xing *et al.*, 2004; Senior y Wade-Martins, 2005).

Con respecto a los sistemas de producción de vectores, existen distintas alternativas (**Figura 8**). Los primeros sistemas que se desarrollaron, y que se siguen empleando en la actualidad en sus versiones mejoradas, emplean virus auxiliares deficientes en replicación y una línea empaquetadora capaz de suplementar en *trans* los genes para los que el virus auxiliar es defectivo (Lim *et al.*, 1996). Los títulos obtenidos son muy altos, pero el mayor inconveniente que presentan estos sistemas es la presencia contaminante de virus auxiliar, lo que conlleva un riesgo de citotoxicidad. Así pues, se desarrollaron sistemas de empaquetamiento libres de virus auxiliar. Inicialmente, se probó uno en el que se dividió el genoma de HSV-1 en cinco partes, que fueron clonadas en cósmidos para su posterior co-transfección en una línea celular junto con el vector a empaquetar (Fraefel *et al.*, 1996). Esta técnica demostró ser válida, pero poco eficiente. Posteriormente, este sistema se ha mejorado utilizando un cromosoma artificial de bacterias (BAC; *Bacterial Artificial Chromosome*) en el que se ha clonado todo el genoma de HSV-1 excepto un gen esencial para la replicación viral, el gen ICP27. Además, se ha eliminado la señal de empaquetamiento viral, y se han añadido copias extra del gen ICP0, por lo que el BAC tiene un tamaño final de 178 kb, con lo cual no puede caber en una cápsida viral. De esta manera, si se cotransfectan el BAC y el vector en una línea celular empaquetadora establemente transfectada con el gen ICP27, se puede generar un stock viral que contiene únicamente el vector, libre de contaminaciones de virus auxiliares (Saeki *et al.*, 2001).

En cuanto a seguridad, la citotoxicidad de los vectores de HSV-1 deficientes en replicación es baja (revisado en Davidson y Breakefield, 2003; Lundstrom, 2003), y algunos trabajos muestran que la inyección in vivo de estos vectores causa una mínima reacción inflamatoria, fundamentalmente debida a la lesión mecánica de la aguja utilizada para la inyección (Agudo *et al.*, 2002; Wolfe *et al.*, 2004), si bien hay estudios que reportan una menor inflamación cuando el sistema de producción es independiente de virus auxiliar, dado que no hay síntesis *de novo* de proteínas virales (Olschowka *et al.*, 2003).

Todas estas características hacen que los vectores de HSV-1 sean particularmente idóneos para la transferencia génica a células neuronales; de ahí que abunden las referencias en la literatura reportando datos basados en el empleo de vectores de HSV-1 tanto *in vitro* como *in vivo*.

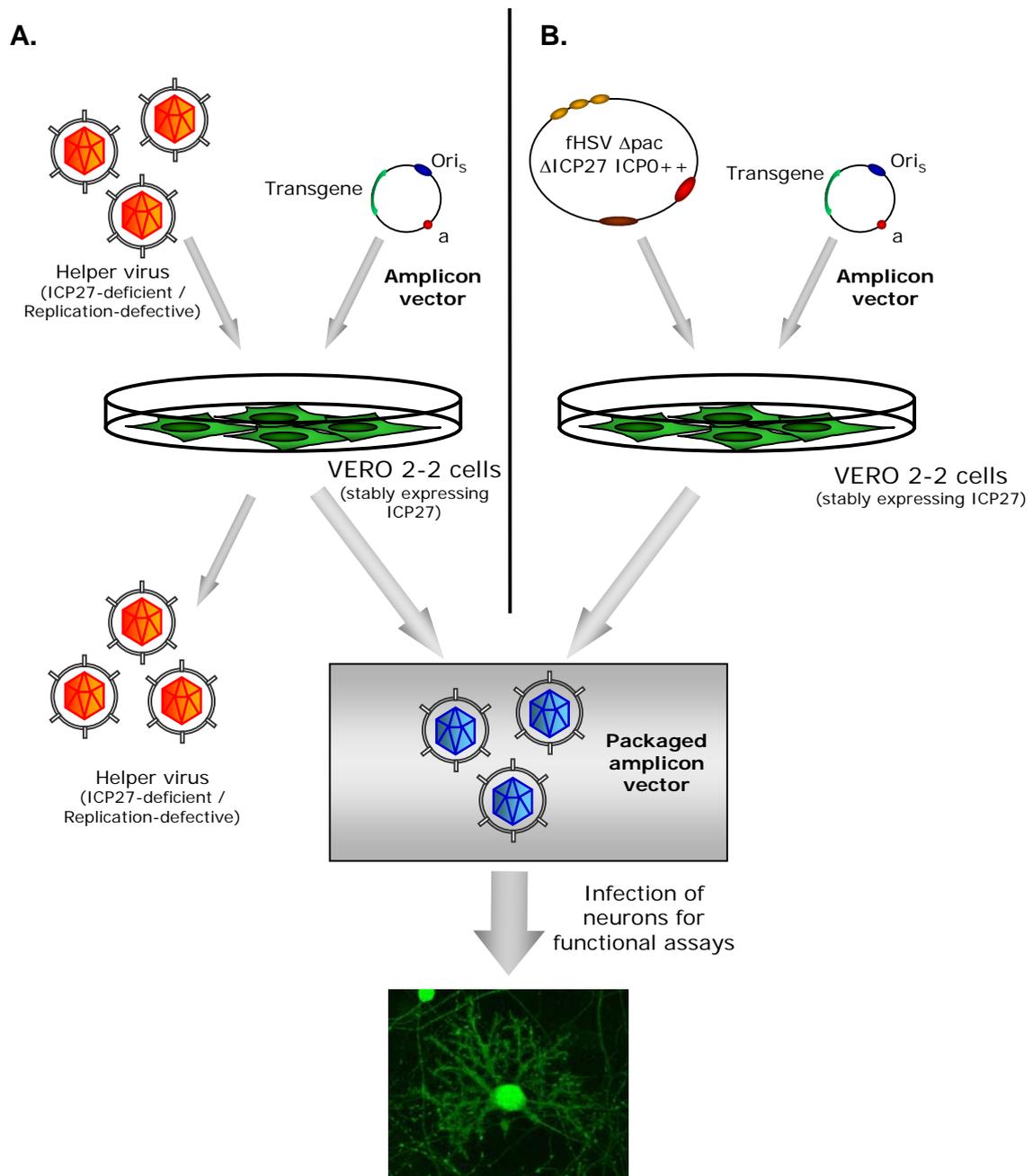


Figura 8. Producción de amplicones de HSV-1. Representación de dos sistemas de obtención de vectores virales basados en HSV-1. **A.** El sistema dependiente de virus auxiliar consiste en transfectar el vector amplicón en una línea celular empaquetadora y posteriormente superinfectar con virus auxiliar defectivo en replicación. En el stock final hay una mezcla de vector y virus auxiliar. **B.** En el sistema libre de virus auxiliar se co-transfectan el vector amplicón junto con un BAC que codifica el genoma de HSV-1 con algunas modificaciones para impedir la reconstitución del virus silvestre (fHSV Δ pac Δ ICP27 ICP0++) en una línea celular empaquetadora; en el stock final únicamente hay vector empaquetado.

Resumen de la *Introducción*

Como resumen final, la disfunción mitocondrial es un evento celular común a numerosas enfermedades neurodegenerativas. Así, la profundización en los mecanismos moleculares asociados a la muerte neuronal inducida por disfunción mitocondrial puede ayudarnos a encontrar nuevas dianas terapéuticas.

En este contexto, la transferencia génica mediada por vectores herpesvirales constituye una plataforma tecnológica muy potente y prometedora para identificar genes potencialmente neuroprotectores, estudiar los mecanismos neuroprotectores a nivel molecular y desarrollar estrategias de terapia génica para el tratamiento de enfermedades neurológicas.

Objetivos

En esta tesis hemos buscado estudiar posibles estrategias neuroprotectoras frente a la disfunción mitocondrial basadas en la transferencia génica a neuronas mediante vectores de HSV-1. Para ello nos hemos planteado los siguientes objetivos:

1. Establecimiento y caracterización de modelos susceptibles a la transducción génica mediada por vectores de HSV-1.
2. Caracterización de un modelo de inducción de muerte neuronal por disfunción mitocondrial.
3. Análisis del efecto de la inhibición de la glucógeno sintasa quinasa-3 (GSK-3) frente a la muerte neuronal inducida por disfunción mitocondrial. Estudio de los mecanismos moleculares subyacentes a la protección derivada de la inhibición de GSK-3.
4. Diseño y construcción de un vector genómico de frataxina humana. Estudio del efecto de la expresión de frataxina sobre la muerte neuronal inducida por disfunción mitocondrial.
5. Diseño y construcción de vectores reporteros de expresión de frataxina humana. Desarrollo de algunas aplicaciones prácticas de estos vectores.

Materiales y Métodos

1. MATERIALES Y REACTIVOS

El ácido retinoico (Sigma, Madrid, España) fue disuelto en etanol al 95% a una concentración final de 1 mM y conservado a -20°C en una botella preservada de la oscuridad. Dada su inestabilidad, cada stock fue descartado al mes de su preparación. El dibutilil-monofosfato de adenosina cíclico (dibutilil AMP cíclico, dbcAMP; Sigma, Madrid, España) fue disuelto en tampón fosfato salino (PBS), filtrado con un filtro de 0,22 µm y conservado a -20°C hasta su uso. El factor neurotrófico derivado de cerebro recombinante humano (BDNF; *Brain-Derived Neurotrophic Factor*; Alomone Labs, Jerusalén, Israel) fue disuelto en H₂O y conservado a -80°C hasta su uso. El inhibidor de receptores de neurotrofinas asociados a actividad tirosina quinasa (Trk) K252a y el inhibidor de PI3-quinasa (PI3-K) LY-294002 (ambos de Calbiochem, La Jolla, CA, EEUU), la rotenona (Sigma, Madrid, España) y el inhibidor de GSK-3 SB-415286 (Tocris Bioscience, Bristol, Reino Unido) fueron resuspendidos en dimetilsulfóxido (DMSO) y conservados a -20°C hasta su uso. La 2-desoxiglucosa (2-DGlc; Sigma, Madrid, España) y la eritropoyetina recombinante humana (hEPO; Calbiochem, La Jolla, CA, EEUU) fueron disueltas en H₂O y conservadas a -20°C hasta su uso. Los oligonucleótidos utilizados como iniciadores para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fueron obtenidos bien de Isogen Lifescience (Ijsselstein, Holanda) o de MWG Biotech (Londres, Reino Unido), y se resuspendieron en Tris-HCl 10 mM pH 8,0.

2. CULTIVOS CELULARES

2.1. Cultivos de líneas celulares

Las líneas celulares SH-SY5Y (neuroblastoma humano), VERO y VERO 2-2 (epitelio de riñón de mono) fueron cultivadas en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado con suero bovino fetal (FBS; Invitrogen Life Technologies-Gibco, Barcelona, España) al 10%, L-glutamina 2 mM y mezcla de antibióticos (penicilina/estreptomicina). Adicionalmente, la línea establemente transfectada VERO 2-2 (con el gen IE2 de HSV-1) fue mantenida en presencia del antibiótico de selección G-418 (500 µg/ml).

La línea celular P19 (carcinoma embrionario de ratón) fue cultivada en medio mínimo esencial (MEM; *Minimal Essential Medium*) con la modificación “alfa” suplementado con FBS inactivado al 10%, L-glutamina 2 mM y mezcla de antibióticos.

En todos los casos, las células se mantuvieron en un incubador a 37°C con un 5% de CO₂ y un 95% de humedad.

2.2. Diferenciación del neuroblastoma humano SH-SY5Y

Para la diferenciación de células SH-SY5Y a células similares a neuronas humanas en cultivo se siguió un nuevo protocolo que hemos optimizado (Gimenez-Cassina *et al.*, 2006a) utilizando como base algunos estudios previos (García-Perez *et al.*, 1998; Encinas *et al.*, 2000) con algunas modificaciones. Básicamente, las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y se sembraron a una densidad de 2-5x10³ células/cm² en placas o cubres previamente recubiertos con MatrigelTM (BD Biosciences, Bedford, EEUU) diluido 1:50 en DMEM. Al día siguiente, se cambió el medio por otro consistente en DMEM suplementado con 5% FBS, L-glutamina 2 mM, ácido retinoico 10 µM y mezcla de antibióticos (penicilina/estreptomicina). Las células se mantuvieron en este medio durante 5 días reemplazándolo por medio fresco cada 2 días. A continuación se cambió el medio por uno definido consistente en Neurobasal suplementado con B-27 (ambos de Invitrogen Life Technologies-Gibco, Barcelona, España), KCl 20 mM,

GlutaMaxI 2 mM (Invitrogen Life Technologies-Gibco, Barcelona, España), dbcAMP, 2 mM, BDNF 50 ng/ml y mezcla de antibióticos. Las células se dejaron en este medio 5 días más.

2.3. Cultivos primarios

El empleo de animales de experimentación (ratones) se llevó a cabo en riguroso cumplimiento de las directrices establecidas por la Unión Europea (86/609/EEC) y aprobadas por la comisión de Bioética de la Universidad Autónoma de Madrid.

a) *Neuronas de bulbo raquídeo de ratón*

Las neuronas primarias de bulbo raquídeo se obtuvieron a partir de embriones de ratón (*Mus musculus*) de la cepa Swiss. Básicamente, las ratonas gestantes fueron sacrificadas en el día 16 de gestación en una cámara de CO₂, y los embriones (E16) fueron extraídos mediante cesárea. La disección del bulbo raquídeo, que se encuentra en el tronco del encéfalo, y la retirada de meninges fueron llevadas a cabo en solución salina equilibrada de Hank (HBSS; *Hank's Balanced Salt Solution*; Invitrogen Life Technologies-Gibco, Barcelona, España), y tras retirar el medio de disección, las células aisladas de bulbo raquídeo fueron obtenidas por digestión con papaína y DNasa, siguiendo las instrucciones del fabricante (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, EEUU). Posteriormente, se disgregaron y plaquearon sobre superficies previamente tratadas con 500 µg/ml de poli-L-lisina (Sigma, Madrid, España). El medio de cultivo utilizado fue una mezcla 1:1 de Neurobasal y Neurobasal A suplementada con B-27, GlutaMax I 2mM y mezcla de antibióticos previamente descrita (Kivell *et al.*, 2000, 2001). A las 24 horas del plaqueo se añadió 1-β-D-arabinofuranosilcitosina 5µM (Ara-C; Calbiochem, La Jolla, CA, EEUU), para evitar la proliferación de la glía. Cada 2-3 días se cambió 1/3 del medio por medio fresco.

b) *Neuronas de corteza cerebral de ratón*

Las neuronas primarias de corteza cerebral se obtuvieron a partir de embriones de ratón de 18 días (E18) de la cepa Swiss por un método previamente descrito (Bartlett y Banker, 1984). La disección de las cortezas fue realizada en medio HBSS, después fueron lavadas 3 veces con HBSS sin Ca²⁺ ni Mg²⁺ y digeridas durante 15 minutos a 37°C con agitación ocasional en una solución de HBSS sin Ca²⁺ ni Mg²⁺ con 2,5 mg/ml Tripsina (Sigma, Madrid, España) y 1 mg/ml DNasaI bovina pancreática (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Posteriormente, la solución de digestión fue retirada y se lavó el tejido 3 veces con HBSS sin Ca²⁺ ni Mg²⁺. Finalmente, se disgregó el tejido con una pipeta Pasteur estrechada al fuego y la suspensión celular resultante se plaqueó sobre placas previamente cubiertas con 500 µg/ml de Poli-L-Lisina en medio MEM suplementado con Glucosa 0,6%, suero de caballo 10% (Invitrogen Life Technologies-Gibco, Barcelona, España) y mezcla de antibióticos. A las 3 horas, el medio de plaqueo fue cambiado a uno definitivo consistente en Neurobasal suplementado con B-27, GlutaMaxI 2 mM y mezcla de antibióticos. A las 24 horas del plaqueo se añadió Ara-C 5µM, para evitar la proliferación de la glía. Cada 2-3 días se cambió 1/3 del medio por medio fresco.

c) *Cultivos mixtos de neuronas de cerebelo de ratón enriquecidos en células de Purkinje*

Los cultivos de células de corteza cerebelosa enriquecidos en neuronas de Purkinje se obtuvieron mediante un nuevo procedimiento (Gimenez-Cassina *et al.*, 2006b, enviado a publicación) a partir de

embriones de ratón de la cepa Swiss. Las ratonas gestantes fueron sacrificadas en el día 16 de gestación en una cámara de CO₂, y los embriones (E16) fueron extraídos mediante cesárea. La disección de la corteza cerebelar y la retirada de meninges fueron llevadas a cabo en HBSS, y tras retirar el medio de disección, las cortezas de cerebelo intactas fueron incubadas en una solución de papaína y DNasa, siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se disgregaron y plaquearon sobre superficies previamente tratadas con 500 µg/ml de poli-L-lisina. El medio de cultivo utilizado fue Neurobasal suplementado con B-27, GlutaMax I 2mM, suero de caballo al 1%, adenina 2 mM (Sigma, Madrid, España), cloruro potásico 3 mM (concentración final 8 mM) y mezcla de antibióticos. A los 3 días del plaqueo se añadió Ara-C 5µM (Calbiochem, La Jolla, CA, EEUU), para evitar la proliferación de la glía. Cada 2-3 días se cambió 1/3 del medio por medio fresco.

2.4. Empaquetamiento y titulación de vectores derivados de HSV-1

a) Sistema dependiente de virus auxiliar

Los amplicones se empaquetaron según un protocolo anteriormente descrito (Lim *et al.*, 1996). Básicamente, las células VERO 2-2, establemente transfectadas con el gen IE2 (*Immediate Early-2*) de HSV-1 que codifica para la proteína ICP27 (*Infected Cell Polypeptide-27*), fueron sembradas en placas p60 a una densidad de 10⁶ células/placa. Al día siguiente, fueron transfectadas transitoriamente con el amplicón (4 µg de DNA) a empaquetar utilizando el reactivo Lipofectamina Plus (Invitrogen Life Technologies, Barcelona, España), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. 24 horas más tarde, se infectaron las células con la cepa de virus auxiliar defectivo en replicación 5dl1.2, que carece del gen IE2 (esencial para la replicación) y que es suplementado en *trans* por la célula empaquetadora. La reacción de empaquetamiento (en la que se empaquetan tanto vectores como virus auxiliares) se dejó transcurrir durante 48 horas. A continuación las partículas virales fueron recogidas extrayendo mecánicamente las células de la placa y someténdolas a lisis mediante tres ciclos de congelación-descogelación (con un baño de hielo seco y etanol y otro a 37°C) seguidos de sonicación. Para aumentar el título de vector y su proporción sobre la de virus auxiliar, se llevaron a cabo sucesivos ciclos de infección con el sobrenadante obtenido sobre monocapas de células VERO 2-2.

b) Sistema libre de virus auxiliar

El sistema de empaquetamiento libre de virus auxiliar ha sido previamente descrito (Saeki *et al.*, 2001). Brevemente, las células VERO 2-2 fueron sembradas en placas p60 a una densidad de 10⁶ células/placa. Al día siguiente fueron sometidas a una triple transfección con Lipofectamina Plus:

- Amplicón (1,8 µg)
- BAC fHSVΔpacΔICP27 ICP0+ (2 µg)
- Plásmido pEBH ICP27 (0,2 µg)

El BAC fHSVΔpacΔICP27 ICP0+ es un vector en el que se ha clonado todo el genoma de HSV-1 con algunas modificaciones como medidas de seguridad para evitar el empaquetamiento de partículas virales: se han eliminado la señal de empaquetamiento (*pac*) y el gen inmediatamente temprano IE2 que codifica para la proteína ICP27, esencial para replicación; además lleva una expansión del gen ICP0, de forma que tiene un tamaño de unas 178 kb, lo que excede la capacidad de la cápsida viral (cuyo límite está en torno a 155-160 kb) (Saeki *et al.*, 2001).

La reacción de empaquetamiento se dejó transcurrir durante 60-62 horas, después de las cuales las partículas virales se prepararon de la misma manera que en el caso anterior.

c) Titulación

El título de los vectores fue determinado en monocapas de células VERO. Básicamente, las células fueron infectadas a distintas diluciones y examinadas 24 horas después, bien por microscopía de fluorescencia (en el caso de los vectores que llevan el gen de la proteína verde fluorescente o *GFP*), tinción X-Gal (para los vectores que llevan el gen de la β -galactosidasa de *E. coli*) o inmunocitoquímica.

2.5. Tratamientos

Las células fueron expuestas a distintos compuestos en determinadas condiciones de tiempo y concentración, indicados en cada caso. Para los tratamientos crónicos con cloruro de litio (LiCl), las células fueron tratadas con LiCl en presencia de añadió myo-inositol 2 mM para minimizar los efectos de la inhibición de la myo-inositol monofosfatasa por cloruro de litio (Berridge *et al.*, 1989).

Cuando las células fueron expuestas a un estímulo proapoptótico (rotenona, LY-294002), el medio utilizado fue el mismo de cultivo habitual para esas células suplementado con B-27 sin antioxidantes (Invitrogen Life Technologies-Gibco, Barcelona, España) en lugar de B-27 completo. En el caso de los tratamientos con 2-desoxiglucosa 2 mM, el medio utilizado fue DMEM sin glucosa suplementado con B-27 y piruvato sódico 2 mM.

En todos los casos, controles con células tratadas únicamente con el vehículo en el que fue disuelta cada droga se llevaron en paralelo a los tratamientos para descartar efectos inespecíficos.

3. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR ELECTROTRANSFERENCIA E INMUNODETECCIÓN (*WESTERN-BLOT*)

Las placas de células se lavaron con tampón fosfato salino (PBS) y se homogeneizaron las células a 4°C en un tampón compuesto por:

- 20 mM HEPES pH 7,4
- 100 mM cloruro sódico (NaCl)
- 100 mM fluoruro sódico (NaF)
- 1 mM ortovanadato sódico (Na_3VO_4)
- 1% Triton X-100
- 5 mM EDTA

Cóctel de inhibidores de proteasas (COMPLETE™, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania)

Después de determinar la concentración de proteínas por el ensayo de Bradford (reactivo de Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.), se mezclaron las muestras con tampón de carga con SDS, se hirvieron 5 minutos y se separaron por electroforesis en geles del 8-15% acrilamida-bisacrilamida-SDS (Laemmli, 1970) y se transfirieron finalmente a membranas de nitrocelulosa. Dichas membranas fueron bloqueadas en una solución de leche desnatada liofilizada al 10% en PBS con Tween-20 al 0.2% (PBST).

A continuación, las membranas fueron incubadas toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario (tabla 3) diluido en la solución de bloqueo. Los filtros fueron entonces lavados tres veces con PBST e incubados 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado a peroxidasa (dilución 1:5000, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EE.UU.). La inmunoreactividad fue visualizada mediante un sistema de quimioluminiscencia (*Enhanced Chemiluminescence Detection system, ECL*, PerkinElmer Life Sciences, Inc., Boston, MA, EE.UU.). El

análisis densitométrico de la intensidad de las bandas se llevó a cabo con un densitómetro GS-710 (BioRad, Hercules, CA, EE.UU.)

Tabla 3. Anticuerpos utilizados en Western-Blot. Abreviaturas: mAb, Anticuerpo monoclonal generado en ratón; pAb, Anticuerpo policlonal generado (a no ser que se especifique otra cosa) en conejo. Todos los anticuerpos son del isotipo IgG, a no ser que se indique específicamente.

Antígeno	Anticuerpo	Tipo	Dilución	Fuente
βIII-Tubulina	334	pAb	1:2000	(Diaz-Nido <i>et al.</i> , 1990)
β-Actina	β-Actina	mAb	1:1000	Sigma (Madrid, España)
Tau total	7.51	mAb	1:500	Regalo del Dr. Wischik (MRC, Cambridge, Reino Unido)
Neurofilamento 160 KDa	NF-160	mAb	1:500	Sigma (Madrid, España)
Quinasa dependiente de ciclina – 1 (cdk-1)	Cdk-1/Cdc-2	pAb	1:1000	Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, EEUU)
β-Galactosidasa	β-Gal	pAb	1:10000	MP Biomedicals, Inc. (Eschwege, Alemania)
Péptido FLAG	FLAG	pAb	1:2000	Generado contra el péptido MDYKDDDDKS (Munoz-Montano <i>et al.</i> , 1999a)
Glucógeno sintasa quinasa-3-β (GSK-3β)	GSK-3β	mAb	1:2000	BD Biosciences (Bedford, EE.UU.)
GSK-3 α/β total	GSK3-α/β	mAb	1:1000	Biosource International, Inc. (Camarillo, CA, EEUU)
GSK3 α/β fosforilada en serina 21/9	GSK3α/β P ^{21/9} Ser	pAb	1:1000	New England Biolabs (Hitchin Hertfordshire, Reino Unido)
GSK3 α/β fosforilada en tirosina 279/216	GSK3α/β P ^{279/216} Ty	pAb	1:1000	Biosource International, Inc. (Camarillo, CA, EEUU)
Bax	Bax	mAb	1:400	BD Biosciences (Bedford, EE.UU.)
Proteína de choque térmico-60	Hsp-60	mAb	1:1000	Stressgen Biotechnologies (Victoria, Canada)
Complejo V mitocondrial, subunidad β	Complejo V	mAb	0,5 µg/ml	Molecular Probes (Eugene, OR, EEUU)
Complejo I mitocondrial, subunidad Fe-S 30 KDa	Complejo I (NUFS3)	mAb	1 µg/ml	Molecular Probes (Eugene, OR, EEUU)
NADH Ubiquinona Oxidorreductasa, Familia α, miembro 9	Complejo I (NDUFA9)	mAb	1 µg/ml	Molecular Probes (Eugene, OR, EEUU)
Complejo III mitocondrial, subunidad Fe-S	Complejo III	mAb	0,5 µg/ml	Molecular Probes (Eugene, OR, EEUU)
Succinato-ubiquinona oxidorreductasa, subunidad Fe-S	Complejo II	mAb	1 µg/ml	Molecular Probes (Eugene, OR, EEUU)

Bcl-X _L	Bcl-X _L	pAb	1:1000	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, EEUU)
Bcl-2	Bcl-2	mAb	1:500	BD Biosciences (Bedford, EEUU)
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	GAPDH	mAb	1:2000	Biogenesis (Poole, Reino Unido)
Porina 3-1HL / <i>Voltage-dependent anion channel</i> (VDAC)	VDAC	mAb	1:1000	Calbiochem (La Jolla, CA, EEUU)
Caspasa 3 activa	Caspasa 3	pAb	1:1000	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, EEUU)
Pentraxina neuronal-1 (NP-1)	NP-1	mAb	1:1000	BD Biosciences (Bedford, EEUU)

4. FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR

Para el aislamiento de mitocondrias de células en cultivo se siguió un protocolo previamente descrito (Pallotti y Lenaz, 2001). Básicamente se lavaron las células 2 veces con PBS, se levantaron y se recogieron por centrifugación a 600g durante 10 min. y se resuspendió el sedimento de células en 100 µl de solución de aislamiento, que tiene la siguiente composición:

- 0,25 M Sacarosa
- 20 mM HEPES pH 7,5
- 10 mM cloruro de potasio (KCl)
- 1,5 mM cloruro de magnesio (MgCl₂)
- 1 mM EDTA
- 1 mM EGTA
- 1 mM DTT

Se homogeneizó la muestra con un homogeneizador potter con 20 pases completos y se centrifugó a 750g durante 10 min. Se conservó el sobrenadante (S1), se resuspendió el sedimento en 50 µl de solución de aislamiento y se volvió a centrifugar a 750g durante 10 min. Se combinaron el sobrenadante de la primera centrifugación (S1) con el de la segunda (S2) y se centrifugó la suspensión resultante a 10.000xg durante 15 min. El sedimento obtenido (fracción mitocondrial cruda) se resuspendido en tampón de lisis descrito anteriormente para proceder a su separación por electroforesis en geles de acrilamida-poliacrilamida. Todo el proceso se llevó a cabo a 4°C.

5. TINCIÓN INMUNOCITOQUÍMICA

Los cultivos fueron analizados por inmunofluorescencia indirecta siguiendo el procedimiento que se describe a continuación. Las células cultivadas sobre cubres de vidrio fueron fijadas con paraformaldehído al 4% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de varios lavados con PBS, las células fueron preincubadas 1 hora con una solución de bloqueo consistente en albúmina de suero bovino al 1% (BSA; Sigma, Madrid, España) en PBS y Triton X-100 al 0,1% (excepto para las tinciones de nectinas y de transportadores de glucosa, que se llevaron a cabo sin Triton X-100). Después, se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con los anticuerpos primarios (tabla 4) diluidos en la misma solución de bloqueo. Después de la incubación con el anticuerpo primario, las células fueron lavadas tres veces con PBS e incubadas a continuación durante 45 minutos-1 hora con el anticuerpo secundario conjugado a Alexa-488 o Alexa-594 diluido en solución de bloqueo (dilución 1:1000, Molecular Probes, Eugene, OR, EE.UU.). Después de lavar con PBS, los cubres fueron montados con

Fluoromount G (Southern Biotech Assoc. Inc., Birmingham, AL, EE.UU.) y examinados en un microscopio invertido de fluorescencia Zeiss Axiovert 200 o en un microscopio confocal LSM510 Meta acoplado a un microscopio de fluorescencia. El procesado final de las imágenes de microscopía confocal se realizó con el programa informático Zeiss LSM510 3.2 Sp2. La cuantificación de intensidad de fluorescencia y la determinación del grado de colocación fueron llevadas a cabo con el programa informático MetaMorph v6.2r6.

Para la tinción de bromo-desoxiuridina (BrdU; Sigma, Madrid, España), la BrdU se añadió al medio de cultivo 24 horas antes de la fijación a una concentración final de 10 μ M. Las células fueron fijadas y permeabilizadas con metanol durante 20 minutos a -20°C , lavadas dos veces con PBS y bloqueadas con 1% BSA en PBS. Las células se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente con ácido clorhídrico 2 N (HCl), fueron lavadas dos veces con BSA al 1% en PBS, incubadas 2 minutos a temperatura ambiente con ortoborato sódico 0.1 M, lavadas dos veces con PBS- BSA 1% e incubadas dos horas con anti-BrdU diluido en PBS- BSA 1%- Tween 20 0,5%. Las células se lavaron entonces tres veces con PBS- BSA 1%- Tween 20 0,5% y se incubaron con el anticuerpo secundario durante 45 minutos. Antes de montar los cubres, se incubaron las células 10 minutos con DAPI (Calbiochem, La Jolla, CA, EE.UU.) para visualizar núcleos.

Tabla 4. Anticuerpos utilizados en Inmunofluorescencia. Abreviaturas: mAb, Anticuerpo monoclonal generado en ratón; pAb, Anticuerpo policlonal generado (a no ser que se especifique otra cosa) en conejo. Todos los anticuerpos son del isotipo IgG, a no ser que se indique específicamente.

<i>Antígeno</i>	<i>Anticuerpo</i>	<i>Tipo</i>	<i>Dilución</i>	<i>Fuente</i>
Fosfoepítos de MAP1B y NF-H	SMI-31	mAb	1:500	Sternberger Molecular, Inc. (Baltimore, MD, EEUU)
MAP2A,B	514	pAb	1:400	(Sanchez Martin <i>et al.</i> , 1998)
MAP2	HM-2	mAb	1:400	Sigma (Madrid, España)
Bromo-desoxiuridina	BrdU	mAb	1:100	BD Biosciences (Bedford, EEUU)
Nectina-1	Nectina-1	mAb	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, EEUU)
Nectina-2	Nectina-2	mAb (IgM)	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, EEUU)
HVEM	HVEM	mAb	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, EEUU)
β -Galactosidasa	β -Gal	pAb	1:5000	MP Biomedicals, Inc. (Eschwege, Alemania)
Proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP)	GFAP	mAb	1:400	Boehringer Mannheim (Indianápolis, EEUU)
Calbindina-D28K	Calbindina-D28K	pAb	1:2000	Chemicon International (Temecula, CA, EEUU)
Péptido FLAG	FLAG-M2	mAb	1:1000	Sigma (Madrid, España)
Transportador de glucosa – 3	GLUT-3	pAb (cabra)	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, EEUU)
Transportador de glucosa – 1	GLUT-1	pAb	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, EEUU)
Complejo V mitocondrial, subunidad β	Complejo V	mAb	5 μ g/ml	Molecular Probes (Eugene, OR, EEUU)

Hexoquinasa I	HKI	pAb (cabra)	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, EEUU)
Hexoquinasa II	HKII	pAb (cabra)	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, EEUU)

6. ENSAYOS DE ACTIVIDAD β -GALACTOSIDASA

6.1. Tinción X-Gal

Para la tinción X-Gal, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 20 min. a temperatura ambiente; a continuación se lavaron con PBS dos veces y se permeabilizaron durante 5 min. con Triton X-100 al 0,1 % en PBS. A continuación se incubaron en solución de tinción X-gal (1 mg/ml de X-Gal en PBS suplementado con $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ 5 mM, $K_3[Fe(CN)_6]$ y $MgCl_2$ 2 mM) a 37°C durante 2 horas, después de las cuales las células fueron visualizadas con un microscopio óptico.

6.2. Actividad β -galactosidasa

Para medir la actividad β -galactosidasa en un extracto de proteínas, se utilizó un ensayo basado en dos reacciones secuenciales acopladas de β -galactosidasa y luciferina, utilizando el reactivo Beta-GloTM (Promega, Madison, WI, EEUU), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este reactivo contiene una mezcla de 6-O- β -galactopiranosil-luciferina y luciferasa, de manera que en presencia de β -galactosidasa, el reactivo se hidroliza liberando luciferina, que puede ser a su vez sustrato de la luciferasa, emitiendo una señal luminiscente que puede ser detectada con un luminómetro.

Los extractos de proteínas se prepararon de la misma manera que para el análisis por “western blot” (ver apartado 3 de esta sección). Se mezclaron 50 μ l de extracto de proteínas con 50 μ l de reactivo Beta-GloTM, se incubó esta mezcla durante 1 hora a temperatura ambiente y se midió a continuación la intensidad de señal luminiscente con un luminómetro. Los valores obtenidos fueron normalizados frente a la cantidad total de proteína.

7. ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR

7.1. Incorporación de Calceína y Yoduro de Propidio

El método de medida de viabilidad basado en la incorporación de calceína-yoduro de propidio ha sido previamente descrito (Mattson *et al.*, 1995). La calceína/acetoximetil-éster es incorporada e hidrolizada por las esterasas celulares presentes en células vivas, siendo retenida en su interior por la generación de carga negativa y emitiendo fluorescencia en el rango de la fluoresceína, mientras que el yoduro de propidio es incorporado sólo por las células con la membrana celular perforada intercalándose en su material genético y emitiendo fluorescencia roja. Las células fueron incubadas a 37°C durante 30 minutos con yoduro de propidio 8 μ M (Sigma, Madrid, España) y calceína/acetoximetil-éster 1 μ M (Molecular Probes, Eugene, OR, EEUU). A continuación, se lavaron las células una vez con HBSS suplementado con $CaCl_2$ 2 mM, y las células se visualizaron por microscopía de fluorescencia usando un microscopio invertido Zeiss Axiovert 200. Para el análisis cuantitativo se seleccionaron al azar cinco campos por pocillo de una placa M24 (300-400 células/campo) en al menos tres experimentos

independientes. La viabilidad celular se expresó como el porcentaje de células positivas para calceína frente al número total de células contadas.

7.2. Análisis de la fragmentación del DNA nuclear (TUNEL)

La medida de viabilidad celular por análisis de fragmentación del DNA celular o TUNEL (*Terminal deoxyribonucleotidyl transferase mediated dUTP Nick End Labeling*; marcaje de los extremos de las roturas con dUTP por medio de la desoxirribonucleotidil transferasa terminal) se llevó a cabo con el kit Fluorescein-FragEL™ (Oncogene Research Products, San Diego, CA, EEUU) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Durante la apoptosis, la acción de algunas nucleasas hace que el DNA celular se fragmente, y como consecuencia quedan expuestos muchos extremos 3'-OH libres (Wyllie, 1980). Es posible detectar la aparición de estos extremos como consecuencia de la fragmentación añadiendo nucleótidos fluoresceinados con la ayuda de una enzima, la desoxirribonucleotidil transferasa terminal (Gavrieli *et al.*, 1992). Brevemente, las células se cultivaron sobre cubres de vidrio, y una vez concluido el experimento, las muestras fueron fijadas con paraformaldehído al 4% y permeabilizadas con proteínaasa K a temperatura ambiente durante 5 minutos. A continuación, la muestra se incubó durante 10-30 minutos con un tampón de equilibrado para la enzima previamente a la reacción. Posteriormente, se aplicó la mezcla de reacción con la transferasa terminal y los nucleótidos fluoresceinados y se dejó transcurrir la reacción en oscuridad a 37°C durante 1-1,5 horas. Para terminar, los cubres se lavaron varias veces con TBS y se montaron sobre portaobjetos con medio de montaje provisto por el fabricante del kit (dicho medio lleva incorporado DAPI para marcar todas las células).

Para determinar la viabilidad se contabilizaron las células muertas (detectadas con el filtro de fluoresceína) y se normalizaron frente al número total de células (filtro de ultravioleta para la detección de DAPI). Para el análisis se seleccionaron tres campos al azar por cubre (300-400 células/campo) en al menos tres experimentos independientes. La muerte celular se expresó como el porcentaje de células marcadas frente al número total de células.

8. MEDIDA DEL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

Para medir el número de células que poseen potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) utilizamos el kit MitoCapture (Calbiochem, La Jolla, CA, EEUU) (Chaturvedi *et al.*, 2004), que consiste en una sonda fluorescente de tipo JC-1 (Cossarizza *et al.*, 1993). Esta sonda es un monómero que emite a una longitud de onda de 527 nm (verde) cuando es excitada a 490 nm, pero, si el potencial de membrana es correcto, puede formar agregados que se acumulan en la mitocondria y que experimentan un cambio en el espectro de emisión, hasta 590 nm (rojo). Básicamente, se lavan las células con una solución tamponada de lavado precalentada a 37°C, y a continuación se incubaron las células con la sonda diluida (1:1000) en la solución tamponada de lavado durante 15-20 minutos a 37°C. Finalmente, se lavaron las células una vez más con la solución de lavado y se cuantificaron mediante observación con un microscopio de fluorescencia.

9. ENSAYO ENZIMÁTICO DE INMUNOADSORCIÓN (ELISA)

Los niveles de BDNF presentes en los medios condicionados por las células sometidas a la inhibición crónica de GSK-3 fueron determinados empleando un sistema de inmunoadsorción comercial para detectar el factor BDNF (Chemikine™ BDNF Sandwich ELISA Kit; Chemicon International, Temecula, CA, EEUU). El procedimiento seguido fue el establecido por el fabricante. Placas de 96 pocillos

revestidas con un anticuerpo específico para el factor BDNF fueron incubadas con las muestras durante toda la noche a 4°C. En paralelo con las muestras de medios condicionados por las células y medio sin condicionar añadido como control se incubaron soluciones estándar de BDNF. El sistema de detección consiste en un anticuerpo monoclonal biotinilado contra el BDNF y anticuerpos secundarios acoplados a estreptavidina-peroxidasa, utilizados para la posterior reacción de detección mediante la oxidación de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, cuyo producto puede ser detectado a una longitud de onda de 450 nm. La absorbancia a dicha longitud de onda fue medida empleando un lector de placas (DYNEX Opys MR). A partir de los resultados obtenidos de las muestras de BDNF estándar, se generaron curvas patrón a partir de las cuales se interpolaron los valores de densidad óptica para obtener la concentración final de BDNF presente en los medios condicionados por las células, normalizada frente a la cantidad total de proteína. Los diagramas representan los resultados de tres experimentos independientes.

10. DETERMINACIÓN DE LACTATO EN MEDIO DE CULTIVO

La concentración de lactato en medio de cultivo se utilizó como parámetro para medir el flujo glucolítico (Merlo-Pich *et al.*, 2004). Las medidas de lactato se llevaron a cabo con un kit de determinación de lactato (Sigma, Madrid, España) en el que introdujimos ligeras modificaciones adaptadas a cultivos celulares. Este ensayo se basa en la reversibilidad de la actividad enzimática lactato deshidrogenasa:



La aparición de NADH se puede medir como el incremento de la absorbancia a 340 nm. Para desplazar el equilibrio de la reacción hacia la formación de piruvato y NADH, en el buffer de reacción se añade hidracina, que atrapa el piruvato que se forma, desplazando así el equilibrio químico en el sentido deseado.

Para la reacción, se resuspendió un vial de 5 mg de NAD en 2 ml de tampón de glicina 0,6 M-hidracina (provisto con el kit), 4 ml de agua y 100 µl de lactato deshidrogenasa bovina. A continuación se combinaron 580 µl de esta mezcla de reacción con 20 µl de medio de cultivo y se incubó la reacción durante 30 minutos a 37°C. La aparición de NADH se midió a 340 nm. En paralelo, se llevó a cabo un ensayo con concentraciones conocidas de lactato, por lo que la concentración final de lactato se pudo determinar interpolando en la curva patrón generada los valores obtenidos en las muestras. La producción de lactato se normalizó frente a la cantidad de proteína.

11. DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE VECTORES DE EXPRESIÓN

Algunas de las construcciones que se han utilizado para el desarrollo experimental de esta tesis han sido descritas previamente y se recogen en tabla 5.

La generación de las construcciones pHG/pEHHG-FRDA, pHG/pEHHG-F-LacZ y pHG/pHZ-F-Luc se detalla a continuación. Las enzimas de restricción que se utilizaron para los análisis de restricción que se llevaron a cabo en cada paso del clonaje son de New England Biolabs, Inc. (Hitchin Hertfordshire, Reino Unido). Todas las preparaciones de DNA de gran tamaño (>100 kb) fueron separadas y analizadas por electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE; *Pulsed Field Gel Electrophoresis*) en un tanque de electroforesis CHEF Mapper (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU). Los geles se corrieron durante 18 horas en tampón TBE 0,5X con una diferencia de potencial de 6 V/cm², en un ángulo de ± 60°, con un cambio de pulso lineal de 2 a 16 segundos a lo largo de la carrera y una temperatura constante de 14°C.

Tabla 5. Resumen de las distintas construcciones que se han empleado en esta tesis, tanto como vectores de expresión como construcciones de punto de partida para generar otras construcciones.

Construcción	Tamaño (Kb)	Fuente
pHSVlac	8,1	(Geller y Breakefield, 1988)
pHSV-GSK3 β	6,5	Generado por Dr. Filip Lim (Munoz-Montano <i>et al.</i> , 1999a; Sanchez <i>et al.</i> , 2001)
pHSV-GSK3 β -R85	6,5	Generado por Dr. Filip Lim (Munoz-Montano <i>et al.</i> , 1999a; Sanchez <i>et al.</i> , 2001)
pHG	6,1	Cedido por Dr. Yoshinaga Saeki (Wade-Martins <i>et al.</i> , 2001)
pEHHG	12,7	Cedido por Dr. Yoshinaga Saeki (Wade-Martins <i>et al.</i> , 2001)
pHZ	8,6	Cedido por Dr. Richard Wade-Martins
RP11-265B8	196	BACPAC Resources (Oakland, CA, EEUU) (Nº de acceso GeneBank: AL162730)
pCTP-T	12,7	Cedido por Dr. Yoshinaga Saeki (Saeki <i>et al.</i> , 2001; Wade-Martins <i>et al.</i> , 2001)
p4215.1	4,2	Cedido por Dr. Richard Wade-Martins
pGL3-Basic	4,8	Promega Biotech (Madison, WI, EEUU)
pHGEX-LacZ	10,4	Cedido por Dr. Richard Wade-Martins
pSC101-BAD-gba ^{1ct}	9,2	Gene Bridges GmbH (Dresden, Alemania)
pHSV-FRDA-FLAG	5,5	Generado por Dra. Belén Illana
pEBHICP27	12,2	Cedido por Dr. Yoshinaga Saeki (Saeki <i>et al.</i> , 2001)
fHSV Δ pacDICP27 ICP0+	178	Cedido por Dr. Yoshinaga Saeki (Saeki <i>et al.</i> , 2001)

11.1. Preparación de células electrocompetentes y electroporación

Para preparar células electrocompetentes, se picó una colonia de bacterias a electroporar y se inoculó en 1,5 ml de medio LB (Sigma, Madrid, España) con el antibiótico de selección adecuado y se dejó crecer toda la noche a la temperatura requerida por las bacterias con agitación. A la mañana siguiente se inoculó el cultivo en 100 ml de LB + antibiótico y se dejó crecer hasta que alcanza una densidad óptica de 0,34-0,36 a una longitud de onda de 600 nm. En este punto, se pusieron las bacterias en hielo y se dejaron 40-60 minutos. A partir de este momento todos los pasos se llevaron a cabo a 4°C. A continuación se lavaron las bacterias 3 veces con glicerol al 10% en agua centrifugando a 7000 rpm durante 5 minutos y resuspendiendo las bacterias sedimentadas en la solución de lavado. Después del último lavado, el sedimento de bacterias es suficientemente fluido como para que se pueda pipetear. Se hacen alícuotas de 50 μ l que se pueden utilizar para electroporar o se pueden almacenar a -80°C.

Para la electroporación, sobre una alícuota de bacterias electrocompetentes se añadió una cantidad óptima de DNA (es preciso titular previamente para lograr una eficiencia óptima), y a continuación se introdujo la mezcla en una cubeta de electroporación y se sometieron las células a un pulso eléctrico con un electroporador (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU) en las siguientes condiciones:

Voltaje	1,8 kV (cubetas de 1 mm)
Resistencia	200 $\mu\Omega$
Capacitancia	25 μ F

Inmediatamente se añadieron 450 μ l de medio SOC (Invitrogen Life Technologies, Paisley, Reino Unido) y se incubó la suspensión a la temperatura requerida con agitación durante 1 hora. Posteriormente se sembraron las bacterias sobre placas de LB-agar + antibióticos.

11.2. Clonaje de pHG/pHHG-FRDA

Para la construcción del amplicón pHG/pHHG-FRDA que codifica el locus genómico de la frataxina humana, se partió del BAC clon RP11-265B8 (número de acceso GeneBank: AL162730), que contiene un fragmento del cromosoma 9 humano que abarca el locus genómico de la frataxina humana (gen FRDA), de unas 80 kb. Tres μg del BAC fueron digeridos con PmeI durante 2 horas a 37°C. El producto de digestión fue religado con la DNA-ligasa del bacteriófago T4 (Invitrogen Life Technologies, Paisley, Reino Unido), incubando la reacción toda la noche a 16°C.

Una vez que se tienen clones de bacterias que contienen el BAC con el nuevo tamaño ajustado, se preparan bacterias electrocompetentes a partir de estos clones para el “retrofitting” (recombinación específica de sitios LoxP dirigida por recombinasa CRE del fago P1) con el plásmido pHG o el pHHG (Saeki *et al.*, 2001; Wade-Martins *et al.*, 2001). Seguidamente se electroporan de manera simultánea 1 μg de plásmido pCTP-T (con la recombinasa CRE) y 1 μg de pHG o pHHG (con las secuencias de empaquetamiento viral). Se añade inmediatamente medio SOC con hicrocloruro de clortetraciclina 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para inducir la expresión de recombinasa CRE y se incuba a 30°C durante 1 hora. El cultivo se diluye y se continúa incubando a 30°C en presencia de antibióticos 2-3 horas más con agitación. Finalmente, la suspensión de células se siembra sobre placas de LB-agar + antibióticos y se dejan crecer toda la noche a 37°C. Los distintos pasos de clonaje fueron comprobados por análisis de restricción.

11.3. Clonaje de los cassettes Luc/Kan y LacZ/Kan

Partimos de los vectores p4215.1 y pGL3-Basic, que fueron digeridos con BamHI y Sall, y tras purificación de fragmentos en gel y posterior religación, se generó el vector pGL3-Basic-Kan (de aquí sale el cassette Luc/Kan). A continuación, para generar el vector pGL3-LacZ/Kan, con el cassette LacZ/Kan para insertar inmediatamente después del promotor del gen FRDA, el vector generado y el vector pHGCX-LacZ fueron digeridos con NcoI y XbaI y posteriormente religados para generar el vector pGL3-LacZ/Kan. Los sucesivos pasos de clonaje fueron comprobados por análisis de restricción.

11.4. Generación de brazos de homología y recombinación homóloga

La generación de inserto con brazos de recombinación homóloga se llevó a cabo por reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) preparativa diseñando oligonucleótidos iniciadores de la reacción específicos de 80 nucleótidos (25 específicos de la región a amplificar y 55 para generar las regiones de homología) y una Taq polimerasa específica para fragmentos de gran tamaño y función correctora de pruebas (BioXact Long; Boline Ltd, Londres, Reino Unido) con una concentración de MgCl_2 de 1,5 mM. Los ciclos de amplificación por PCR se describen a continuación:

1. Activación	95°C	10 min.
2. Desnaturalización	95°C	30 seg.
3. Anillamiento	según oligo	30 seg.
4. Extensión	72°C	8 min.
5. Repetir pasos 2-4	35 ciclos	
6. Extensión final	72°C	12 min.

Los oligonucleótidos utilizados se describen en la tabla 6.

Tabla 6. Resumen de todos los oligonucleótidos utilizados como iniciadores para las distintas reacciones en cadena de la polimerasa (PCR)

Nombre	Secuencia	Producto	T.A. (°C)	Tamaño (pb)
hFRDA _b _fwd hFRDA _b _rev	TCTCCTTTGGGAGTGGTGTC GCTGTGACACATAGCCCAAC	Detecta cDNA de la frataxina humana	57	412
hFRDA ₃ _Fw hFRDA ₃ _Rv	TGGAATGTCAAAAAGCAGAGTG CCACTCCCAAAGGAGACATC	Detecta cDNA de la frataxina humana	54	194
mFrda_fwd mFrda_rev	ACTTGGGGACATTGGACAAC GCACGCCATCCGTTATTAAG	Detecta cDNA de la frataxina murina	57	199
GAPDH_fwd GAPDH_rev	TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTGGT CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC	Detecta cDNA de GAPDH	55	900
ET_FRDA_Lac_F ET_FRDA_R	GTCGCCGCGAGCACCCAGCGCGGAGGGCGG AGCGGGCGGCAGACCCGGAGCAGCATGAG CGAAAAATACATCGTCACCT CGGGCTGGGTGACGCCAGGAGGCCGGCTA CTGCGCGGCCCGAGAGTCCACATTGAA GAAGGTGTTGCTGACTCATAAC	Genera brazos de recombinación homóloga en el cassette LacZ/Kan. La región azul es la de homología.	72	~ 5000
ET_FRDA_Luc_F ET_FRDA_R	GTCGCCGCGAGCACCCAGCGCTGGGGCGG AGCGGGCGGCAGACCCGGAGCAGCATGGAA GACGCCAAAAACATAAAGA Ídem	Genera brazos de recombinación homóloga en el cassette Luc/Kan. La región azul es la de homología. El oligonucleótido reverso es común al par anterior.	72	~ 3000
E1-5J_F E1-5J-LacZ_R	ACTTCCCAGCAAGACAGCAG GGATCGATCTCGCCATACAG	Detección de la nueva unión generada en 5' tras inserción del cassette LacZ/Kan.	54	501
E1-5J_F E1-5J-Luc_R	Ídem GCCTTATGCAGTTGCTCTCC	Detección de la nueva unión generada en 5' tras inserción del cassette Luc/Kan. El primer oligonucleótido ("forward") es común al par anterior	54	378
K.E1-3J_F K.E1-3J_R	ACTTTCTGGCTGGATGATGG CAGAGAAGGGAGTTGCAAGG	Detección de la nueva unión generada en 3' tras inserción de los casetes LacZ/Kan y Luc/Kan.	68	400

Para la recombinación homóloga (Zhang *et al.*, 2000; Muyrers *et al.*, 2004), se prepararon bacterias electrocompetentes que contenían previamente el clon RP11-265B8 con tamaño reducido y el plásmido pSC101-BAD-gba^{Tet} (Gene Bridges GmbH, Dresden, Alemania) necesario para la recombinación homóloga. El proceso de recombinación homóloga se siguió de acuerdo a las instrucciones facilitadas por el proveedor. Durante el crecimiento de las bacterias se añadió L-arabinosa al 0,15% (Sigma, Madrid, España) para inducir la expresión de los genes de recombinación. Una vez preparadas las bacterias electrocompetentes, se electroporó el fragmento generado por PCR, se incubó 1 h 15 min. a 37°C y finalmente se plaqueó toda la mezcla de electroporación sobre agar + antibióticos. Las colonias obtenidas se verificaron por análisis de restricción y PCR. Para el “*retrofitting*” se procede como en el caso anterior.

12. EXTRACCIÓN DE ÁCIDO RIBONUCLEICO (RNA) DE CÉLULAS EN CULTIVO

a) *Extracción con TriZOL*

La extracción de RNA total para su análisis por RT-PCR llevó a cabo empleando el reactivo TriZOL (Invitrogen Life Technologies, Barcelona, España). Las células fueron levantadas de las placas con un rascador, resuspendidas en TriZOL y procesadas de acuerdo con las instrucciones del fabricante hasta purificar el RNA total. El RNA total se resuspendió en agua libre de ribonucleasas (tratada con DEPC, dietil-pirocarbonato; Sigma, Madrid, España) y se guardó a -80°C para su posterior uso. La concentración, pureza e integridad del RNA total fueron determinadas para cada uno de los lotes empleando el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 y el Bioanalizador 2100 (Agilent Technologies, Inc. Palo Alto, CA, EEUU)

b) *Extracción en columna*

La extracción de RNA para el análisis transcriptómico a gran escala por *microarrays* fue llevada a cabo por medio del kit RNeasy (Qiagen, Valencia, CA, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez aislada la muestra, la determinación de la concentración y calidad del RNA se llevaron a cabo de la misma manera que en el caso anterior.

13. RETROTRANSCRIPCIÓN Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

13.1 Retrotranscripción – síntesis de primera cadena.

La retrotranscripción de RNA a la primera cadena de DNA complementario (cDNA) fue llevada a cabo con el kit de la retrotranscriptasa con actividad RNasa-H Superscript III (Invitrogen Life Technologies, Barcelona, España) partiendo de 1 µg de RNA total aislado de células de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

13.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las PCRs (excepto las de amplificación de productos de gran tamaño para clonaje, que ya han sido detalladas) se llevaron a cabo con la polimerasa Taq Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA,

EE.UU.) en su tampón correspondiente y a una concentración de $MgCl_2$ de 2,5 mM. Los ciclos de amplificación se describen a continuación:

1. Activación	95°C	5 min.
2. Desnaturalización	95°C	30 seg.
3. Anillamiento	según oligo	30 seg.
4. Extensión	72°C	según tamaño del producto
5. Repetir pasos 2-4	30 ciclos	
6. Extensión final	72°C	3 min.

Los oligonucleótidos utilizados como iniciadores, sus temperaturas óptimas de anillamiento y el tamaño de los productos correspondientes se describen en la tabla 4.

13.3. RT-PCR a tiempo Real

Para la conversión de RNA a cDNA se siguieron los procedimientos del método Archivekit de Applied Biosystems (Foster City, CA, EEUU). Realizamos la PCR a tiempo real a partir de 0,5 ng/ μ l de cDNA procedente de cada una de las muestras.

La reacción se llevó a cabo con 10 μ l de muestra utilizando los reactivos Universal PCR Master Mix de Applied Biosystems. Las sondas para la detección de los mensajeros de interés se adquirieron también de Applied Biosystems (Sondas TaqMan). La RT-PCR se llevó a cabo en el aparato AB7900 HT (Applied Biosystems).

Los resultados obtenidos para cada gen fueron normalizados con el gen endógeno hGAPDH y posteriormente procesados (mediante análisis $\Delta\Delta Ct$) empleando el programa informático de Applied Biosystems. Se representan los valores logarítmicos de la cantidad relativa de mensajero (RQ) con márgenes de confianza del 95%. En la representación gráfica, los niveles de los distintos genes en las poblaciones celulares transducidas con pHSVlac, pHSVGSK3^{WT} o pHSVGSK3^{K85R} están representados tomando las células infectadas con pHSVlac como referencia.

14. ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO A GRAN ESCALA: MICROARRAYS

Para el análisis transcriptómico a gran escala comparando distintas condiciones de tratamiento de las células, empleamos la plataforma Human Genome Survey Microarray v2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU). Esta plataforma contiene 32.878 sondas para cubrir 29.098 genes, abarcando la práctica totalidad del genoma humano.

Las sondas de esta plataforma son oligonucleótidos de 60 unidades sintetizadas en fase sólida con control de calidad de espectrometría de masas. Una vez sintetizadas, son depositadas y unidas covalentemente sobre un sustrato derivado de nylon (2.5x3 pulgadas) reforzado por una plataforma de cristal.

A partir de 1 μ g de RNA de muestra se generó cRNA marcado con digoxigenina-UTP utilizando el kit Chemiluminescent RT-IVT Labeling v2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU) siguiendo las indicaciones del fabricante. La hibridación de los cRNA, la detección por luminiscencia, adquisición y análisis de imágenes fueron realizadas utilizando el kit Chemiluminescence Detection y el analizador de microarrays AB1700 (ambos de Applied Biosystems, Foster City, EEUU), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

El software Applied Biosystems Expression System se empleó para extraer y analizar las señales obtenidas. Dado que nos interesaba comparar las diferencias en el transcriptoma en células sometidas a inhibición crónica de GSK-3, establecimos 3 condiciones distintas: expresión de la forma silvestre o “*wild-type*” de GSK-3 β , expresión de un mutante dominante negativo de GSK-3 β , K85R, y expresión de un vector sin actividad biológica como control (los vectores empleados para ello fueron pHSVGSK3^{WT}, pHSVGSK3^{K85R} y pHSVlac, respectivamente). Para la selección de genes candidatos a ser responsables de la neuroprotección inducida por la inhibición crónica de GSK-3 empleamos dos criterios. El primero era la comparación entre células que sobreexpresaban la forma silvestre o la forma mutada de GSK-3 con respecto al control, seleccionando los transcritos que cambiasen (tanto por sobreexpresión como por represión) en las muestras expresando la forma mutada. El segundo criterio fue la comparación directa entre las muestras expresando la forma silvestre y la forma mutada. Los genes de interés para nuestro estudio fueron seleccionados de entre los candidatos cuya sobreexpresión o represión fuese al menos de 2 veces. Este valor se calcula a partir del SLR (*Signal Log Ratio*) de una comparación. El SLR es la medida logarítmica en base 2 del cambio en la señal de un gen en dos hibridaciones diferentes. La magnitud de cambio de un mensajero entre dos muestras se obtiene a partir del valor de 2^{SLR} .

Resultados

1. ESTABLECIMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE MODELOS CELULARES

Para el desarrollo de esta tesis nos planteamos inicialmente desarrollar unos modelos celulares que pudieran ser útiles y relevantes a la hora de obtener datos experimentales, además de usar otros modelos previamente utilizados y descritos. Estos modelos que hemos desarrollado son descritos y caracterizados a continuación.

1.1. Cultivos de células similares a neuronas humanas obtenidas mediante la diferenciación del neuroblastoma SH-SY5Y

El sistema de cultivo celular que hemos elegido para llevar a cabo la mayor parte de nuestros experimentos se basa en células humanas similares a neuronas en cultivo que hemos obtenido a partir de la diferenciación de la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y (Biedler *et al.*, 1978) en un protocolo de dos fases (*ver Materiales y Métodos*; Gimenez-Cassina *et al.*, 2006, aceptado para publicación), constando de cinco días cada una. Este protocolo está basado otros procedimientos previamente descritos (García-Pérez *et al.*, 1998; Encinas *et al.*, 2000) sobre los que hemos introducido algunas modificaciones para optimizar el sistema de acuerdo con nuestros requerimientos. Algunas de estas modificaciones se detallan a continuación. Durante la primera fase (de exposición a ácido retinoico) hemos reducido el porcentaje de suero de 10% a 5%, con el objetivo de crear un entorno menos mitogénico para las células. En la segunda fase, el medio que utilizamos es Neurobasal, en lugar de DMEM, suplementado con B-27. Se ha descrito previamente esta combinación como idónea para el mantenimiento de neuronas primarias en cultivo (Brewer *et al.*, 1993; Brewer, 1995), por lo que decidimos emplearla también para estas células. Introdujimos, además, la adición de factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), dibutilil-adenosina monofosfato cíclico (dibutilil AMP cíclico o dbcAMP) –un potente inductor de la diferenciación celular a través de la activación de PKA (Heidemann *et al.*, 1985; Heidemann *et al.*, 1995)-, cloruro potásico y la sustitución de glutamina por GlutaMaxI. Ya ha sido descrito anteriormente que esta combinación de Neurobasal-B27 y dbcAMP a 2 mM es capaz de potenciar la diferenciación neuronal de la línea celular SH-SY5Y (García-Pérez *et al.*, 1998)

Así pues, en primer lugar y antes de comenzar los ensayos de citotoxicidad y neuroprotección que constituyen el núcleo fundamental de esta tesis, hemos estudiado el fenotipo de este sistema modelo y caracterizado su respuesta a los vectores derivados de HSV-1.

Adquisición de fenotipo neuronal

Para confirmar que la diferenciación de las células del neuroblastoma SH-SY5Y se había completado correctamente, llevamos a cabo un análisis inmunocitoquímico y bioquímico de la morfología y de la expresión de marcadores típicos neuronales adquiridos durante el proceso.

En primer lugar hicimos un doble marcaje a distintos tiempos (de 0 a 12 días) con dos anticuerpos que nos podrían indicar el estado de polaridad celular a nivel de citoesqueleto, SMI-31 y 514. SMI-31 reconoce fosfoepítomos específicos axonales de proteínas de citoesqueleto como la proteína asociada a microtúbulos 1B (MAP1B, *Microtubule-associated protein 1B*) o la proteína del neurofilamento de alto peso molecular (H-NF, *High molecular weight-neurofilament protein*) (Ulloa *et al.*, 1993). El anticuerpo 514 reacciona con las isoformas de alto peso molecular de la proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP2), que se localizan preferentemente en el compartimento somatodendrítico (Sanchez Martín *et al.*, 1998).

La tinción de las células SH-SY5Y en distintos estadios a lo largo de la diferenciación reveló que durante los estadios iniciales las células comenzaban a extender procesos citoplasmáticos similares a neuritas, pero no es hasta las últimas fases de la diferenciación que se establece la polaridad a nivel de citoesqueleto (**Figura 9**)

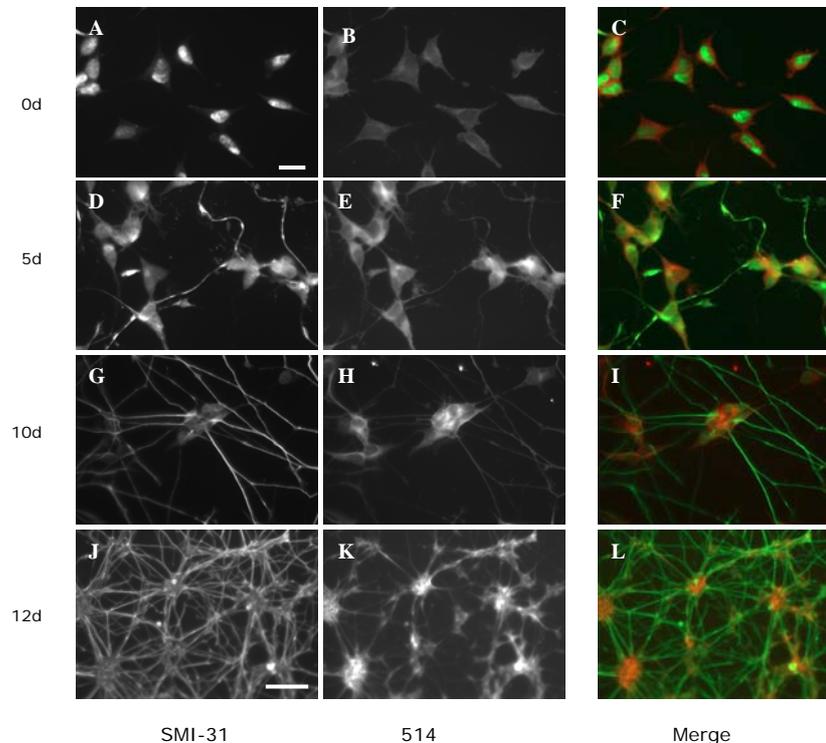


Figura 9. Morfología y polaridad de las células SH-SY5Y diferenciadas. Las células SH-SY5Y fueron plaqueadas sobre Matrigel y diferenciadas en medio DMEM suplementado con 5% FBS y ácido retinoico 10 μ M durante 5 días que posteriormente se cambió a un medio Neurobasal suplementado con B-27, dibutilil-AMP cíclico 2 mM, BDNF 50 ng/ml, GlutaMax1 2 mM y KCl 20 mM durante otros 5 días. Se fijaron las células a distintos puntos a lo largo de la diferenciación (0, 5, 10 y 12 días; 0d, 5d, 10d y 12d, respectivamente) y se tiñeron con los anticuerpos SMI-31 (para la localización axonal de MAP1B y cadena pesada del neurofilamento fosforiladas) y 514 (localización somatodendrítica de las isoformas de alto peso molecular de MAP2, A y B). Escala: **A-I** 20 μ m; **J-L** 100 μ m.

El análisis por *western-blot* a lo largo de la diferenciación (de 0 a 12 días) que llevamos a cabo a continuación confirmó que la diferenciación de las células SH-SY5Y iba acompañada de un claro incremento en los niveles de expresión de algunas proteínas de citoesqueleto específicas de neuronas maduras, como la proteína asociada a microtúbulos Tau o la proteína del neurofilamento de 160 KDa (NF-160 KDa) (**Figura 10A**). De hecho, la expresión de la proteína NF-160 KDa, prácticamente ausente en las células SH-SY5Y sin diferenciar, es detectada principalmente en la segunda fase del proceso. La expresión de la isoforma específica neuronal β III de la tubulina no varió a lo largo de la diferenciación, lo cual es típico de varias líneas celulares de neuroblastoma.

En paralelo al aumento progresivo de marcadores neuronales, observamos una drástica reducción desde los primeros estadios en la expresión de la quinasa de ciclo celular CDC2/CDK1 (**Figura 10A**). Precisamente, la reducción en la actividad quinasa dependiente de ciclinas se ha descrito previamente para otras líneas de neuroblastoma en diferenciación (Kranenburg *et al.*, 1995).

La naturaleza post-mitótica de las células diferenciadas fue confirmada por un ensayo de incorporación de bromo-desoxiuridina (BrdU). La BrdU se incorpora al DNA de las células en división, y puede ser posteriormente detectada con anticuerpos específicos (Gratzner, 1982; Morstyn *et al.*, 1983). Las células SH-SY5Y diferenciadas no incorporaron BrdU después de 24 horas de exposición, mientras que las células en proliferación sí lo hicieron (**Figura 10B**)

Estos resultados demuestran, en conjunto, que las células SH-SY5Y diferenciadas son post-mitóticas y presentan una morfología neuronal adecuadamente polarizada.

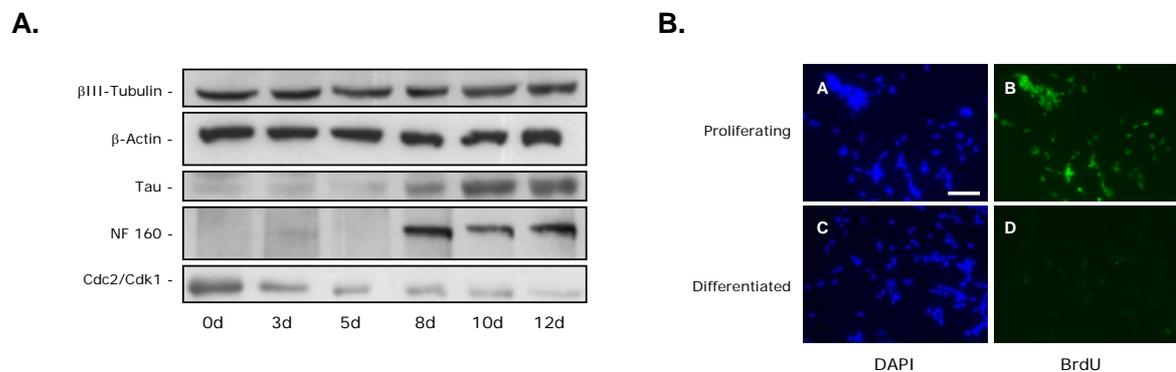


Figura 10. Expresión de marcadores neuronales y fenotipo postmitótico de las células SH-SY5Y diferenciadas. **A.** Extractos de proteínas de células SH-SY5Y a distintos tiempos a lo largo de la diferenciación (de 0 a 12 días; 0d-12d) fueron analizados por *western-blot* con los siguientes anticuerpos: βIII-tubulina (334), Tau y cadena intermedia del neurofilamento (NF-160), como marcadores neuronales; Cdc2/cdk1, como marcador de ciclo celular; y β-Actina, como control de carga. **B.** Las células fueron tratadas con bromodesoxiuridina (BrdU) durante 24 horas y posteriormente teñidas con un anticuerpo específico anti-BrdU y contrateñidas con DAPI. Las células proliferando (0d) incorporan BrdU, mientras que las células diferenciadas (10d) no lo hacen, indicando que son postmitóticas. Escala: 200 μm.

Transducción génica con vectores de HSV-1: Estudios de toxicidad

Una vez que obtuvimos un modelo celular adecuado, y dado nuestro interés en realizar estudios de transferencia génica mediada por vectores de HSV-1, el primer paso que dimos con respecto a la caracterización de la respuesta de las células SH-SY5Y diferenciadas a los vectores de HSV-1 fue estudiar la posible citotoxicidad de diferentes cepas de HSV-1 defectivas en replicación.

Decidimos ensayar en las células la toxicidad de tres stocks virales a diferentes multiplicidades de infección (MOI, *Multiplicity of Infection*), en un rango de 0 a 50 unidades infectivas/célula: 5dl1.2, d120 –ambas cepas son utilizadas como virus auxiliar para el empaquetamiento de vectores herpesvirales- y el vector amplicón pHSVlac, que fue empaquetado con ayuda del virus auxiliar 5dl1.2 y codifica la β-galactosidasa de *E. coli* (Geller y Breakefield, 1988).

La cepa 5dl1.2 es un mutante de delección para el gen IE2 (*Immediate Early-2*) por lo que carece de la proteína ICP27 (*Infected Cell Polypeptide-27*). La cepa d120 es un mutante de delección para el gen IE3, teniendo por tanto suprimida la expresión de la proteína ICP4. Tanto ICP27 como ICP4 son proteínas esenciales para la replicación viral, por lo que ninguna de estas dos cepas es capaz de replicarse salvo en células permisivas (DeLuca *et al.*, 1985; Sacks *et al.*, 1985; McCarthy *et al.*, 1989).

Expusimos las células a diferentes MOIs (0-50) en distintas fases de la diferenciación (proliferando, después de la primera fase con ácido retinoico y diferenciadas), y analizamos la toxicidad de los distintos stocks a las 24 horas. Los resultados se muestran en la **figura 11**. La toxicidad derivada de la cepa 5dl1.2 y de pHSVlac se vio claramente disminuida después de la diferenciación. En particular, la toxicidad de pHSVlac es prácticamente despreciable a bajas dosis (MOI < 5). En contraposición, el efecto tóxico de la cepa d120 fue similar en todos los casos, independiente del estadio de diferenciación. De hecho, en la **figura 11D** se representa una comparación de la toxicidad inducida por las cepas 5dl1.2 y d120 a la multiplicidad más alta (50) en células proliferando y diferenciadas. Esta comparación muestra que la toxicidad de la cepa 5dl1.2 se reduce notablemente en células diferenciadas con respecto a las células

proliferando, y esta toxicidad es modesta pero significativamente menor en células diferenciadas que la provocada por la cepa d120, que no varió significativamente a lo largo de la diferenciación.

Estos resultados concuerdan con el hecho previamente descrito de que la cepa d120 es más tóxica en neuronas primarias murinas a baja MOI que la cepa 5dl1.2 (Garrido *et al.*, 1999). Este comportamiento enfatiza la similitud entre las células SH-SY5Y diferenciadas y las neuronas primarias.

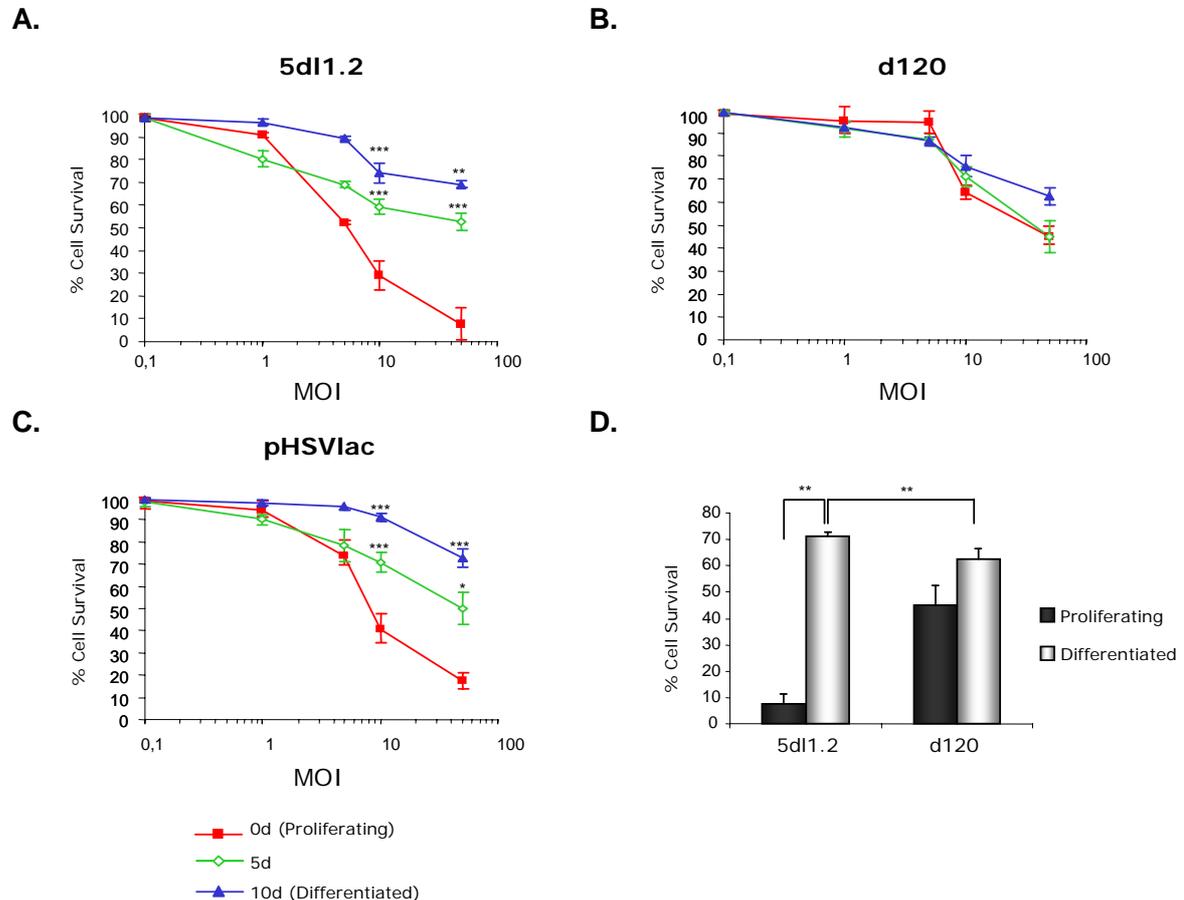


Figura 11. Evaluación de la toxicidad de los vectores herpesvirales en células SH-SY5Y. Las células SH-SY5Y fueron expuestas a distintas dosis (MOI en un rango de 0 a 50) de los stocks virales 5dl1.2 (A), d120 (B) y pHSVlac (C) a distintos tiempos a lo largo de la diferenciación (proliferando -0d-, después de la primera fase -5d- y diferenciadas -10d-). La viabilidad celular fue determinada a las 24 horas. D. Comparación entre las cepas 5dl1.2 y d120 a la MOI más alta en células proliferando y diferenciadas. Las comparaciones estadísticas se establecieron entre células en distintos estadios de diferenciación infectadas a la misma MOI, tomando la toxicidad en células proliferando como referencia. Se muestran los valores medios y sus desviaciones estándar de al menos tres experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$ (test *t* de Student)

Eficiencia de transducción génica con vectores de HSV-1. Mecanismos moleculares subyacentes

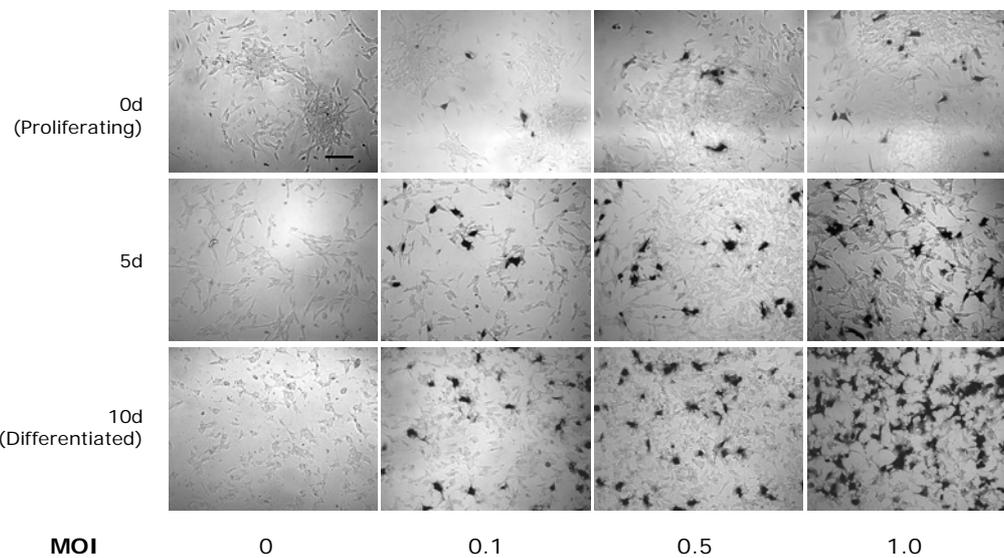
A la vista de los prometedores resultados que denotaban una toxicidad prácticamente despreciable a MOI baja, quisimos averiguar si la transferencia génica a las células SH-SY5Y diferenciadas mediada por vectores de HSV-1 era eficaz. Así, transdujimos las células SH-SY5Y con pHSVlac a diferentes MOIs (0,1; 0,5 y 1) en distintos estadios durante la diferenciación. Para determinar el número de células transducidas llevamos a cabo una tinción X-Gal a las 24 horas de la transducción (Figura 12)

Como se puede observar, hay una modesta mejoría en la eficiencia de transducción después de la primera fase del proceso de diferenciación. Sin embargo, esta eficiencia se ve altamente incrementada después de la segunda fase, alcanzando niveles cercanos al 70% a una MOI de 1 (Figura 12B). De hecho,

un ligero aumento en la MOI utilizada (MOI = 2) permite niveles de transducción de hasta el 90% (datos no mostrados).

Quisimos indagar en los eventos moleculares que podían estar teniendo lugar en las células durante la diferenciación que condujesen a una mayor eficiencia en la transducción mediada por vectores de HSV-1. Inicialmente nos planteamos la posibilidad de que el promotor viral utilizado (promotor IE4/5) no fuese eficiente en las células en proliferación, por lo que el virus, a pesar de entrar en las células, no se estaría expresando correctamente. Para ello diseñamos un experimento por el cual transdujimos células SH-SY5Y inmediatamente después de plaquearlas, y a continuación las dejábamos diferenciar, analizando la expresión en distintos estadios de la diferenciación. Como control positivo de eficiencia de transducción utilizamos células SH-SY5Y diferenciadas previamente a la transducción. En la **figura 13A** se resume el experimento de manera esquemática.

A.



B.

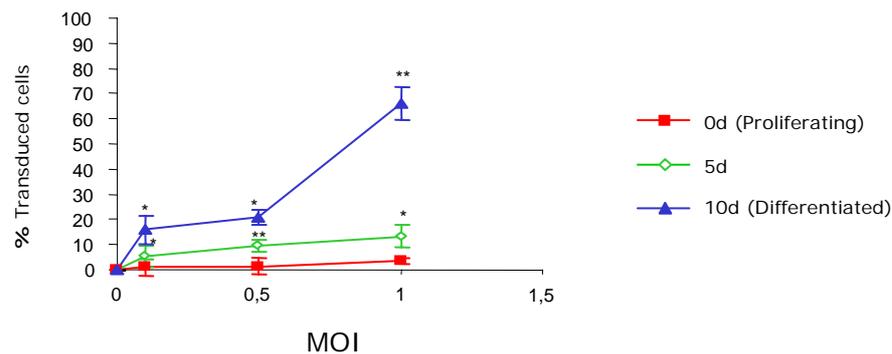


Figura 12. Eficiencia de transducción en las células SH-SY5Y a lo largo de su diferenciación. **A.** Las células SH-SY5Y fueron infectadas con pHSVlac a distintas multiplicidades de infección antes (0d), durante (5d) y después (10d) de su diferenciación, fijadas a las 24 horas y teñidas con X-Gal. Escala: 100 μ m. **B.** Contaje de células azules positivas para β -galactosidasa. Las comparaciones estadísticas se establecieron entre células en distintos estadios de diferenciación transducidas a la misma MOI, tomando la eficiencia de transducción en células proliferando como referencia. Se muestran los valores medios y sus desviaciones estándar de al menos tres experimentos independientes. * p < 0,005; ** p < 0,001 (test t de Student)

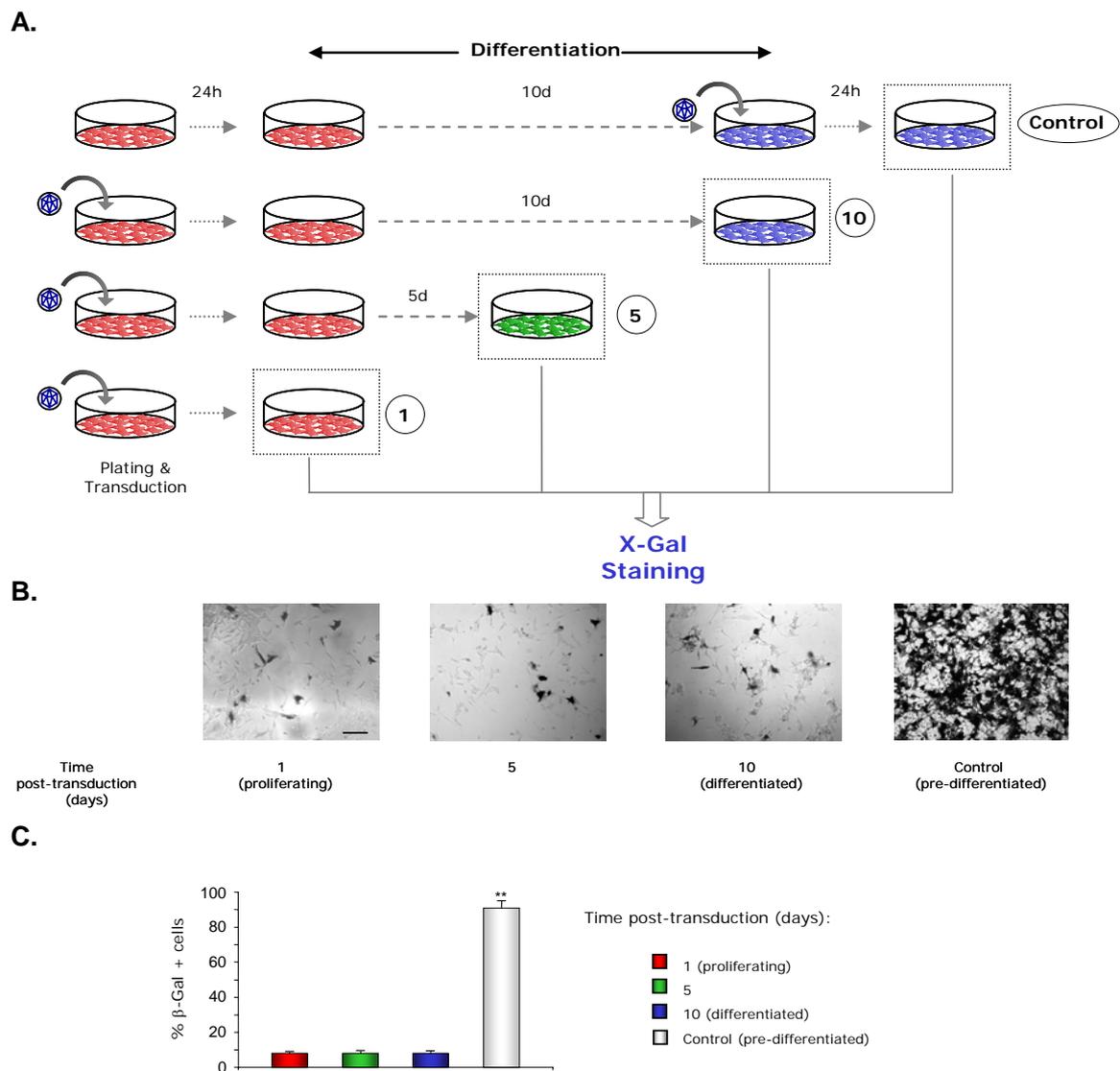
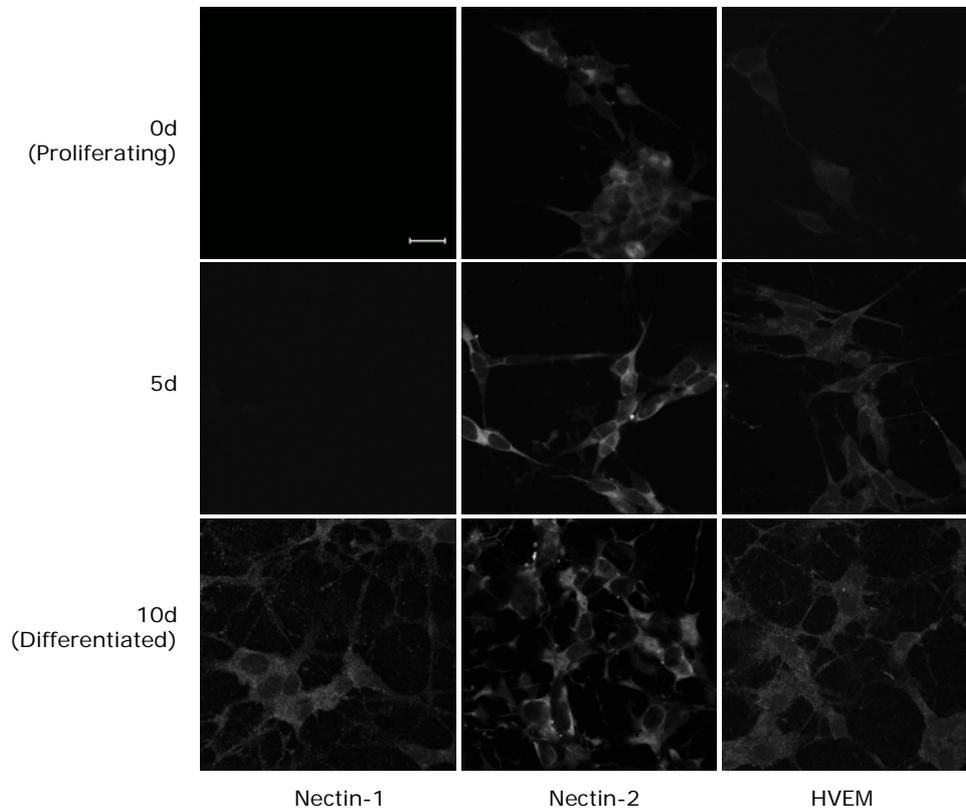


Figura 13. Expresión transgénica mediada por vectores de HSV-1 durante la diferenciación de SH-SY5Y. Células SH-SY5Y en proliferación fueron transducidas con pHSVlac a MOI 2 y posteriormente se indujo su diferenciación. Como control de máxima eficiencia de transducción se utilizaron células SH-SY5Y diferenciadas previamente a su transducción. **A.** Esquema del experimento, indicando en qué punto las células fueron transducidas, inducidas a diferenciar y analizadas. **B.** Imágenes de células teñidas con X-Gal al final del experimento. Escala: 100 μ m. **C.** Cuantificación de células azules positivas para β -galactosidasa. Se muestran los valores medios y sus desviaciones estándar de al menos tres experimentos independientes. ** $p < 0,001$ (test t de Student)

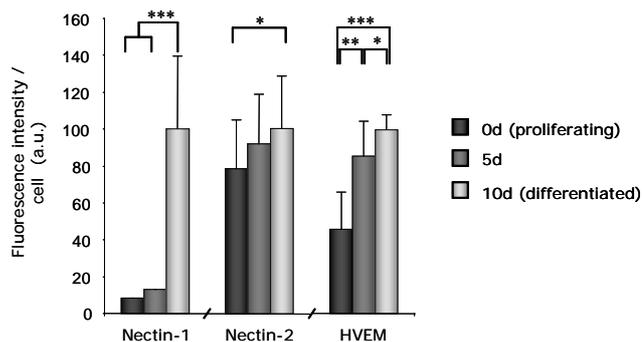
Básicamente, lo que observamos es que la eficiencia de transducción seguía siendo muy baja cuando las células en proliferación tratadas con el amplicón pHSVlac eran diferenciadas, mientras que cerca del 90% de las células diferenciadas previamente a la transducción expresaban la β -galactosidasa (**Figura 13B-C**). Dado que no podíamos descartar la posibilidad de que el promotor viral, si bien pudiendo estar activo en una célula diferenciada, se hubiese silenciado debido al tiempo transcurrido (más adelante se caracteriza la persistencia del vector), en paralelo con este experimento llevamos otro control de células transducidas, posteriormente diferenciadas y finalmente re infectadas 24 horas antes del análisis con el virus 5dl1.2 (datos no mostrados), ya que se ha visto que éste puede reactivar el promotor viral (Starr *et al.*, 1996). Estos experimentos confirmaron que las células no diferenciadas realmente no habían sido transducidas con el vector pHSVlac.

En función de estos resultados, exploramos la posibilidad más probable: la baja eficiencia de transducción en células SH-SY5Y en proliferación se debe probablemente a la pobre capacidad del vector para entrar en las células. Esto nos llevó a buscar posibles cambios en el patrón de los receptores celulares para HSV-1.

A.



B.



C.

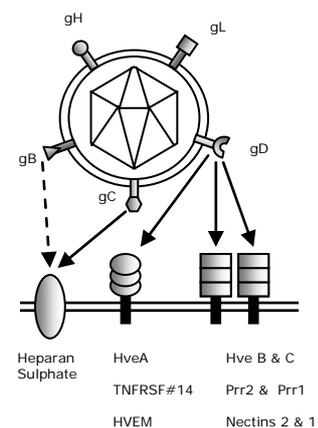


Figura 14. Expresión de los receptores celulares para la entrada de Herpesvirus durante la diferenciación de SH-SY5Y. **A.** Células SH-SY5Y en proliferación (0d), durante (5d) y después (10d) de su diferenciación fueron teñidas con anticuerpos específicos para los mediadores de entrada de herpesvirus (HVEM; *Herpes-Virus Entry Mediators*) y analizadas con microscopía confocal. Escala: 20 μ m. **B.** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia por célula individual para cada uno de los receptores con el software MetaMorph v6.2r6. Se muestran los valores medios y sus desviaciones estándar de al menos 15 células por campo de 3 campos elegidos aleatoriamente por experimento en al menos tres experimentos independientes. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ (test t de Student). **C.** Esquema que muestra las interacciones básicas entre glicoproteínas virales y receptores celulares que median la entrada de los herpesvirus en las células.

Hay varias glicoproteínas en la envuelta del virus (llamadas gB, gC, gD, gH y gL, entre otras), que contribuyen al anclaje del virus a la membrana celular (**Figura 14C**). Las glicoproteínas B y C (gB y gC) se unen fundamentalmente al heparán-sulfato, un glicosaminoglicano presente en la superficie celular. Sin embargo, la unión a heparán-sulfato, si bien es necesaria, es poco eficaz para permitir que el virus entre en la célula. Hay otras proteínas, conocidas como los mediadores de entrada de Herpes Virus (HVEM, *Herpes-Virus Entry Mediators*), entre los que destacan HVEM o HveA, Nectina-1 o HveC y Nectina-2 o HveB. Estos receptores celulares facilitan el anclaje y entrada del virus en las células, haciendo ésta más eficiente por su interacción fundamentalmente con la glicoproteína viral gD (Schweighardt y Atwood, 2001).

De esta manera, el análisis inmunocitoquímico de las células SH-SY5Y por microscopía confocal con anticuerpos específicos contra los receptores celulares clásicos de HSV-1 (HVEM, nectina-1 y nectina-2) reveló que la nectina-1, el mediador de la entrada de HSV-1 más extendido y considerado como máximo responsable de la susceptibilidad a este virus en el sistema nervioso central (Geraghty *et al.*, 1998; Haarr *et al.*, 2001) experimenta un marcado incremento en su expresión en las células diferenciadas (**Figura 14A-B**). Por otra parte, la tinción inmunoespecífica para HVEM y nectina-2 mostró que estos receptores también sufrían un modesto pero significativo aumento en las células SH-SY5Y diferenciadas con respecto a estas mismas células en proliferación (**Figura 14A-B**). Así pues, parece evidente que la razón principal del aumento en la eficiencia de transducción en células SH-SY5Y diferenciadas se debe a un incremento de los receptores celulares para HSV-1 de alta afinidad.

Persistencia de la expresión génica en las células transducidas con vectores de HSV-1

Por último, quisimos también determinar la persistencia de la expresión génica mediada por los vectores de HSV-1 en células SH-SY5Y diferenciadas. Para ello transdujimos células SH-SY5Y diferenciadas con pHSVlac y analizamos la expresión de β -galactosidasa por *western-blot* a distintos tiempos hasta un máximo de 7 días (**Figura 15B**). Encontramos que la expresión podía ser claramente detectada a las 6 horas, alcanzando el pico de máxima expresión a las 24 horas y decayendo a partir de entonces, permaneciendo los niveles a un 25% del máximo de expresión a los 7 días (**Figura 15B-C**). Dado que esta bajada en los niveles de expresión podía deberse bien a una atenuación paulatina del promotor viral en cada célula o bien a un silenciamiento completo en algunas células de manera aleatoria, cuantificamos el número de células SH-SY5Y diferenciadas que expresaban la β -galactosidasa a distintos tiempos después de ser transducidas con pHSVlac (**Figura 15A**). Lo que encontramos fue que prácticamente la totalidad de las células inicialmente expresando la β -galactosidasa se mantenía así hasta el final del experimento.

Estos resultados sugieren que la expresión de DNA exógeno mediada por vectores de HSV-1 decae con el tiempo, probablemente debido a una atenuación progresiva del promotor viral. Así, prácticamente todas las células mantienen la construcción del amplicón y muestran unos niveles significativos de expresión. Este patrón de expresión es muy similar al encontrado en neuronas de corteza de ratón en cultivo (Lim *et al.*, 1996).

La caracterización de este sistema así como su respuesta a vectores herpesvirales se recoge en una publicación recientemente aceptada (Gimenez-Cassina *et al.*, 2006a).

1.2. Cultivos primarios de neuronas de ratón

Mientras que las células similares a neuronas humanas obtenidas mediante la diferenciación de la línea celular SH-SY5Y constituyen un sistema muy homogéneo, al tratarse de una línea clonal, de células

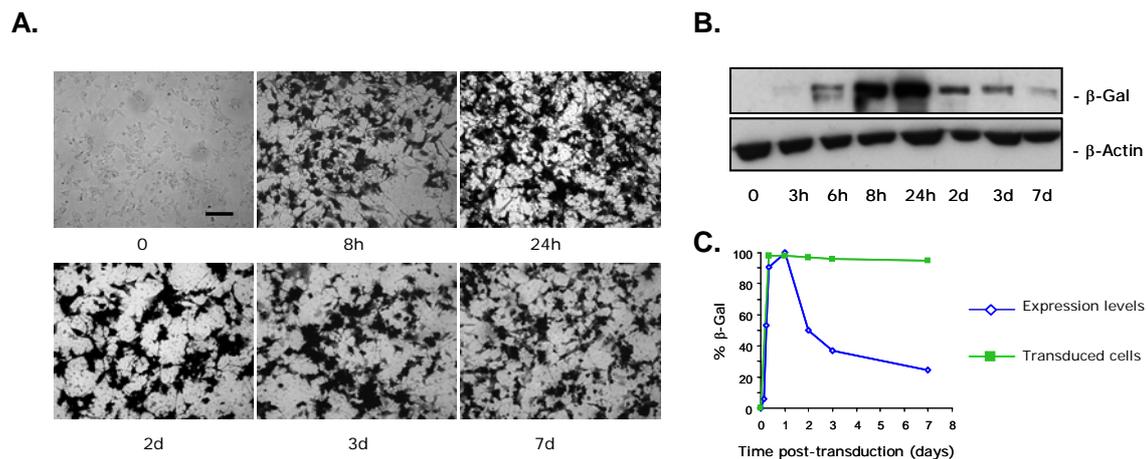


Figura 15. Persistencia de la expresión mediada por vectores de HSV-1 en células SH-SY5Y diferenciadas. Células SH-SY5Y diferenciadas fueron infectadas con pHSVlac a MOI 2 y posteriormente analizadas a distintos tiempos hasta 7 días, bien con tinción X-Gal sobre células fijadas (**A**) o por *western-blot* de extractos celulares (**B**). Escala: 100 μm. **C.** Cuantificación mostrando la proporción de células positivas para β-galactosidasa (determinadas por tinción X-Gal) y los niveles de expresión de β-galactosidasa (expresados como unidades arbitrarias determinadas por escaneado densitométrico del *western-blot*).

postmitóticas con un fenotipo neuronal, no podemos dejar de lado la relevancia fisiológica de los estudios llevados a cabo en neuronas primarias. Es por esto que hemos decidido completar nuestros estudios con cultivos primarios de neuronas de ratón.

Los cultivos primarios de neuronas son muy útiles como herramientas de trabajo experimental para estudiar procesos que tienen lugar en una neurona (Banker y Goslin, 1998). Constituyen un sistema modelo más relevante fisiológicamente que las líneas celulares, ya que las células son directamente extraídas de un animal y cultivadas *in vitro*. Sin embargo, presentan una mayor heterogeneidad que las líneas celulares. Para minimizar este problema en la medida de lo posible, hemos cultivado neuronas de regiones concretas del sistema nervioso central.

1.2.1. Cultivos primarios de neuronas de bulbo raquídeo murino

En primer lugar, nos hemos interesado por los cultivos de neuronas del bulbo raquídeo. Estas neuronas juegan un papel fisiológico muy relevante dentro del sistema nervioso central, ya que controlan numerosas funciones vegetativas e involuntarias, y sin embargo no son muchas las referencias en la literatura que reporten resultados extraídos de cultivos de neuronas de esta región en concreto (Kivell *et al.*, 2000, 2001).

Caracterización fenotípica

Los cultivos primarios de neuronas del bulbo raquídeo, situado en el tronco del encéfalo murino, se llevaron a cabo como se describe en *Materiales y Métodos*, y se caracterizaron mediante inmunocitoquímica para determinar a grandes rasgos la composición poblacional del cultivo obtenido al cabo de 6 días *in vitro* (6 DIV). En primer lugar llevamos a cabo un doble marcaje inmunocitoquímico SMI31/514, que ya ha sido descrito con anterioridad para la diferenciación de las células SH-SY5Y, y observamos que el contenido neuronal del cultivo era muy elevado, aparte de que las neuronas presentaban una polaridad bien definida y una profusa red de dendritas y axones (**Figura 16A-F**). Además, el doble marcaje con 514 y un anticuerpo específico contra la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP; *Glial Fibrillary Acidic Protein*) nos indicaba que, si bien el cultivo contaba con la presencia de

células gliales, éste estaba compuesto en su mayoría (>80%) por células neuronales (**Figura 16G-I**). Por último, cabe destacar que el hecho de utilizar un cultivo primario de neuronas a partir de tejido embrionario disociado conlleva inevitablemente la heterogeneidad del mismo (Banker y Goslin, 1998). De hecho, en estos cultivos hemos podido también detectar la presencia de algunas neuronas positivas para calbindina-D28_K (datos no mostrados), una proteína quelante de calcio que se expresa en algunas poblaciones de neuronas específicas en el cerebelo o en el bulbo raquídeo, entre otras regiones (Nordquist *et al.*, 1988).

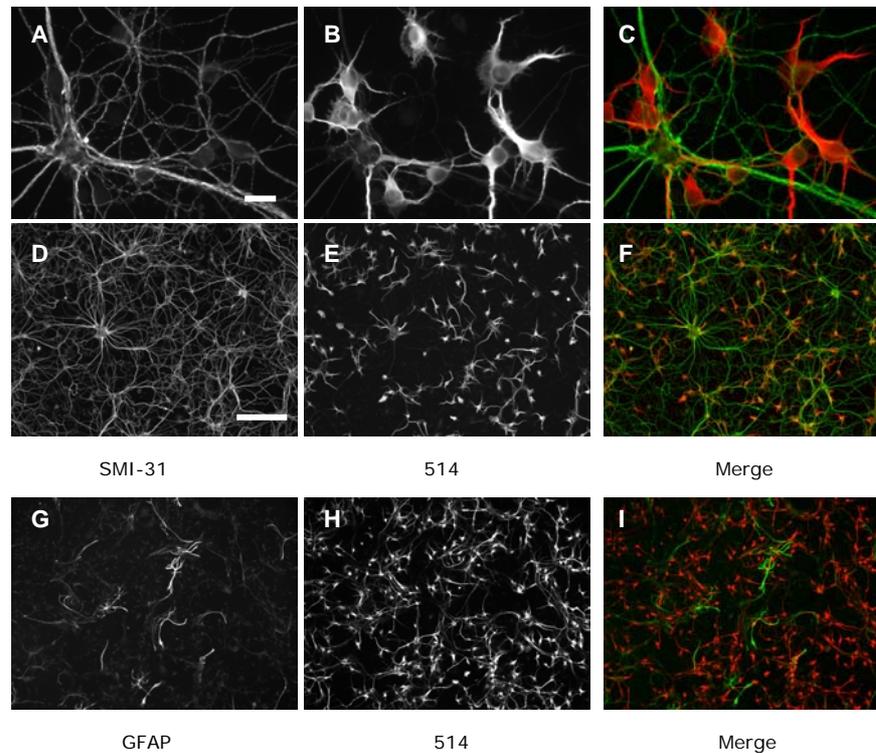


Figura 16. Caracterización fenotípica de cultivos de tronco del encéfalo. Los cultivos de tronco del encéfalo fueron fijados a 6 días *in vitro* (DIV) y doblemente teñidos con los anticuerpos SMI-31 y 514 (ya descritos) (**A-F**) o con un anticuerpo que reconoce la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP) y 514 (**G-I**). La tinción SMI-31/514 muestra el estado de la red de neuritas, mientras que la tinción GFAP/514 muestra la proporción de neuronas y células gliales. Escala: **A-C** 20 μ m; **D-I** 200 μ m.

Eficiencia de transducción con vectores de HSV-1. Persistencia

Dado que no hay muchos estudios con neuronas de bulbo raquídeo *in vitro*, no hay muchos datos sobre la eficiencia de transducción de los vectores derivados de HSV-1 en estas neuronas en cultivo.

Expusimos los cultivos de bulbo raquídeo a pHSVlac a distintas MOIs (0-10) e hicimos un marcaje doble con β -galactosidasa y MAP2 a las 24 horas para identificar específicamente las neuronas transducidas (**Figura 17**). Así se observa que a una MOI de 5-10 se pueden alcanzar unos niveles de transducción cercanos al 90% de las neuronas en cultivo expresando el gen exógeno, con unos niveles despreciables de toxicidad, inferiores al 5% (datos no mostrados).

Al igual que hicimos con las células SH-SY5Y quisimos además estudiar la persistencia del vector en estas células. Para ello infectamos cultivos de bulbo raquídeo e hicimos extractos de proteínas a distintos tiempos después de la infección. Pudimos comprobar mediante análisis por *western-blot* que, si bien la expresión decaía en el tiempo, ésta era muy duradera, ya que a 4 días se mantenía prácticamente igual que a 24 horas, y era incluso detectable a 14 días después de la transducción (**Figura 17C-D**).

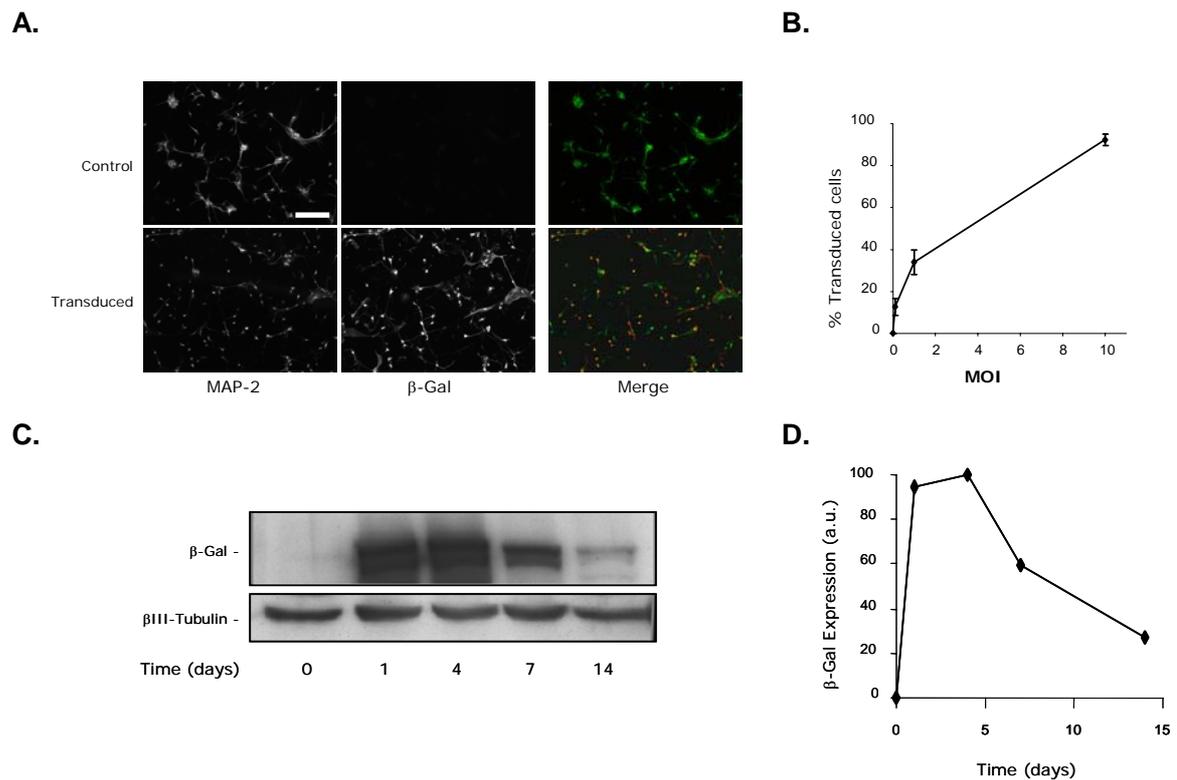


Figura 17. Caracterización de la respuesta de los cultivos de tronco del encéfalo a los vectores de HSV-1: eficiencia y persistencia. **A.** Los cultivos de neuronas de tronco del encéfalo fueron infectados con pHSVlac a distintas MOIs (0-10) y doblemente teñidos con anticuerpos anti-MAP2 y anti- β -galactosidasa a las 24 horas para determinar la eficiencia de transducción en neuronas. Se muestra la tinción a MOI 10. Escala: 200 μ m. **B.** Cuantificación de la eficiencia de transducción a neuronas de tronco del encéfalo en función de la MOI de amplicón. **C** y **D.** Análisis por *western-blot* y cuantificación de los niveles de expresión de β -galactosidasa (expresados como unidades arbitrarias determinadas por escaneado densitométrico) mediada por pHSVlac en cultivos de tronco del encéfalo a lo largo del tiempo. Los cultivos de tronco del encéfalo fueron transducidos con pHSVlac a MOI 5 y los extractos de proteína fueron analizados por *western-blot* a distintos tiempos.

1.2.2. Cultivos primarios de células de cerebelo enriquecidos en neuronas de Purkinje

También hemos desarrollado un modelo de cultivo primario de células de cerebelo enriquecido en neuronas de Purkinje. Esta población neuronal constituye la única proyección eferente de la corteza cerebelar, jugando un papel esencial en la integración de la información sensorial y motora, siendo clave en el proceso de coordinación motora (Apps y Garwicz, 2005). Además, esta población está específicamente afectada en algunas patologías neurológicas, fundamentalmente en las ataxias espinocerebelosas (Taroni y DiDonato, 2004).

Se ha descrito previamente que las neuronas de Purkinje presentan una baja tasa de supervivencia en cultivo. Aunque se han descrito distintos procedimientos para cultivarlas (Baptista *et al.*, 1994; Furuya *et al.*, 1998; Morrison y Mason, 1998; Tabata *et al.*, 2000), quisimos desarrollar un método alternativo optimizado y más reproducible que nos permitiese cultivar esta población específica del cerebelo de forma rutinaria. Por ello realizamos una disociación muy suave empleando papaína y diseñamos un medio específico consistente en una combinación de Neurobasal y B-27, por su idoneidad para células neuronales de distintos tipos (Brewer *et al.*, 1993; Brewer, 1995), suplementado con adenina (Watanabe *et al.*, 2003), un bajo porcentaje de suero de caballo (Bartlett y Banker, 1984; Dux *et al.*, 1996) y una concentración ligeramente superior de cloruro potásico.

Las neuronas de Purkinje constituyen una población minoritaria dentro del cerebelo y no son fáciles de mantener en cultivo, pues dependen en gran medida del soporte trófico que proporcionan otras

poblaciones, como las neuronas granulares, las células gliales o las interneuronas (Baptista *et al.*, 1994; Furuya *et al.*, 1998; Morrison y Mason, 1998; Tabata *et al.*, 2000). Por ello, aunque existen procedimientos específicos que permiten aislar neuronas de Purkinje mediante gradientes de Percoll seguidos de *immunopanning* (Baptista *et al.*, 1994) o *cell sorting* (Tomomura *et al.*, 2001), nos decantamos por un cultivo mixto para favorecer las interacciones intercelulares.

Caracterización fenotípica

Al igual que en los casos anteriores, en primer lugar llevamos a cabo una caracterización fenotípica del cultivo (**Figura 18**). Por ello, el primer paso fue realizar una tinción con anticuerpos específicos contra calbindina-D28K, una proteína quelante de calcio que, en la corteza cerebelosa, se expresa únicamente en las neuronas de Purkinje (Nordquist *et al.*, 1988).

Lo primero que pudimos apreciar al analizar un cultivo tras 18 DIV fue que había una gran densidad de neuronas de Purkinje (llegando a representar aproximadamente el 20% de la población total) en el cultivo mixto que habíamos establecido utilizando un medio semi-definido (**Figura 18A-F**). Estas neuronas presentaban además un aspecto saludable, indicado por el desarrollo del árbol dendrítico, con dendritas gruesas y ramificadas recubiertas de espinas dendríticas (Baptista *et al.*, 1994).

A continuación, hicimos dobles marcajes con anti-calbindina-D28K combinado con otros anticuerpos para definir a grandes rasgos la composición del cultivo (**Figura 18G-L**). La tinción con HM-2, un anticuerpo contra MAP2, reveló que el cultivo estaba compuesto principalmente por células neuronales (neuronas granulares en su mayoría, y algunas interneuronas) (**Figura 18G-I**). Finalmente, la tinción específica contra la proteína GFAP mostró el bajo contenido en glía (menos del 10%) presente en el cultivo (**Figura 18J-L**).

Eficiencia de transducción con vectores de HSV-1. Persistencia

Dado nuestro interés en utilizar vectores de HSV-1 para nuestros estudios, quisimos averiguar la susceptibilidad de las células de Purkinje a ser transducidas por estos vectores, ya que estudios previos de nuestro laboratorio mostraban la posibilidad de transducir hasta un 30% de esta población *in vivo* tras inyectar el vector herpesviral en la oliva inferior (Agudo *et al.*, 2002).

Infectamos las células a 4 DIV con el vector reportero pHSVlac a una MOI de 0,25, que determinamos como óptima para minimizar la toxicidad originada como consecuencia de la infección. Dejamos que el vector se expresase durante 24 horas antes de analizar las células. El doble marcaje con anti-calbindina-D28K y anti- β -galactosidasa mostró la eficiencia de la infección (**Figura 19A**). En concreto, se observó que en algunos casos hasta el 50% de las neuronas de Purkinje presentes en el cultivo estaban correctamente transducidas. De hecho, de todas las células transducidas presentes en el cultivo, hasta un 40% eran neuronas de Purkinje.

También llevamos a cabo un análisis de la persistencia de la expresión de los vectores de HSV-1 en estos cultivos. Para ello, empleamos un ensayo de alta sensibilidad consistente en 2 reacciones de β -galactosidasa y luciferasa acopladas, de tal manera que el producto de la primera constituía el sustrato de la segunda (ver *Materiales y Métodos*). Básicamente, los cultivos de cerebelo fueron infectados a 4 DIV, y se procesaron como se indica en la sección *Materiales y Métodos* a distintos tiempos. Los resultados, recogidos en la **figura 19B**, indican que hay un aumento progresivo de la expresión del transgen durante los primeros 4 días, momento en el cual alcanza su máximo de expresión, para empezar a decaer gradualmente, siendo aun así detectable la expresión 14 días después de la infección.

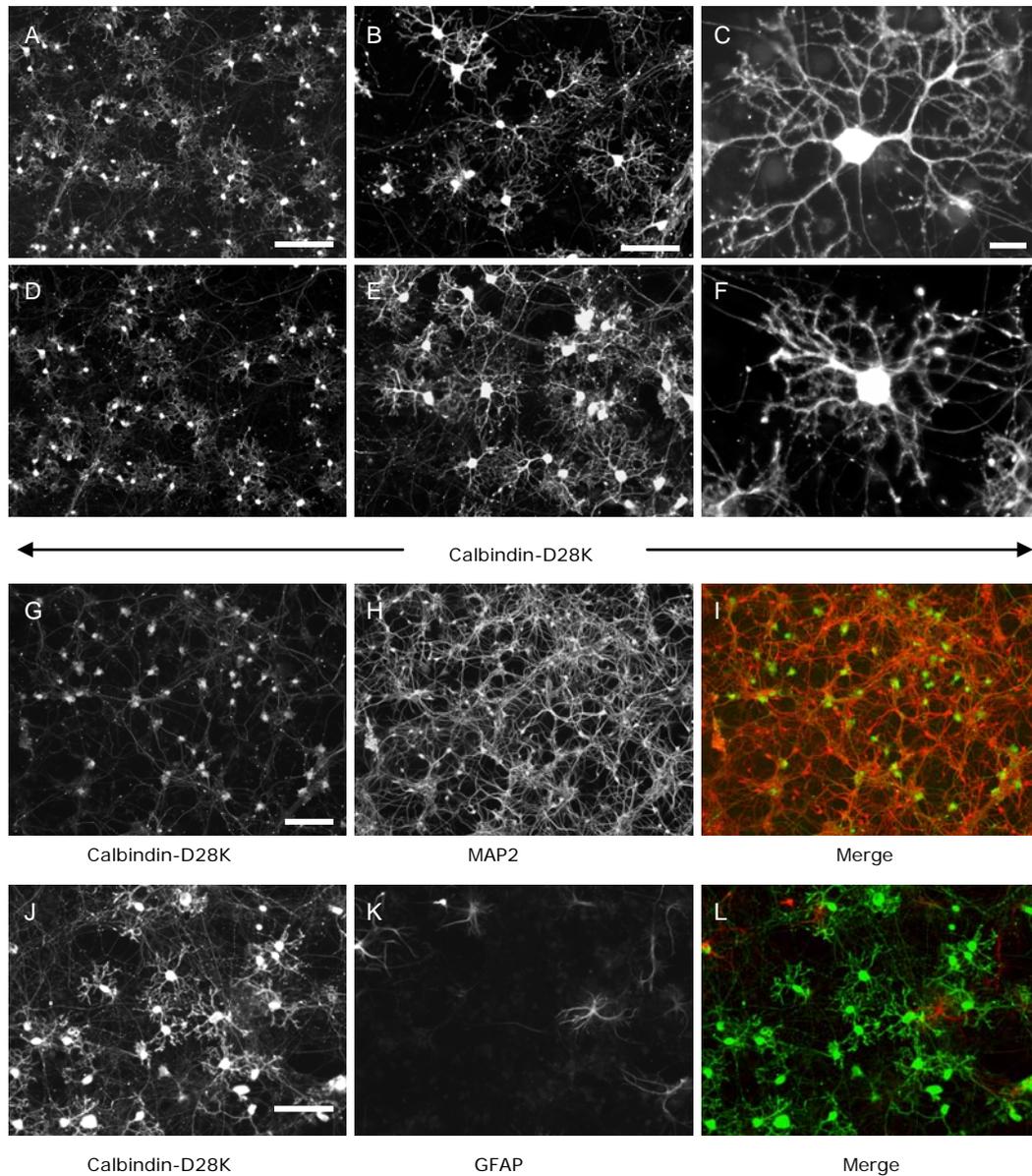
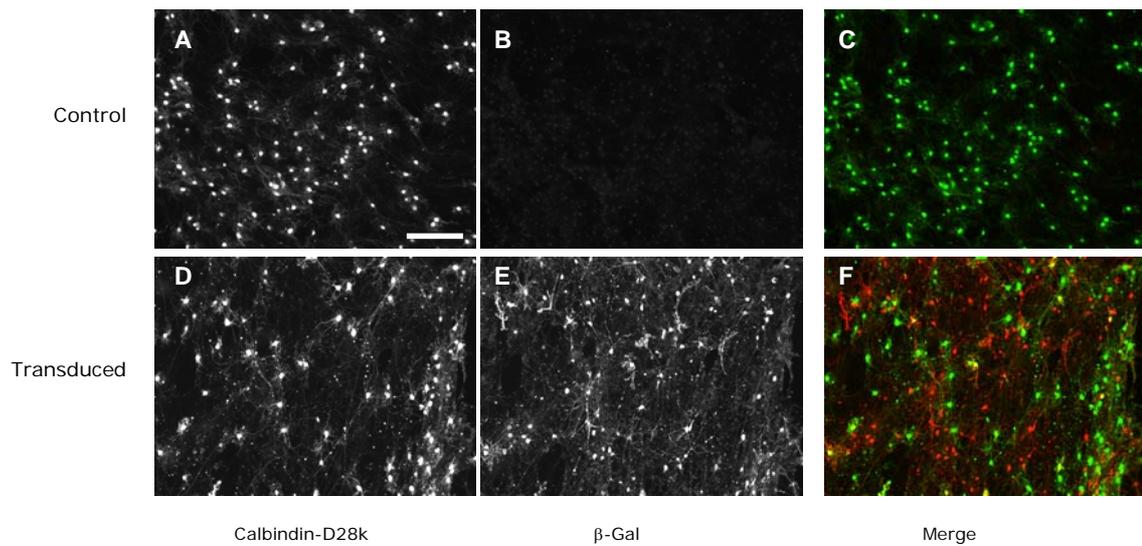


Figura 18. Caracterización fenotípica de cultivos mixtos de cerebelo. *A-F.* Los cultivos de cerebelo de ratón fueron fijados a 18 DIV y teñidos con un anticuerpo anti-Calbindina-D28K para detectar las neuronas de Purkinje presentes en el cultivo, así como el estado de su árbol dendrítico. *G-I.* La doble tinción con anticuerpos para calbindina-D28K/MAP2 muestra la proporción de neuronas de Purkinje con respecto a la población total de neuronas. *J-L.* La doble tinción con anticuerpos contra calbindina-D28K/GFAP muestra el contenido en células gliales de estos cultivos. Escala: *A, D* 200 μm ; *B, E, G-L* 100 μm ; *C, F* 20 μm .

A.



B.

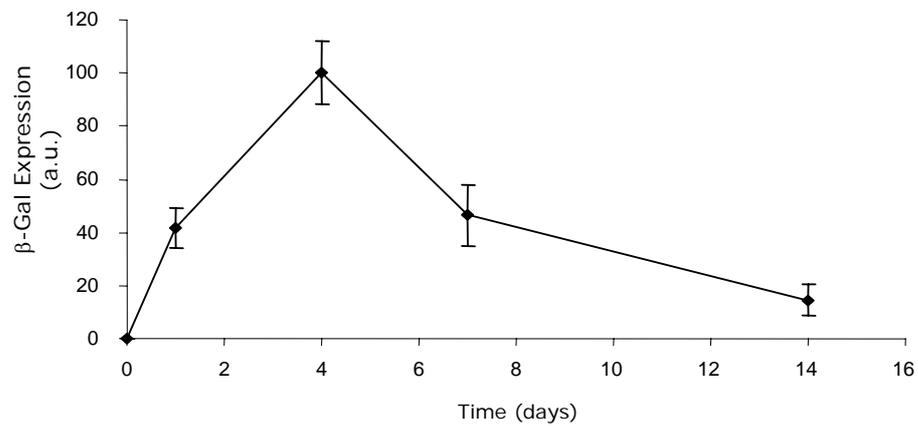


Figura 19. Caracterización de la respuesta de las neuronas de Purkinje en cultivo mixto a los vectores de HSV-1: eficiencia y persistencia. **A.** Los cultivos de cerebelo enriquecidos en neuronas de Purkinje fueron infectados con pHSVlac a MOI 0,25 y doblemente teñidos con anticuerpos anti-Calbindina-D28K y anti-β-galactosidasa a las 24 horas para determinar la eficiencia de transducción en neuronas. Escala: 200 μm. **B.** Análisis y cuantificación de los niveles de expresión de β-galactosidasa (expresados como unidades arbitrarias determinadas por escaneado densitométrico) mediada por pHSVlac en cultivos de cerebelo a lo largo del tiempo. Los cultivos de cerebelo fueron transducidos con pHSVlac y los extractos de proteína fueron analizados con un ensayo X-Gal/Luciferina a distintos tiempos. Se muestran los valores medios y desviaciones estándar de tres experimentos independientes.

2. EFECTO DE LA INHIBICIÓN CRÓNICA DE LA GLUCÓGENO SINTASA QUINASA-3 (GSK-3) FRENTE A LA DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL

2.1. Caracterización de la expresión de vectores de HSV-1 de GSK-3

Como ya se ha indicado anteriormente, la glucógeno sintasa quinasa-3 (GSK-3) es una enzima multifuncional con un amplio espectro de sustratos y una regulación muy compleja a nivel de fosfo-/defosforilación y formación de complejos macromoleculares que parece estar implicada, entre muchos otros procesos, en fenómenos de señalización de muerte neuronal (Cohen y Frame, 2001; Frame y Cohen, 2001; Grimes y Jope, 2001; Doble y Woodgett, 2003), fundamentalmente si se tiene en cuenta que existen numerosos trabajos que describen que la inhibición de GSK-3, ya sea crónica o aguda, puede proteger células neuronales de una amplia variedad de estímulos proapoptóticos, como la exposición al péptido β -amiloide (Takashima *et al.*, 1998; Alvarez *et al.*, 1999), la proteína del prión (Perez *et al.*, 2003), la retirada de factores tróficos (Cross *et al.*, 2001; Bhat *et al.*, 2003), o excitotoxicidad (Facci *et al.*, 2003; Goodenough *et al.*, 2004), por citar algunos ejemplos. Así, la GSK-3 se revela como una posible diana terapéutica para trastornos neurodegenerativos (Gould *et al.*, 2004).

Así pues, en primer lugar quisimos caracterizar la expresión de distintos vectores de HSV-1 codificando dos formas de GSK-3 β : la forma silvestre o “*wild-type*” y un mutante con carácter dominante negativo (GSK-3 β -K85R), ambos generados por el Dr. Filip Lim (Munoz-Montano *et al.*, 1999a; Sanchez *et al.*, 2001). La caracterización bioquímica, inmunocitoquímica y funcional se describe a continuación.

Caracterización bioquímica e inmunocitoquímica de la expresión del mutante dominante negativo de GSK-3 β

Para nuestros estudios decidimos usar el mutante K85R de GSK-3 β , ya que se ha descrito su carácter dominante negativo durante la regulación de la formación del eje dorsoventral en el desarrollo de *Xenopus laevis* (Dominguez *et al.*, 1995). Además, también se ha visto que la expresión de este mutante puede proteger células frente a determinados estímulos apoptóticos, como la retirada de factores tróficos o la toxicidad inducida por la proteína del prión (Pap y Cooper, 1998; Hetman *et al.*, 2000; Perez *et al.*, 2003). En este trabajo hemos utilizado un amplicón de HSV-1 que codifica este mutante, pHSVGSK3^{K85R} (**Figura 20F**) (Munoz-Montano *et al.*, 1999a; Sanchez *et al.*, 2001). Además, como controles, hemos utilizado también un amplicón que codifica la forma silvestre de GSK-3 β , pHSVGSK3^{WT} (**Figura 20F**) (Munoz-Montano *et al.*, 1999a; Sanchez *et al.*, 2001), y el amplicón pHSVlac (Geller y Breakefield, 1988), que codifica la β -galactosidasa de *E. coli* y es con el que se ha hecho toda la caracterización de respuesta a virus de los sistemas celulares utilizados en esta tesis (ver apartado 1 de esta sección).

De esta manera, lo primero que hicimos fue transducir las células SH-SY5Y diferenciadas con los amplicones pHSVGSK3^{WT} y pHSVGSK3^{K85R} a distintas dosis y evaluamos la expresión por tinción inmunocitoquímica (**Figura 20A-D**) y por *western-blot* a las 24 horas (**Figura 20E**). En ambos casos, la existencia del péptido “*Flag*” clonado en posición N-terminal inmediatamente antes del gen de las formas silvestre y mutada de GSK-3 β simplificó mucho su detección con la ayuda de anticuerpos específicos. Observamos que, a una multiplicidad de infección de 2 partículas infectivas por célula, prácticamente la totalidad de las células expresaban las construcciones (**Figura 20B, D**). Además, el incremento en los niveles de expresión de GSK-3 β correlacionaba con el incremento en la dosis de amplicón suministrada (**Figura 20E**).

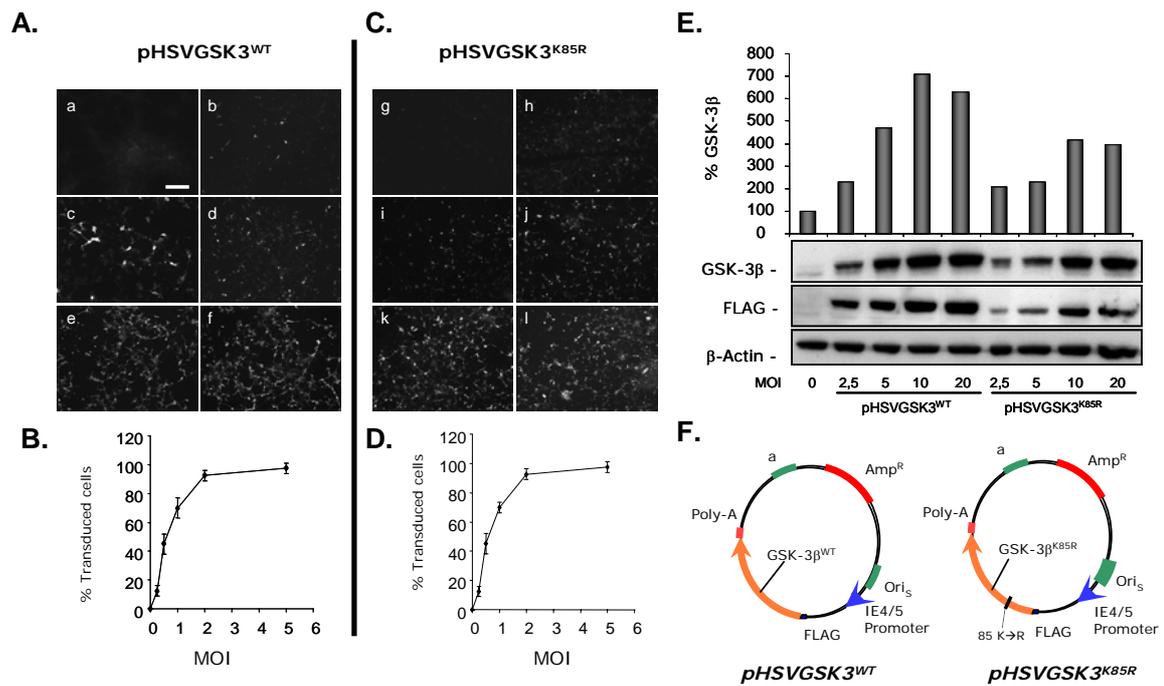


Figura 20. Transducción de células SH-SY5Y diferenciadas con los amplicones de GSK-3β. **A.** Las células SH-SY5Y diferenciadas fueron infectadas con pHSVGSK3^{WT} a distintas MOI (0-5) y analizadas por inmunofluorescencia con un anticuerpo anti-FLAG para reconocer específicamente la forma sobreexpresada. **B.** Cuantificación de la proporción de células transducidas con pHSVGSK3^{WT} en función de la MOI. **C.** Las células SH-SY5Y diferenciadas fueron infectadas con pHSVGSK3^{K85R} a distintas MOI (0-5) y analizadas por inmunofluorescencia con un anticuerpo anti-FLAG para reconocer específicamente la forma sobreexpresada. **D.** Cuantificación de la proporción de células transducidas con pHSVGSK3^{K85R} en función de la MOI. Para ambos casos **A** y **C**: las MOI empleadas fueron: **a** 0; **b** 0,25; **c** 0,5; **d** 1; **e** 2; **f** 5. Escala 200 μ m. **E.** Análisis por *western-blot* de los extractos de proteínas de células SH-SY5Y diferenciadas infectadas con los amplicones de GSK-3 β a distintas MOI (0-20). Para detectar la sobreexpresión se utilizaron anticuerpos específicos anti-FLAG y anti-GSK-3 β . **F.** Esquema que recoge los mapas de los vectores amplicones de la forma silvestre (*wild-type*) (pHSVGSK3^{WT}) o el mutante dominante negativo K85R (pHSVGSK3^{K85R}) de GSK-3 β . En ambos casos los vectores contienen los ADNc de dichos genes fusionados con FLAG en la región N-terminal bajo el control del promotor viral IE 4/5 y secuencias necesarias para el empaquetamiento en cápsidas de HSV-1: la señal "a" (también llamada "pac") de empaquetamiento y el origen de replicación viral "Ori_s".

Determinamos que una MOI de 2 era suficiente para transducir más del 90% de las células (estos datos son consistentes con los ensayos previos que habíamos realizado con pHSVlac) alcanzando unos niveles de sobreexpresión de GSK-3 β de unas 2-2,5 veces con respecto a los niveles basales.

A continuación, hicimos una caracterización bioquímica más exhaustiva (**Figura 21**). Transdujimos las células SH-SY5Y diferenciadas a una MOI de 2 y las analizamos por *western-blot* a las 24 horas. El análisis se inició con anticuerpos capaces de reconocer a GSK-3 α y β o sólo GSK-3 β , independientemente de su estado de fosforilación, confirmando una vez más la sobreexpresión de GSK-3 β en las células transducidas con pHSVGSK3^{WT} o pHSVGSK3^{K85R}. En todos los casos se pudo discriminar sin dificultad la banda correspondiente a la GSK-3 β exógena de la endógena por un pequeño retraso en la movilidad electroforética de aquella como consecuencia del péptido "Flag" fusionado en el extremo N-terminal, que pudo también ser detectado con la ayuda de anticuerpos específicos.

Como ya se ha indicado previamente, la GSK-3 es una enzima con una regulación muy compleja, tanto a nivel de fosfo-defosforilación como de formación de complejos con otras proteínas (Cohen y Frame, 2001; Frame y Cohen, 2001; Grimes y Jope, 2001). Así, utilizando anticuerpos específicos que reconocen el estado de fosforilación de GSK-3, observamos que el nivel de fosforilación inhibitoria en serina 9 de la GSK-3 β (Cross *et al.*, 1995) era ostensiblemente superior en las células transducidas con pHSVGSK3^{WT} o pHSVGSK3^{K85R} que en las células transducidas con pHSVlac o en las células control.

Extrañamente, el caso de la fosforilación activadora en tirosina en posición 216 de la isoforma β (Hughes *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1994) fue distinto, pues si bien en las células transducidas con pHSVGSK3^{WT} la fosforilación sí se vio fuertemente incrementada, ésta no experimentó ningún cambio en las células transducidas con pHSVGSK3^{K85R}, bien porque este mutante no es capaz de fosforilarse en tirosina o porque el anticuerpo empleado no es capaz de reconocerlo en este estado. Los niveles de GSK-3 α fosforilada en tirosina 279 no variaron en ningún caso.

Esta caracterización bioquímica se completó con un anticuerpo anti- β -galactosidasa, para confirmar la transducción de las células con pHSVlac como control de transducción sin efecto biológico. La β -actina se utilizó como control de cantidad de proteína total.

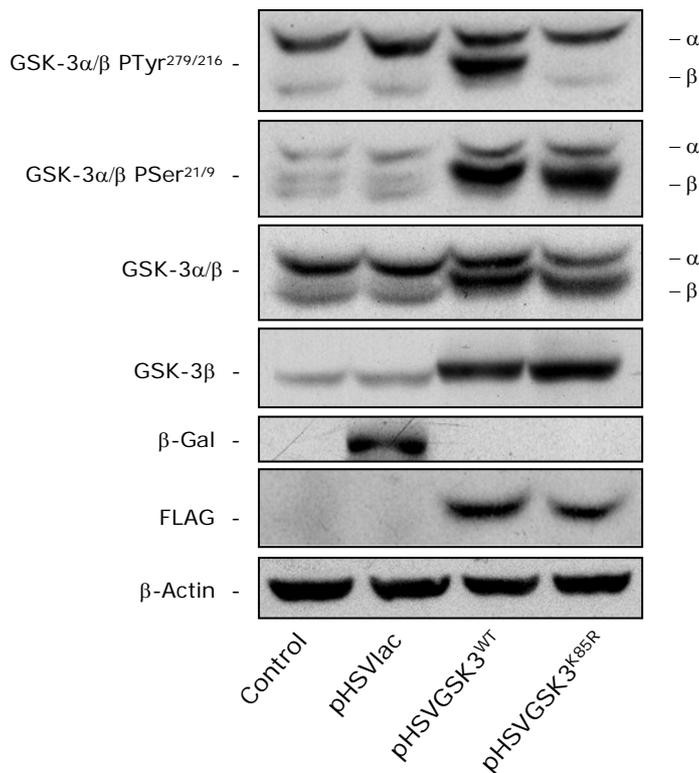


Figura 21. Caracterización bioquímica de la transducción de células SH-SY5Y diferenciadas con los amplicones de GSK-3 β . Las células SH-SY5Y diferenciadas fueron transducidas a MOI 2 con los amplicones de GSK-3 β , pHSVGSK3^{WT} o pHSVGSK3^{K85R}, o con pHSVlac como control de transducción con un vector sin efecto biológico, y los extractos de proteínas de las células se analizaron a las 24 horas por *western-blot*. Además de los anticuerpos anti-FLAG y anti- β -Gal para confirmar la eficiencia de transducción, se utilizaron también anticuerpos específicos para GSK-3 β y GSK-3 α/β totales, y para GSK-3 α/β fosforiladas en serina (21/9) o en tirosina (279/216).

Validación funcional del dominante negativo K85R de GSK-3 β : Protección frente a inhibición de PI3-K

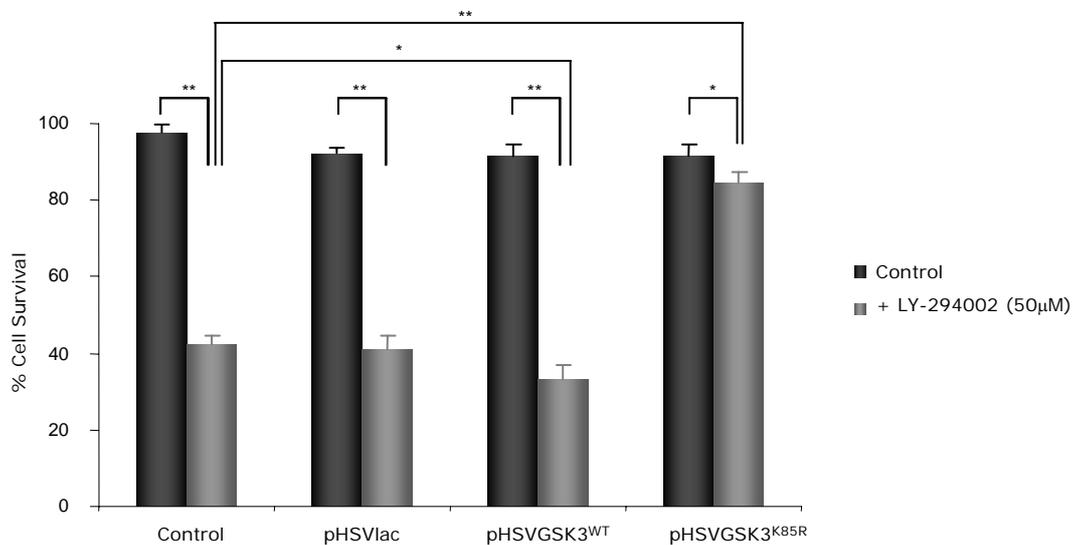
Una vez hubimos comprobado la correcta expresión en células SH-SY5Y diferenciadas, antes de pasar a realizar nuestros estudios de protección frente a disfunción mitocondrial, quisimos llevar a cabo un ensayo previo para verificar que la expresión del dominante negativo de GSK-3 β por medio de amplicones de HSV-1 tiene un efecto biológico funcional en las células SH-SY5Y diferenciadas.

Para nuestro estudio utilizamos un inhibidor específico de la enzima fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3-K) (Vlahos *et al.*, 1994), que mimetiza un modelo drástico de retirada de factores tróficos, ya que boquea la señalización a través de esta vía de supervivencia celular (**Figura 22C**). Estudios previos demostraron que es posible bloquear la muerte celular inducida por inhibidores de PI3-K como LY-294002 o wortmannina, bien utilizando inhibidores farmacológicos de GSK-3 (Cross *et al.*, 2001; Bhat *et al.*, 2003), bien mediante la expresión del dominante negativo de GSK-3 β K85R en células PC12 (Pap y

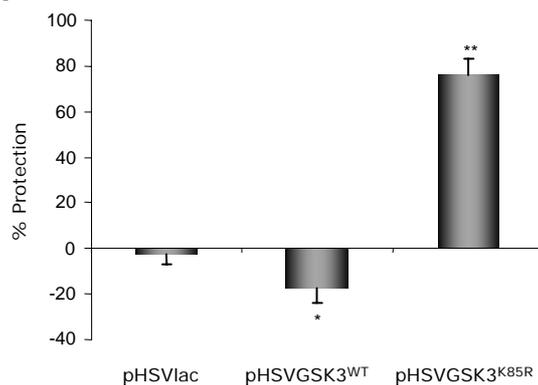
Cooper, 1998), en neuronas de corteza de ratón (Hetman *et al.*, 2000), en neuronas simpáticas (Crowder y Freeman, 2000) o de hipocampo (Johnson-Farley *et al.*, 2006).

Así pues, infectamos células SH-SY5Y diferenciadas con los amplicones pHSVlac, pHSVGSK3^{WT} y pHSVGSK3^{K85R} a una MOI de 2, dejamos transcurrir 12 horas para que las construcciones pudiesen empezar a expresarse y a continuación tratamos las células con el inhibidor de PI3-K LY-294002 a una concentración final de 50 μ M durante 24 horas, transcurridas las cuales pasamos a evaluar la supervivencia celular (**Figura 22A**). Lo que vimos fue que la sobreexpresión del dominante negativo de GSK-3 β efectivamente protegía las células SH-SY5Y diferenciadas de la muerte inducida por la inhibición de PI3-K, alcanzando niveles de hasta el 80% de protección. Además, la expresión de la forma silvestre de GSK-3 β por medio del vector pHSVGSK3^{WT} potenciaba ligera pero significativamente el efecto de LY-294002 (**Figura 22A-B**). Estos resultados son muy similares a los previamente descritos para neuronas de corteza de ratón (Hetman *et al.*, 2000).

A.



B.



C.

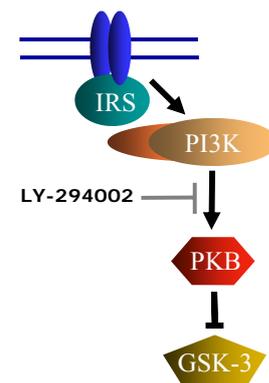


Figura 22. Protección frente a la inhibición de PI3-K por inhibición de GSK-3 β expresando el mutante dominante negativo K85R en células SH-SY5Y diferenciadas. **A.** Las células SH-SY5Y fueron transducidas a MOI 2 con pHSVlac, pHSVGSK3^{WT} o pHSVGSK3^{K85R}. Después de 12 horas, fueron expuestas al inhibidor de PI3-K LY-294002 (50 μ M) durante 24 horas, tras las cuales se evaluó la viabilidad. **B.** Se representa la protección frente a la inhibición de PI3-K con la expresión del dominante negativo de GSK-3 β , K85R, que alcanzó niveles cercanos al 80%. **C.** Esquema representando la vía de supervivencia de PI3-K/Akt, indicando la acción de LY-294002. Se muestran los valores medios y sus desviaciones estándar de al menos tres experimentos independientes. * p < 0,05; ** p < 0,001 (test *t* de Student).

También hicimos este mismo ensayo en cultivos de cerebelo estudiando el efecto de la expresión del dominante negativo de GSK-3 β K85R sobre la viabilidad de las neuronas de Purkinje tratadas con LY-294002. Para ello infectamos los cultivos de cerebelo con los amplicones pHSVlac, pHSVGSK3^{WT} y pHSVGSK3^{K85R} a una MOI de 0,25 en el día 4 del cultivo, dejamos transcurrir 24 horas pasadas las cuales tratamos las células con LY-294002 a una concentración final de 50 μ M durante 24 horas. A continuación, fijamos las células e hicimos un doble marcaje contra calbindina-D28K y el transgen correspondiente en cada caso (anti- β -galactosidasa para pHSVlac y anti-péptido FLAG para pHSVGSK3^{WT} y pHSVGSK3^{K85R}). La viabilidad se expresó en porcentaje de neuronas de Purkinje transducidas con respecto al control tras cuantificar el número total de neuronas de Purkinje transducidas presentes en el cultivo tras los tratamientos (**Figura 23A**). En este caso se lograron niveles de protección significativos con el dominante negativo de GSK-3 β que alcanzaban hasta el 50% (**Figura 23B**).

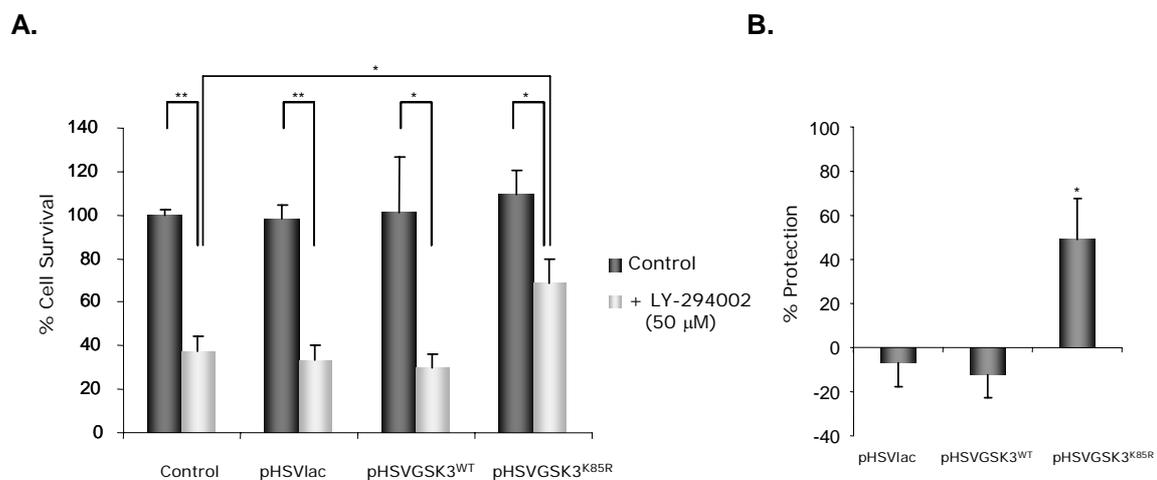


Figura 23. Protección frente a la inhibición de PI3-K por inhibición de GSK-3 β expresando el mutante dominante negativo K85R en neuronas de Purkinje. **A.** Los cultivos mixtos de cerebelo fueron transducidas a MOI 0,25 con pHSVlac, pHSVGSK3^{WT} o pHSVGSK3^{K85R}. A las 24 horas se expusieron los cultivos al inhibidor de PI3-K LY-294002 (50 μ M) durante otras 24 horas, tras las cuales se evaluó la supervivencia en función del número de células calbindina-positivas transducidas. **B.** Cuantificación de la protección obtenida frente a la inhibición de PI3-K por expresión del dominante negativo de GSK-3 β , K85R. Los niveles de protección alcanzaron el 50%. Se muestran los valores medios y sus desviaciones estándar de al menos tres experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (test t de Student).

Estos resultados demuestran, por primera vez, que la expresión de una forma dominante-negativa de GSK-3 protege a las células de Purkinje frente a la muerte disparada por LY-294002, de una manera similar a lo que sucede en otros tipos neuronales (Crowder y Freeman, 2000; Hetman *et al.*, 2000; Johnson-Farley *et al.*, 2006). En su conjunto, los resultados mostrados en las **figuras 22 y 23** demuestran la funcionalidad de estos vectores para realizar más ensayos en los que explorar el potencial neuroprotector de la forma dominante negativa de GSK-3 frente a otros estímulos proapoptóticos.

2.2. Efecto neuroprotector de la inhibición crónica de GSK-3 sobre la muerte celular inducida por la disfunción mitocondrial

Dado nuestro interés en estudiar modelos de neuroprotección frente a la disfunción mitocondrial, centramos nuestra atención en la rotenona, un inhibidor del complejo I mitocondrial que es utilizado como agente inductor de disfunción mitocondrial y muerte celular (Betarbet *et al.*, 2000; Sherer *et al.*, 2002; Ahmadi *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2003; Pei *et al.*, 2003; Sherer *et al.*, 2003b; Tada-Oikawa *et al.*, 2003).

Existen evidencias previas de que el pre-tratamiento de células en cultivo con litio, un inhibidor relativamente específico aunque no completamente selectivo de la GSK-3 (Klein y Melton, 1996; Stambolic *et al.*, 1996), puede atenuar la activación de caspasa-3 en células SH-SY5Y en proliferación tratadas con rotenona (King *et al.*, 2001). Esto nos llevó a preguntarnos si sería posible proteger células neuronales de la muerte inducida por rotenona mediante la inhibición de GSK-3 con el empleo de fármacos o a través de la expresión de un mutante con carácter dominante negativo.

Efecto neuroprotector de los fármacos inhibidores de GSK-3 frente a la muerte celular inducida por rotenona

De esta forma, y antes de comenzar los estudios de transferencia génica, caracterizamos el efecto del tratamiento con dos inhibidores de la GSK-3 de distinta naturaleza química: el ion litio, inhibidor no competitivo del enzima (Klein y Melton, 1996), y el SB-415286, una maleimida que compite por el sitio de unión a ATP (Coghlan *et al.*, 2000; Cross *et al.*, 2001).

Llevamos a cabo una serie de experimentos con células SH-SY5Y diferenciadas para determinar la concentración y el tiempo óptimos de tratamiento con los inhibidores para lograr el máximo efecto protector posible frente a la disfunción mitocondrial inducida por rotenona (**Figura 24**). En todos los casos, a menos que se indique, el tratamiento con rotenona fue de 24 horas a una concentración de 2 μ M.

Observamos que era necesario un pretratamiento con los inhibidores de GSK-3 de al menos 5 días antes de la exposición a rotenona para obtener el mayor efecto neuroprotector, en torno al 50% (**Figura 24D-F**), no funcionando en co-tratamiento. Esta necesidad de inhibición crónica durante 5 días previa a la exposición a rotenona podría sugerir la implicación de cambios en la expresión génica. Además, para lograr este efecto no era necesario mantener la enzima completamente inhibida; dosis cercanas a la IC_{50} de la enzima para cada uno de los inhibidores (utilizamos 2 mM para el cloruro de litio -LiCl- y 5 μ M para el SB-415286) eran suficientes para lograr el máximo efecto protector, no viéndose éste mejorado con un incremento en la concentración de los inhibidores (**Figura 24A-C**). El tratamiento crónico de las células únicamente con los inhibidores no tuvo ningún efecto negativo sobre la viabilidad celular (datos no mostrados).

Efecto neuroprotector de la expresión del dominante negativo de GSK-3 β , K85R, frente a la disfunción mitocondrial inducida por rotenona

Una vez habíamos comprobado que tratando células SH-SY5Y diferenciadas crónicamente con inhibidores específicos de GSK-3 era posible proteger parcialmente estas células de la muerte inducida por rotenona, quisimos comprobar si este efecto era reproducible por la expresión de un mutante con carácter dominante negativo de GSK-3 β .

Habíamos demostrado previamente que la expresión del dominante negativo de GSK-3 β , K85R, por medio de amplicones de HSV-1, tenía un efecto neuroprotector frente a la muerte inducida por bloqueo de la vía de supervivencia de PI3-K/Akt tanto en células SH-SY5Y diferenciadas (**Figura 22**) como en neuronas primarias de Purkinje de cerebelo de ratón (**Figura 23**). Más aún, habíamos comprobado también que era posible, mediante la inhibición crónica de GSK-3, proteger parcialmente las células SH-SY5Y diferenciadas de la muerte inducida por la disfunción mitocondrial desencadenada por la exposición al inhibidor del complejo I mitocondrial rotenona (**Figura 24**). Quisimos por tanto averiguar si la muerte celular inducida por rotenona podía ser atenuada mediante la expresión crónica del mutante GSK-3 β -K85R.

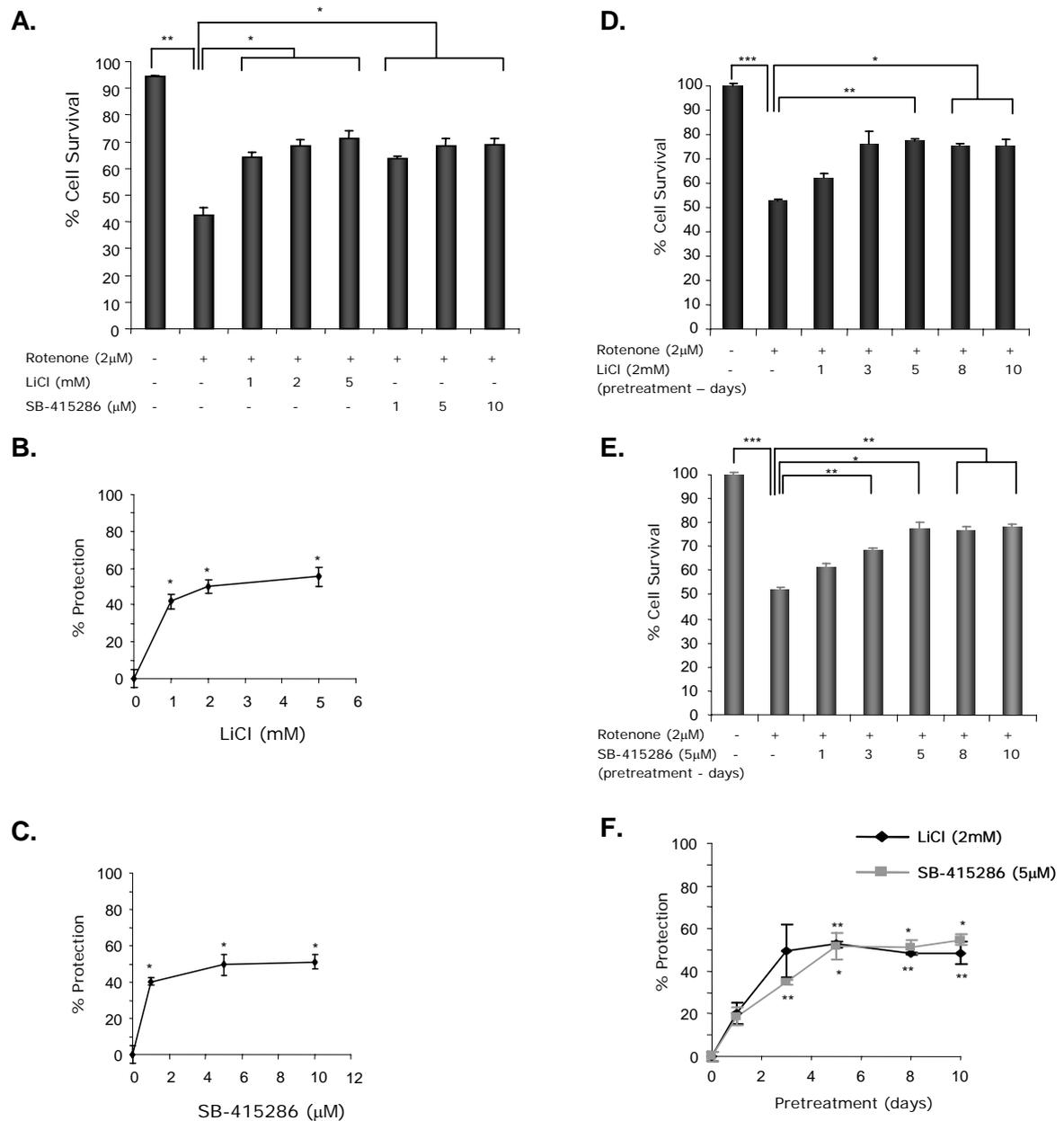


Figura 24. Protección frente a rotenona por inhibición farmacológica crónica de GSK-3. Células SH-SY5Y diferenciadas fueron pre-tratadas con dos inhibidores farmacológicos de GSK-3 de distinta naturaleza química a distintas dosis (**A-C**) y durante distintos tiempos (**D-F**) y posteriormente expuestas a rotenona (2 μM) durante 24 horas. Los inhibidores de GSK-3 utilizados fueron litio (en forma de cloruro de litio, LiCl, en el rango de 0-5 mM) y SB-415286 (en el rango de 0-10 μM), en un rango de tiempo de pre-tratamiento de 0 a 10 días. **A.** Cuantificación de la supervivencia de las células SH-SY5Y en función de los tratamientos administrados. **B-C.** Niveles de protección alcanzados con los distintos inhibidores en función de la dosis. **D-E.** Cuantificación de la supervivencia de las células SH-SY5Y en función de los tratamientos administrados durante distintos tiempos. **F.** Niveles de protección alcanzados con los distintos inhibidores en función del tiempo de pre-tratamiento (por encima de la gráfica se muestra el significado estadístico de la curva de litio, y por debajo el de la curva de SB-415286). Se muestran los valores medios y sus desviaciones estándar de al menos tres experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$ (test t de Student).

Así pues, infectamos células SH-SY5Y diferenciadas con distintas dosis de pHSVlac, pHSVGSK3^{WT} y pHSVGSK3^{K85R} (MOIs de 0 a 2) y dejamos que los genes codificados por los amplicones se expresasen durante 5 días, que es el tiempo mínimo de inhibición necesario para conseguir el máximo efecto neuroprotector que habíamos determinado con los inhibidores de GSK-3 LiCl y SB-415286. A continuación expusimos las células a rotenona durante 24 horas para evaluar seguidamente la viabilidad celular (**Figura 25A-C**).

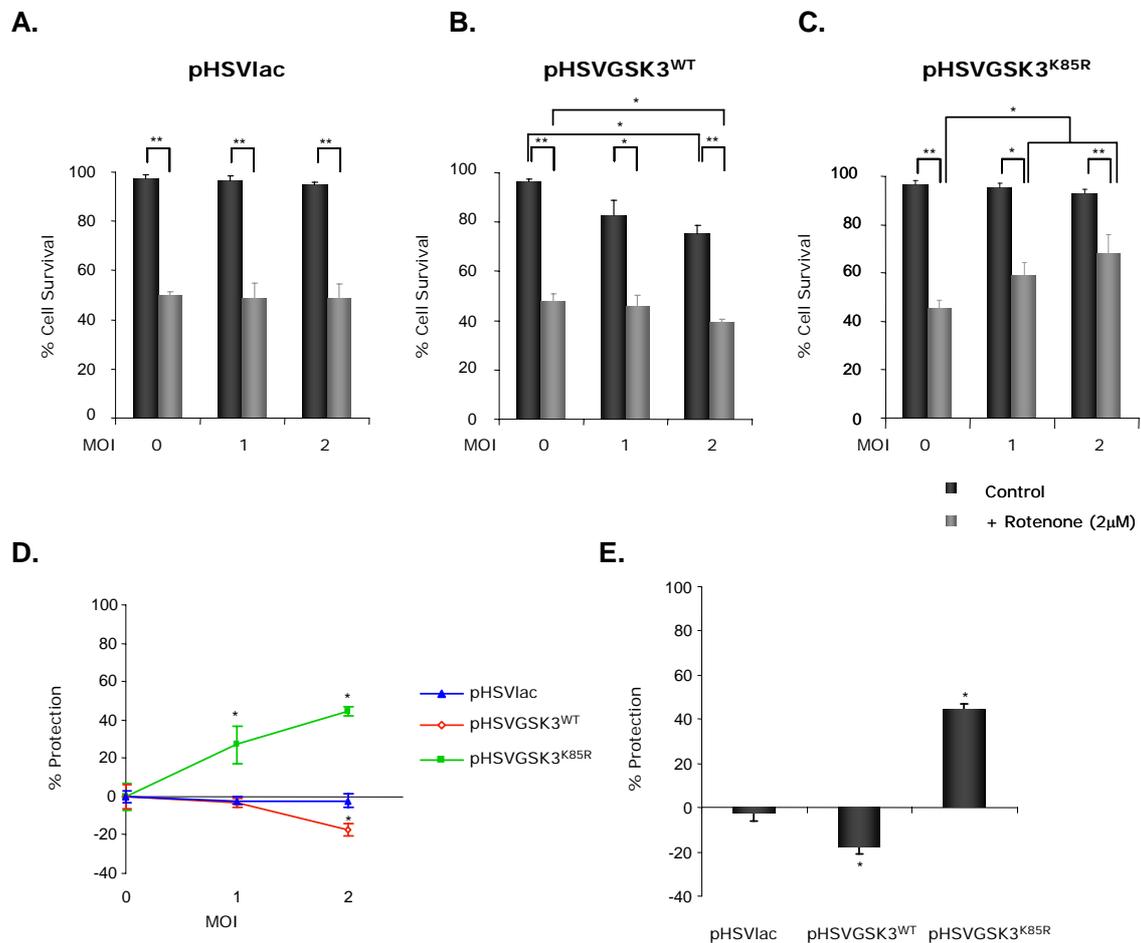


Figura 25. Protección frente a rotenona en células SH-SY5Y diferenciadas por inhibición crónica de GSK-3 β expresando el dominante negativo K85R. Las células SH-SY5Y diferenciadas fueron infectadas a distintas MOI (0-2) con pHSVlac (**A**), pHSVGSK3^{WT} (**B**) o pHSVGSK3^{K85R} (**C**). Las construcciones se expresaron durante 5 días y a continuación se expusieron las células a rotenona (2 μ M) durante 24 horas, transcurridas las cuales se evaluó la viabilidad (**A-C**). **D.** Niveles de protección obtenidos con el dominante negativo de GSK-3 β , K85R, en función MOI. **E.** Niveles de protección alcanzados a la MOI más alta (2), cuando aproximadamente el 90% de las células expresan la construcción. Se muestran los valores medios y sus desviaciones estándar de al menos tres experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ (test t de Student).

Lo que observamos fue que a una multiplicidad de 2, en la que aproximadamente el 90% de las células están expresando el transgén, se alcanzaban unos niveles de protección con el dominante negativo de GSK-3 β que rondaban el 40-50% (**Figura 25D-E**), muy similares a los obtenidos con los fármacos inhibidores de la GSK-3. Además, la muerte celular inducida por rotenona se veía modesta pero significativamente incrementada por la expresión de la forma silvestre de GSK-3 β (**Figura 25B**). De hecho, la sobreexpresión de la forma silvestre de GSK-3 β durante 5 días en células SH-SY5Y diferenciadas resultó *per se* en un pequeño incremento en la tasa de muerte neuronal (**Figura 25B**). La exposición durante 5 días a los vectores de HSV-1 no tuvo ningún efecto estadísticamente significativo sobre la muerte celular, como se puede ver en el caso de pHSVlac (**Figura 25A**).

Además quisimos validar estos mismos resultados en otro modelo celular: un cultivo primario de neuronas de bulbo raquídeo de ratón (**Figura 26**). Neuronas de bulbo raquídeo de ratón de 2 DIV fueron sometidas a inhibición crónica (durante 5 días) de GSK-3, bien con inhibidores farmacológicos (LiCl a 2 mM; SB-415286 a 5 μ M), bien mediante la expresión del dominante negativo de GSK-3 β , K85R, utilizando amplicones de HSV-1 a una MOI de 5 (los amplicones pHSVlac y pHSVGSK3^{WT} fueron utilizados en paralelo como control), a la que más del 80% de las células fue eficientemente transducida. Las células fueron a continuación expuestas a rotenona (2 μ M) durante 24 horas, después de las cuales evaluamos la viabilidad celular del modo usual (**Figura 26A-B**). Si bien estas células demostraron ser ligeramente más susceptibles al tratamiento con rotenona que las células SH-SY5Y diferenciadas, los resultados obtenidos de los experimentos con cultivos primarios fueron muy similares a los de la línea de neuroblastoma humano diferenciado. Se lograron niveles de protección superiores al 40% (**Figura 26C**), y, una vez más, la sobreexpresión de la forma silvestre de GSK-3 β no sólo resultó ligeramente perjudicial *per se*, sino que acentuó de manera sutil pero significativa la muerte inducida por rotenona.

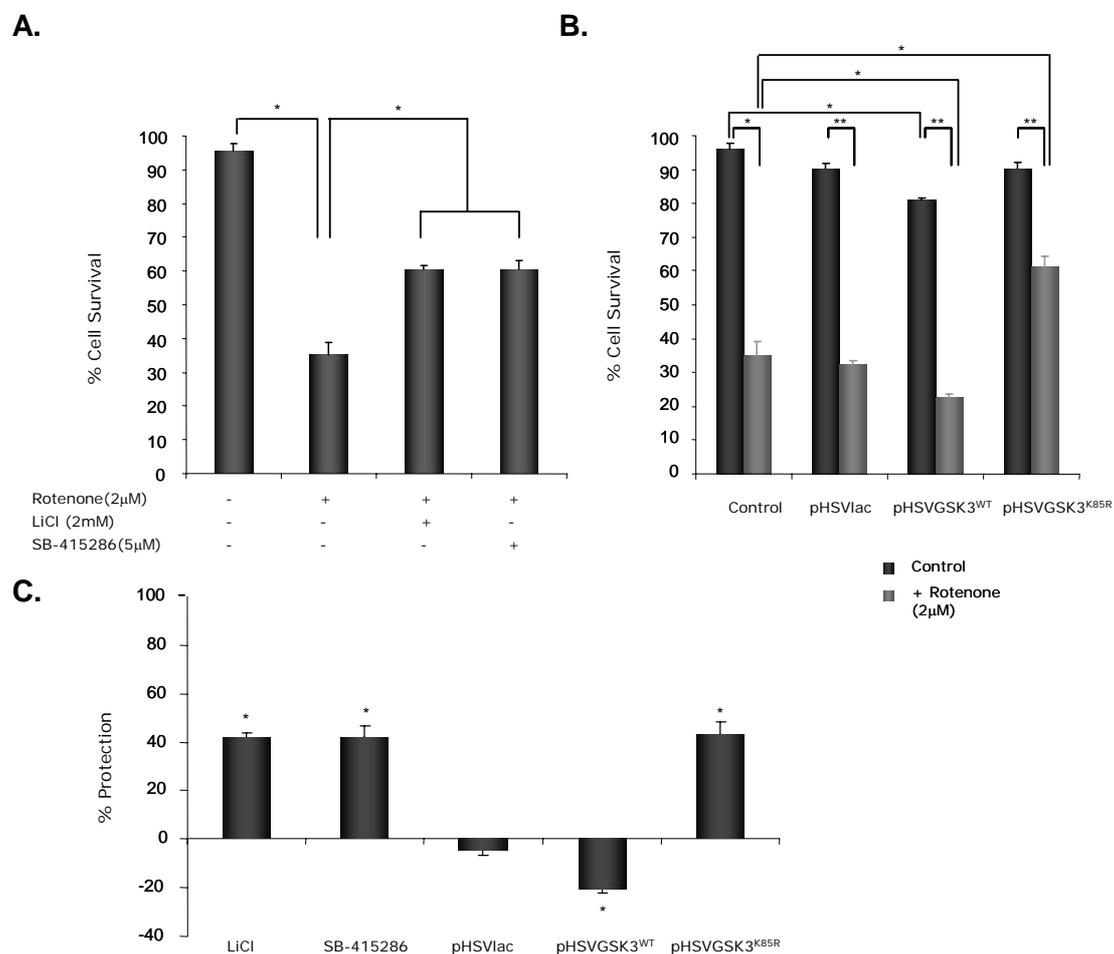


Figura 26. Protección frente a rotenona en cultivos primarios de neuronas de tronco del encéfalo por inhibición crónica de GSK-3. Las neuronas de tronco del encéfalo fueron sometidas a inhibición crónica de GSK-3 durante 5 días, bien con los inhibidores farmacológicos LiCl (2 mM) y SB-415286 (5 μ M) (**A**), bien por expresión del dominante negativo de GSK-3 β , K85R, con el amplicón pHSVGSK3^{K85R} a MOI 2 (**B**). Posteriormente fueron tratadas con rotenona (2 μ M) durante 24 horas, y a continuación se determinó la viabilidad celular (**A-B**). **C.** Niveles de protección alcanzados tras inhibición crónica de GSK-3. Se muestran los valores medios y sus desviaciones estándar de al menos tres experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$ (test *t* de Student).

La inhibición crónica de GSK-3 bloquea parcialmente la apoptosis inducida por rotenona en células SH-SY5Y diferenciadas

Los ensayos realizados hasta el momento mostraban que la inhibición crónica de la GSK-3 protegía a las células neuronales en cultivo frente a la toxicidad de la rotenona. Quisimos profundizar un poco más en los procesos que estaban teniendo lugar en las células durante el programa de muerte inducida por rotenona, y cómo afectaba a este proceso la inhibición crónica de GSK-3

En primer lugar quisimos mirar la localización subcelular de la proteína proapoptótica Bax. Como ya se ha mencionado en la *Introducción*, durante la muerte celular programada, distintos eventos conducen a la translocación de la proteína Bax a la membrana externa mitocondrial para promover la permeabilidad transitoria que permite la liberación de factores pro-apoptóticos (Newmeyer y Ferguson-Miller, 2003), además de datos previos que demuestran que la fosforilación de Bax por parte de GSK-3 promueve su translocación a la mitocondria (Linseman *et al.*, 2004). Así pues, llevamos a cabo el fraccionamiento subcelular de las células SH-SY5Y diferenciadas tratadas con rotenona durante 4 horas, y analizamos por *western-blot* los niveles de la proteína Bax en las fracciones mitocondrial y citosólica (**Figura 27A**). Observamos que las fracciones mitocondriales de las células tratadas con rotenona contenían más proteína Bax que las no tratadas; y que la inhibición crónica de la GSK-3 podía reducir parcialmente esta localización mitocondrial de Bax. Además, no se pudieron detectar cambios apreciables en los niveles de Bax en las fracciones citosólicas. Esto sugiere que durante la apoptosis inducida por rotenona podría estar teniendo lugar una síntesis *de novo* de Bax, que es inmediatamente exportado a la mitocondria. Por lo tanto, la inhibición crónica de GSK-3 podría estar ejerciendo un doble control sobre Bax durante la apoptosis, a nivel transcripcional impidiendo en parte su expresión, y a nivel post-transcripcional previniendo su translocación a la mitocondria.

A continuación, quisimos mirar otro parámetro relacionado con la muerte celular: la activación de caspasa-3 (Chan y Mattson, 1999; Degterev *et al.*, 2003), que además es un evento que se ha observado que ocurre en la muerte celular inducida por rotenona (Pei *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2005). Dado que la activación de caspasa-3 es un evento más avanzado en el tiempo, miramos su estado de activación en células SH-SY5Y diferenciadas tratadas con rotenona durante 24 horas. Para ello llevamos a cabo un análisis por *western-blot* empleando un anticuerpo que reconoce específicamente los fragmentos activos de 17 y 19 KDa que proceden de la proteólisis de la procaspasa-3 inactiva. Los resultados sugieren que la activación de caspasa-3 inducida por rotenona a las 24 horas es menor en las células previamente sometidas a la inhibición crónica de GSK-3 (**Figura 27B**)

Asimismo quisimos medir otro parámetro diferente que tiene lugar durante la muerte celular por apoptosis: la fragmentación del DNA nuclear (Wyllie, 1980). Utilizamos para ello la técnica de TUNEL (*Terminal deoxyribonucleotidyl transferase mediated dUTP Nick End Labeling*), por la cual es posible marcar los extremos 3'OH que quedan libres durante la fragmentación del DNA nuclear con nucleótidos dUTP fluoresceinados por medio de la enzima desoxirribonucleotidil transferasa terminal (Gavrieli *et al.*, 1992), de manera que es posible detectar *in situ* por técnicas de microscopía de fluorescencia en qué células están teniendo lugar procesos de muerte.

Los resultados obtenidos mediante el ensayo de TUNEL fueron muy similares a los obtenidos con calceína (**Figura 27C-D**), mostrando una vez más que la inhibición crónica de GSK-3, ya fuese por inhibidores farmacológicos como por la expresión de un dominante negativo de GSK-3 β , tenía un efecto neuroprotector frente a la fragmentación del DNA nuclear inducida por rotenona en células SH-SY5Y diferenciadas después de 24 horas de tratamiento (**Figura 27E**).

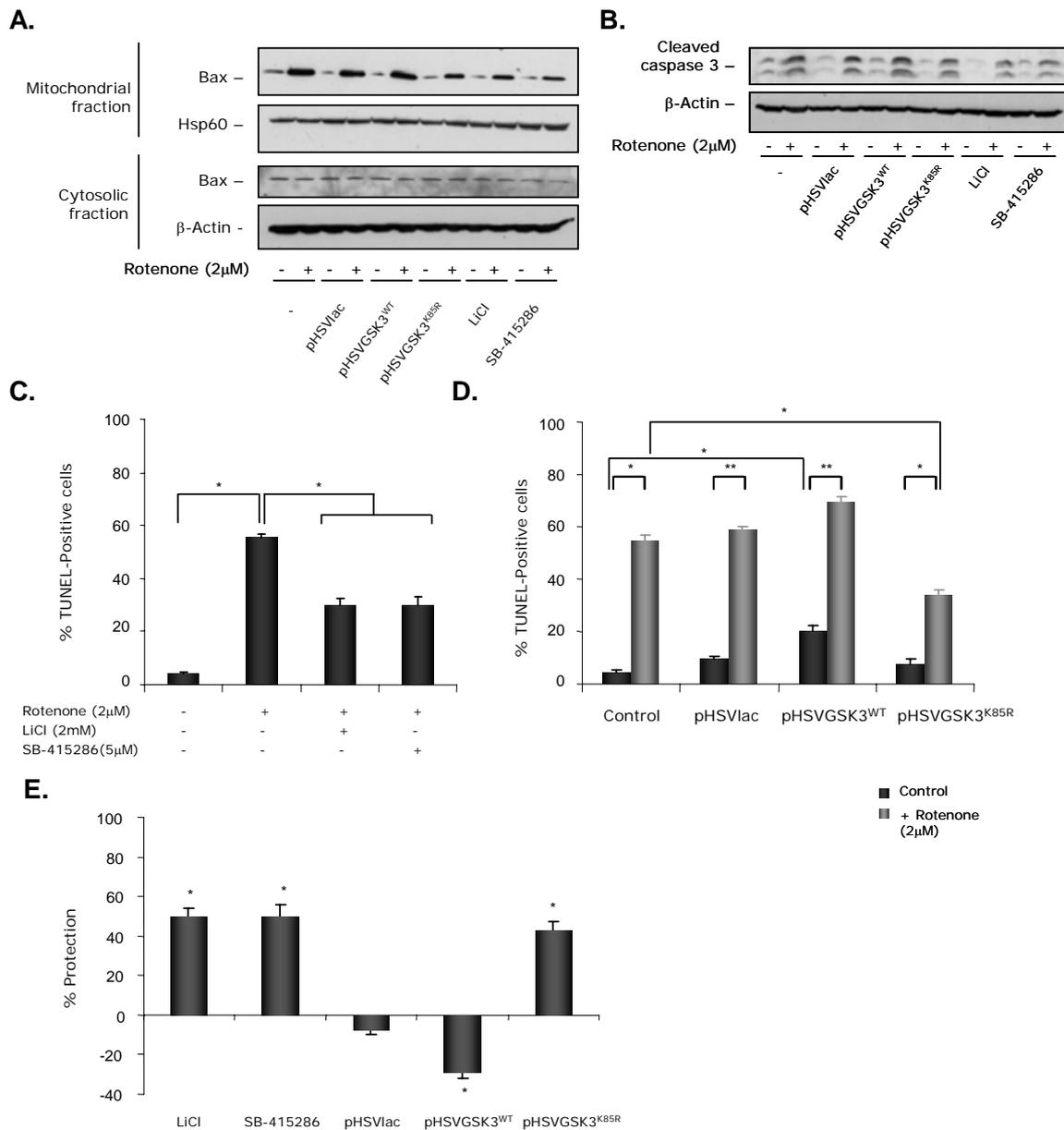


Figura 27. Estudio de la inhibición crónica de GSK-3 sobre la muerte celular programada inducida por rotenona. Las células SH-SY5Y diferenciadas fueron sometidas a inhibición crónica de GSK-3 durante 5 días, bien con los inhibidores LiCl (2 mM) o SB-415286 (5 μM), bien por expresión del dominante negativo de GSK-3β, infectando con el amplicón pHSVGSK3^{K85R} a MOI 2. A continuación, se expusieron las células a rotenona (2 μM) a distintos tiempos y se analizaron distintos eventos. **A.** Tras la exposición a rotenona durante 4 horas, se llevó a cabo fraccionamiento subcelular y se analizó por *western-blot* el contenido de la proteína pro-apoptótica Bax en las fracciones mitocondrial y citosólica. **B.** Tras la exposición a rotenona (2 μM) durante 24 horas, se analizó el estado de activación de la caspasa-3 por *western-blot* con un anticuerpo específico contra los fragmentos activos de 17 y 19 KDa de caspasa-3 tras proteólisis de la pro-caspasa inactiva. **C-D.** También se analizó el estado de fragmentación del ADN nuclear por la técnica de TUNEL tras la exposición a rotenona (2 μM) durante 24 horas. A continuación se analizaron las células mediante análisis por microscopía de fluorescencia. **E.** Se muestra el grado de protección frente a rotenona por inhibición crónica de GSK-3 evaluado por TUNEL. Se muestran los valores medios y sus desviaciones estándar de al menos tres experimentos independientes. * p < 0,05; ** p < 0,01.

A la luz de los resultados obtenidos, y viendo que la inhibición crónica de GSK-3 era capaz de bloquear de manera efectiva la muerte inducida por la disfunción mitocondrial causada por la rotenona en células neuronales en cultivo, quisimos indagar sobre el estado de las mitocondrias de las células que habían sido únicamente tratadas con rotenona o protegidas mediante la inhibición crónica de GSK-3 previa a la exposición a rotenona. Para ello utilizamos la sonda JC-1 (Cossarizza *et al.*, 1993), que se utiliza como indicador del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). Esta sonda es un monómero que emite a una longitud de onda de 527 nm (verde) cuando es excitada a 490 nm, pero puede formar agregados que se acumulan en la mitocondria (si ésta mantiene un potencial de membrana correcto) y que experimentan un desplazamiento en el espectro de emisión, hasta 590 nm (rojo).

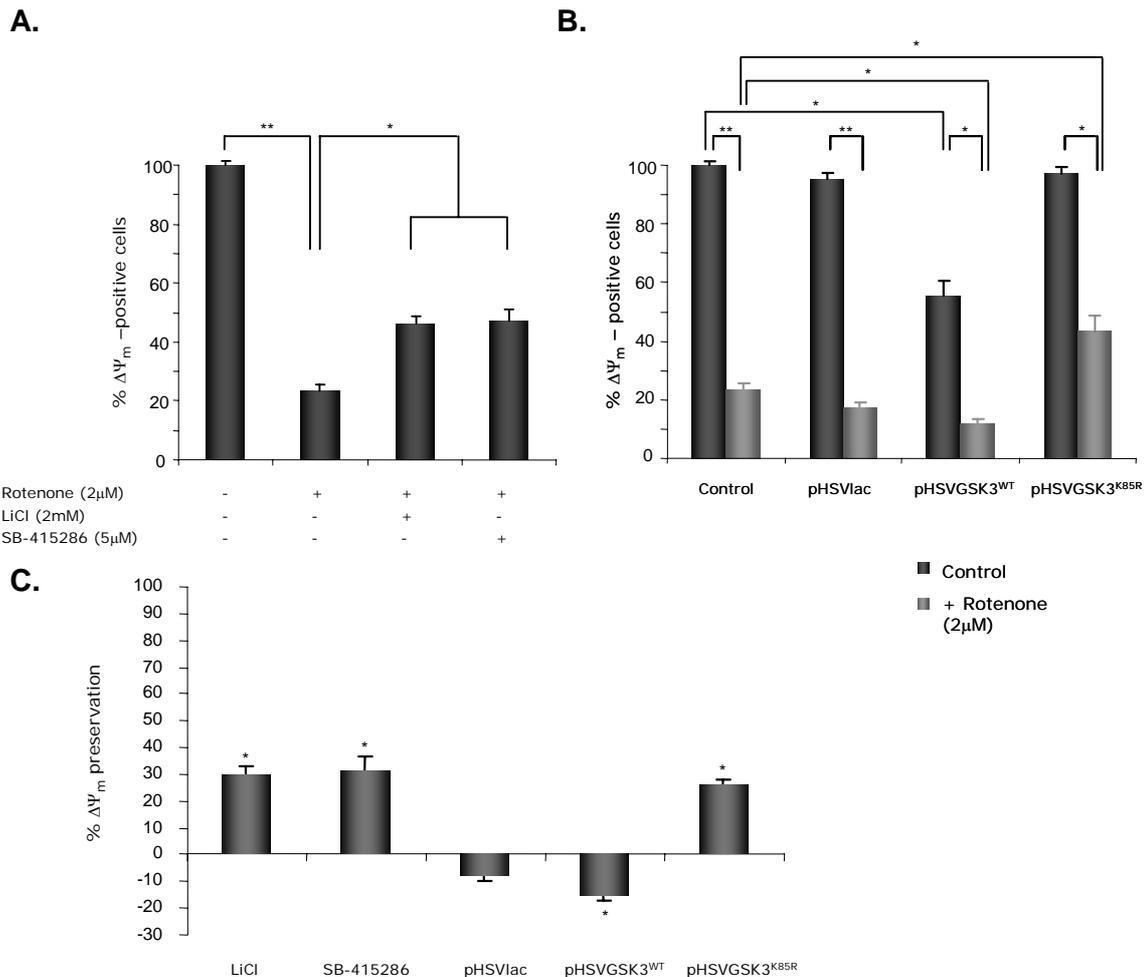


Figura 28. Efecto de la inhibición crónica de GSK-3 sobre el potencial de membrana mitocondrial tras la disfunción mitocondrial inducida por rotenona. A-B. Las células SH-SY5Y diferenciadas fueron sometidas a inhibición crónica de GSK-3 durante 5 días con inhibidores farmacológicos (LiCl, 2mM; SB-415286, 5 μ M) o expresando el dominante negativo de GSK-3 β , K85R (con el amplicón pHSVGSK3^{K85R}, MOI 2) y fueron posteriormente tratadas con rotenona (2 μ M) durante 24 horas. A continuación fueron examinadas con la sonda fluorescente JC-1, que puede permanecer intacta difusa en el citosol emitiendo fluorescencia verde en el rango de la fluoresceína o reducirse a expensas del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) y emitir fluorescencia roja en el rango de la rodamina. **C.** Se muestra el grado de preservación de $\Delta\Psi_m$ tras exposición a rotenona durante 24 horas en función de la modulación de actividad de GSK-3. Se muestran los valores medios y sus desviaciones estándar de al menos tres experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$ (test t de Student).

Para llevar a cabo esta medida, repetimos los experimentos anteriormente descritos con células SH-SY5Y diferenciadas: las tratamos durante 5 días con los amplicones pHSVlac, pHSVGSK3^{WT} o pHSVGSK3^{K85R} (a una MOI de 2, en todos los casos), o con los inhibidores farmacológicos LiCl o SB-415286 (a concentraciones de 2 mM y 5 μ M, respectivamente), para luego exponerlas a rotenona durante 24 horas. Finalmente, y después del tratamiento con rotenona, las incubamos con la sonda JC-1 y evaluamos el porcentaje de células que conservaban un potencial de membrana mitocondrial detectable con esta sonda (**Figura 28A-B**). Lo que observamos fue que la pérdida de $\Delta\Psi_m$ con rotenona fue mucho más dramática que la pérdida de viabilidad, y la preservación del mismo mediante la inhibición crónica de GSK-3, si bien estadísticamente significativa (alcanzando niveles del 30%), también fue mucho más pobre (**Figura 28C**) (los niveles de protección en términos de supervivencia alcanzaban niveles casi del 50%). Adicionalmente, la sobreexpresión de la forma silvestre de GSK-3 β por medio del amplicón pHSVGSK3^{WT} condujo por sí misma a una pérdida muy sustancial (de algo más del 40%) en el número de células que conservaban el potencial de membrana mitocondrial.

2.3. Mecanismos moleculares de neuroprotección por inhibición crónica de GSK-3

El siguiente paso fue profundizar en los mecanismos moleculares subyacentes a la neuroprotección observada por inhibición crónica de GSK-3.

Ausencia de implicación de la pentraxina neuronal en la muerte celular inducida por rotenona

La pentraxina neuronal (NP-1; *Neuronal Pentraxin-1*) es una proteína cuya expresión se ve incrementada en neuronas granulares de cerebelo durante la apoptosis inducida por retirada de potasio del medio extracelular. Además, este incremento en su expresión forma parte del mecanismo de muerte, como muestra el hecho de que el empleo de oligonucleótidos antisentido frente a NP-1 tiene un cierto efecto protector frente a la muerte inducida por retirada de potasio (DeGregorio-Rocasolano *et al.*, 2001).

Por otro lado, se ha visto que la inducción de NP-1 está mediada por GSK-3, lo cual podría suponer uno de los posibles mecanismos por los cuales GSK-3 podría mediar muerte neuronal (Enguita *et al.*, 2005). Es por ello que los niveles de NP-1 fue uno de los primeros aspectos que miramos durante la muerte inducida por rotenona, con objeto de comprobar si uno de los mecanismos de protección por inhibición de GSK-3 podía consistir en una atenuación en la expresión de NP-1.

Para ello, tratamos células SH-SY5Y diferenciadas con rotenona durante 4 y 24 horas, y vimos que en ningún caso la expresión de NP-1 (prácticamente indetectable en condiciones basales) experimentó variación alguna, por lo que los tratamientos de inhibición crónica de GSK-3 tampoco tuvieron un efecto apreciable (**Figura 29**). Para confirmar que estos resultados eran correctos, llevamos a cabo un experimento control en el que tratamos células SH-SY5Y diferenciadas con el inhibidor de PI3-K LY-294002 (50 μ M) durante 2 y 4 horas, de forma que estábamos induciendo una activación directa de GSK-3. En este caso, sí se observó a las 4 horas un modesto pero significativo incremento en los niveles de NP-1, evento que pudo ser parcialmente atenuado por el co-tratamiento con SB-415286 (25 μ M) (**Figura 29B**). Estos resultados indican una diferencia en las vías de inducción de muerte neuronal por la rotenona o por la inhibición de PI3-K.

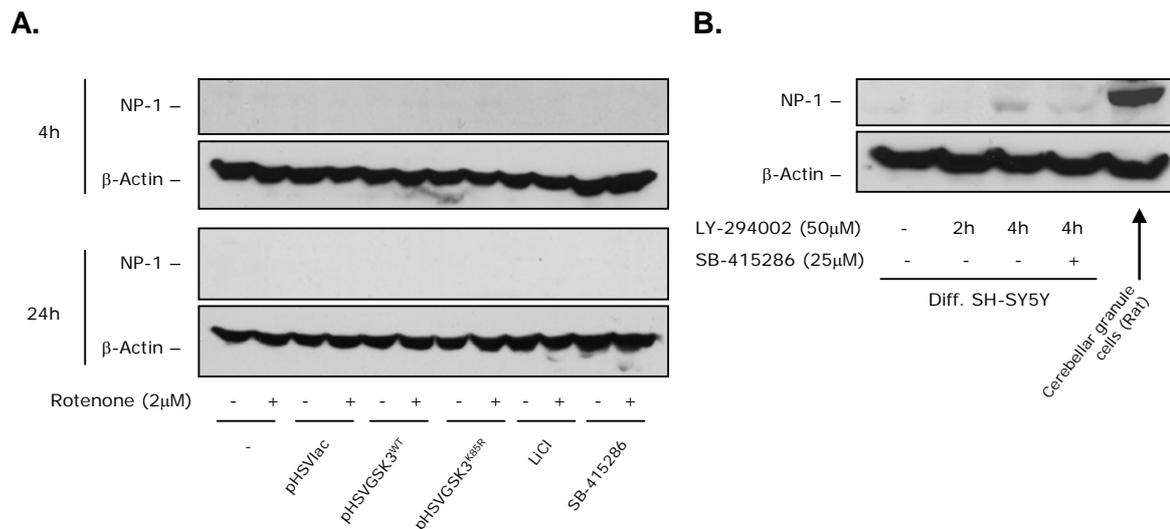


Figura 29. Efecto de la inhibición crónica de GSK-3 sobre la expresión de pentraxina neuronal (NP-1). **A.** Células SH-SY5Y diferenciadas fueron sometidas a inhibición crónica de GSK-3 durante 5 días y posteriormente expuestas a rotenona (2 μ M) durante 4 ó 24 horas, tras la cuales se analizó la expresión de NP-1 por *western-blot*. **B.** Células SH-SY5Y diferenciadas fueron expuestas al inhibidor de PI3-K LY-294002 (50 μ M) durante distintos tiempos. Además, se realizó un co-tratamiento con el inhibidor de GSK-3 SB-415286 (25 μ M). A continuación se analizaron los niveles de NP-1 por *western-blot*. Como control positivo de NP-1 se utilizó un extracto de neuronas granulares de cerebelo de rata (cedido por Diana Simón).

Ausencia de cambios significativos en los niveles de proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2

Como ya se ha sugerido anteriormente, una de nuestras hipótesis es que el efecto neuroprotector inducido por la inhibición crónica de GSK-3 está, si no totalmente, al menos parcialmente mediado por cambios en la expresión génica. El hecho de que GSK-3 module la actividad y estabilidad de numerosos factores de transcripción (Cohen y Frame, 2001; Grimes y Jope, 2001) favorece esta hipótesis.

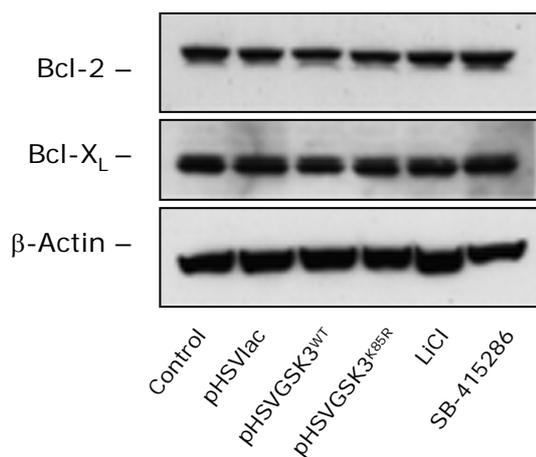


Figura 30. Efecto de la inhibición crónica de GSK-3 sobre los niveles de expresión de proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2. Tratamos células SH-SY5Y diferenciadas con los inhibidores de GSK-3 LiCl (2 mM) o SB-415286 (5 μ M), o expresamos el dominante negativo K85R de GSK-3 β , durante 5 días, transcurridos los cuales analizamos por *western-blot* el contenido celular en las proteínas Bcl-2 y Bcl-X_L.

Evidencias previas han puesto de manifiesto que el tratamiento crónico con litio puede ejercer su efecto protector frente a distintos estímulos pro-apoptóticos mediante el incremento en la expresión del gen anti-apoptótico Bcl-2 en el sistema nervioso (Chen *et al.*, 1999; Chen y Chuang, 1999; Huang *et al.*, 2003; Bush y Hyson, 2006). Por ello inicialmente planteamos la posibilidad de que parte del efecto neuroprotector que observamos pudiera ser debido a un incremento en los niveles de la proteína Bcl-2. Para ello, hicimos extractos de proteínas de células SH-SY5Y diferenciadas en las que GSK-3 había sido

inhibida de manera crónica durante 3 y 5 días y los analizamos por *western-blot*, utilizando anticuerpos específicos contra Bcl-2 y Bcl-X_L (sólo se muestran los datos a 5 días), para comprobar si los niveles de alguna de estas proteínas anti-apoptóticas se encontraban aumentados (**Figura 30**). La ausencia de cambios significativos en ninguna de las muestras de células tratadas con dominante negativo de GSK-3 β , K85R, LiCl o SB-415286 durante 5 días nos indicó que probablemente el aumento de las proteínas Bcl-2 o Bcl-X_L no forma parte de los mecanismos por los cuales la inhibición crónica de GSK-3 tiene un efecto neuroprotector frente a la muerte inducida por rotenona. Es posible que tratamientos más largos sean requeridos para inducir modificaciones en la expresión de Bcl-2 o Bcl-X_L.

Aumento en la producción de lactato tras la inhibición crónica de GSK-3

Dada la ausencia aparente de efecto en los niveles sobre proteínas de la familia Bcl-2, sometimos a examen otra hipótesis, según la cual la inhibición crónica de GSK-3 podría estar incrementando el consumo de glucosa mediante glucolisis, independizando así parcialmente a la célula del metabolismo oxidativo y produciendo energía mediante vías alternativas a la mitocondria, de manera que las células serían más resistentes a la inhibición del complejo I mitocondrial. Por lo tanto, en primer lugar comprobamos si el consumo de glucosa a través de la glucolisis se encontraba aumentado. El parámetro que determinamos para ello fue la cantidad de lactato liberada al medio de cultivo (Merlo-Pich *et al.*, 2004). Sometimos a las células SH-SY5Y diferenciadas a una inhibición crónica de GSK-3, por medio de la expresión del dominante negativo de GSK-3 β , K85R, o mediante la administración de los inhibidores farmacológicos de la enzima, LiCl y SB-415286. A continuación retiramos el medio y añadimos medio fresco, del que fuimos retirando pequeños volúmenes a distintos tiempos (6 h, 12 h, 24 h, 36 h y 48 h) en los que posteriormente determinamos la concentración de lactato mediante un ensayo enzimático.

Los resultados recogidos en la **figura 31** muestran los niveles de lactato recogidos a las 24 horas. La producción de lactato por las células sometidas a inhibición crónica de GSK-3 fue significativamente mayor, llegando incluso a duplicar la producción basal de lactato por las células sin tratar, indicando así un aumento de la actividad glucolítica en estas células.

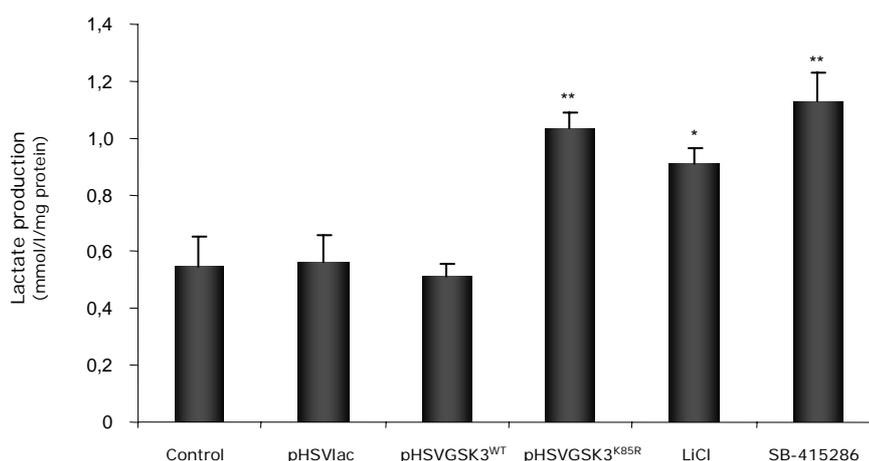


Figura 31. Efecto de la inhibición crónica de GSK-3 sobre la producción de lactato. Como parámetro de la tasa de metabolismo glucolítico tomamos la producción de lactato liberado al medio extracelular. Para ello, sometimos a células SH-SY5Y diferenciadas a inhibición crónica de GSK-3 durante 5 días, transcurridos los cuales sustituimos el medio de cultivo por medio fresco del que fuimos retirando pequeñas alícuotas a distintos tiempos (hasta 48 horas) sobre las que luego medimos la concentración de lactato con un ensayo enzimático. En la gráfica se representan los datos de producción de lactato a las 24 horas. Se muestran los valores medios y sus desviaciones estándar de al menos tres experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$ (test *t* de Student)

La inhibición de la glucólisis abroga la protección frente a rotenona por inhibición crónica de la GSK-3

Nos planteamos la posibilidad de que este aumento en la tasa glucolítica fuese en parte responsable de la protección observada, ya que podría estar de alguna manera compensando el déficit energético derivado de la inhibición del complejo I. Para verificar esta hipótesis, llevamos a cabo un ensayo de viabilidad con células SH-SY5Y diferenciadas en las condiciones previamente establecidas de inhibición crónica de GSK-3 y exposición a rotenona durante 24 horas, pero en este caso incluyendo una nueva situación de inhibición de glucólisis. Para ello empleamos medio DMEM sin glucosa suplementado con un inhibidor de la glucólisis, 2-desoxiglucosa (2-DGlc) a una concentración de 2 mM. La 2-desoxiglucosa es un análogo estructural de la glucosa que puede ser fosforilado por la hexoquinasa o por la glucoquinasa, pasando a ser 2-desoxiglucosa-6-fosfato, pero que no puede ser metabolizado más allá por las enzimas celulares (Chi *et al.*, 1987). Además, añadimos también al medio piruvato sódico (2 mM) como sustrato para la mitocondria, con objeto de compensar el déficit en este metabolito intermediario causado por la reducción en el flujo glucolítico. Lo que observamos fue que la inhibición crónica de GSK-3, tanto con los inhibidores LiCl o SB-415286 como con el dominante negativo GSK-3 β K85R, fue incapaz de proteger a las células del tratamiento con rotenona en presencia de 2-DGlc (**Figura 32B, D**; no se muestran algunas de las comparaciones estadísticas previamente mostradas y mencionadas en otras figuras para no entorpecer en exceso su interpretación). De hecho, y como se puede observar, la combinación de 2-desoxiglucosa y rotenona (inhibición de glucólisis y de la fosforilación oxidativa, respectivamente), resultó devastadora (**Figura 32A, C**; no se muestran todas las comparaciones estadísticas para facilitar la interpretación de las gráficas). Esta muerte neuronal masiva no pudo ser paliada en ningún caso por la inhibición crónica de GSK-3, sugiriendo que la glucólisis podría ser una vía fundamental requerida para la neuroprotección inducida por la inhibición crónica de GSK-3.

Aumento en la localización en la membrana plasmática de los transportadores de glucosa tras la inhibición crónica de la GSK-3

Dado que nuestros resultados sugerían un papel importante de la vía glucolítica en la neuroprotección frente a rotenona inducida por la inhibición crónica de GSK-3, nos preguntamos si las células estarían desarrollando algún mecanismo para aumentar el flujo glucolítico. Para ello, en primer lugar, analizamos la localización subcelular de los transportadores de glucosa, lo que nos daría una idea de si la entrada de glucosa pudiese estar viéndose facilitada. Concretamente, centramos nuestra atención en los transportadores de glucosa 1 y 3 (GLUT1 y GLUT3, respectivamente), ya que son abundantes en el sistema nervioso de mamíferos (Maher *et al.*, 1994; Duelli y Kuschinsky, 2001). GLUT1 se expresa de forma preferente en células gliales, aunque está presente en prácticamente todos los tipos celulares del sistema nervioso, mientras que GLUT3 es específico de neuronas. Además, en ambos casos, se ha visto que su actividad puede verse incrementada en determinadas condiciones, como estrés, diabetes o hipoglicemia (Maher *et al.*, 1994; Uehara *et al.*, 1997; Duelli y Kuschinsky, 2001). Después de 5 días de inhibición crónica de GSK-3 en células SH-SY5Y diferenciadas, hicimos un doble marcaje con anticuerpos específicos para GLUT1 y GLUT3, y analizamos las tinciones con microscopía confocal (**Figura 33A**), que fueron cuantificadas mediante el software MetaMorph v6.2r6 (**Figura 33B-C**). Para el translocador GLUT1 no observamos ningún cambio significativo en su distribución subcelular después de expresar el dominante negativo de GSK-3 β , K85R durante 5 días. Sin embargo, la translocación de GLUT3 a la membrana plasmática tras la expresión de este mutante sí era muy evidente.

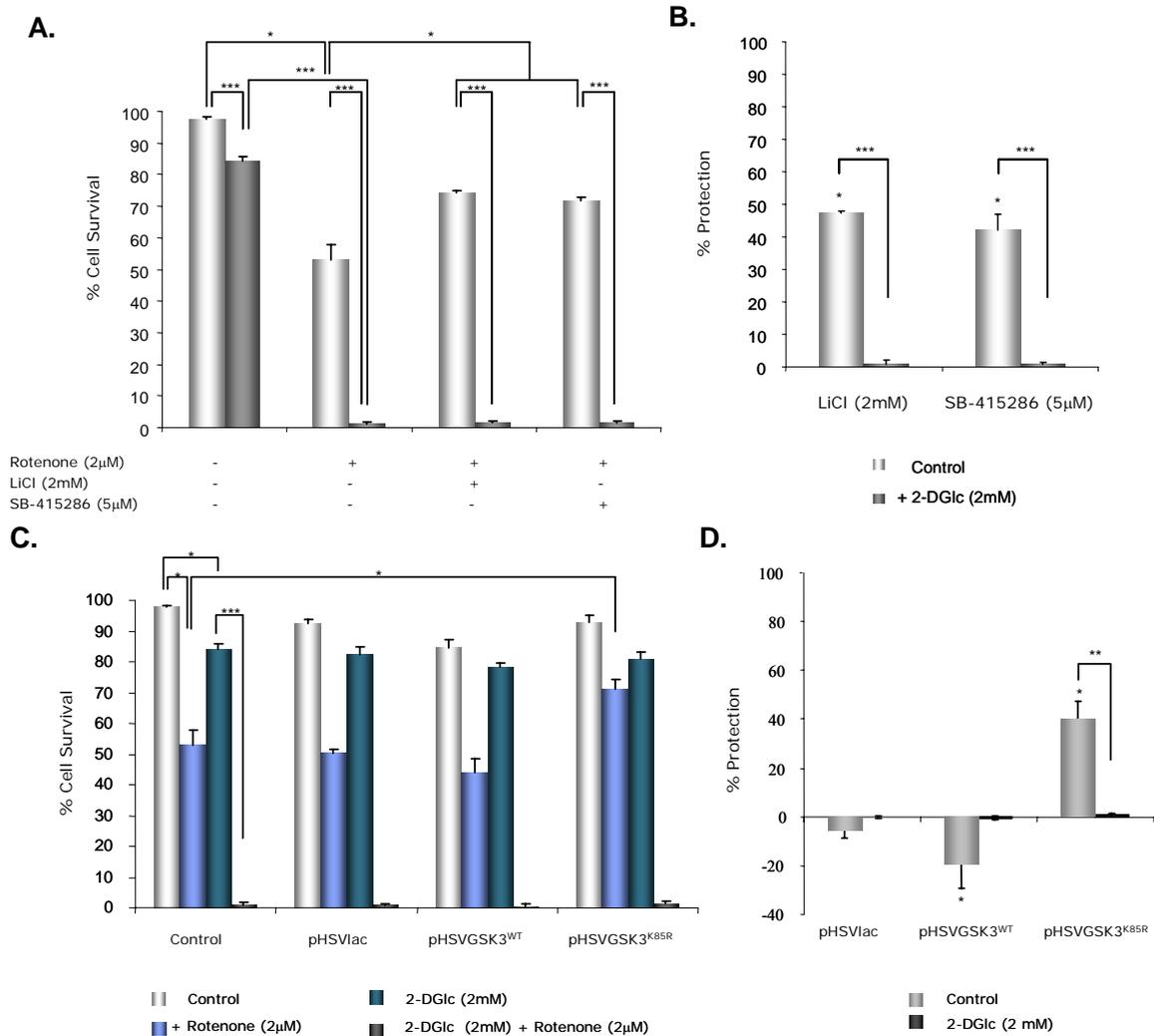
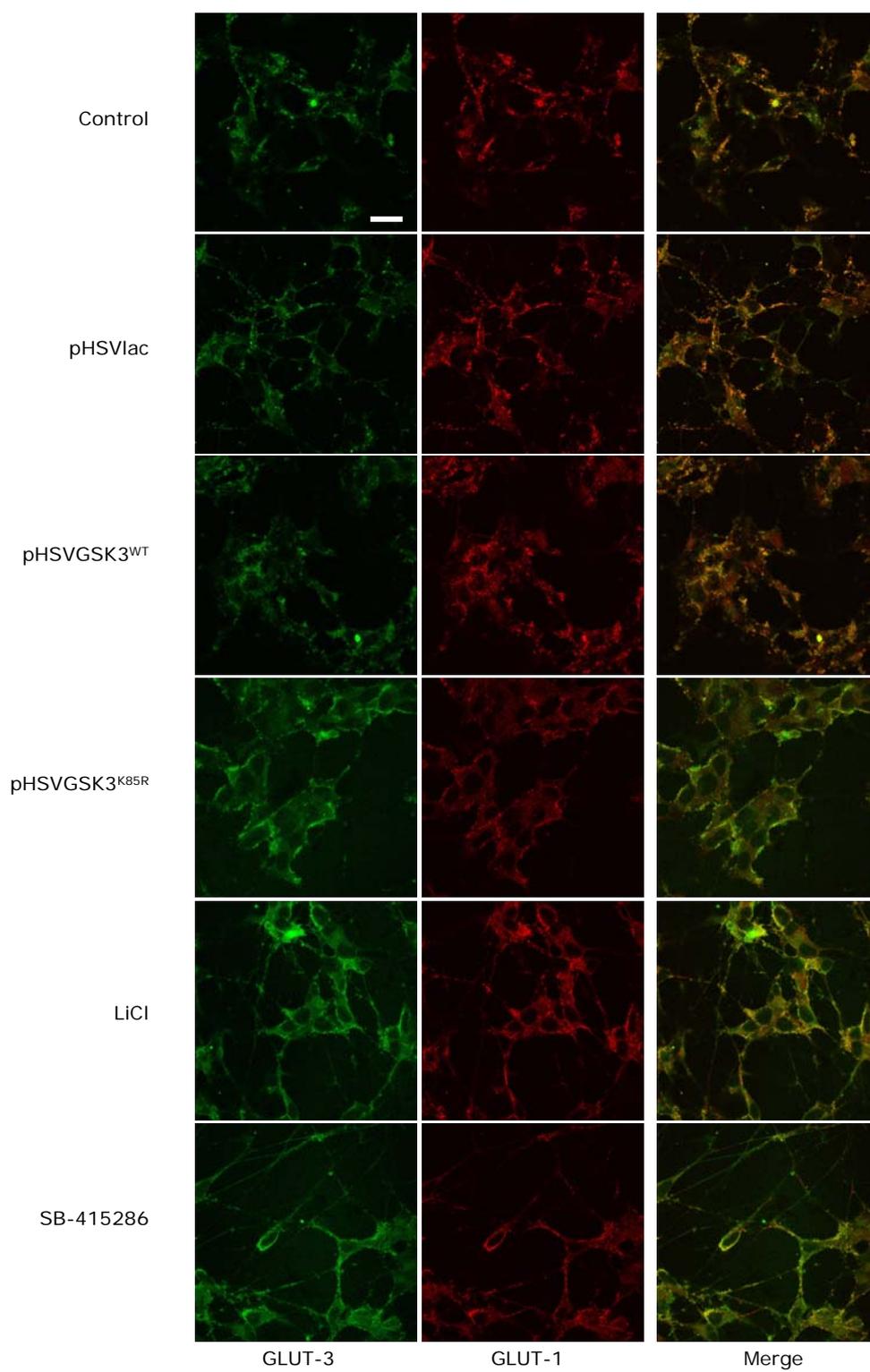


Figura 32. La inhibición de la glucólisis neutraliza la neuroprotección derivada de la inhibición crónica de GSK-3. **A, C.** Sometimos células SH-SY5Y diferenciadas a inhibición crónica de GSK-3 durante 5 días y analizamos el efecto sobre la viabilidad celular de la adición del inhibidor de la glucólisis 2-desoxiglucosa (2-DGlc, 2mM) durante el tratamiento con rotenona. Para asegurar la provisión de sustratos a la mitocondria estos experimentos se llevaron a cabo en presencia de piruvato sódico (2 mM). **B, D.** Niveles de protección frente a rotenona alcanzados por inhibición crónica de GSK-3 en condiciones de inhibición de glucólisis. Se muestran los valores medios y sus desviaciones estándar de al menos tres experimentos independientes. Sólo se representan las comparaciones estadísticas más relevantes para extraer conclusiones de estos experimentos a fin de no entorpecer la interpretación de los resultados. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$ (test t de Student).

De hecho, el análisis informático de las imágenes mostró un claro y significativo aumento en la intensidad de la señal relativa a GLUT3 en toda la superficie celular tras la inhibición crónica de GSK-3, y esta señal se intensificaba de manera especial en la membrana plasmática (Figura 33B-C). Este fenómeno fue corroborado por lo observado con el tratamiento crónico con inhibidores de GSK-3, LiCl y SB-415286, con los que se observaba el mismo comportamiento para GLUT1 y GLUT3 que con pHSVGSK3^{K85R}. Estos resultados sugieren fuertemente que la inhibición crónica de GSK-3 en células SH-SY5Y diferenciadas propicia una mayor predisposición de éstas a incorporar glucosa al interior de la célula.

A.



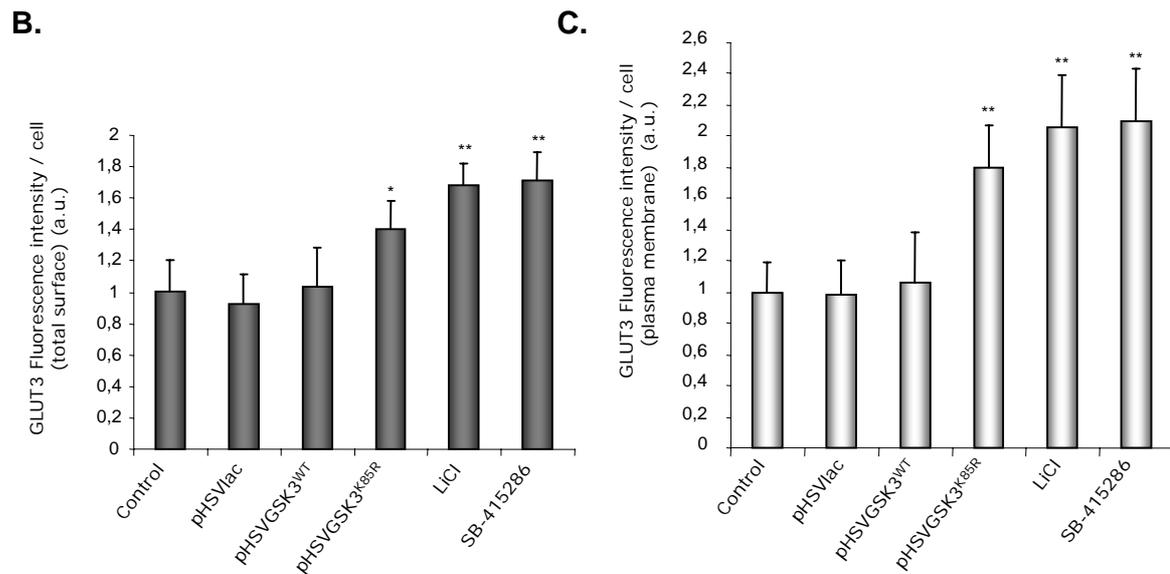


Figura 33. Distribución subcelular de los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT3 tras la inhibición crónica de GSK-3. Células SH-SY5Y diferenciadas fueron sometidas a inhibición crónica de GSK-3 durante 5 días, bien con los inhibidores LiCl (2 mM) o SB-415286 (5 μ M), bien mediante la expresión del dominante negativo de GSK-3 β , K85R. Pasados 5 días, las células fueron fijadas y teñidas con anticuerpos específicos contra los transportadores de glucosa GLUT3 (verde) y GLUT1 (rojo). **A.** La distribución de los transportadores de glucosa GLUT3 (verde) y GLUT1 (rojo) fue analizada por microscopía confocal (página anterior). Escala: 20 μ m. **B-C.** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia del transportador GLUT3 con el programa informático MetaMorph v6.2r6 en la superficie total de la célula (**B**) y en la membrana plasmática (**C**). * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ (test t de Student)

Cambios en la distribución subcelular de Hexoquinasa II (HKII) tras inhibición crónica de GSK-3: translocación a la mitocondria

A continuación quisimos mirar la localización subcelular de algunas isoformas de la enzima hexoquinasa. Nos hemos centrado en las hexoquinasas I y II (HKI y HKII, respectivamente). HKI es la forma predominante en sistema nervioso, mientras que la HKII tiene una expresión más variable, sujeta en parte a cambios en la concentración de glucosa, presencia de factores tróficos o modulación por distintas vías de señalización (Pastorino y Hoek, 2003). Evidencias previas sugieren una mayor actividad hexoquinasa cuando ésta está ligada a la mitocondria (Adams *et al.*, 1988; Pastorino y Hoek, 2003). Además, la hexoquinasa juega un papel antiapoptótico cuando está unida a la mitocondria (Pastorino *et al.*, 2002; Pastorino y Hoek, 2003; Azoulay-Zohar *et al.*, 2004; da-Silva *et al.*, 2004). Así, sometimos células SH-SY5Y diferenciadas a inhibición crónica de GSK-3 durante 5 días en las condiciones establecidas, transcurridos los cuales llevamos a cabo un doble marcaje con anticuerpos específicos contra HKI o HKII y contra una subunidad del complejo V mitocondrial (**Figuras 34 y 35**). La observación por microscopía confocal y posterior análisis informático no reveló cambios significativos en la localización subcelular de la HKI (**Figura 34**). Sin embargo, se observa una significativa translocación de la HKII a la mitocondria tras la inhibición crónica de GSK-3, bien mediante la expresión del dominante negativo de GSK-3 β , K85R, bien tras el tratamiento con inhibidores específicos de la enzima, LiCl y SB-415286 (**Figura 35A**). De hecho, el procesamiento informático de imágenes con el software MetaMorph v6.2r6 indicó no sólo un aumento en la intensidad de señal de HKII con respecto a la de complejo V (**Figura 35B**), sino también un significativo aumento en el grado de co-localización de estas dos proteínas, pasando de valores cercanos al 50% en condiciones basales a un grado de co-localización próximo al 80% en condiciones de inhibición crónica de GSK-3 (**Figura 35C**).

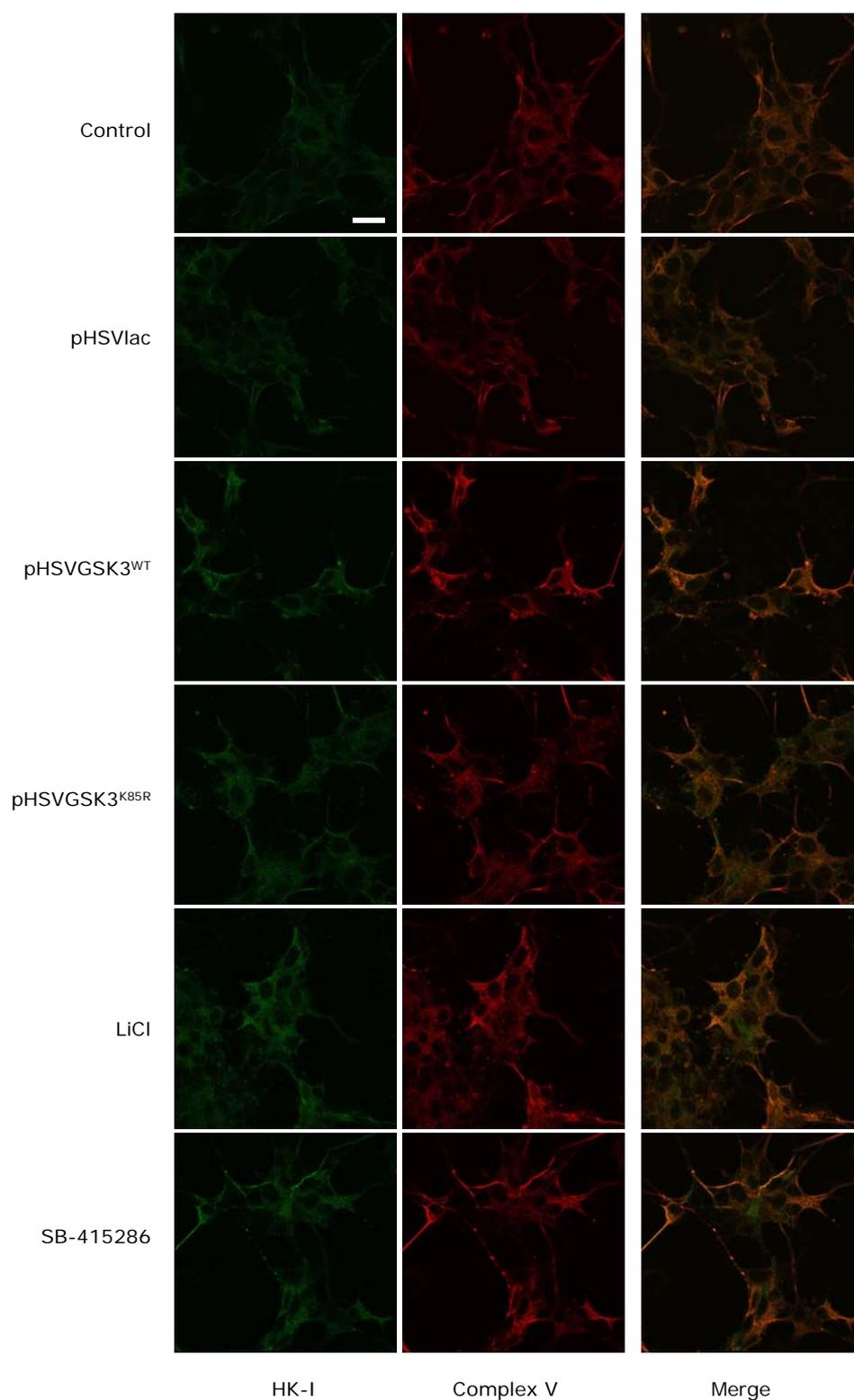
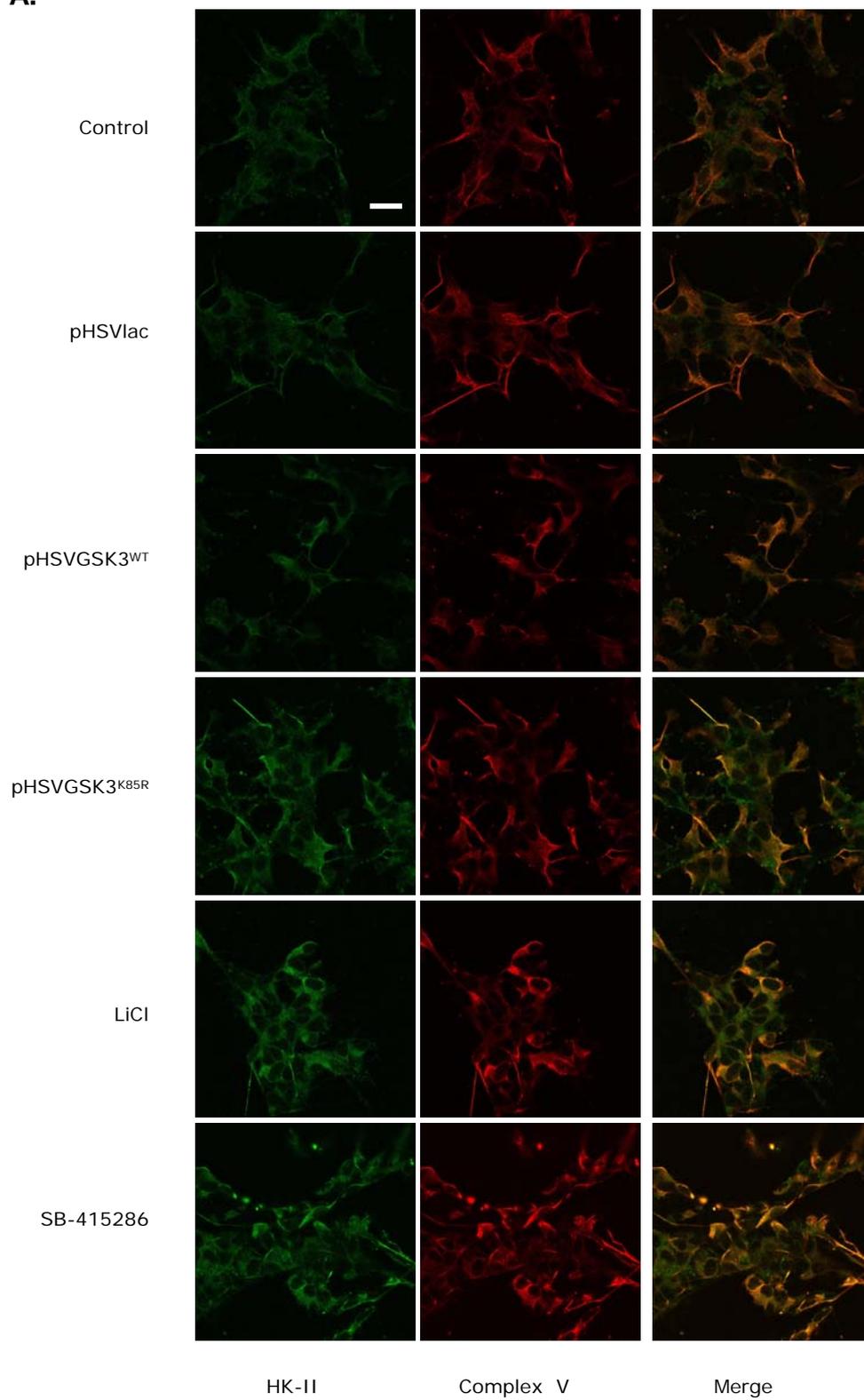


Figura 34. Distribución subcelular de la Hexoquinasa I (HKI) tras la inhibición crónica de GSK-3. Células SH-SY5Y fueron sometidas a inhibición crónica de GSK-3 durante 5 días, bien con los inhibidores LiCl (2 mM) o SB-415286 (5 μ M), bien mediante la expresión del dominante negativo de GSK-3 β , K85R. Pasados 5 días, las células fueron fijadas y teñidas con anticuerpos específicos contra HKI (verde) y complejo V mitocondrial (rojo). La distribución subcelular de HKI se analizó por microscopía confocal. Escala: 20 μ m.

A.



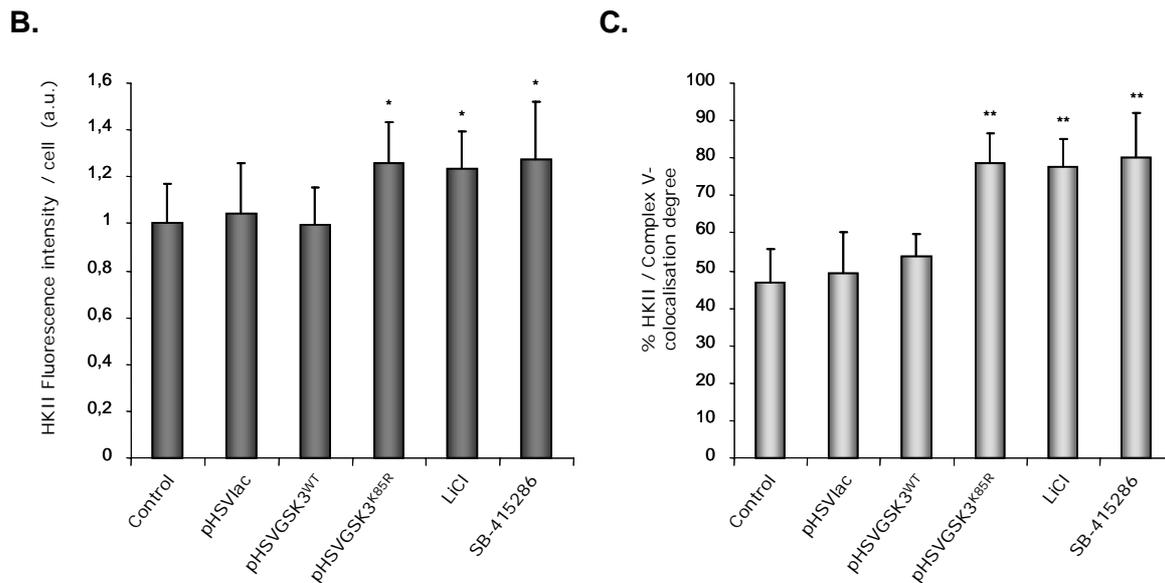


Figura 35. Distribución subcelular de la Hexoquinasa II (HKII) tras la inhibición crónica de GSK-3. Células SH-SY5Y fueron sometidas a inhibición crónica de GSK-3 durante 5 días, bien con los inhibidores LiCl (2 mM) o SB-415286 (5 μ M), bien mediante la expresión del dominante negativo de GSK-3 β , K85R. Pasados 5 días, las células fueron fijadas y teñidas con anticuerpos específicos contra HKII (verde) y complejo V mitocondrial (rojo). **A.** Análisis por microscopía confocal de la distribución subcelular de la HKII (página anterior). Escala: 20 μ m. **B-C.** Análisis informático de las imágenes obtenidas con el programa MetaMorph v6.2r6, mostrando la intensidad de fluorescencia de HKII con respecto a la de complejo V (**B**) o el grado de co-localización entre estas dos proteínas (**C**). * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$ (test *t* de Student)

De esta manera, la HKII podría estar jugando un doble papel en la neuroprotección observada al localizarse preferente en la mitocondria tras someter a las células a inhibición crónica de GSK-3: mediante su actividad incrementada podría contribuir al incremento en la glucólisis y así compensar parcialmente el déficit energético provocado por el tratamiento con rotenona, y simultáneamente podría estar impidiendo el acceso de Bax a la mitocondria, evitando así en parte el efecto promotor de muerte de esta proteína pro-apoptótica.

La inhibición crónica de GSK-3 conduce a un aumento en la secreción de BDNF al medio extracelular

Trabajos previos habían demostrado que los tratamientos crónicos con litio pueden resultar en un incremento en la secreción del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF; *Brain-Derived Neurotrophic Factor*) al medio extracelular, tanto *in vivo* como *in vitro* (Fukumoto *et al.*, 2001; Hashimoto *et al.*, 2002). Es por esto que quisimos averiguar si este aumento se podía deber a cambios en la expresión génica inducidos por la inhibición crónica de GSK-3 o era una consecuencia derivada de la actuación del litio sobre alguna otra de sus dianas.

Así pues, sometimos a células SH-SY5Y diferenciadas a la inhibición crónica de GSK-3 durante 5 días mediante el dominante negativo K85R o el tratamiento con los inhibidores farmacológicos LiCl (2 mM) o SB-415286 (5 μ M). Transcurrido el tiempo de tratamiento, recogimos medio condicionado por las células y lo analizamos mediante un ensayo enzimático de inmunoadsorción (ELISA; *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*). Los resultados, recogidos en la **figura 36**, muestran que la producción de BDNF en las células en las que la GSK-3 ha sido sometida a inhibición crónica es significativamente superior (con aumento de 2-2,5 veces) a la de los controles. Así, la producción de BDNF, que en estado basal es de aproximadamente 10 pg de BDNF/ mg de proteína, pasa a ser de 20-25 pg/mg de proteína, lo que supone

un incremento significativo. De hecho, este rango de valores de BDNF secretado son consistentes con trabajos previos realizados en neuronas primarias de corteza de rata (Hashimoto *et al.*, 2002).

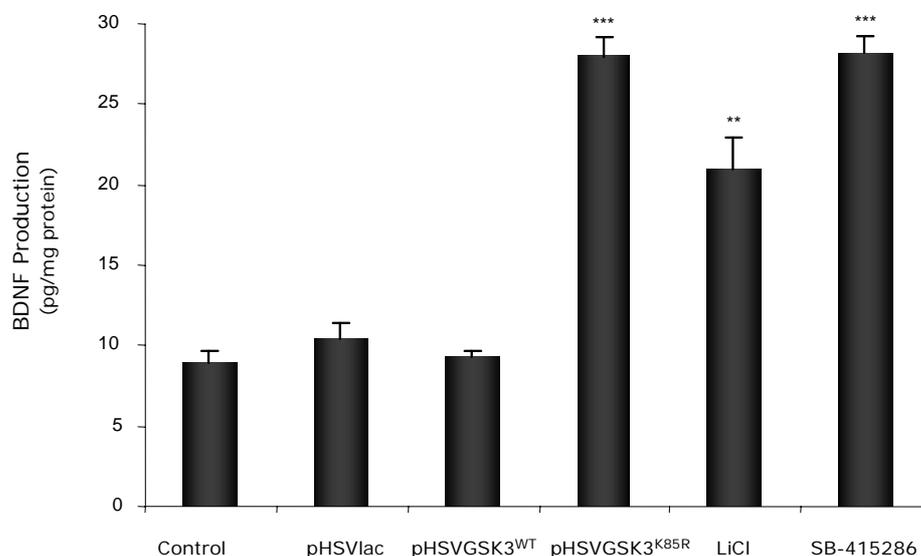


Figura 36. Producción de BDNF tras inhibición crónica de GSK-3. Para averiguar el efecto de la inhibición crónica de GSK-3 sobre la producción y posterior secreción de BDNF al medio extracelular, sometimos a células SH-SY5Y diferenciadas a inhibición crónica de GSK-3 durante 5 días, transcurridos los cuales retiramos una pequeña alícuota de medio condicionado que utilizamos para medir la concentración de BDNF por medio de un ensayo enzimático de inmunoabsorción o ELISA. Se muestran los valores medios y sus desviaciones estándar de al menos tres experimentos independientes. ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$ (test t de Student).

El efecto neuroprotector de la inhibición crónica de GSK-3 está parcialmente mediado por BDNF

En vista del aumento en la secreción de BDNF por parte de las células SH-SY5Y diferenciadas en las que GSK-3 ha sido inhibida crónicamente durante 5 días, nos preguntamos si dicho BDNF podría estar mediando algunos de los efectos de neuroprotección frente a la disfunción mitocondrial.

Para contestar a esta pregunta, diseñamos un experimento con las condiciones habituales de inhibición crónica de GSK-3 en el cual tratamos las células SH-SY5Y diferenciadas con K252a, un inhibidor del receptor TrkB, responsable de la señalización de BDNF. El tratamiento con K252a (50 nM) comenzó 24 horas antes de la exposición a rotenona, y se mantuvo hasta el final del experimento. Además, también se llevó a cabo un tratamiento con BDNF (50 ng/ml), que igualmente comenzó 24 horas antes de la exposición a rotenona y se mantuvo hasta el final del experimento. El objetivo de este tratamiento era comprobar si el BDNF por sí solo confería protección frente a la muerte inducida por rotenona.

En la **figura 37** se recogen los resultados de estos experimentos. No están representadas todas las comparaciones estadísticas (únicamente se muestran las más relevantes) con el objeto de facilitar la visualización e interpretación de los resultados.

Hay varias conclusiones que se pueden deducir de este experimento. En primer lugar, la adición de BDNF recombinante al medio de cultivo confiere una protección modesta pero significativa frente a la muerte celular inducida por rotenona. Este efecto puede ser neutralizado mediante la adición de K252a, que por sí mismo resulta moderadamente tóxico (**Figura 37A-B**) (es posible aumentar la dosis de K252a hasta 200 nM para neutralizar de manera más eficaz el efecto del BDNF, pero a una dosis tan elevada el K252a resulta más tóxico para las células; datos no mostrados).

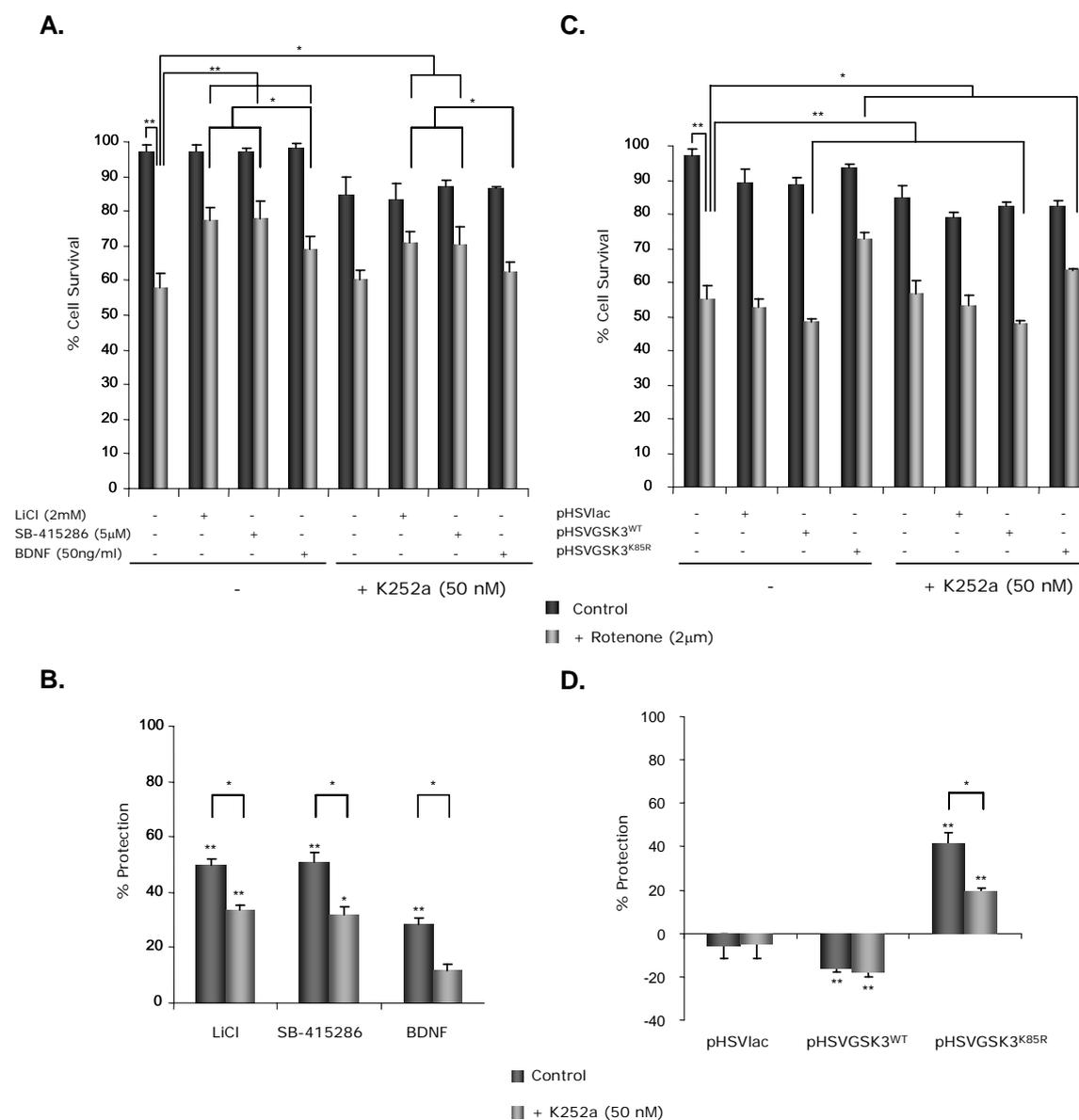


Figura 37. Efecto de la inhibición de la señalización de BDNF sobre la neuroprotección por inhibición crónica de GSK-3. **A, C.** Células SH-SY5Y diferenciadas fueron sometidas a inhibición crónica de GSK-3 durante 5 días, bien con los inhibidores LiCl (2 mM) o SB-415286 (5 μM), bien con el dominante negativo K85R de GSK-3β (MOI 2). Además, se pre-trataron las células durante 24 horas con BDNF (**A**). Tras este tratamiento, las células fueron expuestas a rotenona durante 24 horas, en ausencia o presencia del inhibidor de la actividad tirosina-quinasa del receptor TrkB K252a (50 nM); a continuación se evaluó la viabilidad celular. **B, D.** Niveles de protección frente a rotenona alcanzados por inhibición crónica de GSK-3 en presencia o ausencia de K252a. Se muestran los valores medios y sus desviaciones estándar de al menos tres experimentos independientes. En algunos casos sólo se representan las comparaciones estadísticas más relevantes para extraer conclusiones de estos experimentos a fin de no entorpecer la interpretación de los resultados. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (test t de Student).

Además, la inhibición de la señalización a través del receptor TrkB reduce significativamente el efecto neuroprotector frente a rotenona derivado de la inhibición crónica de la GSK-3, tanto por la expresión de un dominante negativo (**Figura 37D**) como por el tratamiento con inhibidores farmacológicos (**Figura 37B**). Sin embargo, y a pesar de que la disminución del efecto neuroprotector es significativa, el tratamiento con K252a no es capaz de neutralizar completamente este efecto (**Figura 37B, D**), ni siquiera a las dosis más elevadas (datos no mostrados). Estos datos, en su conjunto, sugieren que el efecto neuroprotector que se observa está parcial pero no totalmente mediado por el aumento en la secreción de BDNF por las células en las que GSK-3 ha sido inhibida crónicamente durante 5 días.

Análisis de cambios en la expresión génica tras la inhibición crónica de GSK-3

Una de nuestras hipótesis principales se fundamenta en que la inhibición crónica de GSK-3 podría producir una serie de cambios en el patrón de expresión génica que se traducen finalmente en una mayor resistencia a la muerte celular.

Por este motivo, y con objeto de intentar profundizar un poco más en los posibles mecanismos moleculares responsables del efecto neuroprotector derivado de la inhibición crónica de GSK-3, acometimos un análisis de la expresión génica a gran escala empleando técnicas de *microarrays* de DNA. Dado que el patrón de expresión génica a lo largo de cinco días de tratamiento puede variar considerablemente, escogimos un punto de tiempo intermedio para tratar de averiguar algunos de los procesos que tienen lugar en una célula durante la inhibición crónica de GSK-3. Comparamos tres poblaciones celulares en distintas condiciones. En primer lugar, quisimos comparar células que expresasen la forma silvestre de GSK-3 β con células que expresasen el dominante negativo K85R de GSK-3 β . Además, como control de células que expresan un DNA exógeno sin efecto biológico alguno, añadimos un tercer grupo de células expresando la β -galactosidasa de *E. coli*.

Así, infectamos células SH-SY5Y diferenciadas con pHSVlac, pHSVGSK3^{WT} o pHSVGSK3^{K85R} a MOI 2 y dejamos que las construcciones se expresasen durante tres días, transcurridos los cuales extrajimos el RNA total de las células y comparamos las muestras con técnicas de *microarrays* de DNA. Los criterios que se siguieron para las comparaciones están detallados en la sección de *Materiales & Métodos*.

Después de analizar los datos obtenidos (recogidos y clasificados en el **Material Suplementario** – ver *Anexo I*), preseleccionamos una serie de genes candidatos cuyos cambios en los niveles de expresión podrían estar relacionados con el proceso de neuroprotección.

De todo este grupo conformado por 95 genes, elegimos 18 para validar por RT-PCR cuantitativa a tiempo real por medio de sondas TaqMan, normalizando los niveles de expresión con el RNA ribosomal 18S y con el gen GAPDH. Las diferencias observadas de una muestra a otra no fueron significativamente distintas, por lo que los resultados fueron inconcluyentes (datos no mostrados). Únicamente de entre los genes validados se pudo confirmar el de la protocadherina-8, que codifica una proteína extracelular de membrana implicada en adhesión y en otros procesos de señalización celular (Strehl *et al.*, 1998; Yagi y Takeichi, 2000), cuya expresión parece inducirse por la inhibición crónica de la GSK-3.

Nos interesó especialmente el hecho de que hubiese un grupo de genes relacionados con el metabolismo mitocondrial cuya expresión parecía reprimirse en términos generales. Por ello sometimos células SH-SY5Y diferenciadas a inhibición crónica de GSK-3 durante 3 y 5 días y posteriormente llevamos a cabo un análisis por *western-blot* de los niveles de distintas subunidades proteicas pertenecientes a la cadena transportadora de electrones (complejos I, II, III y V) con una batería de anticuerpos disponibles. En este caso tampoco se observaron diferencias significativas (**Figura 38**; sólo

se muestran los resultados a 5 días). En conjunto, no podemos confirmar ningún cambio en la expresión de genes relacionados con la función mitocondrial tras la inhibición crónica de GSK-3.

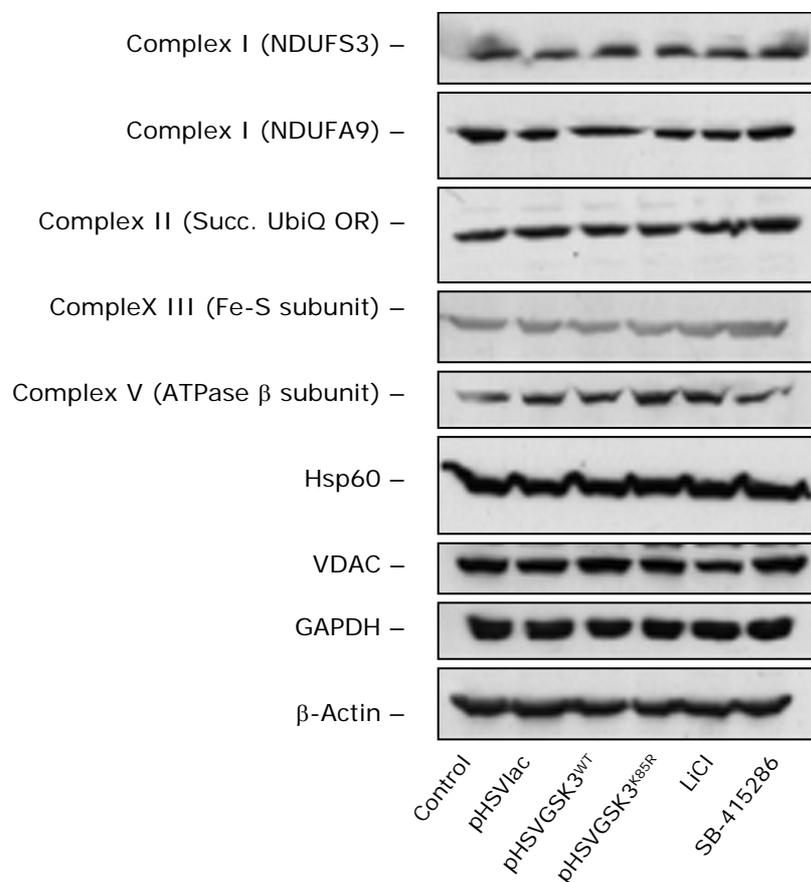


Figura 38. Análisis de la expresión de distintas proteínas relacionadas con el metabolismo oxidativo tras la inhibición crónica de GSK-3. Células SH-SY5Y diferenciadas fueron sometidas a inhibición crónica de GSK-3 durante 5 días. A continuación, se prepararon extractos de proteínas que se analizaron por western-blot utilizando anticuerpos específicos para algunas de las subunidades proteicas que forman parte de los distintos complejos de la cadena transportadora de electrones.

3. EFECTO NEUROPROTECTOR DE LA FRATAXINA FRENTE A LA DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL

En el bloque anterior hemos demostrado cómo la transferencia de una forma dominante negativa de un gen pro-apoptótico (GSK-3 β) puede conferir neuroprotección frente a determinados estímulos que conducen a la muerte neuronal por disfunción mitocondrial, además de caracterizar algunos de los mecanismos moleculares subyacentes. Esto nos llevó a plantearnos un abordaje diferente con el mismo objetivo: suministrar a las células un gen que por su actividad (en lugar de por su carácter inhibitorio) fuese capaz de proporcionar resistencia frente a estos estímulos.

Como gen de interés escogimos en este caso la frataxina, mencionada en la *Introducción*. Dado el papel estimulador en la fosforilación oxidativa que se ha postulado para la frataxina (Ristow *et al.*, 2000; Gonzalez-Cabo *et al.*, 2005), nos planteamos la posibilidad de comparar los niveles de protección frente a la disfunción mitocondrial inducida por rotenona de dos vectores que codificasen la frataxina humana: un vector que codificase el cDNA de la frataxina bajo el control de un promotor viral (que ya había sido generado en el laboratorio por la Dra. Belén Illana), como habíamos ido haciendo hasta ahora, y otro que codificase el locus genómico completo de la frataxina, de 80 Kb (Campuzano *et al.*, 1996), que incluye exones, intrones y secuencias reguladoras nativas, con lo que intentaríamos conseguir un nivel de expresión fisiológico y más estable en el tiempo. La construcción de este vector se llevó a cabo en colaboración con el Dr. Richard Wade-Martins (*The Wellcome Trust Centre for Human Genetics*, Universidad de Oxford, Oxford, Reino Unido).

3.1. Generación y validación funcional de vectores genómicos de frataxina

La construcción de vectores genómicos abre un nuevo campo de posibilidades a la hora de diseñar vectores que permitan una regulación sostenida y específica de tejido. Gracias a nuevas técnicas de Biología Molecular es posible clonar en un vector herpesviral un locus genómico completo procedente de una librería genómica de BACs o PACs (*Bacterial Artificial Chromosome*; *P1-derived Artificial Chromosome*) (Wade-Martins *et al.*, 2001; Wade-Martins *et al.*, 2003; Inoue *et al.*, 2004). Este tipo de vectores, por su enorme tamaño, sólo pueden ser albergados en cápsidas de HSV-1, que pueden alojar hasta 155-160 Kb (Sena-Esteves *et al.*, 2000; Burton *et al.*, 2002; Glorioso *et al.*, 2003; Senior y Wade-Martins, 2005).

Estrategia de clonaje

El esquema fundamental para construir un vector con un locus genómico está representado en la **figura 39A**. El planteamiento es muy sencillo: se selecciona un clon de un BAC o un PAC de una librería genómica que contenga nuestro gen de interés. A continuación se recombina el clon con el inserto genómico con un vector que lleve secuencias de HSV-1 necesarias para su empaquetamiento (origen de replicación *ori_s* y señal de empaquetamiento *pac*). Esta recombinación, conocida con el nombre de “*retrofitting*” (descrita en detalle en la sección *Materiales y Métodos*), está mediada entre dos sitios LoxP por la recombinasa CRE del fago P1, y es posible por la existencia de un único sitio LoxP en los clones de BACs y PACs (Shizuya *et al.*, 1992; Ioannou *et al.*, 1994) y otro sitio LoxP en los vectores con secuencias virales que se utilizan para el “*retrofitting*” (**Figura 40**) (Wade-Martins *et al.*, 2001). Además, en estos vectores se pueden introducir secuencias del virus Epstein-Barr (EBV, *Epstein-Barr Virus*) de retención nuclear, así como un *cassette* de resistencia a un antibiótico de selección (en este caso, higromicina) (**Figura 40B**), de forma que el vector puede permanecer de forma episomal sin integrarse en

el genoma celular replicándose de manera autónoma en células en división (Wade-Martins *et al.*, 2001). Esto permite mantener la expresión del DNA foráneo al menos hasta 3 meses de manera estable (Wade-Martins *et al.*, 2003).

Una vez generado un vector que lleva un inserto genómico y contiene secuencias de empaquetamiento viral, es posible empaquetar el vector en una cápsida de HSV-1 y comenzar a hacer ensayos funcionales.

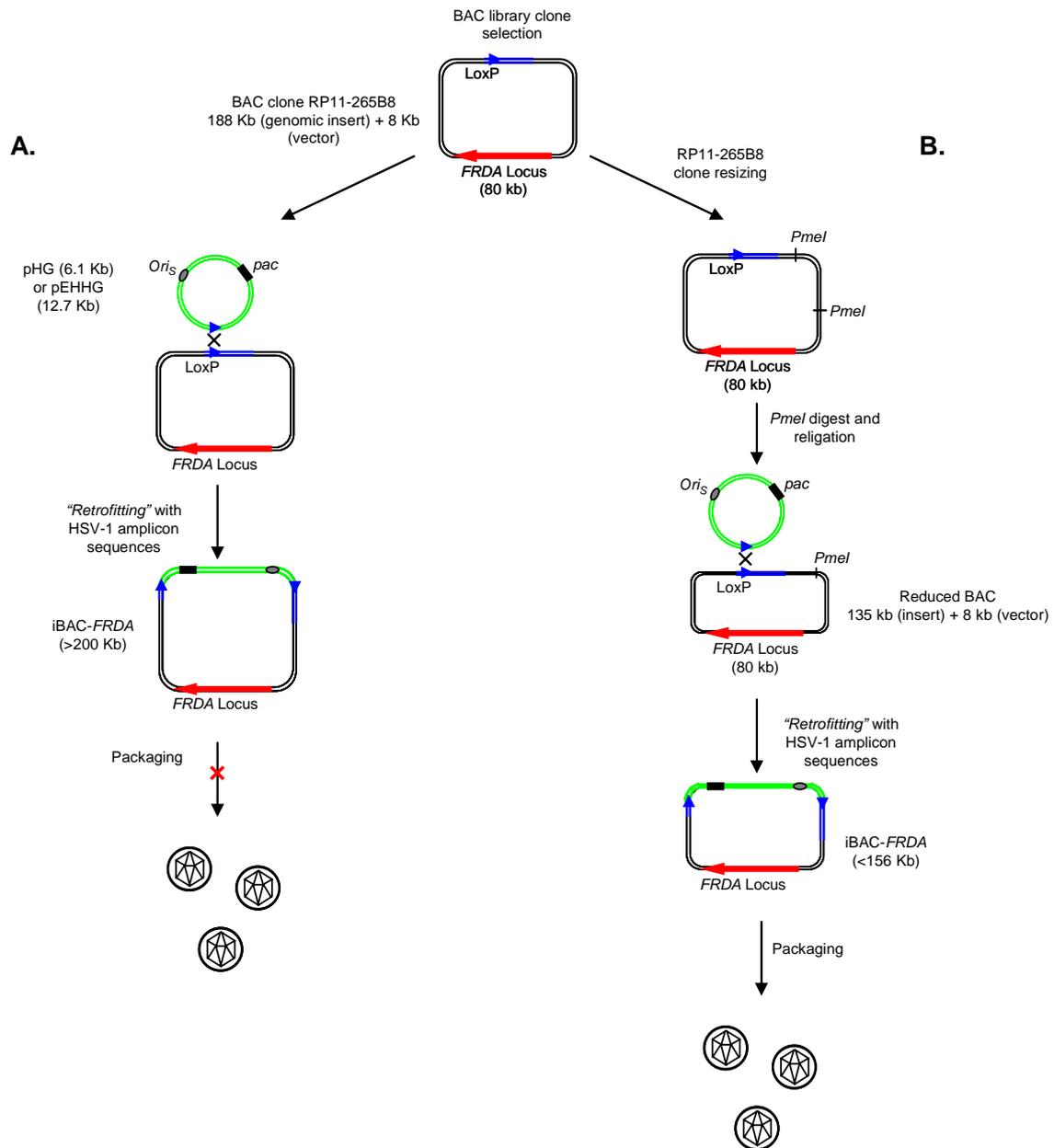


Figura 39. Esquema de la estrategia general para clonar un inserto genómico de gran tamaño en un vector con secuencias de amplicón. **A.** Simplificación de la estrategia. "Retrofitting", o subclonaje por recombinación específica de sitios LoxP dirigida por la recombinasa CRE, del clon de BAC con el vector que lleva las secuencias de HSV-1 de empaquetamiento ("*pac*") y el origen de replicación viral ("*ori_s*"), necesarias para empaquetar el vector en una cápsida viral. En nuestro caso concreto, y debido al tamaño del clon 265B8, el vector resultante sería demasiado grande para ser albergado en una cápsida de HSV-1. **B.** Estrategia empleada en nuestro caso concreto para poder reducir el tamaño del clon 265B8 preservando la estructura del locus genómico completo *FRDA*, mediante digestión con la enzima de restricción *PmeI* y posterior re-ligación.

Identificación del clon. Reajuste de tamaño del inserto

El clon escogido de una librería genómica fue el BAC RP11-265B8 (n° de acceso: AL162730), que contiene un fragmento del cromosoma 9 humano y se sabe que contiene el locus genómico completo de la frataxina (Sarsero *et al.*, 2003). Después de comprobar por análisis de restricción con la enzima NotI que, efectivamente, el BAC contenía el inserto genómico de interés (**Figura 41A**), observamos que, debido al tamaño del inserto (188 Kb), era imposible que cupiese en una cápsida de HSV-1 (**Figura 39A**), por lo que hubo que plantearse una estrategia alternativa para reducir el tamaño del inserto genómico (**Figura 39B**).

Nos planteamos una estrategia de clonaje clásico, con enzimas de restricción que cortaban en unos sitios determinados para escindir y eliminar del BAC un fragmento genómico lo suficientemente alejado del locus de la frataxina como para suponer que no debería afectar significativamente a la expresión (**Figura 39B**). Identificamos dos sitios *PmeI* alejados entre sí una distancia de 53 Kb y a 38 Kb del locus *FRDA*. Por digestión y religación, obtuvimos una serie de clones. El análisis de restricción de estos clones (**Figura 41B**) reveló que la reducción del BAC se había llevado a cabo de manera satisfactoria.

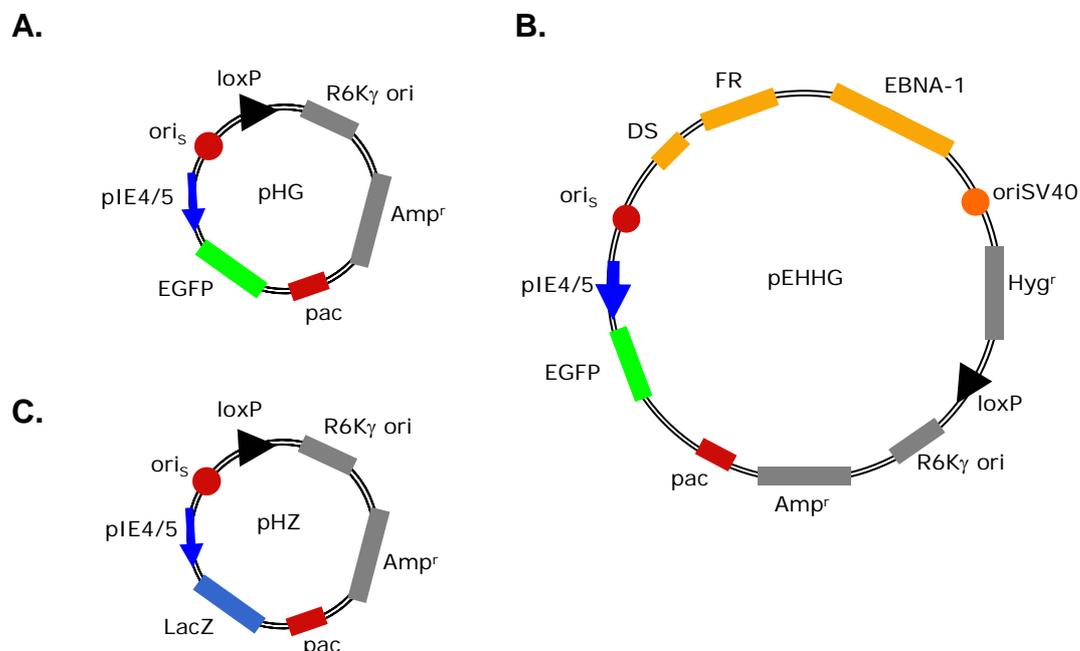


Figura 40. Mapas de los vectores amplicones empleados para el "retrofitting". **A.** El vector pHG contiene todas las secuencias requeridas para el empaquetamiento del vector (señal de empaquetamiento "*pac*" y origen de replicación viral "*Ori_s*"), además de un sitio *LoxP* para poder llevar a cabo el "retrofitting" y el gen de la proteína verde fluorescente (*EGFP*; *Enhanced Green Fluorescent Protein*), como reportero de eficiencia de transferencia génica. **B.** El vector pEHHG contiene, además, secuencias del virus Epstein-Barr (*EBNA-1*; *Epstein-Barr Nuclear Antigen-1*), que le permiten mantenerse de forma autónoma y extracromosómica en células en replicación. También contiene un gen de resistencia a higromicina para selección estable. **C.** El vector pHZ es similar al vector pHG, excepto por el gen reportero, que es *LacZ* en lugar de *EGFP*.

“Retrofitting” – Recombinación específica de sitios *LoxP* mediada por la recombinasa *CRE*

El siguiente paso en el clonaje fue el de “*retrofitting*” o recombinación entre dos sitios *LoxP* con secuencias virales. Los vectores pHG y pEHHG que llevan las secuencias virales *ori_S* (origen de replicación viral) y *pac* (señal de empaquetamiento viral) están detallados en la **figura 40**. Además, también llevan un gen reportero (proteína verde fluorescente o *GFP*) para poder seguir la eficiencia de transducción. De manera adicional y como ya se ha indicado, el vector pEHHG lleva secuencias de retención episomal de EBV, para que se pueda replicar de manera autónoma en células en división sin integrarse en el genoma nuclear, y un *cassette* de resistencia a higromicina, para poder seleccionar únicamente las células que contengan la construcción (Wade-Martins *et al.*, 2001; Wade-Martins *et al.*, 2003). El proceso de “*retrofitting*” está cuidadosamente detallado en la sección *Materiales y Métodos*.

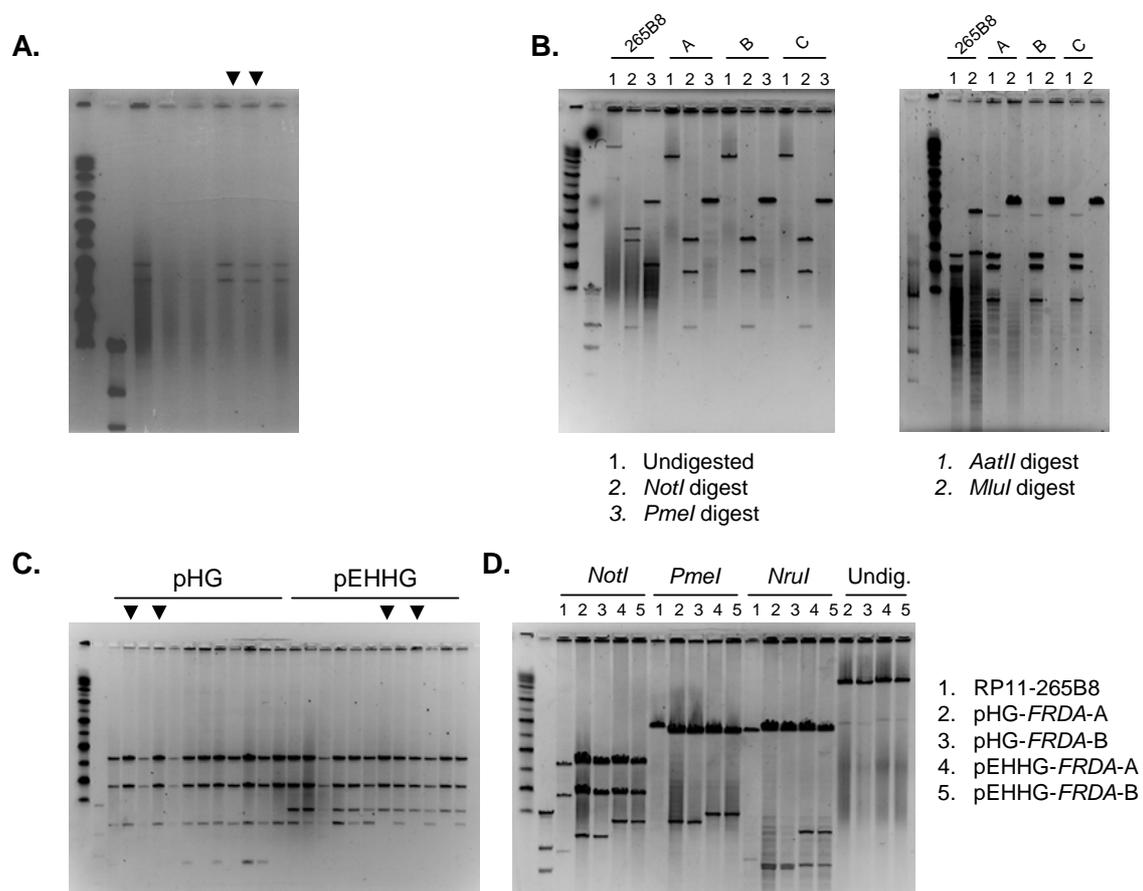


Figura 41. Análisis de restricción durante los distintos pasos de generación de los vectores genómicos de frataxina. **A.** Digestión con *NotI* de las diferentes colonias que llevan el clon RP11-265B8, que contiene el locus genómico de frataxina. **B.** Análisis de restricción con las enzimas *NotI*, *PmeI*, *AatII* y *MluI* antes y después de la digestión con *PmeI* y posterior re-ligación (A, B y C corresponden a 3 clones obtenidos). **C.** Digestión con *NotI* después del “*retrofitting*” con los vectores amplicones con secuencias de HSV-1 pHG y pEHHG para la identificación de los clones recombinados satisfactoriamente. Las flechas indican los clones seleccionados para verificación y empaquetamiento (designados pHG-*FRDA*-A y B y pEHHG-*FRDA*-A y B, respectivamente). **D.** Análisis de restricción con las enzimas *NotI*, *PmeI* y *NruI* de los clones obtenidos tras el “*retrofitting*”.

Así, obtuvimos una serie de clones que analizamos por restricción (**Figura 41C-D**) e identificamos aquellos que habían recombinado satisfactoriamente. Estos clones se denominaron pHG-*FRDA* (inserto reducido del cromosoma 9 humano conteniendo el locus *FRDA* recombinado con pHG) y pEHHG-*FRDA* (inserto reducido del cromosoma 9 humano conteniendo el locus *FRDA* recombinado con pEHHG). Este tipo de vectores, una vez empaquetados, también se conocen como *iBACs* (*infectious BACs*), en este caso concreto *iBAC-FRDA*.

Expresión de frataxina humana en células de ratón transducidas con pHG-*FRDA* y pEHHG-*FRDA*

En primer lugar, quisimos comprobar que los vectores que codificaban el gen humano *FRDA* expresaban frataxina correctamente. Quisimos demostrar que era posible expresar frataxina humana con el vector que habíamos construido. Para ello, diseñamos un ensayo de RT-PCR a partir del cual era posible discriminar la detección de mRNA de frataxina humana y frataxina murina mediante el empleo de unos oligonucleótidos iniciadores específicos de especie. Empaquetamos el vector obtenido y transdujimos la línea celular de carcinoma embrionario de ratón P19 a una MOI de 20, obteniendo una eficiencia de transducción del 60%.

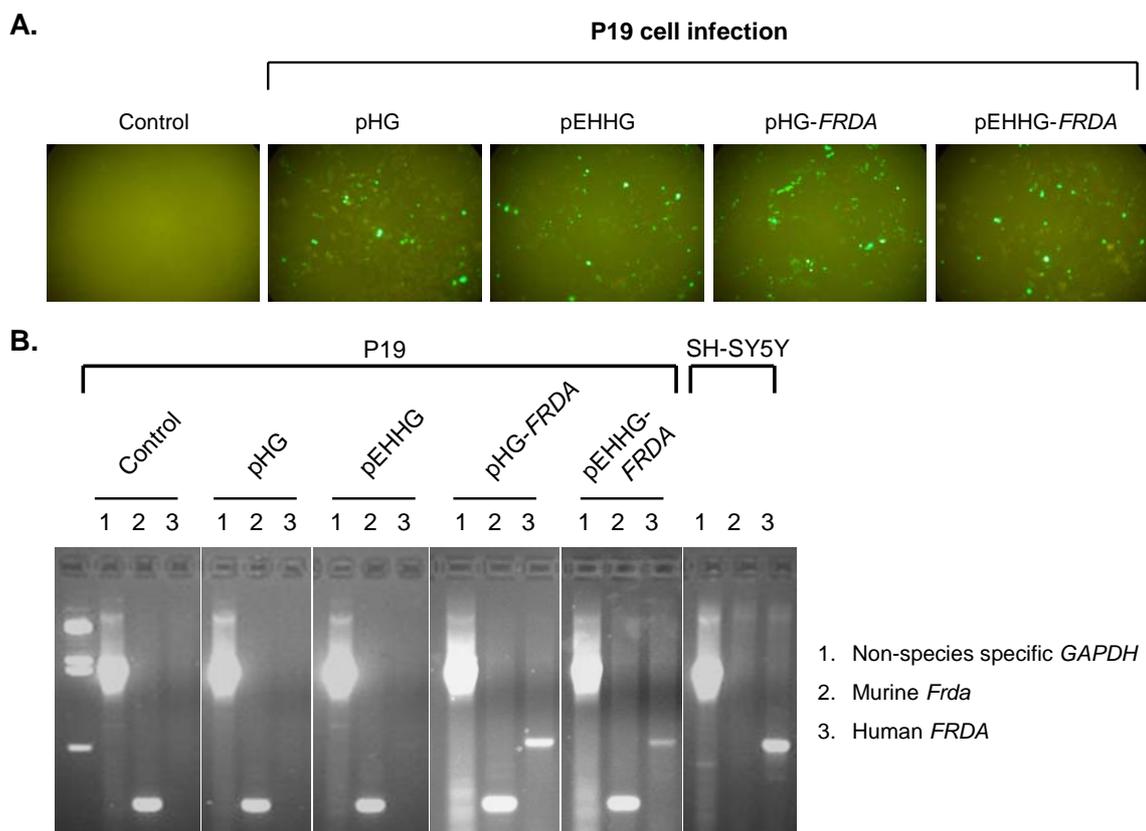


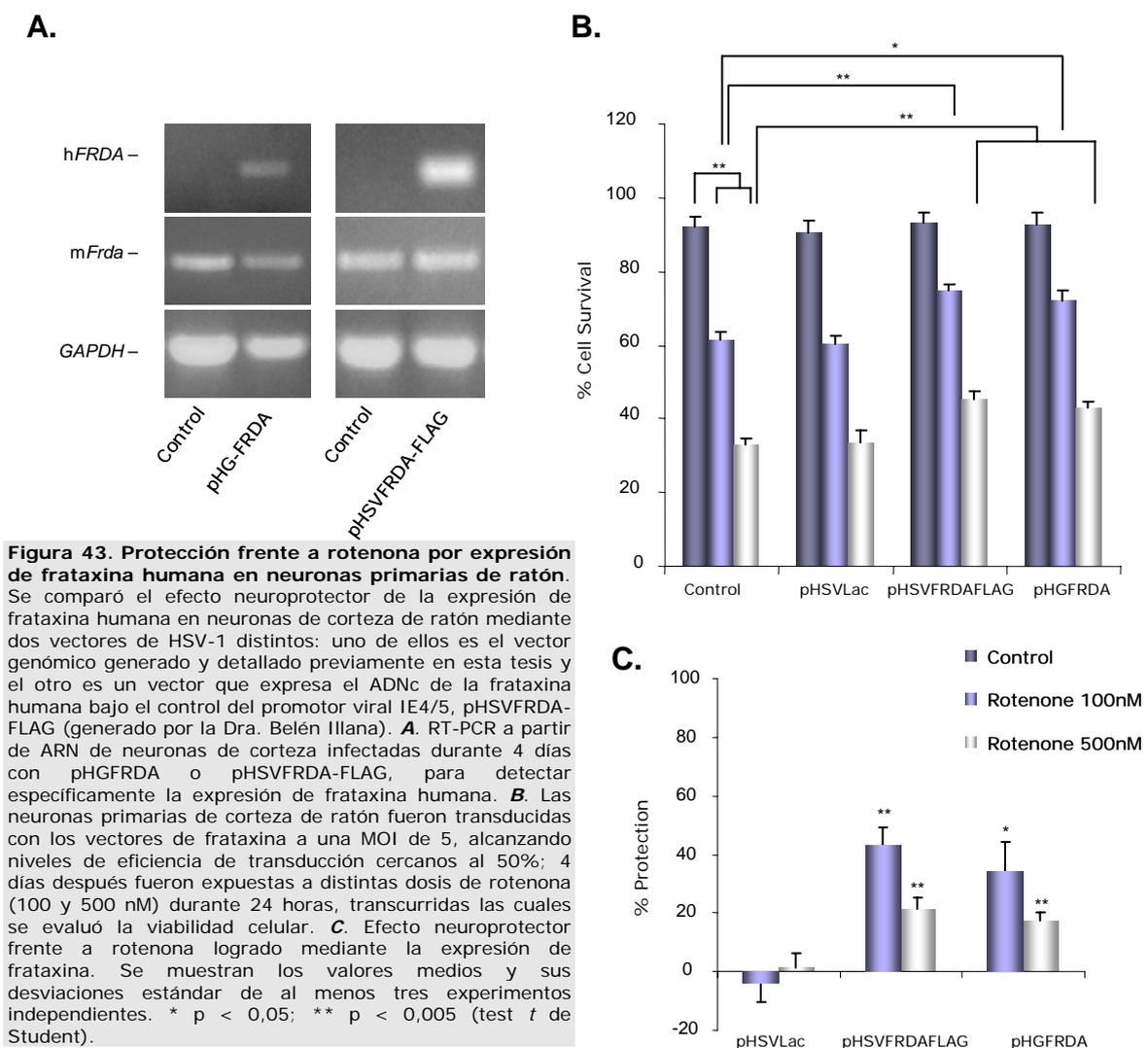
Figura 42. Expresión de frataxina humana en células de ratón P19 mediante los vectores de expresión *iBAC-FRDA*. **A.** Las células de carcinoma embrionario de ratón P19 fueron infectadas a una MOI de 20 con los vectores pHG, pEHHG (ambos empleados como control de infección), pHG-*FRDA* o pEHHG-*FRDA* (estos últimos codificando el locus genómico completo *FRDA*). **A.** El análisis por microscopía de fluorescencia a las 24 horas de la transducción para detectar la expresión de GFP reveló que la transferencia génica había sido satisfactoria. **B.** Para verificar si la expresión de frataxina humana en células murinas por medio de los vectores de expresión *iBAC-FRDA* era correcta, aislamos ARN de células P19 a las 48 horas de infectarlas con los vectores, y llevamos un ensayo de RT-PCR que diseñamos para poder discriminar específicamente los ARN mensajeros de la frataxina humana y la murina.

Tras comprobar que la transducción se había llevado a cabo con éxito visualizando la expresión de GFP con un microscopio de fluorescencia (**Figura 42A**), extrajimos el RNA total de las células pasadas 48 horas de la transducción. Llevamos a cabo entonces un ensayo de RT-PCR que nos permitiese discriminar específicamente la frataxina humana de la murina. El análisis de RT-PCR (**Figura 42B**) demostró que únicamente era posible detectar la expresión de frataxina humana en células de ratón infectadas con pHG-FRDA o pEHHG-FRDA. Como control de infección sin ningún efecto biológico, infectamos células adicionalmente con pHG y pEHHG. Así pues quedó confirmado que los vectores genómicos generados expresan correctamente la frataxina humana.

Protección frente a rotenona por expresión de frataxina

A continuación quisimos estudiar el posible efecto neuroprotector de la expresión de frataxina humana en nuestro modelo de disfunción mitocondrial inducido por rotenona. En este caso, el tipo celular escogido fueron las neuronas de corteza cerebral de ratón.

Además, quisimos comparar las posibles diferencias sobre la protección frente a rotenona de la expresión del locus genómico con la expresión del cDNA bajo el control de un promotor viral, utilizando la construcción pHSVFRDA-FLAG (generada en el laboratorio por la Dra. Belén Illana), que codifica el cDNA de la frataxina humana bajo el control del promotor viral IE4/5.



Infectamos neuronas de corteza de ratón de 1 DIV a una MOI de 5 (alcanzando niveles de eficiencia de transducción en torno al 50-60%) y a los 4 días comprobamos la expresión de frataxina humana en las neuronas corticales por RT-PCR (**Figura 43A**). En este punto expusimos las células a distintas concentraciones de rotenona durante 24 horas, después de las cuales evaluamos la viabilidad (**Figura 43B**). Los resultados obtenidos revelaron que la expresión de frataxina, independientemente del vector utilizado, tenía un moderado pero significativo efecto protector frente a la disfunción mitocondrial inducida por rotenona, alcanzando niveles cercanos al 50% de protección a una dosis de rotenona de 100 nM, y un efecto más modesto, en torno al 20%, a dosis más elevadas (500 nM) (**Figura 43C**).

3.2. Generación y validación funcional de vectores reporteros de expresión de frataxina

Diseño y construcción de un vector reportero de expresión de frataxina

A continuación, quisimos diseñar una herramienta para poder realizar estudios de expresión génica. La idea es poder estudiar distintos eventos que puedan estar afectando a la actividad del promotor de frataxina, como el desarrollo normal de una célula o tejido, algún tipo de estrés celular o la exposición a determinados fármacos.

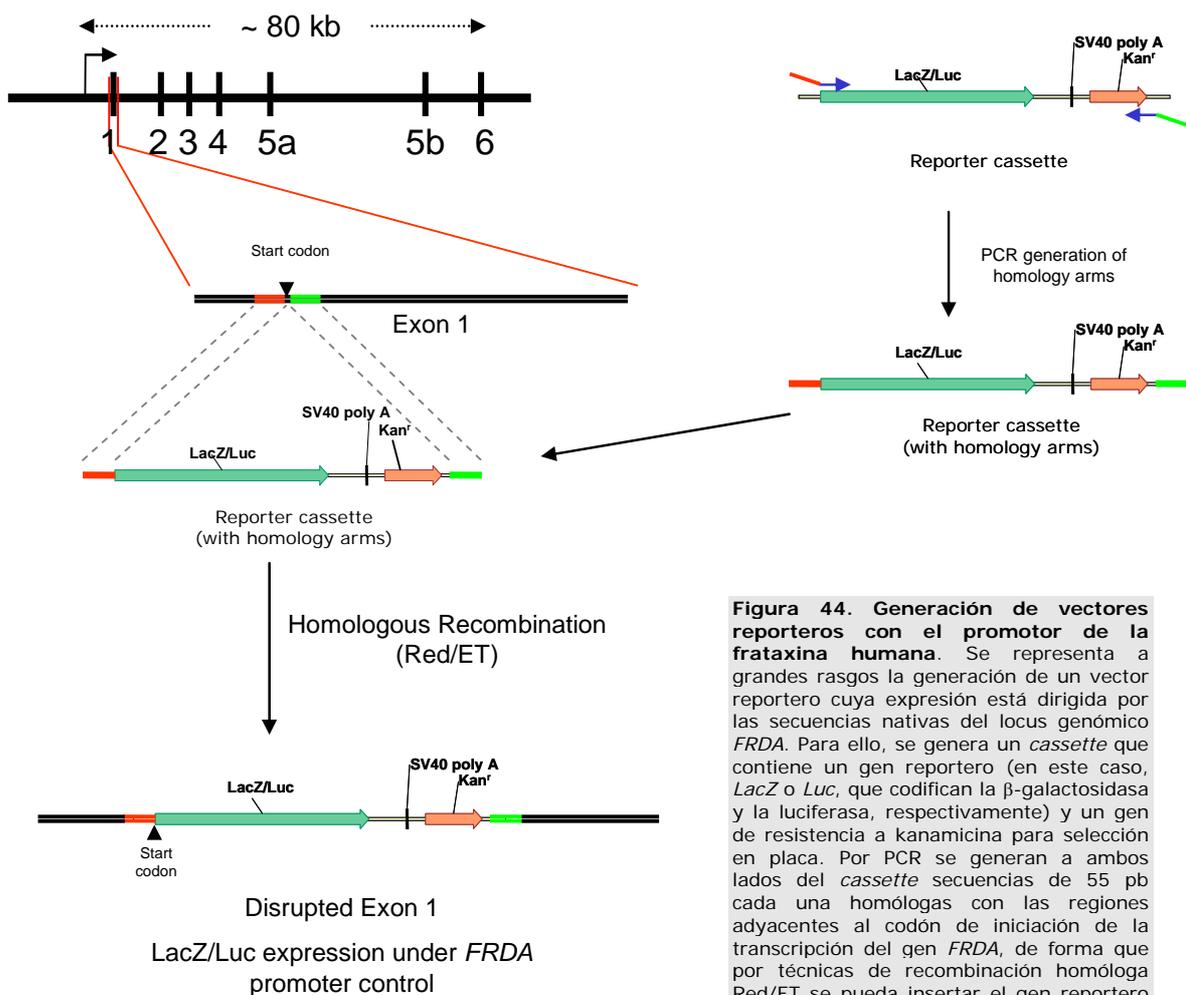


Figura 44. Generación de vectores reporteros con el promotor de la frataxina humana. Se representa a grandes rasgos la generación de un vector reportero cuya expresión está dirigida por las secuencias nativas del locus genómico *FRDA*. Para ello, se genera un *cassette* que contiene un gen reportero (en este caso, *LacZ* o *Luc*, que codifican la β -galactosidasa y la luciferasa, respectivamente) y un gen de resistencia a kanamicina para selección en placa. Por PCR se generan a ambos lados del *cassette* secuencias de 55 pb cada una homólogas con las regiones adyacentes al codón de iniciación de la transcripción del gen *FRDA*, de forma que por técnicas de recombinación homóloga Red/ET se pueda insertar el gen reportero inmediatamente a continuación del promotor.

La estrategia que diseñamos se basaba en la inserción de un gen reportero (*LacZ* o *Luc*, que codifican respectivamente para la β -galactosidasa y luciferasa) inmediatamente después del promotor, de forma que el control del gen reportero en cuestión esté dirigido por el promotor genómico de la frataxina. Para poder llevar a cabo esta inserción era necesario generar en primer lugar un *cassette* que contuviese el gen reportero y a continuación un gen de resistencia a algún antibiótico (dado que el BAC tiene resistencia a cloramfenicol, y durante el proceso de “retrofitting” se requiere resistencia a tetraciclina y se adquiere resistencia a ampicilina, diseñamos un *cassette* con resistencia a kanamicina). A continuación la técnica elegida para insertar este *cassette* generado inmediatamente después del promotor fue la recombinación homóloga de sitio Red/ET (Muyrers *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2000). Para ello era necesario seleccionar las secuencias adyacentes al codón de iniciación en el BAC y generar por PCR esas mismas secuencias a ambos lados del *cassette*. De esta manera, tendríamos un *cassette* flanqueado por dos secuencias de homología con el BAC, por lo que la recombinación homóloga dirigida podría tener lugar. El esquema general de esta estrategia se recoge en la **figura 44**.

El primer paso fue generar las construcciones que contuviesen el gen reportero (**Figura 45** y sección *Materiales y Métodos*). Una vez verificadas las construcciones por análisis de restricción, procedimos a añadir por PCR las regiones de homología necesarias a ambos lados del *cassette* para que tuviese lugar la recombinación homóloga (Muyrers *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2000). En primer lugar digerimos las construcciones para escindir los *cassettes* reporteros y utilizar éstos en forma linearizada como molde para la PCR (**Figura 46A**). A continuación llevamos a cabo la PCR preparativa (**Figura 46C**), después de haber seleccionado la temperatura de anillamiento más adecuada, 72°C (**Figura 46B**). Finalmente, y tras purificar el fragmento obtenido por PCR y digerir con la enzima de restricción DpnI para eliminar cualquier resto de DNA bacteriano (esta enzima reconoce y digiere secuencias de DNA metiladas), electroporamos el fragmento lineal obtenido en bacterias electrocompetentes y con los genes de recombinación homóloga inducidos (ver *Materiales y Métodos*), después de haber comprobado que los clones de los que se prepararon bacterias electrocompetentes para la recombinación homóloga contenían correctamente el BAC 265B8 (con el nuevo tamaño reducido) y el plásmido pSC101-BAD-gba^{Tet}, necesario para la recombinación homóloga (**Figura 46D**) (Zhang *et al.*, 2000; Muyrers *et al.*, 2004).

Una vez tuvo lugar el proceso de recombinación homóloga obtuvimos una serie de colonias para las construcciones generadas. La inserción tanto del *cassette* con el gen *Luc* como del *cassette* con el gen *LacZ* propició la aparición de nuevas dianas de restricción en el BAC, así como nuevas uniones (la región 3' del promotor en el exón 1 con el extremo 5' del *cassette* reportero –esta unión es única en cada *cassette*- y el extremo 3' del *cassette* –idéntico en ambos casos- con la región 5' de la secuencia codificante del exón 1). Todo esto está esquematizado en la **figura 47A**. El análisis de restricción de las colonias obtenidas nos indicó que la inserción del *cassette* Luc-Kan se completó con éxito en 10 casos de 12 analizados, mientras que para la inserción del *cassette* LacZ-Kan se obtuvieron 3 colonias de las cuales 1 era correcta (**Figura 47B-C**). Finalmente, el análisis por PCR de las nuevas uniones generadas confirmó la correcta inserción de sendos *cassettes* (**Figura 47D**). De esta manera pudimos proceder al siguiente paso (“retrofitting”), con los vectores pHG, pEHHG y pHZ (este último contiene como gen reportero *LacZ* en lugar de *eGFP*), generando así las construcciones pHG-F-Luc, pHZ-F-Luc, pHG-F-LacZ y pEHHG-F-LacZ (**Figura 47E**).

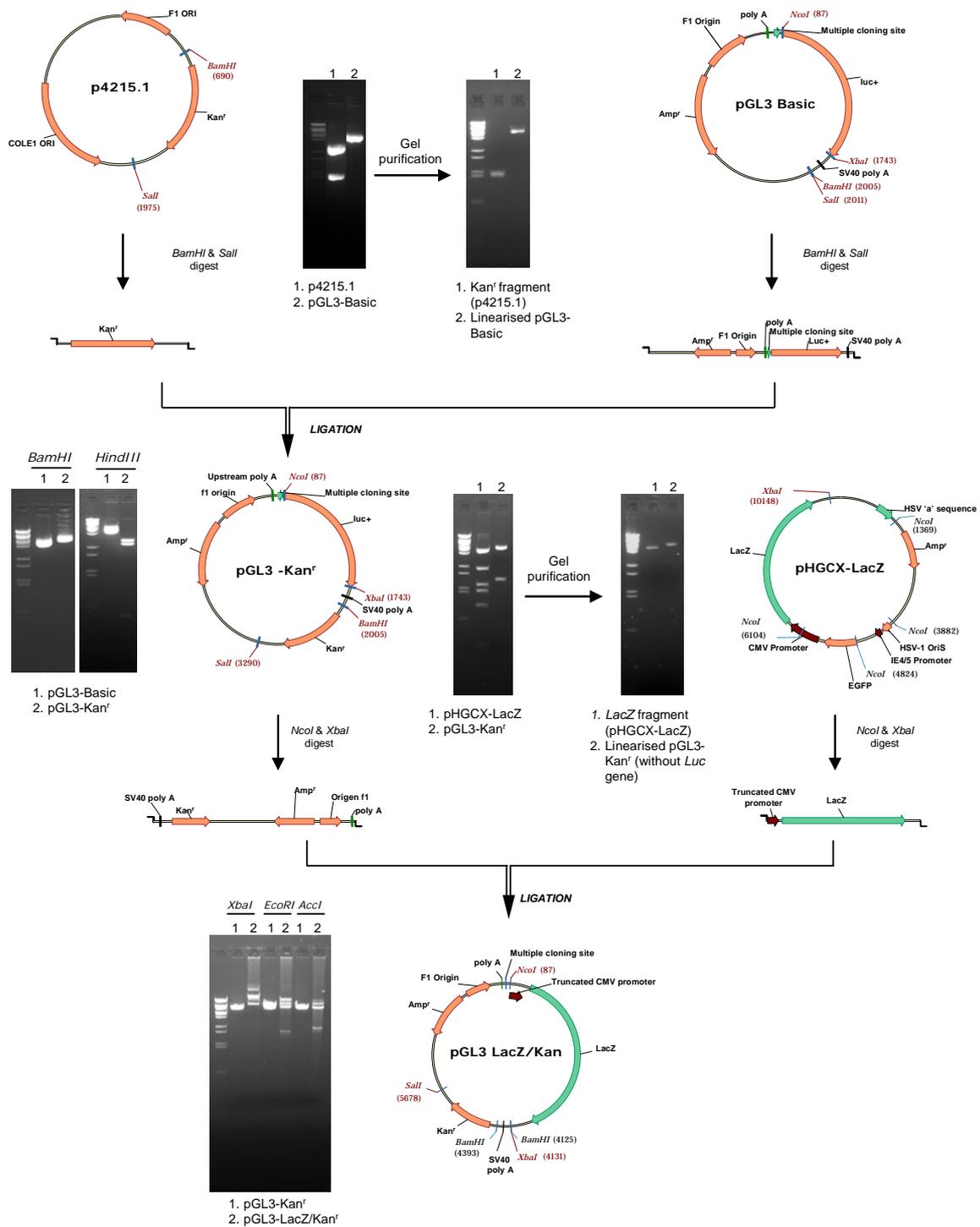


Figura 45. Obtención de los cassettes con los genes reporteros. Se muestra la estrategia seguida para obtener los dos cassettes reporteros a insertar en el exón 1 del gen *FRDA*, a continuación del promotor. A partir de los plásmidos p4215.1 y pGL3 Basic se generó, tras digestión con BamHI y Sall y posterior ligación de los fragmentos obtenidos y purificados en gel, el plásmido pGL3-Kan, que contiene el gen reportero *Luc* y el gen de resistencia a kanamicina. A continuación, por digestión de los plásmidos pGL3-Kan y pHGEX-LacZ con NcoI y XbaI y posterior ligación de los fragmentos obtenidos, se obtuvo el plásmido pGL3 LacZ/Kan, que contiene el gen reportero *LacZ* y el gen de resistencia a kanamicina. Se muestran los análisis de restricción llevados a cabo en cada paso del clonaje.

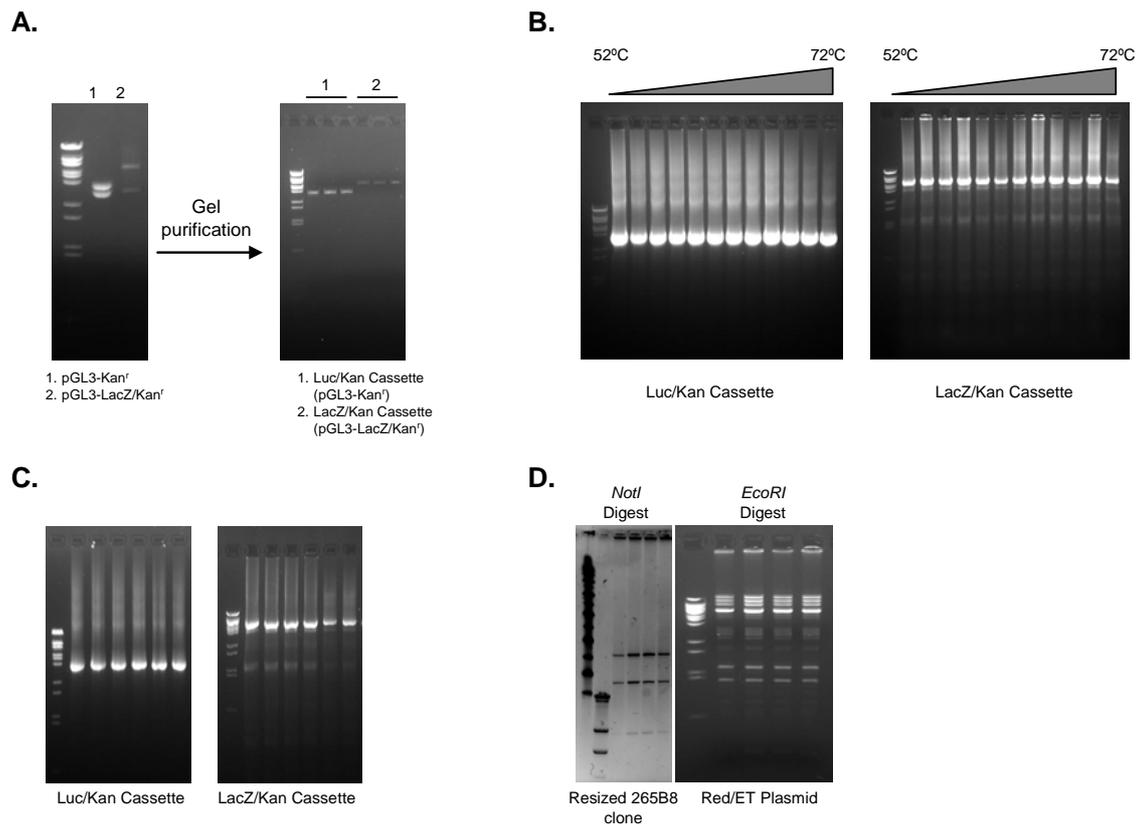


Figura 46. Preparación de los componentes necesarios para la recombinación homóloga. **A.** Con objeto de linearizar los *cassettes* reporteros como moldes para la generación de secuencias de homología con el locus genómico por PCR, éstos fueron escindidos por doble digestión de los plásmidos pGL3-Kan (para obtener el *cassette* *Luc/Kan*) y pGL3-LacZ/Kan (para obtener el *cassette* *LacZ/Kan*) con las enzimas *NheI* y *Sall*. **B.** Puesta a punto de condiciones de PCR preparativa, con un gradiente de temperatura de anillamiento de 52°C a 72°C, para la generación de secuencias de homología con el locus *FRDA* a ambos lados de los *cassettes* reporteros. **C.** PCR preparativa de los *cassettes* reporteros tras la generación de regiones de homología con el locus *FRDA* en ambos extremos, utilizando una temperatura de anillamiento de 72°C. Los productos de PCR fueron digeridos con la enzima de restricción *DpnI* para eliminar restos de ADN bacteriano y purificados en gel antes de electroporarlos en bacterias electro-competentes con los genes de recombinación homóloga Red/ET inducidos. **D.** Análisis de 4 clones de bacterias diferentes que llevan el clon 265B8 reducido y el plásmido pSC101-BAD-*gba*^{Tet}, necesario para la recombinación homóloga. El objetivo de esta comprobación es verificar que las bacterias electrocompetentes contienen toda la maquinaria molecular necesaria para llevar a cabo la recombinación homóloga.

Aplicaciones de los vectores reporteros: estudios de cinética de expresión y de compuestos que afectan a la actividad del promotor

Finalmente, acometimos una serie de experimentos destinados a poner de manifiesto algunas de las posibles aplicaciones de los vectores reporteros con el promotor nativo del gen *FRDA* que habíamos generado. En primer lugar quisimos analizar su cinética de expresión en neuronas primarias de corteza de ratón. Para ello tratamos las células de 1 DIV con pHG-F-LacZ a una MOI de 5 e hicimos extracto de proteínas a distintos tiempos, hasta 10 días. El análisis por *western-blot* mostró que, si bien la cinética de expresión es más lenta que con un promotor viral (Lim *et al.*, 1996) (son necesarios unos 4-7 días para alcanzar el máximo de expresión), también es más persistente (**Figura 48**). Estos datos sugieren que el empleo de promotores fisiológicos proporciona una expresión más sostenida y duradera.

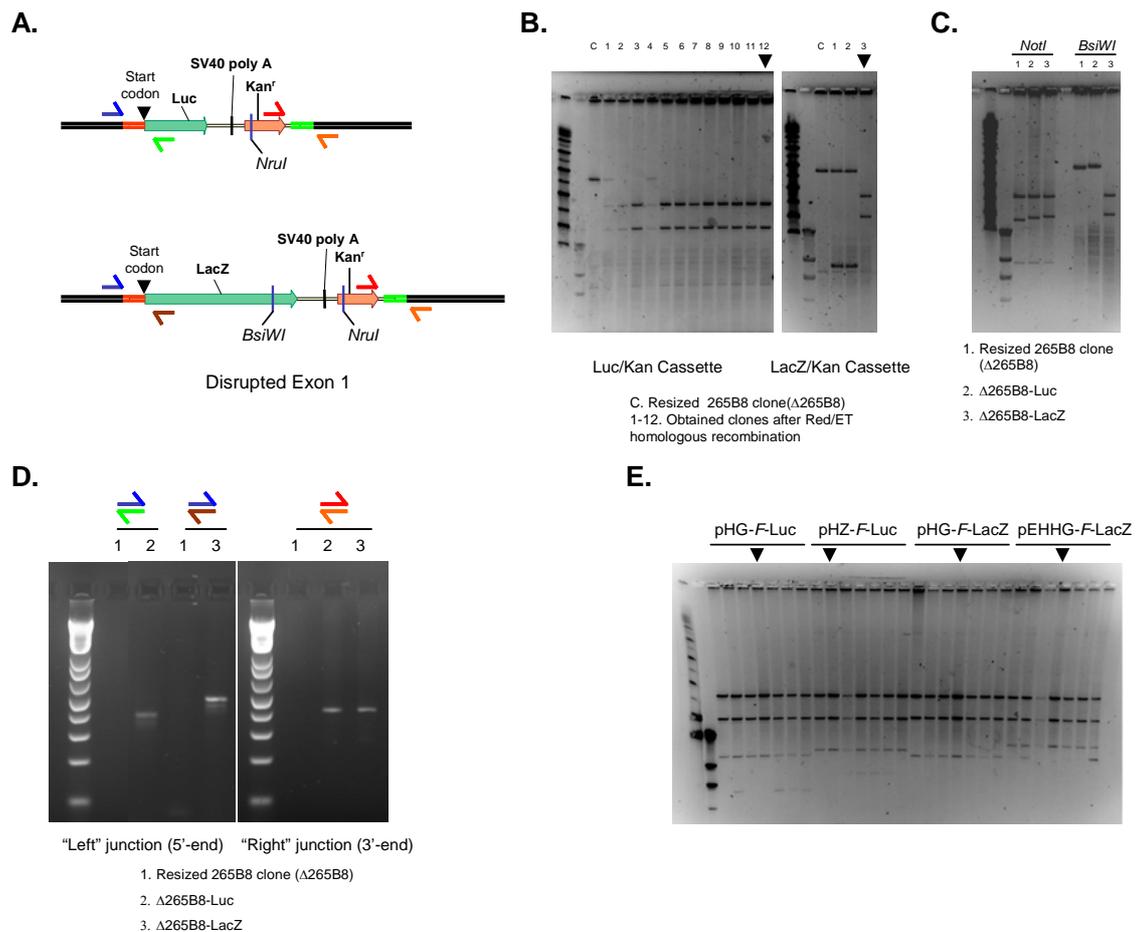


Figura 47. Recombinación homóloga y "retrofitting" con secuencias de HSV-1. **A.** Esquema detallado de las nuevas construcciones generadas, con los *cassettes* reporteros insertados inmediatamente a continuación del promotor del gen *FRDA*. Se indican algunos de los nuevos sitios de restricción generados así como las regiones seleccionadas para amplificación por PCR y detección de las nuevas uniones generadas. **B.** Análisis de restricción tras digestión con *NruI* de los productos obtenidos de la recombinación homóloga Red/ET. Las flechas indican las colonias seleccionadas para más análisis. **C.** Análisis de restricción con las enzimas *NotI* y *BsiWI* de las colonias seleccionadas. **D.** Detección por PCR de las nuevas uniones (5' y 3') generadas en los vectores reporteros. **E.** Identificación por digestión con *NotI* de los clones recombinados satisfactoriamente con secuencias de HSV-1 mediante el proceso de "retrofitting" con los vectores pHG, pHZ y pEHHG. Las flechas indican las colonias seleccionadas.

A continuación, quisimos averiguar si los vectores reporteros que habíamos generado podrían ser utilizados como una herramienta de uso rutinario en el laboratorio para estudiar distintos factores o eventos que puedan afectar a la expresión de frataxina en neuronas.

Recientemente se ha descrito que el tratamiento con eritropoyetina recombinante humana (hEPO) induce un aumento en la expresión de frataxina en distintos tipos celulares, como linfocitos o fibroblastos humanos o células P19 de ratón (Sturm *et al.*, 2005b). Así, nos propusimos averiguar si la adición de hEPO a las células SH-SY5Y, como sistema de células similares a neuronas humanas en cultivo, podía tener algún efecto en la actividad del promotor de frataxina. Para ello, infectamos células SH-SY5Y diferenciadas con pHG-F-LacZ a una MOI de 2, y pasadas 24 horas, expusimos las células a distintas concentraciones de hEPO (10, 50 y 200 U/ml) durante distintos tiempos, en un rango de 24 a 96 horas más. El análisis por *western-blot* de la β -galactosidasa mostró que la adición de hEPO incrementa claramente la expresión mediada por el promotor de frataxina en células SH-SY5Y diferenciadas a las dosis más altas durante las primeras 24 horas (**Figura 49A**); sin embargo este efecto es transitorio a no ser que la dosis empleadas sea muy elevada (200 U/ml), ya que los niveles de β -galactosidasa alcanzados por las células infectadas con pHG-F-LacZ y tratadas con hEPO a 50 U/ml o a 200 U/ml sólo se mantuvieron a 3 días en las células tratadas con la dosis más alta de hEPO (**Figura 49B**).

Estos resultados demuestran que los vectores reporteros generados pueden ser herramientas útiles para el análisis de los cambios en la expresión de frataxina en respuesta a distintos estímulos.

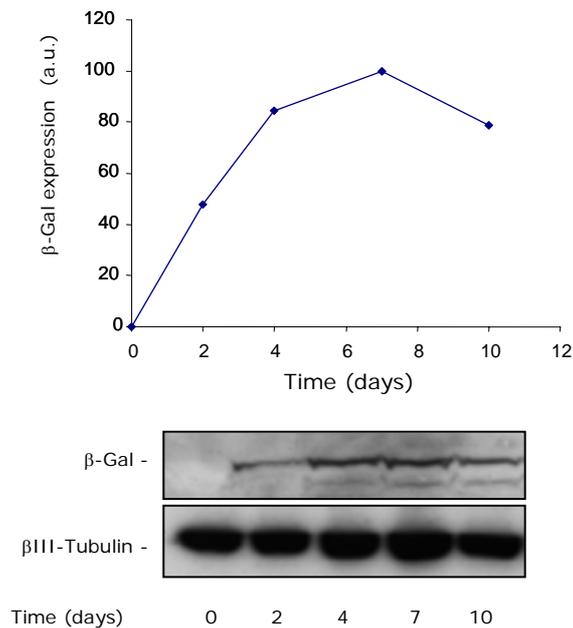


Figura 48. Cinética de expresión de vectores genómicos en neuronas primarias de ratón. Se infectaron neuronas primarias de corteza de ratón a una MOI de 5 con el vector reportero pHG-F-LacZ, y se estudió la cinética de expresión de β-galactosidasa bajo el control del promotor del gen *FRDA* realizando extractos de proteínas y analizándolos por *western-blot*. Los niveles de β-galactosidasa se expresaron en unidades arbitrarias determinadas por escaneado densitométrico de las bandas.

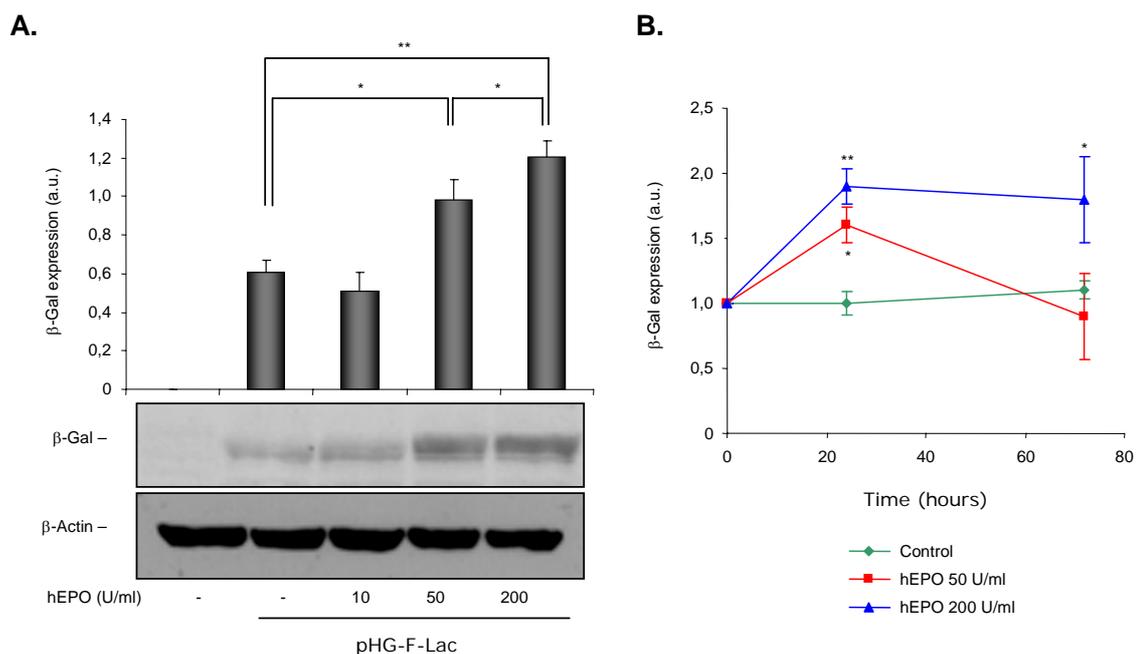


Figura 49. Efecto de la eritropoyetina humana en la actividad del promotor de frataxina. Células SH-SY5Y diferenciadas fueron transducidas a una MOI de 2 con el vector reportero pHG-F-LacZ. A las 24 horas, fueron sometidas a distintas dosis (10, 50 y 200 U/ml) de eritropoyetina recombinante humana (hEPO) durante distintos tiempos (24 y 72 horas). La expresión de β-galactosidasa se llevó a cabo por *western-blot* de extractos de proteínas, y se determinó en unidades arbitrarias por análisis densitométrico de las bandas. **A.** Se muestra el efecto de las distintas dosis de hEPO en la expresión de β-galactosidasa bajo el control del promotor del gen *FRDA* a 24 horas. **B.** Se comparan las cinéticas de expresión de β-galactosidasa controlada por el promotor del gen *FRDA* a 24 y 72 horas en función de las distintas dosis de hEPO. Se muestran los valores medios y sus desviaciones estándar de al menos tres experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ (test *t* de Student).

Discusión

Las patologías neurodegenerativas plantean, hasta la fecha, un escenario difícil a la hora de establecer estrategias terapéuticas. El objetivo fundamental de este trabajo ha sido estudiar y caracterizar posibles estrategias neuroprotectoras mediante transferencia génica a neuronas con vectores de HSV-1, de manera que sea posible proteger a éstas de la muerte inducida por disfunción mitocondrial. A continuación pasamos a discutir más específicamente algunos de los puntos clave de esta tesis.

Desarrollo de modelos celulares

En primer lugar hemos querido desarrollar y caracterizar una serie de modelos celulares en los que llevar a cabo nuestros experimentos. El modelo que más exhaustivamente hemos caracterizado es el de la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y cuya diferenciación da lugar a células similares a neuronas humanas, ya que es el que más hemos utilizado para nuestros estudios. Este sistema, como ya se ha mencionado, está basado en procedimientos anteriormente descritos (García-Pérez *et al.*, 1998; Encinas *et al.*, 2000) con algunas modificaciones. El resultado es el de unas células que presentan un fenotipo neuronal postmitótico, con una morfología y polaridad estructural bien definidas y la expresión de marcadores neuronales típicos (Giménez-Cassina *et al.*, 2006a).

Las células SH-SY5Y diferenciadas son mucho más susceptibles a la transducción por vectores de HSV-1, y esta sensibilidad presenta una correlación con un significativo aumento en la expresión de receptores celulares para la entrada de Herpesvirus. Precisamente este aumento en la eficiencia de transducción con vectores de HSV-1 permite la posibilidad de realizar estudios de transferencia y expresión génica en células humanas similares a neuronas en cultivo.

Además, hemos observado también una disminución progresiva de toxicidad en respuesta a vectores de HSV-1 a medida que la diferenciación avanzaba para una de las cepas testadas, 5dl1.2; sin embargo la respuesta frente a la otra cepa, d120, no experimentó variaciones significativas a lo largo de la diferenciación. Esta diferencia podría deberse a los distintos programas genéticos que se ejecutan por cada una de las distintas cepas en una célula infectada (Garrido *et al.*, 1999), con lo que la cepa d120 estaría causando una cierta citotoxicidad independientemente del estado de diferenciación, mientras que la infección con la cepa 5dl1.2 podría transcurrir con la expresión de proteínas que resultan más tóxicas para células en proliferación.

Podemos por tanto concluir que las células SH-SY5Y diferenciadas constituyen un modelo homogéneo y altamente reproducible de células similares a neuronas humanas en cultivo. Este sistema se puede así considerar como una herramienta versátil en el que se pueden llevar a cabo distintos tipos de análisis, entre los que se incluyen estudios bioquímicos, inmunocitoquímicos o transcriptómicos. De hecho, la posibilidad de hacer análisis transcriptómicos a gran escala puede servir para la identificación de genes candidatos que puedan ser utilizados como dianas terapéuticas a la hora de diseñar nuevas estrategias para el tratamiento de diversas patologías neurodegenerativas. Además, la posibilidad de transferencia génica a células humanas con un fenotipo claramente neuronal abre un enorme campo de posibilidades para estudios funcionales. La caracterización de este sistema así como su respuesta a vectores herpesvirales se recoge en una publicación recientemente aceptada (Giménez-Cassina *et al.*, 2006a).

Aunque el desarrollo experimental fundamental de esta tesis ha sido realizado en las células SH-SY5Y diferenciadas, también hemos querido complementar este trabajo con el empleo de cultivos primarios de neuronas de ratón de distintas regiones del sistema nervioso. Es por ello que hemos caracterizado el fenotipo y la respuesta a vectores de HSV-1 de algunos de estos sistemas. Hemos escogido cultivos de poblaciones neuronales de la región espinocerebelar, concretamente cultivos de neuronas de bulbo raquídeo y cultivos mixtos de células de cerebelo enriquecidos en neuronas de

Purkinje. Una de las razones que nos llevó a escoger estos dos sistemas fue que trabajos previos de nuestro laboratorio han demostrado que es posible transducir eficientemente estas poblaciones *in vivo*, con una toxicidad prácticamente despreciable (Agudo *et al.*, 2002).

En el caso de los cultivos de bulbo raquídeo, nos hemos encontrado unos cultivos que, si bien están compuestos por distintas poblaciones celulares, están altamente enriquecidos en neuronas, constituyendo éstas la fracción claramente mayoritaria. Estas neuronas, además, sobreviven bien en cultivo, estableciendo complejas y profundas redes dendríticas, y son susceptibles de ser eficientemente transducidas por vectores de HSV-1, lo que las convierte en particularmente útiles para nuestros intereses.

Finalmente, también hemos desarrollado un sistema de cultivo mixto de células de cerebelo enriquecido en neuronas de Purkinje. Estas neuronas, que constituyen la única proyección eferente del cerebelo, presentan una muy baja tasa de supervivencia en cultivo, pero constituyen un modelo muy interesante para el estudio de interacciones neurona-glía (Baptista *et al.*, 1994; Morrison y Mason, 1998) y otras funciones neuronales (Brorson *et al.*, 1994; Brorson *et al.*, 1995; Bravin *et al.*, 1999). Con el sistema de cultivo que hemos desarrollado observamos un alto porcentaje de neuronas de Purkinje (hasta un 15-20% de la población total del cultivo) que presentan una profusa red de dendritas cubiertas de espinas dendríticas, síntoma de su buen estado y actividad (Baptista *et al.*, 1994; Kapfhammer, 2004). Además, estas células también son susceptibles de ser eficientemente transducidas con ayuda de vectores herpesvirales, como ya sugerían los trabajos *in vivo*.

Con todos estos sistemas, junto con neuronas de corteza de ratón, que ya habían sido previamente utilizadas en el laboratorio (Alvarez *et al.*, 1999; Perez *et al.*, 2003), y que se sabe que se pueden transducir eficientemente con ayuda de vectores de HSV-1 (Lim *et al.*, 1996), podemos concluir que contamos con una batería de modelos de células neuronales en cultivo en los que llevar a cabo diversos análisis y estudios funcionales.

Para proceder a realizar estos estudios, los vectores derivados de HSV-1 ofrecen una herramienta única para la transferencia génica a estos tipos celulares, por su escasa toxicidad y por la flexibilidad del tamaño de inserto que pueden acomodar, siendo apropiados para transferir fragmentos de pequeño tamaño o loci genómicos completos de hasta 145 Kb, además de la ausencia de riesgo por mutagénesis insercional debido a su carácter episomal (Fink y Glorioso, 1997; Burton *et al.*, 2002; Glorioso y Fink, 2004; Oehmig *et al.*, 2004; Senior y Wade-Martins, 2005).

Disfunción mitocondrial inducida por rotenona

Después de establecer los sistemas celulares en los que realizar nuestros experimentos, seleccionamos un modelo de inducción de muerte celular. Actualmente se utilizan multitud de estímulos apoptóticos para estudiar mecanismos moleculares que conducen a la muerte celular, como la retirada de factores tróficos, la privación de oxígeno, el choque térmico o la administración de agentes tóxicos que produzcan selectivamente daños en el DNA o en determinados orgánulos celulares, como la mitocondria, el retículo endoplásmico o el aparato de Golgi, por poner algunos ejemplos.

Dado el papel central que tiene la mitocondria en las patologías neurodegenerativas (Kroemer *et al.*, 1997; Mattson, 2000; Newmeyer y Ferguson-Miller, 2003; Sastre *et al.*, 2003; Duchon, 2004), centramos nuestra atención en este orgánulo. Para desarrollar un modelo de muerte celular por disfunción escogimos un agente tóxico que inhibe el complejo I mitocondrial: la rotenona (Lindahl y Oberg, 1961). Ya hemos hablado extensamente de la rotenona y de sus posibles implicaciones en la enfermedad de Parkinson en la *Introducción* (Butterfield *et al.*, 1993; Betarbet *et al.*, 2000; Sherer *et al.*, 2002). Independientemente de su validez para desarrollar modelos animales de la enfermedad de Parkinson, sobre la que existen ciertas dudas (Lapointe *et al.*, 2004), sí es cierto que la rotenona, a través de la

inhibición del complejo I mitocondrial, es responsable de una disfunción mitocondrial que dispara un proceso de degeneración neuronal (Barrientos y Moraes, 1999; Kitamura *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2003; Pei *et al.*, 2003; Diaz-Corrales *et al.*, 2004; Kweon *et al.*, 2004; Watabe y Nakaki, 2004; Li *et al.*, 2005; Perier *et al.*, 2005). Es por esto que pensamos que la rotenona nos puede proporcionar un modelo experimental sobre el que diseñar y aplicar estrategias neuroprotectoras.

Protección por inhibición de GSK-3: buscando mecanismos neuroprotectores

Ya ha mencionado la enzima Glucógeno Sintasa Quinasa-3 (GSK-3) en la *Introducción* y su implicación en procesos de muerte celular. Existen inhibidores farmacológicos de GSK-3 de distinta naturaleza química que son mecanísticamente distintos, como el litio (Klein y Melton, 1996; Stambolic *et al.*, 1996), maleimidias (Coghlan *et al.*, 2000; Cross *et al.*, 2001), tiazoles (Bhat *et al.*, 2003) o paulonas (Leost *et al.*, 2000), entre otros. Asimismo se ha visto que la expresión de un mutante con carácter dominante negativo de GSK-3 β , K85R, también puede modular negativamente la actividad de esta enzima (Dominguez *et al.*, 1995; Pap y Cooper, 1998; Munoz-Montano *et al.*, 1999b; Hetman *et al.*, 2000; Sanchez *et al.*, 2001; Perez *et al.*, 2003).

La inhibición de la GSK-3, ya sea crónica o aguda, tiene un efecto protector, en mayor o menor medida, frente a multitud de estímulos pro-apoptóticos, como la retirada de factores tróficos (Pap y Cooper, 1998; Hetman *et al.*, 2000), el péptido β -amiloide (Takashima *et al.*, 1998; Alvarez *et al.*, 1999) distintas toxinas (Elyaman *et al.*, 2002; Song *et al.*, 2002; Watcharasit *et al.*, 2002) o la proteína del prion (Perez *et al.*, 2003), entre otros. Además, evidencias recientes la sitúan por encima de la mitocondria en la cascada de muerte celular (Bijur y Jope, 2003; Linseman *et al.*, 2004; Maurer *et al.*, 2006).

Con todas estas premisas nos planteamos la posibilidad de que la GSK-3 fuese una buena diana terapéutica para los procesos neurodegenerativos que cursan con disfunción mitocondrial. De hecho, se ha visto que el tratamiento con litio puede proteger a las células de la muerte inducida por rotenona (King *et al.*, 2001; King y Jope, 2005; Lai *et al.*, 2006). Por ello, utilizamos vectores amplicones de HSV-1 que codificasen el dominante negativo K85R de GSK-3 β (Munoz-Montano *et al.*, 1999a; Sanchez *et al.*, 2001), y utilizamos también dos inhibidores distintos, LiCl y SB-415286, para confirmar con otra aproximación los datos obtenidos por expresión del mutante.

Los primeros experimentos que realizamos mostraron que era necesario inhibir crónicamente a la GSK-3 antes del tratamiento con rotenona para lograr un efecto neuroprotector significativo (hasta el 50%) frente a la muerte neuronal inducida por el tratamiento con rotenona. De hecho, era necesaria una pre-inhibición crónica de hasta 5 días antes de la exposición a rotenona para lograr el máximo efecto. Y no sólo eso, sino que además no se observó ningún efecto neuroprotector después del co-tratamiento de las células con rotenona en presencia de los inhibidores de GSK-3.

Cuando estudiamos el efecto de la inhibición crónica de la GSK-3 sobre distintos parámetros celulares durante la muerte celular inducida por rotenona, nos encontramos varias situaciones. En primer lugar, observamos que los niveles de protección frente a la muerte neuronal se encuentran en torno al 50%. Además, se bloquean parcialmente la translocación de Bax a la mitocondria, la activación de caspasa-3 y la fragmentación del DNA nuclear. Está descrito que la transcripción de la proteína Bax se induce durante la apoptosis, y está mediada por p53 (Zhan *et al.*, 1994; Miyashita y Reed, 1995). Con respecto a Bax, los niveles en las fracciones citosólica y mitocondrial de esta proteína sugieren que durante la muerte inducida por rotenona se induce su expresión, y las nuevas unidades de Bax sintetizadas *de novo* se translocan a la mitocondria para promover la permeabilidad transitoria y la consiguiente liberación de factores apoptogénicos. Nuestros resultados muestran asimismo que la inhibición crónica de la GSK-3 puede atenuar esta síntesis *de novo* de Bax. Este fenómeno podría ser debido a que la inhibición

crónica de GSK-3 está colaborando a fortalecer parcialmente las células de manera que éstas no se ven forzadas a sufrir un proceso neurodegenerativo.

En su conjunto, estos resultados nos indujeron a pensar que la muerte celular inducida por rotenona no discurre directamente por la vía de GSK-3, a diferencia de otros estímulos pro-apoptóticos, como la inhibición de PI3-K, que pueden ser bloqueados por inhibición directa de GSK-3 (Pap y Cooper, 1998; Cross *et al.*, 2001; Bhat *et al.*, 2003).

Esta hipótesis se ve apoyada por el hecho de que la pentraxina neuronal-1 (NP-1) no experimenta cambios en respuesta a rotenona. La NP-1 es una proteína cuya expresión se ve inducida en neuronas granulares de cerebelo durante la muerte celular por retirada de potasio, y el bloqueo en dicha inducción tiene un efecto protector (DeGregorio-Rocasolano *et al.*, 2001). Se ha visto que esta inducción está mediada por GSK-3, lo que sugiere un mecanismo por el cual GSK-3 podría estar mediando muerte neuronal (Enguita *et al.*, 2005). Sin embargo, nuestros datos relativos a NP-1 sugieren que la GSK-3 parece no estar directamente mediando la muerte inducida por rotenona; al menos no por la vía que implica una sobreexpresión de NP-1.

De hecho, nuestros resultados sugieren que la inhibición crónica de la GSK-3 podría inducir una serie de cambios en el patrón de expresión génica que podrían promover un microambiente celular más resistente a la disfunción mitocondrial. Esta hipótesis no es en absoluto descabellada dado el amplio espectro de sustratos de GSK-3 entre los que se incluyen multitud de factores de transcripción (revisado en Grimes y Jope, 2001).

Así pues, tal vez GSK-3 no estuviese directamente implicada en la muerte celular inducida por la disfunción mitocondrial, pero su inhibición crónica podría propiciar una evolución hacia un fenotipo capaz de resistir con más fuerza los ataques por distintos estímulos pro-apoptóticos. Nos planteamos así comenzar a indagar en algunos de los posibles mecanismos de neuroprotección conferidos por la inhibición crónica de GSK-3. Esto nos ofrece precisamente la oportunidad de encontrar nuevas dianas moleculares para desarrollar estrategias terapéuticas.

Proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2

Existen evidencias de que la sobreexpresión de proteínas anti-apoptóticas de la familia de Bcl-2, como Bcl-2 o Bcl-X_L, puede tener un efecto protector frente a la muerte neuronal, como ya se indicó en la *Introducción* (Linnik *et al.*, 1995; Jia *et al.*, 1996; Lawrence *et al.*, 1996; Blomer *et al.*, 1998; Matsuoka *et al.*, 1999). Es más, existen trabajos previos que muestran que el tratamiento con litio a largo plazo induce la expresión de Bcl-2, lo que podría explicar la protección observada por tratamiento crónico con litio frente a estímulos excitotóxicos (Chen *et al.*, 1999; Chen y Chuang, 1999; Huang *et al.*, 2003; Bush y Hyson, 2006). Estos datos sugieren que tal vez este efecto del litio a largo plazo podría estar mediado por su efecto modulador en la actividad de GSK-3. Es por esto que una de las primeras hipótesis que evaluamos como posible mecanismo neuroprotector derivado de la inhibición crónica de GSK-3 fue un incremento en la expresión de Bcl-2 y Bcl-X_L en células SH-SY5Y diferenciadas tras 5 días de inhibición crónica de GSK-3. Sin embargo, ni la expresión crónica del dominante negativo de GSK-3 β , K85R, ni el tratamiento durante 5 días con los inhibidores SB-415286 o, sobre todo, LiCl, resultaron en un incremento en los niveles de Bcl-2 o Bcl-X_L en nuestro sistema.

El hecho de que este efecto se viera sólo con litio pero no con otros moduladores podría indicar que el incremento en los niveles de Bcl-2 se debe a otros efectos del litio independientes de GSK-3, pero no fue así. Asimismo, inicialmente se podría aducir que en nuestro caso los tratamientos fueron más cortos de los que se habían descrito para ver estos efectos sobre los niveles de Bcl-2, ya que nuestro tratamiento era de 5 días frente a otros tratamientos de 17 días (Bush y Hyson, 2006) o incluso 4 semanas

(Chen *et al.*, 1999). Sin embargo, en otros casos los tratamientos con litio con los que se vio un aumento en los niveles de la proteína Bcl-2 fueron muy similares a los nuestros, tanto en rangos de tiempo como de concentración (Chen y Chuang, 1999; Huang *et al.*, 2003).

Estas diferencias de comportamiento en respuesta al litio podrían deberse por tanto a las diferencias entre los modelos celulares empleados. Nosotros hemos utilizado para nuestros experimentos una población homogénea de células humanas similares a neuronas en cultivo, mientras que en otros trabajos se utilizan neuronas primarias ganglionares de retina (Huang *et al.*, 2003) o granulares de cerebelo (Chen y Chuang, 1999), lo que ya podría explicar, al menos en parte, estas diferencias. Además, el hecho de que estos resultados hayan sido obtenidos de cultivos primarios plantea la cuestión de que tal vez la heterogeneidad del cultivo aporte de alguna manera diferencias debidas a las interacciones entre los distintos tipos celulares, que podrían verse de alguna forma alteradas por acción del litio, resultando finalmente en un mayor incremento en los niveles de Bcl-2 en respuesta a este ion.

En cualquier caso, parece seguro que, al menos en nuestro sistema, el incremento en la expresión de proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 no parece ser uno de los mecanismos neuroprotectores por inhibición crónica de GSK-3 frente a la muerte inducida por rotenona.

Metabolismo glucolítico

La rotenona puede tener distintos efectos en la célula en función de la dosis empleada, siempre derivados de la inhibición del complejo I mitocondrial. A bajas dosis, si bien es capaz de reducir la velocidad respiratoria, su principal efecto es la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS; *Reactive Oxygen Species*). Este tipo de tratamiento va originando un daño crónico por acúmulo de pequeñas lesiones oxidativas. Cuando la dosis es más elevada, este efecto se mantiene, pero además la fuerte inhibición del complejo I suprime la fosforilación oxidativa, causando una drástica disminución en los recursos bioenergéticos de la célula, lo que conduce irremisiblemente a la muerte celular (Li *et al.*, 2003; Sherer *et al.*, 2003a; Zeevalk y Bernard, 2005).

La muerte celular inducida por rotenona se inhibe parcialmente en las células neuronales sometidas previamente a inhibición crónica de la GSK-3, alcanzando cotas de protección de en torno al 50%. Sin embargo, al fijarnos en el potencial de membrana mitocondrial, la preservación de éste alcanza en el mejor de los casos, niveles del 30%. Así pues, ¿qué mecanismo podría tener lugar que esté salvando a las células de la muerte a pesar de que la mitocondria siga en parte afectada?

Ante esta pregunta, formulamos la siguiente hipótesis: tal vez un posible mecanismo neuroprotector derivado de la inhibición crónica de GSK-3 que explique este hecho es que los cambios que están teniendo lugar en la célula estén, de alguna manera, “independizando” a la célula metabólicamente de la mitocondria, esto es, promoviendo un metabolismo más glucolítico. En resumen, la inhibición crónica de GSK-3 podría estar favoreciendo otras vías de producción de ATP alternativas a la mitocondria que ayuden a la célula a conservar su carga bioenergética incluso en situaciones en las que la integridad de la mitocondria está amenazada, de forma que la célula pueda continuar llevando a cabo sus funciones normales.

Una de las vías más básicas de obtención de ATP es la glucólisis, conservada a lo largo de la evolución. Así, ¿sería posible que las células sometidas a una inhibición crónica de la GSK-3 estuviesen consumiendo más glucosa a través de la vía glucolítica? Este hecho podría explicar que, en una situación en que la respiración mitocondrial esté comprometida, como sucede en el tratamiento con rotenona, las células puedan seguir funcionando con una relativa “normalidad”, ya que un incremento en la tasa glucolítica podría compensar en términos de producción de ATP el déficit bioenergético causado por el bloqueo en la fosforilación oxidativa.

Para validar esta hipótesis, lo primero que hicimos fue comprobar si efectivamente el consumo de glucosa a través de la glucólisis estaba incrementado tras la inhibición crónica de GSK-3. Esta comprobación la llevamos a cabo midiendo la liberación al medio extracelular del producto final del metabolismo glucolítico de la glucosa, el lactato (Merlo-Pich *et al.*, 2004). Como se indicó en la sección de *Resultados*, la producción de lactato como consecuencia del metabolismo glucolítico estaba notablemente incrementada tras la inhibición crónica de GSK-3.

A fin de comprobar si este cambio metabólico era, al menos en parte, responsable del efecto neuroprotector frente a la muerte por disfunción mitocondrial, llevamos a cabo un ensayo en el que inhibimos la vía glucolítica con 2-desoxiglucosa (2-DGlc). La inhibición de la glucólisis neutralizó completamente el efecto neuroprotector de la inhibición crónica de la GSK-3, apoyando nuestra hipótesis de un cambio hacia un metabolismo menos dependiente de la respiración mitocondrial.

Dado que nuestros datos apuntaban a un incremento en el metabolismo glucolítico, quisimos estudiar con mayor profundidad la incidencia de la inhibición crónica de la GSK-3 en este proceso celular en nuestras células. Para ello analizamos la localización subcelular de algunos transportadores de glucosa, con objeto de averiguar si ésta estaba alterada.

Nos fijamos particularmente en los transportadores de glucosa 1 y 3 (GLUT1 y GLUT3, respectivamente), por su especial relevancia con respecto a otros transportadores en el sistema nervioso de mamíferos (Maher *et al.*, 1994; Duelli y Kuschinsky, 2001); en este sentido hemos dejado GLUT5 al margen, ya que si bien es un transportador de monosacáridos presente en el sistema nervioso, tiene una afinidad mayor por fructosa que por glucosa.

La expresión de GLUT1 se da de manera preferente en células gliales, aunque se puede encontrar en prácticamente todos los tipos celulares del sistema nervioso; GLUT3 sin embargo es específico de neuronas. Se ha visto que la localización en membrana y la actividad de ambos transportadores pueden verse incrementadas en determinadas condiciones, como estrés, diabetes o hipoglicemia (Maher *et al.*, 1994; Uehara *et al.*, 1997; Vannucci *et al.*, 1997; Duelli y Kuschinsky, 2001). La presencia de GLUT1 y GLUT3 pudo ser detectada en células SH-SY5Y diferenciadas, y la intensidad de fluorescencia se vio significativamente incrementada para el transportador GLUT3 en el caso de las células sometidas a inhibición crónica de la GSK-3. De manera más precisa, medimos también la intensidad de señal en la región de la membrana plasmática, donde el incremento en la inmunorreactividad era aún mayor. En el caso de GLUT1 no observamos cambios significativos.

El interés de este resultado radica en que este aumento en la localización de GLUT3 en la membrana plasmática tras la inhibición crónica de GSK-3 podría significar que la célula, de algún modo, está propiciando una mayor disponibilidad de glucosa, facilitando el transporte desde el exterior celular al citosol. Esto es aún más llamativo si tenemos en cuenta que GLUT3 tiene una afinidad por glucosa mucho mayor que GLUT1, siendo capaz de mediar la entrada de glucosa en la célula incluso en condiciones en las que la concentración de este metabolito en el medio extracelular es baja.

Por último, también nos hemos interesado por la enzima glucolítica hexoquinasa y su relación con la mitocondria. Existen trabajos previos que muestran una mayor actividad hexoquinasa cuando ésta está ligada a la mitocondria (Adams *et al.*, 1988; Pastorino y Hoek, 2003). Además, existen evidencias que sugieren una función antiapoptótica para la hexoquinasa cuando está unida a la mitocondria (Pastorino *et al.*, 2002; Pastorino y Hoek, 2003; Azoulay-Zohar *et al.*, 2004; da-Silva *et al.*, 2004). Nos hemos centrado particularmente en dos isoformas, hexoquinasa I (HKI), la forma predominante en sistema nervioso, y hexoquinasa II (HKII) de expresión más variable, modulada por cambios en la concentración de glucosa, presencia de factores tróficos o señalización por distintas vías en respuesta a determinados estímulos (Gottlob *et al.*, 2001; Pastorino y Hoek, 2003).

Nuestros datos sugieren un mayor aumento en la inmunorreactividad de HKII en células sometidas a inhibición crónica de GSK-3 durante 5 días, y este incremento se da fundamentalmente a nivel mitocondrial. Mientras que los niveles totales de HKII aumentan muy poco tras la inhibición crónica de la GSK-3, sí parece evidente que hay una mayor cantidad de HKII unida a la membrana mitocondrial. Como ya se ha mencionado, esta unión podría tener un doble papel. En primer lugar, el hecho de que la actividad hexoquinasa sea mayor cuando la enzima está asociada a la mitocondria (Adams *et al.*, 1988; Pastorino y Hoek, 2003) es consistente con nuestra hipótesis de un mayor consumo de glucosa a través de la glucólisis. Y, en segundo lugar, y dado que la HKII se ancla a la mitocondria a través del canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC; *Voltage-Dependent Anion Channel*), la interacción HKII-VDAC estaría impidiendo el acceso de Bax y, por tanto, impidiendo así la subsiguiente permeabilidad transitoria que precede a la liberación del citocromo c y otros factores apoptogénicos (Pastorino *et al.*, 2002; Azoulay-Zohar *et al.*, 2004). Finalmente hay evidencia de que la disociación de HKII de la mitocondria puede preceder a la apoptosis incluso en ausencia de Bax y Bak, si bien con una cinética mucho más lenta (Majewski *et al.*, 2004a). En cualquier caso, sí parece claro que la unión de HKII a la mitocondria es sinónimo de resistencia a muerte celular.

Este papel anti-apoptótico de la HKII también es consistente con nuestros datos en los que se muestra una disminución de la translocación de Bax a la mitocondria durante la apoptosis inducida por rotenona tras la inhibición crónica de la GSK-3. Por otro lado, antes hemos hablado de la aparente reducción en la síntesis *de novo* de Bax en células sometidas a inhibición crónica de la GSK-3. Precisamente, y a la luz de nuestros resultados que sugieren una posible implicación de la glucólisis como mecanismo neuroprotector, se podría plantear que precisamente este incremento en la vía glucolítica estaría compensando el déficit bioenergético inducido por la inhibición del complejo I con rotenona, por lo que las células no se verían tan forzadas a activar un programa de muerte celular. Harán falta más experimentos para confirmar esta hipótesis.

Se ha hablado anteriormente de un trabajo reciente que ha relacionado GSK-3 y HKII (Pastorino *et al.*, 2005). Este trabajo propone una fosforilación directa de VDAC por GSK-3, interrumpiendo la interacción entre HKII y la mitocondria. Nuestros datos, si bien van en la misma línea de regulación de la asociación HKII-VDAC por GSK-3, intuitivamente sugieren un mecanismo que difiere del anterior, ya que, en nuestro caso, hacen falta varios días de inhibición crónica de GSK-3 para que se pueda apreciar la translocación de HKII a la mitocondria, por lo que pensamos que esta redistribución subcelular de HKII es la consecuencia de una serie de cambios en el patrón de expresión génica de la célula, mientras que el mecanismo propuesto por Pastorino *et al.* (2005) implica una relación directa entre GSK-3 y VDAC (en nuestro sistema, la translocación empieza a verse tras 4 días de inhibición crónica, no antes; datos no mostrados).

Estas diferencias, sin embargo, no son completamente irreconciliables, ya que en primer lugar hay que señalar que el trabajo mencionado fue realizado en la línea celular HeLa (Pastorino *et al.*, 2005), con lo cual la diferencia fenotípica entre dicho sistema celular y el nuestro ya podría explicar en parte los resultados obtenidos; y, en segundo lugar, nosotros hemos aplicado una inhibición de la GSK-3 más suave, mientras que en el estudio de Pastorino *et al.* (2005) emplean tratamientos más agudos, tanto a nivel de inhibición de GSK-3 como de PI3-K y Akt, con lo que los efectos observados son diferentes. Por otro lado, otro trabajo describe la disociación de hexoquinasa de la mitocondria promovida por litio en una línea celular de melanoma de ratón (Penso y Beitner, 2003). Si bien los autores de este trabajo no profundizan exhaustivamente en los mecanismos moleculares subyacentes a este fenómeno, sí parece claro que la relación entre hexoquinasa y mitocondria podría estar modulada por la actividad GSK-3, aunque los mecanismos responsables puedan variar ostensiblemente en función del tipo celular.

En cualquier caso, en los últimos años se han ido acumulando evidencias a favor de una estrecha regulación del metabolismo por distintas vías de señalización (Vander Heiden *et al.*, 2001; Kuznetsov *et al.*, 2004), incluyendo la vía de PI3-K/Akt/GSK-3 (Clodfelder-Miller *et al.*, 2005). También se ha visto cómo algunas proteínas de la maquinaria apoptótica están íntimamente acopladas al metabolismo basal, de manera que pueden actuar como sensores que disparan procesos de muerte en caso de que la célula no disponga de nutrientes o recursos suficientes para continuar con sus procesos fisiológicos normales (Danial *et al.*, 2003; Nutt *et al.*, 2005). Nuestros resultados, en definitiva, no sólo apuntan a un posible papel neuroprotector del metabolismo glucolítico, sino que están en consonancia con esta línea de relación íntima entre el metabolismo y la apoptosis; aunque evidentemente harán falta más experimentos para poder desenmarañar en profundidad los cambios que están teniendo lugar sobre los procesos metabólicos tras la inhibición crónica de GSK-3 en células neuronales.

Acción del BDNF

Como posible mecanismo neuroprotector nos planteamos la posible implicación de la neurotrofina BDNF, dado su papel en la señalización anti-apoptótica así como su efecto neuroprotector en algunos modelos de daño neuronal (Tong y Perez-Polo, 1998; Hammond *et al.*, 1999; Hetman *et al.*, 1999; Chao, 2003; Perez-Navarro *et al.*, 2005). Las evidencias previas de que el tratamiento crónico con litio incrementa la expresión de BDNF en células neuronales (Fukumoto *et al.*, 2001; Hashimoto *et al.*, 2002) nos llevaron a pensar que tal vez este efecto fuese una consecuencia de la inhibición crónica de GSK-3. Por ello, en primer lugar, medimos los niveles de BDNF secretados al medio por las células tras 5 días de inhibición crónica de la GSK-3, y observamos que, efectivamente, las células en las que la GSK-3 había sido inhibida durante 5 días secretaban una cantidad superior de BDNF al medio extracelular.

A continuación, analizamos las posibles implicaciones funcionales de este incremento en la producción de BDNF. Nuestros datos sugerían que un pre-tratamiento de 24 horas con BDNF tenía un efecto neuroprotector modesto pero significativo frente a la muerte inducida por rotenona, por lo que tal vez el aumento en la secreción de BDNF derivado de la inhibición crónica de GSK-3 podía tener también un efecto neuroprotector. Para validar esta hipótesis quisimos interferir en la vía de señalización de BDNF utilizando K252a, un inhibidor de la actividad tirosina-quinasa del receptor TrkB, responsable de transducir la señalización por BDNF al interior celular.

Nuestro estudio mostró que la interferencia en la señalización del BDNF atenúa significativamente el efecto neuroprotector derivado de la inhibición crónica de GSK-3; sin embargo, este efecto no era neutralizado en su totalidad, sino que aún persistía una moderada pero consistente protección a pesar del tratamiento con K252a. A la dosis empleada de K252a (50 nM) el efecto protector de la administración directa de BDNF era prácticamente abrogado en su totalidad. Probamos dosis más elevadas de K252a (hasta 200 nM) que tenían una cierta toxicidad, con las que observamos que el efecto del BDNF desaparecía por completo; sin embargo un modesto pero significativo efecto protector frente a rotenona continuaba persistiendo en aquellas células sometidas a inhibición crónica de la GSK-3 incluso a las dosis más elevadas de K252a (datos no mostrados). Tomados en su conjunto, estos datos nos llevaron a concluir que el incremento en la secreción de BDNF como consecuencia de la inhibición crónica de la GSK-3 es responsable sólo de parte del efecto neuroprotector frente a la muerte celular desencadenada por la disfunción mitocondrial tras el tratamiento con rotenona.

Análisis de la expresión génica. Estudios de transcriptómica

Finalmente, y ya que el núcleo principal de nuestra hipótesis para explicar los mecanismos moleculares subyacentes a la neuroprotección derivada de la inhibición crónica de GSK-3 apuntaba a posibles cambios en la expresión génica, nos propusimos llevar a cabo un análisis a gran escala de expresión génica mediante técnicas de *microarrays* de DNA. Realmente, al hablar de neuroprotección tras una inhibición crónica de GSK-3 de cinco días, es difícil escoger un tiempo adecuado para realizar el análisis. A cinco días nos podríamos encontrar que ya todos los cambios han tenido lugar, por lo que nos encontramos un escenario de mayor resistencia a la apoptosis, pero sin saber exactamente qué ha pasado en todo ese tiempo. Es por eso que seleccionamos tres días, momento en el cual se empieza a atisbar efecto neuroprotector significativo.

El análisis transcriptómico a gran escala nos ayudó a encontrar algunos genes candidatos que podían resultar interesantes. Por ejemplo, el inhibidor de la kexina de tipo 1 (PCSK1N), que de acuerdo con los *microarrays* se encontraría reprimido tras la inhibición crónica de la GSK-3, podría ser en parte responsable del aumento en la producción de BDNF, ya que su acción inhibitoria sobre la actividad de la proconvertasa / kexina de tipo 1 - encargada de procesar el pro-BDNF inactivo para generar BDNF – se vería atenuada (Seidah *et al.*, 1999). También la proteína ADAM28, cuya expresión según los *microarrays* se ve aumentada tras la expresión del dominante negativo de GSK-3, podría estar favoreciendo una señalización de supervivencia más robusta a través de la proteólisis de factores que señalizan muerte celular (Fourie *et al.*, 2003; Mochizuki *et al.*, 2004; Ohtsuka *et al.*, 2006). O el caso de Mdm2, cuya expresión incrementada tras inhibición crónica de GSK-3 podría estar acelerando la tasa de proteólisis del gen supresor de tumores p53 por la vía de ubiquitina-proteosoma (Fang *et al.*, 2000).

Desafortunadamente, la validación por RT-PCR cuantitativa de los genes que hemos seleccionado de los datos obtenidos de los *microarrays* ha sido inconcluyente, excepto en el caso de la protocadherina-8, que se encuentra sobreexpresada tras inhibición crónica de la GSK-3. Este gen está implicado en adhesión celular en el sistema nervioso y posiblemente es un mediador de la señalización por la vía de la reelina y de la neurotransmisión por receptores NMDA en el proceso de potenciación a largo plazo de la memoria (LTP; *Long-Term Potentiation*), por lo que también podría estar mediando señalización de supervivencia (Strehl *et al.*, 1998; Yagi y Takeichi, 2000).

Este hecho pone de manifiesto la necesidad de llevar a cabo otras aproximaciones experimentales complementarias para que podamos ir desentrañando poco a poco las bases moleculares de la neuroprotección derivada de la inhibición crónica de la GSK-3, además de acometer estudios centrados en el curso temporal de los cambios en la expresión génica, para poder situar cada evento en un momento concreto. Por otra parte, hace reflexionar sobre las técnicas de análisis de expresión génica a gran escala. El volumen de datos generado con estas técnicas es muy elevado y valioso, proporcionando posibles puntos de partida en muchos casos insospechados para el estudio de las bases moleculares de diversos procesos biológicos. Sin embargo, no hay que aceptar estos datos sin cuestionarse su validez, por lo que la confirmación funcional se hace imprescindible (Jarvinen *et al.*, 2004; Allison *et al.*, 2006; Draghici *et al.*, 2006).

Modelo integrado hipotético de neuroprotección por inhibición crónica de la GSK-3

Los resultados que tenemos proponen dos mecanismos moleculares mediante los cuales la inhibición crónica de GSK-3 podría proteger frente a la muerte neuronal inducida por rotenona. El primero, la translocación de HKII a la mitocondria, con un doble papel antiapoptótico y metabólico, fomentando un incremento en la glucólisis que se ve sostenida por la mayor presencia del transportador de glucosa GLUT3 en la membrana plasmática, lo que podría estar compensando el déficit bioenergético causado por la inhibición del complejo I. El segundo, un aumento en la producción y secreción de BDNF,

que podría estar promoviendo la supervivencia neuronal; de hecho, el tratamiento con BDNF protege parcialmente frente a la muerte inducida por rotenona.

No tenemos una secuencia temporal de los cambios que tienen lugar, es decir, no sabemos qué ocurre antes, si la translocación de HKII a la mitocondria, la translocación de GLUT3 a la membrana plasmática o la secreción aumentada de BDNF al medio extracelular. Tampoco sabemos si estos hechos son independientes o están interrelacionados, al menos en parte, entre sí. Sí que hay evidencias de que la señalización desencadenada por algunos factores tróficos actúa sobre el metabolismo de la glucosa (Vander Heiden *et al.*, 2001), y, de hecho, se ha demostrado que el BDNF puede estimular el metabolismo glucolítico en neuronas de corteza a través de acciones que incluyen, entre otras, el incremento de GLUT3 en la membrana o la síntesis de proteínas (Burkhalter *et al.*, 2003). Además, el BDNF puede activar, a través de su receptor de membrana con actividad tirosina-quinasa TrkB, las vías de señalización de MAPK y de PI3-K/Akt (Hetman *et al.*, 1999). Se sabe que la activación de Akt propicia en parte la translocación de HKII a la mitocondria (Gottlob *et al.*, 2001; Majewski *et al.*, 2004b), sin contar con el reciente trabajo ya discutido que muestra que la GSK-3 podría estar regulando directamente el grado de asociación HKII-mitocondria por medio de la fosforilación de VDAC (Pastorino *et al.*, 2005).

Todos estos datos nos sugieren un posible escenario en el que, en parte vía señalización por BDNF, en parte por otros mecanismos aún por determinar, se estuviese orquestando en la célula un programa integrado en el que confluyen la activación de vías de supervivencia con un incremento en el metabolismo glucolítico, y todo desencadenado por la inhibición crónica de GSK-3 (esquemático en la **figura 50**).

Evidentemente, este planteamiento no deja de ser una hipótesis de trabajo que habrá que validar a nivel funcional, llevando a cabo un diseño experimental dirigido a comprobar si todas estas interacciones con las que estamos especulando están realmente teniendo lugar. Asimismo, es fundamental estudiar minuciosamente los eventos que acaecen durante las fases más tempranas de la inhibición crónica de la GSK-3, para intentar empezar a identificar posibles factores de transcripción u otras cascadas de señalización implicados en los procesos que hemos descrito.

En esta línea, recientemente se ha mostrado la fosforilación del factor de transcripción Nrf-2 por parte de GSK-3, lo cual determina su exclusión nuclear (Salazar *et al.*, 2006). Precisamente, la inhibición de GSK-3 podría estar liberando este factor, permitiendo que se transcriban los genes diana del mismo, que forman parte de la respuesta antioxidante. Este trabajo pone de manifiesto la necesidad de profundizar en la regulación de la expresión génica por GSK-3 en función del tipo celular.

En cualquier caso, está claro que la inhibición de la GSK-3 confiere protección frente a numerosos estímulos pro-apoptóticos. Una estrategia de terapia génica basada en la administración de un vector codificando un dominante negativo de la GSK-3 podría tener alguna ventaja respecto a la terapia farmacológica con inhibidores ya que la GSK-3 es una quinasa de expresión ubicua implicada en numerosos procesos celulares. La posibilidad de modular negativamente la actividad de la GSK-3 sin inhibirla por completo de manera selectiva en determinadas células abre una nueva vía terapéutica frente a ciertos trastornos neurodegenerativos que no siempre es viable por medio de inhibidores farmacológicos, por la dificultad de éstos para atravesar la barrera hematoencefálica en algunos casos y por los impredecibles efectos secundarios derivados de una inhibición sistémica de la enzima. Al fin y al cabo, el ratón *knock out* de la GSK-3 presenta letalidad embrionaria por degeneración hepática severa durante el desarrollo (Hoeflich *et al.*, 2000), y existen datos que correlacionan una disminución en la actividad de GSK-3 con la progresión tumoral (Manoukian y Woodgett, 2002; Lustig y Behrens, 2003). En este sentido, una terapia génica dirigida a la inhibición selectiva de la GSK-3 en ciertas poblaciones

neuronales podría ser ventajosa respecto a la inhibición sistémica de la GSK-3 en todos los órganos y tejidos.

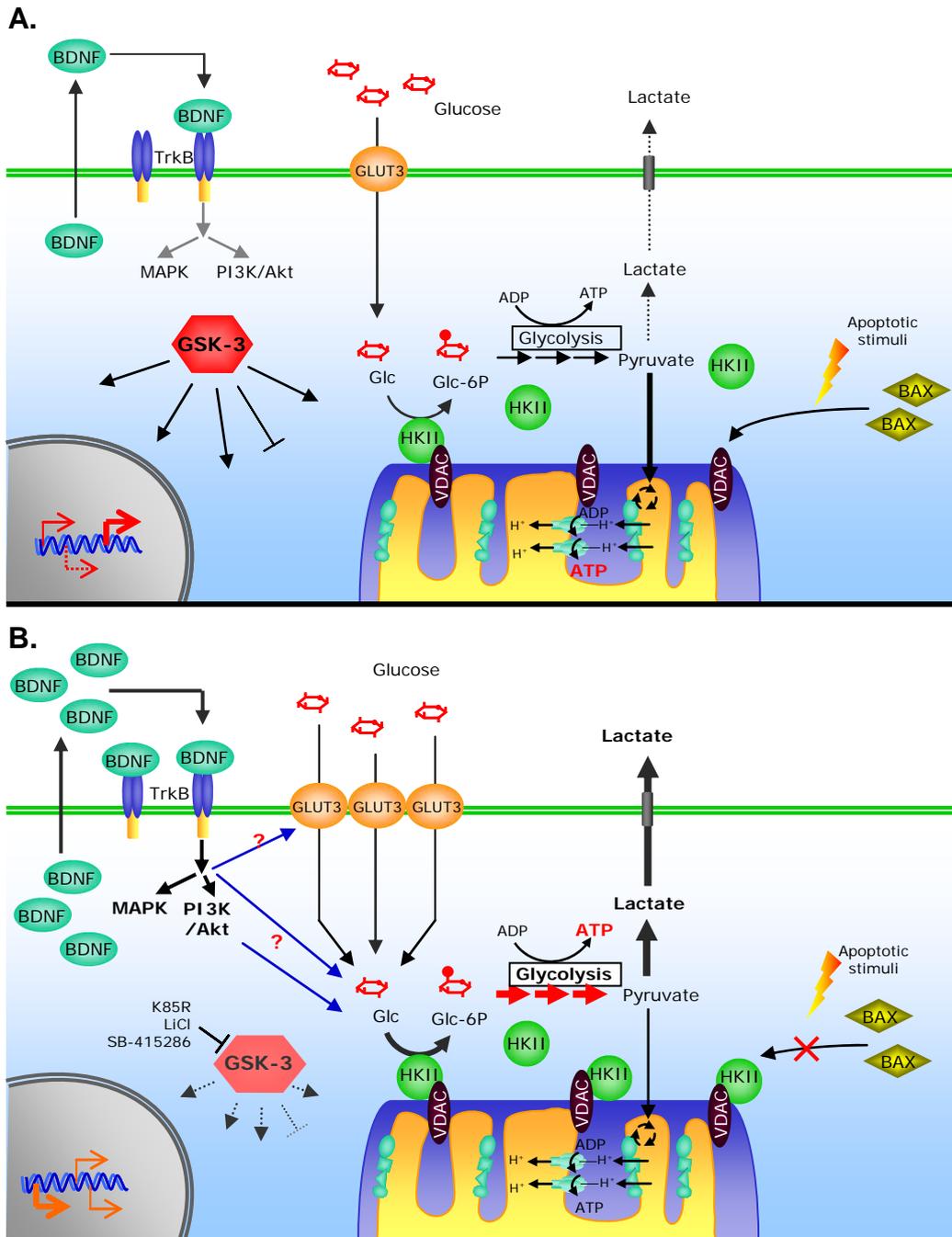


Figura 50. Modelo hipotético de neuroprotección por inhibición crónica de GSK-3. El esquema muestra la situación de una célula neuronal en condiciones normales (**A**) y en condiciones de inhibición de GSK-3 (**B**). **A.** En condiciones normales, la célula tiene un patrón de expresión génica determinado y secreta una moderada cantidad de BDNF que puede señalizar por distintas vías de supervivencia. Además, la presencia de transportadores de glucosa en la membrana hace que pueda entrar glucosa en la célula que se metaboliza por la vía glucolítica y posteriormente por la vía oxidativa mitocondrial. **B.** Tras inhibición crónica de GSK-3, el patrón de expresión génica podría cambiar, conduciendo a una mayor producción de BDNF, por lo que la señalización de supervivencia sería más robusta. Además, mediante señalización de BDNF o por otras vías, la mayor presencia del transportador de glucosa GLUT3 en la membrana plasmática facilitaría una mayor entrada de glucosa en la célula, aumentando además el metabolismo anaerobio independiente de la mitocondria. Por otra parte, la mayor presencia de HKII en la mitocondria haría a la célula más resistente a estímulos apoptóticos impidiendo la translocación de Bax.

Neuroprotección frente a la disfunción mitocondrial por expresión de frataxina

El primer abordaje de estrategia de neuroprotección que llevamos a cabo fue el de transferencia de un gen que podía bloquear la muerte celular: el dominante negativo de GSK-3. Diseñamos a continuación un abordaje distinto: transferir un gen que, en vez de bloquear la muerte, pudiese promover la supervivencia de las neuronas.

En este contexto, escogimos el gen *FRDA* por diversos motivos. Este gen codifica la frataxina, una proteína mitocondrial (Campuzano *et al.*, 1997) cuya función no está muy bien establecida, si bien una deficiencia en esta proteína es la responsable de la ataxia de Friedreich (Campuzano *et al.*, 1996). Las evidencias existentes la implican en procesos que tienen que ver con el metabolismo mitocondrial, como la biosíntesis de complejos hierro-azufre o estimulación de la fosforilación oxidativa, por mencionar algunos ejemplos (Ristow *et al.*, 2000; Bulteau *et al.*, 2004; Gonzalez-Cabo *et al.*, 2005); y también hay trabajos que sugieren que la frataxina podría intervenir en la inducción de una respuesta antioxidante, si bien no tiene una función antioxidante por sí misma (Chantrel-Groussard *et al.*, 2001; Shoichet *et al.*, 2002). Además, la eliminación completa del gen de la frataxina resulta letal durante el desarrollo embrionario del ratón (Cossee *et al.*, 2000), y su reducción acorta la esperanza de vida media en *C. elegans* (Vazquez-Manrique *et al.*, 2006). Es por esto que quisimos comprobar si el aumento en la expresión de frataxina en células neuronales por medio de vectores de HSV-1 protegía a dichas células de la disfunción mitocondrial inducida por rotenona. De hecho, recientemente se ha publicado que la sobreexpresión de frataxina, incluso de un mutante que permanece extramitocondrial, puede proteger células normales de distintos estímulos apoptóticos, aunque los mecanismos de esta protección no están del todo claros (Condo *et al.*, 2006).

Construcción de vectores genómicos

Quisimos además abordar la expresión de frataxina de dos maneras distintas, en ambos casos empleando vectores de HSV-1. Utilizamos para ello dos vectores. El primero es un vector convencional, que codifica el cDNA de frataxina bajo el control de un promotor viral (generado en el laboratorio por la Dra. Belén Illana). El segundo supone introducir todo el locus genómico *FRDA* que codifica la frataxina humana en un vector viral. Este vector ha sido generado en colaboración con el laboratorio del Dr. Richard Wade-Martins, que desarrolló una técnica para recombinar un locus genómico completo clonado en un BAC o un PAC con secuencias de HSV-1, de manera que es posible empaquetar un locus genómico en un vector viral derivado de HSV-1 (Wade-Martins *et al.*, 2001; Wade-Martins *et al.*, 2003; Inoue *et al.*, 2004). El empaquetamiento de un locus genómico, por su tamaño, generalmente sólo puede ser llevado a cabo en vectores derivados de HSV-1, capaces de albergar construcciones de hasta 155 kb de DNA exógeno (Fink y Glorioso, 1997; Burton *et al.*, 2002; Oehmig *et al.*, 2004).

Existen una serie de ventajas de los vectores genómicos sobre los convencionales (revisado en Senior y Wade-Martins, 2005). Al poseer todas las secuencias reguladoras nativas (región promotora, exones, intrones...), la regulación de la expresión del vector será muy precisa, tanto en cuanto a los niveles de proteína obtenidos, muy cercanos a los niveles fisiológicos en función del tipo celular, como en términos de procesamiento del mRNA, pudiendo obtener la expresión de distintas isoformas específicas de tejido con un único vector. Además, el control de la expresión bajo un promotor celular hace que la persistencia del vector pueda ser mucho más sostenida que la de los vectores en los que la expresión está bajo el control de un promotor viral, que tienden a silenciarse con el tiempo. Estos vectores son, por tanto, idóneos para estudios de expresión génica o para rescates de función en células o tejidos en los que hay un gen deficiente.

La frataxina humana es una proteína pequeña (unos 17 KDa) codificada en el locus *FRDA*, que abarca unas 80 Kb en el cromosoma 9 (Campuzano *et al.*, 1996). Además, presenta distintas isoformas, una mayoritaria y dos minoritarias, cuya relevancia funcional es del todo desconocida (Campuzano *et al.*, 1996; Pianese *et al.*, 2002). De esta forma, pensamos que el locus *FRDA* era un buen candidato para ser introducido en un vector HSV-1; este vector genómico nos aseguraría la expresión de las 3 isoformas en su proporción relativa adecuada con un único vector.

Como se ha detallado en las secciones *Materiales y Métodos* y *Resultados*, la construcción de un vector de HSV-1 que codifica un locus genómico completo es posible gracias a la existencia de sitios LoxP en todos los clones de BACs y PACs (Shizuya *et al.*, 1992; Ioannou *et al.*, 1994), de manera que por la técnica de “retrofitting”, o recombinación específica de sitios LoxP mediada por la recombinasa CRE del fago P1, se puede subclonar un locus genómico en un vector amplicón de HSV-1 que también lleve un sitio LoxP en su estructura. Únicamente hay que tener en cuenta que en ocasiones el tamaño de los BACs o PACs procedentes de librerías genómicas excede en mucho la capacidad de los vectores de HSV-1; es por ello que en este caso hay que reducir el inserto genómico previamente al paso de “retrofitting”, preservando por supuesto la integridad del locus de interés.

En nuestro caso concreto, pudimos excepcionalmente reducir el clon RP11-265B8 mediante técnicas tradicionales de biología molecular por la existencia de dos sitios únicos de restricción que, por su posición, nos permitieron reducir el clon a un tamaño idóneo para los pasos siguientes, preservando por completo su estructura. Sin embargo, este hecho es, efectivamente, excepcional, ya que el enorme tamaño de los BACs o PACs hace prácticamente imposible su manipulación con enzimas de restricción. El trabajo con construcciones de este calibre ha de llevarse a cabo rutinariamente mediante técnicas de recombinación homóloga (Zhang *et al.*, 2000; Muyrers *et al.*, 2001; Muyrers *et al.*, 2004).

Protección frente a rotenona por expresión de frataxina

Después de haber generado la construcción genómica de frataxina y comprobar que se expresaba correctamente, comprobamos, mediante un ensayo de viabilidad, que la expresión de frataxina humana tenía un modesto pero significativo efecto protector frente a la muerte celular inducida por rotenona a bajas dosis en neuronas primarias de corteza de ratón.

Ya que las funciones de la frataxina no están completamente establecidas, los mecanismos moleculares subyacentes a la protección que proporciona la expresión de frataxina humana en neuronas murinas no están muy claros. Adicionalmente, harán falta más experimentos para dilucidar dichos mecanismos con precisión; mientras tanto, únicamente podemos movernos en el terreno especulativo apoyándonos en las evidencias disponibles.

Una primera hipótesis que se podría barajar, y teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, es que si la frataxina pudiera, de alguna manera, inducir la respuesta antioxidante de la célula (Chantrel-Groussard *et al.*, 2001; Shoichet *et al.*, 2002), tal vez el incremento en la expresión de frataxina que estamos originando con nuestros vectores virales estaría disparando esta respuesta y colaborando así en la protección frente a la muerte inducida por rotenona.

Sin embargo, y sin descartar en absoluto esta posibilidad, favorecemos una hipótesis alternativa. Una de las funciones que se propone para la frataxina es la de estimular la fosforilación oxidativa (Ristow *et al.*, 2000). De hecho, se ha demostrado la interacción física entre la frataxina y la enzima succinato deshidrogenasa del complejo II mitocondrial (Gonzalez-Cabo *et al.*, 2005). En este trabajo, los autores proponen que esta interacción podría estar mediando el ensamblaje de la enzima con su complejo Fe-S y el resto de las subunidades del complejo y regulando así su actividad, además de facilitar la entrada de electrones a la cadena respiratoria a través del complejo II.

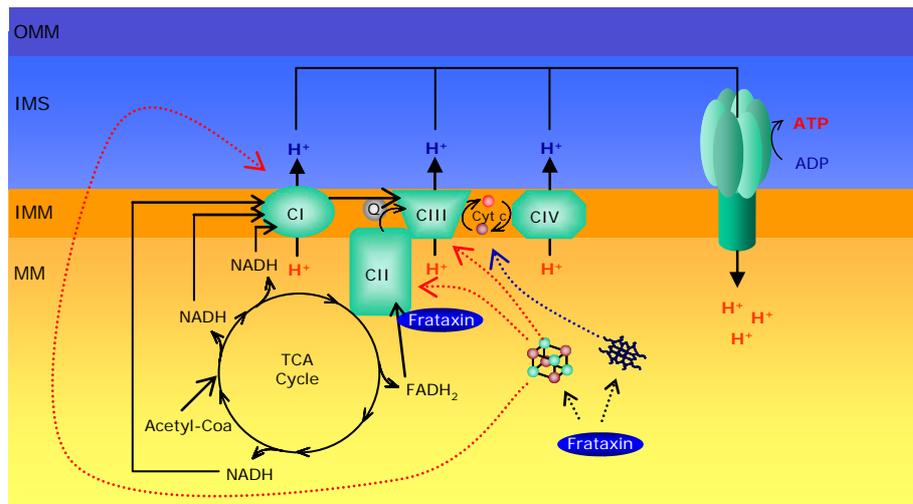
Esta posibilidad podría explicar la protección frente a rotenona que observamos por la expresión de frataxina. En una situación normal, las células tienen ya sus niveles fisiológicos de frataxina y los complejos de la cadena transportadora de electrones están funcionando a un nivel normal. Sin embargo, cuando tratamos las células con rotenona, la inhibición del complejo I mitocondrial desencadena un proceso de déficit en el transporte de electrones, con la subsiguiente catástrofe bioenergética y generación de ROS que finalmente llevan a la muerte celular. Cuando expresamos frataxina, sobre todo con el vector genómico, no estamos hablando de una sobreexpresión masiva, como sucedía anteriormente con los vectores de GSK-3. En este caso estamos incrementando ligeramente el “*pool*” celular de frataxina. Quizá este pequeño incremento podría estar ayudando a estimular la entrada de electrones a través del complejo II, de forma que, a excepción del complejo I, el resto de la cadena transportadora, estimulada por el incremento en frataxina, estaría funcionando a un ritmo superior al habitual, y compensando así a la deficiencia en complejo I.

Adicionalmente, y teniendo en cuenta los trabajos que implican a la frataxina en la formación de complejos Fe-S (Bulteau *et al.*, 2004; Stehling *et al.*, 2004; Anderson *et al.*, 2005) y en la biosíntesis del grupo hemo (Yoon y Cowan, 2004; Schoenfeld *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005), quizá el modesto incremento en los niveles de frataxina mediado por los vectores de expresión esté promoviendo, a través del ensamblaje de un mayor número de complejos Fe-S y de la síntesis del grupo hemo, una mayor actividad de los complejos I (inhibido por la rotenona en nuestro modelo de disfunción mitocondrial) y III, además del complejo II, y un incremento asimismo en los niveles o al menos en la actividad de citocromo c. Esto plantea un hipotético modelo de protección frente a la disfunción mitocondrial por expresión de frataxina en el cual la inhibición del complejo I es compensada parcialmente por una afluencia mayor de electrones a través del complejo II y una actividad respiratoria más elevada en los complejos que no están afectados (este modelo hipotético está representado en la **figura 51**). En cualquier caso, harán falta más evidencias experimentales en el futuro para validar este hipotético mecanismo.

En cualquier caso, y como se ha apuntado anteriormente, este tipo de vectores genómicos están particularmente indicados para el rescate de función (Wade-Martins *et al.*, 2001; Wade-Martins *et al.*, 2003; Inoue *et al.*, 2004). Es por esto que quizá el vector genómico de frataxina que hemos generado podría ser empleado con razonable éxito para el tratamiento de la ataxia de Friedreich, causada por una reducción en los niveles de frataxina por debajo del 25% con respecto a los niveles normales. Precisamente, trabajos previos han mostrado que la introducción del locus humano *FRDA* en un ratón *knock-out* de frataxina es capaz de rescatar el fenotipo letal embrionario (Sarsero *et al.*, 2004), y más recientemente se ha descrito también el rescate parcial del fenotipo patológico de fibroblastos de pacientes de ataxia de Friedreich mediante la transferencia del cDNA de frataxina utilizando vectores derivados de lentivirus y de AAV (Fleming *et al.*, 2005). Nuestros resultados también indican que el vector genómico de frataxina es capaz de rescatar el fenotipo de los fibroblastos de pacientes con ataxia de Friedreich (Gomez-Sebastian *et al.*, 2006, en preparación).

Sin menospreciar en absoluto la calidad de los vectores de cDNA como herramientas para estudios básicos y aplicados, el vector genómico de frataxina que hemos generado aún las grandes ventajas de los trabajos anteriores. En primer lugar, el empleo del locus genómico para generar ratones transgénicos en lugar un cDNA, tal y como sugiere el trabajo de Sarsero *et al.* (2004) permite alcanzar niveles fisiológicos de frataxina regulados adecuadamente de una manera específica de tejido. Por otro lado, la posibilidad de empaquetar este locus genómico en un vector viral podría abrir un amplio abanico de posibilidades en el campo de la terapia génica para la administración *in vivo* de esta construcción; más aún si tenemos en cuenta que los vectores herpesvirales muestran un especial tropismo hacia las neuronas, también *in vivo*.

A.



B.

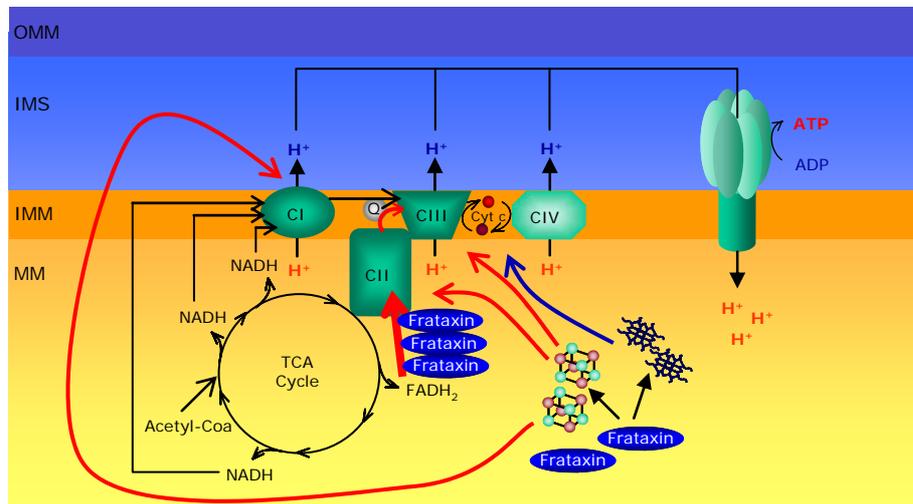


Figura 51. Modelo hipotético de neuroprotección por expresión de frataxina. El esquema muestra la situación de una célula neuronal en condiciones normales (**A**) y en condiciones de expresión incrementada de frataxina (**B**). **A.** En condiciones fisiológicas, la célula lleva a cabo la fosforilación oxidativa con su tasa habitual. La frataxina basal facilitaría la entrada de electrones en la cadena respiratoria a través del complejo II y contribuiría a la formación de complejos Fe-S (necesarios para el correcto funcionamiento de los complejos I, II y III) y a la síntesis del grupo hemo (necesario para el ensamblaje del citocromo c). **B.** Tras el incremento en la expresión de frataxina, la tasa de entrada de electrones a través del complejo II sería más elevada. Además, un aumento en la síntesis de complejos Fe-S y del grupo hemo podría tener como consecuencia una mayor actividad de los complejos I, II y III, así como del citocromo c. Por tanto, incluso en condiciones de inhibición del complejo I, el resto de la maquinaria de la cadena respiratoria podría funcionar a un ritmo más elevado del fisiológico, compensando así la depleción energética causada por rotenona. (OMM, *Outer Mitochondrial Membrane*, membrana externa mitocondrial; IMS, *Intermembrane Space*, espacio intermembrana; IMM, *Inner Mitochondrial Membrane*, membrana interna mitocondrial; MM, *Mitochondrial Matrix*, matriz mitocondrial; TCA, *Tricarboxylic Acid*, ácido tricarbóxico).

Generación y aplicaciones de vectores genómicos reporteros

Otra herramienta que desarrollamos en el laboratorio, también en colaboración con el Dr. Richard Wade-Martins, fue una serie de vectores reporteros de expresión de frataxina basados en el locus genómico *FRDA*. Como ya hemos mencionado, una de las ventajas principales de un locus genómico frente a un vector convencional es que contiene todas las secuencias reguladoras nativas del gen en cuestión, y en el BAC que estamos utilizando, después de haber reducido su tamaño, aún se preservan 38 kb por delante de la región codificante del gen *FRDA*.

Previamente se ha descrito un vector no viral portador del locus genómico de la frataxina, en el que se insertaban *cassettes* con proteínas fluorescentes de fusión en el clon 265B8 (Sarsero *et al.*, 2003). Nuestro abordaje fue distinto por diversas razones. Como ya se ha comentado anteriormente, existen tres isoformas de frataxina que se producen tras un procesamiento alternativo de un único mRNA que se transcribe a partir del gen *FRDA* (Campuzano *et al.*, 1996; Pianese *et al.*, 2002). Precisamente porque todas las diferencias en el procesamiento se producen en el extremo 3' del mRNA, y se desconoce la relevancia funcional del procesamiento alternativo de la frataxina, decidimos inicialmente hacer un vector que reportase expresión de frataxina, independientemente de la isoforma. Y para ello insertamos con técnicas de recombinación homóloga *cassettes* reporteros de β -galactosidasa o de luciferasa al comienzo de la región codificante. Estos genes reporteros presentan la posibilidad de ser detectados por distintos procedimientos, permitiéndonos por tanto seguir la actividad del promotor de frataxina mediante tinciones específicas o por ensayos de actividad, ofreciendo incluso la alternativa de seguir su expresión *in vivo* mediante técnicas de adquisición de imágenes por luminiscencia (*imaging*).

Además, el hecho de que este vector sea herpesviral hace que constituya una herramienta muy versátil para uso rutinario en el laboratorio para su empleo en neuronas, tanto *in vivo* como *in vitro*, para analizar los cambios de expresión de un gen en respuesta a determinados compuestos. En este sentido, es muy interesante el hecho de que se piensa que la administración de fármacos que sean capaces de influir positivamente en la expresión de frataxina podría paliar, en parte, algunos síntomas de la enfermedad.

Estudios previos mostraron que la expresión de frataxina podía verse incrementada en respuesta al tratamiento con hemina o con ácido butírico por ensayos basados en un vector reportero de expresión de frataxina en células BHK21 de hámster (Sarsero *et al.*, 2003). Posteriormente, se ha visto que también es posible inducir la expresión de frataxina en fibroblastos, linfoblastos y cardiomiocitos humanos de pacientes de ataxia de Friedreich y en células P19 de ratón tras exposición a eritropoyetina (Sturm *et al.*, 2005a). Con ayuda del vector herpesviral reportero de expresión de frataxina que hemos generado, hemos podido comprobar que este efecto en respuesta a eritropoyetina también se observa en células humanas de tipo neuronal.

Estos datos, junto con el análisis de expresión a lo largo del tiempo que demuestra una cinética más lenta pero más sostenida que la de un vector convencional, demuestran que estos vectores virales reporteros de expresión basados en la modificación de loci genómicos pueden constituir herramientas útiles para estudios de transferencia génica a neuronas tanto *in vitro* como presumiblemente *in vivo*.

Concluyendo...

A lo largo de este trabajo hemos mostrado cómo los vectores de HSV-1 pueden ser utilizados eficientemente para transferir genes a células neuronales en cultivo con fines neuroprotectores. Mediante dos aproximaciones distintas, utilizando el dominante negativo de una proteína capaz de bloquear la cascada apoptótica, o expresando un gen que pueda promover la supervivencia, demostramos una protección eficaz y consistente frente a la muerte celular inducida por disfunción mitocondrial, una alteración muy común en numerosas patologías neurodegenerativas.

También se ha visto la posibilidad de estudiar algunos mecanismos moleculares subyacentes a la neuroprotección observada, así como otras posibles aplicaciones de vectores derivados de HSV-1, como demuestran los experimentos con los vectores reporteros.

En resumen, creemos que los vectores de HSV-1 constituyen una herramienta muy útil para los estudios de transferencia génica a neuronas con numerosas aplicaciones posibles.

Conclusiones

1. La línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y puede ser diferenciada a células similares a neuronas humanas bajo condiciones específicas en cultivo. Esta diferenciación conduce al incremento en la expresión de receptores celulares para HSV-1, lo que permite una transducción eficiente por vectores de HSV-1. En conjunto, las células SH-SY5Y diferenciadas constituyen un sistema celular útil como modelo experimental. Asimismo, los cultivos primarios de neuronas de bulbo raquídeo y de Purkinje de ratón suponen una herramienta complementaria muy valiosa para el desarrollo de distintas aproximaciones experimentales.
2. La inhibición crónica, no aguda, de la GSK-3 mediante el uso de inhibidores farmacológicos o la expresión de un mutante con carácter dominante negativo tiene un efecto neuroprotector frente a la muerte celular inducida por disfunción mitocondrial en células SH-SY5Y diferenciadas y en neuronas primarias de ratón. En concreto, la inhibición crónica de la GSK-3 puede atenuar la translocación de Bax, la activación de la caspasa-3 y la fragmentación del DNA nuclear observadas durante la apoptosis inducida por rotenona. El efecto sobre la preservación del potencial de membrana mitocondrial es, sin embargo, algo más modesto.
3. El incremento en el consumo de glucosa a través de la vía glucolítica podría ser uno de los mecanismos moleculares responsables de la neuroprotección frente a rotenona por inhibición crónica de GSK-3, como muestra la elevada producción de lactato tras la inhibición de GSK-3. La mayor presencia del transportador de glucosa GLUT3 en la membrana plasmática y de la hexoquinasa II en la mitocondria son consistentes con esta hipótesis.
4. Las células sometidas a inhibición crónica de la GSK-3 secretan una mayor cantidad de BDNF, que también es parcialmente responsable del efecto neuroprotector observado.
5. La expresión de frataxina humana, ya sea por medio de un vector de DNA genómico como por un vector de cDNA, tiene un efecto protector frente a la muerte inducida por rotenona en neuronas de ratón.
6. Los vectores herpesvirales basados en DNA genómico tienen una cinética de expresión más lenta y sostenida que los vectores herpesvirales convencionales. A este respecto, el empleo de vectores herpesvirales reporteros basados en construcciones genómicas permite llevar a cabo distintos estudios de expresión génica, así como el análisis de compuestos que puedan afectar a la expresión de un gen de interés en cultivos neuronales.
7. El tratamiento con eritropoyetina es capaz de modular positivamente la actividad del promotor de frataxina en células neuronales humanas de manera dependiente de dosis. Además, esta inducción sólo persiste en los casos en los que la dosis de eritropoyetina es elevada.

Bibliografía

- Acquaviva, F., De Biase, I., Nezi, L., Ruggiero, G., Tatangelo, F., Pisano, C., Monticelli, A., Garbi, C., Acquaviva, A.M. y Coccozza, S. (2005) Extra-mitochondrial localisation of frataxin and its association with IscU1 during enterocyte-like differentiation of the human colon adenocarcinoma cell line Caco-2. *J Cell Sci*, **118**, 3917-3924.
- Adams, J.M. y Cory, S. (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*, **281**, 1322-1326.
- Adams, J.M. y Cory, S. (2002) Apoptosomes: engines for caspase activation. *Curr Opin Cell Biol*, **14**, 715-720.
- Adams, V., Bosch, W., Hammerle, T. y Brdiczka, D. (1988) Activation of low Km hexokinases in purified hepatocytes by binding to mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, **932**, 195-205.
- Afford, S. y Randhawa, S. (2000) Apoptosis. *Mol Pathol*, **53**, 55-63.
- Agudo, M., Trejo, J.L., Lim, F., Avila, J., Torres-Aleman, I., Diaz-Nido, J. y Wandosell, F. (2002) Highly efficient and specific gene transfer to Purkinje cells in vivo using a herpes simplex virus I amplicon. *Hum Gene Ther*, **13**, 665-674.
- Ahmadi, F.A., Linseman, D.A., Grammatopoulos, T.N., Jones, S.M., Bouchard, R.J., Freed, C.R., Heidenreich, K.A. y Zawada, W.M. (2003) The pesticide rotenone induces caspase-3-mediated apoptosis in ventral mesencephalic dopaminergic neurons. *J Neurochem*, **87**, 914-921.
- Alam, J.J. (2003) Apoptosis: target for novel drugs. *Trends Biotechnol*, **21**, 479-483.
- Alvarez, G., Munoz-Montano, J.R., Satrustegui, J., Avila, J., Bogonez, E. y Diaz-Nido, J. (1999) Lithium protects cultured neurons against beta-amyloid-induced neurodegeneration. *FEBS Lett*, **453**, 260-264.
- Alvarez, G., Munoz-Montano, J.R., Satrustegui, J., Avila, J., Bogonez, E. y Diaz-Nido, J. (2002) Regulation of tau phosphorylation and protection against beta-amyloid-induced neurodegeneration by lithium. Possible implications for Alzheimer's disease. *Bipolar Disord*, **4**, 153-165.
- Allison, D.B., Cui, X., Page, G.P. y Sabripour, M. (2006) Microarray data analysis: from disarray to consolidation and consensus. *Nat Rev Genet*, **7**, 55-65.
- Anderson, P.R., Kirby, K., Hilliker, A.J. y Phillips, J.P. (2005) RNAi-mediated suppression of the mitochondrial iron chaperone, frataxin, in *Drosophila*. *Hum Mol Genet*, **14**, 3397-3405.
- Apps, R. y Garwicz, M. (2005) Anatomical and physiological foundations of cerebellar information processing. *Nat Rev Neurosci*, **6**, 297-311.
- Ashkenazi, A. y Dixit, V.M. (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science*, **281**, 1305-1308.
- Assuncao Guimaraes, C. y Linden, R. (2004) Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles. *Eur J Biochem*, **271**, 1638-1650.
- Azoulay-Zohar, H., Israelson, A., Abu-Hamad, S. y Shoshan-Barmatz, V. (2004) In self-defence: hexokinase promotes voltage-dependent anion channel closure and prevents mitochondria-mediated apoptotic cell death. *Biochem J*, **377**, 347-355.
- Babcock, M., de Silva, D., Oaks, R., Davis-Kaplan, S., Jiralerspong, S., Montermini, L., Pandolfo, M. y Kaplan, J. (1997) Regulation of mitochondrial iron accumulation by Yfh1p, a putative homolog of frataxin. *Science*, **276**, 1709-1712.
- Baehrecke, E.H. (2002) How death shapes life during development. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 779-787.
- Baehrecke, E.H. (2005) Autophagy: dual roles in life and death? *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 505-510.
- Banker, G. y Goslin, K. (1998) *Culturing nerve cells*. MIT Press, Cambridge, Mass.

- Baptista, C.A., Hatten, M.E., Blazeski, R. y Mason, C.A. (1994) Cell-cell interactions influence survival and differentiation of purified Purkinje cells in vitro. *Neuron*, **12**, 243-260.
- Barnham, K.J., Masters, C.L. y Bush, A.I. (2004) Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov*, **3**, 205-214.
- Barrientos, A. y Moraes, C.T. (1999) Titrating the effects of mitochondrial complex I impairment in the cell physiology. *J Biol Chem*, **274**, 16188-16197.
- Bartlett, W.P. y Banker, G.A. (1984) An electron microscopic study of the development of axons and dendrites by hippocampal neurons in culture. I. Cells which develop without intercellular contacts. *J Neurosci*, **4**, 1944-1953.
- Barzilai, A. y Melamed, E. (2003) Molecular mechanisms of selective dopaminergic neuronal death in Parkinson's disease. *Trends Mol Med*, **9**, 126-132.
- Beal, M.F. (1995) Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann Neurol*, **38**, 357-366.
- Beere, H.M. (2001) Stressed to death: regulation of apoptotic signaling pathways by the heat shock proteins. *Sci STKE*, **2001**, RE1.
- Beere, H.M., Wolf, B.B., Cain, K., Mosser, D.D., Mahboubi, A., Kuwana, T., Taylor, P., Morimoto, R.I., Cohen, G.M. y Green, D.R. (2000) Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol*, **2**, 469-475.
- Berlett, B.S. y Stadtman, E.R. (1997) Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem*, **272**, 20313-20316.
- Berridge, M.J., Downes, C.P. y Hanley, M.R. (1989) Neural and developmental actions of lithium: a unifying hypothesis. *Cell*, **59**, 411-419.
- Bertram, L. y Tanzi, R.E. (2005) The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. *J Clin Invest*, **115**, 1449-1457.
- Betarbet, R., Sherer, T.B., MacKenzie, G., Garcia-Osuna, M., Panov, A.V. y Greenamyre, J.T. (2000) Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci*, **3**, 1301-1306.
- Bhat, R., Xue, Y., Berg, S., Hellberg, S., Ormo, M., Nilsson, Y., Radesater, A.C., Jerning, E., Markgren, P.O., Borgegard, T., Nylof, M., Gimenez-Cassina, A., Hernandez, F., Lucas, J.J., Diaz-Nido, J. y Avila, J. (2003) Structural insights and biological effects of glycogen synthase kinase 3-specific inhibitor AR-A014418. *J Biol Chem*, **278**, 45937-45945.
- Bhat, R.V. y Budd, S.L. (2002) GSK3beta signalling: casting a wide net in Alzheimer's disease. *Neurosignals*, **11**, 251-261.
- Bhat, R.V., Shanley, J., Correll, M.P., Fieles, W.E., Keith, R.A., Scott, C.W. y Lee, C.M. (2000) Regulation and localization of tyrosine216 phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta in cellular and animal models of neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 11074-11079.
- Biedler, J.L., Roffler-Tarlov, S., Schachner, M. y Freedman, L.S. (1978) Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res*, **38**, 3751-3757.
- Bijur, G.N., De Sarno, P. y Jope, R.S. (2000) Glycogen synthase kinase-3beta facilitates staurosporine- and heat shock-induced apoptosis. Protection by lithium. *J Biol Chem*, **275**, 7583-7590.
- Bijur, G.N. y Jope, R.S. (2001) Proapoptotic stimuli induce nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3 beta. *J Biol Chem*, **276**, 37436-37442.
- Bijur, G.N. y Jope, R.S. (2003) Glycogen synthase kinase-3beta is highly activated in nuclei and mitochondria. *Neuroreport*, **14**, 2415-2419.

- Blomer, U., Kafri, T., Randolph-Moore, L., Verma, I.M. y Gage, F.H. (1998) Bcl-xL protects adult septal cholinergic neurons from axotomized cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 2603-2608.
- Borasio, G.D., Robberecht, W., Leigh, P.N., Emile, J., Guilloff, R.J., Jerusalem, F., Silani, V., Vos, P.E., Wokke, J.H. y Dobbins, T. (1998) A placebo-controlled trial of insulin-like growth factor-I in amyotrophic lateral sclerosis. European ALS/IGF-I Study Group. *Neurology*, **51**, 583-586.
- Borner, C. (2003) The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol*, **39**, 615-647.
- Bravin, M., Morando, L., Vercelli, A., Rossi, F. y Strata, P. (1999) Control of spine formation by electrical activity in the adult rat cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 1704-1709.
- Brewer, G.J. (1995) Serum-free B27/neurobasal medium supports differentiated growth of neurons from the striatum, substantia nigra, septum, cerebral cortex, cerebellum, and dentate gyrus. *J Neurosci Res*, **42**, 674-683.
- Brewer, G.J., Torricelli, J.R., Evege, E.K. y Price, P.J. (1993) Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *J Neurosci Res*, **35**, 567-576.
- Brorson, J.R., Manzillo, P.A., Gibbons, S.J. y Miller, R.J. (1995) AMPA receptor desensitization predicts the selective vulnerability of cerebellar Purkinje cells to excitotoxicity. *J Neurosci*, **15**, 4515-4524.
- Brorson, J.R., Manzillo, P.A. y Miller, R.J. (1994) Ca²⁺ entry via AMPA/KA receptors and excitotoxicity in cultured cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci*, **14**, 187-197.
- Brown, R.C., Lockwood, A.H. y Sonawane, B.R. (2005) Neurodegenerative diseases: an overview of environmental risk factors. *Environ Health Perspect*, **113**, 1250-1256.
- Brywe, K.G., Mallard, C., Gustavsson, M., Hedtjarn, M., Leverin, A.L., Wang, X., Blomgren, K., Isgaard, J. y Hagberg, H. (2005) IGF-I neuroprotection in the immature brain after hypoxia-ischemia, involvement of Akt and GSK3beta? *Eur J Neurosci*, **21**, 1489-1502.
- Bulteau, A.L., O'Neill, H.A., Kennedy, M.C., Ikeda-Saito, M., Isaya, G. y Szwedda, L.I. (2004) Frataxin acts as an iron chaperone protein to modulate mitochondrial aconitase activity. *Science*, **305**, 242-245.
- Bullido, M.J., Artiga, M.J., Recuero, M., Sastre, I., Garcia, M.A., Aldudo, J., Lendon, C., Han, S.W., Morris, J.C., Frank, A., Vazquez, J., Goate, A. y Valdivieso, F. (1998) A polymorphism in the regulatory region of APOE associated with risk for Alzheimer's dementia. *Nat Genet*, **18**, 69-71.
- Burkhalter, J., Fiumelli, H., Allaman, I., Chatton, J.Y. y Martin, J.L. (2003) Brain-derived neurotrophic factor stimulates energy metabolism in developing cortical neurons. *J Neurosci*, **23**, 8212-8220.
- Burton, E.A., Fink, D.J. y Glorioso, J.C. (2002) Gene delivery using herpes simplex virus vectors. *DNA Cell Biol*, **21**, 915-936.
- Bush, A.L. y Hyson, R.L. (2006) Lithium increases bcl-2 expression in chick cochlear nucleus and protects against deafferentation-induced cell death. *Neuroscience*, **138**, 1341-1349.
- Butterfield, P.G., Valanis, B.G., Spencer, P.S., Lindeman, C.A. y Nutt, J.G. (1993) Environmental antecedents of young-onset Parkinson's disease. *Neurology*, **43**, 1150-1158.
- Calabrese, V., Ravagna, A., Colombrita, C., Scapagnini, G., Guagliano, E., Calvani, M., Butterfield, D.A. y Giuffrida Stella, A.M. (2005) Acetylcarnitine induces heme oxygenase in rat astrocytes and protects against oxidative stress: involvement of the transcription factor Nrf2. *J Neurosci Res*, **79**, 509-521.
- Campuzano, V., Montermini, L., Lutz, Y., Cova, L., Hindelang, C., Jiralerspong, S., Trottier, Y., Kish, S.J., Faucheux, B., Trouillas, P., Authier, F.J., Durr, A., Mandel, J.L., Vescovi, A.,

- Pandolfo, M. y Koenig, M. (1997) Frataxin is reduced in Friedreich ataxia patients and is associated with mitochondrial membranes. *Hum Mol Genet*, **6**, 1771-1780.
- Campuzano, V., Montermini, L., Molto, M.D., Pianese, L., Cossee, M., Cavalcanti, F., Monros, E., Rodius, F., Duclos, F., Monticelli, A., Zara, F., Canizares, J., Koutnikova, H., Bidichandani, S.I., Gellera, C., Brice, A., Trouillas, P., De Michele, G., Filla, A., De Frutos, R., Palau, F., Patel, P.I., Di Donato, S., Mandel, J.L., Coccozza, S., Koenig, M. y Pandolfo, M. (1996) Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science*, **271**, 1423-1427.
- Carmichael, J., Sugars, K.L., Bao, Y.P. y Rubinsztein, D.C. (2002) Glycogen synthase kinase-3beta inhibitors prevent cellular polyglutamine toxicity caused by the Huntington's disease mutation. *J Biol Chem*, **277**, 33791-33798.
- Cattaneo, E. (2003) Dysfunction of wild-type huntingtin in Huntington disease. *News Physiol Sci*, **18**, 34-37.
- Cattaneo, E., Rigamonti, D., Goffredo, D., Zuccato, C., Squitieri, F. y Sipione, S. (2001) Loss of normal huntingtin function: new developments in Huntington's disease research. *Trends Neurosci*, **24**, 182-188.
- Clodfelder-Miller, B., De Sarno, P., Zmijewska, A.A., Song, L. y Jope, R.S. (2005) Physiological and pathological changes in glucose regulate brain Akt and glycogen synthase kinase-3. *J Biol Chem*, **280**, 39723-39731.
- Coghlan, M.P., Culbert, A.A., Cross, D.A., Corcoran, S.L., Yates, J.W., Pearce, N.J., Rausch, O.L., Murphy, G.J., Carter, P.S., Roxbee Cox, L., Mills, D., Brown, M.J., Haigh, D., Ward, R.W., Smith, D.G., Murray, K.J., Reith, A.D. y Holder, J.C. (2000) Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription. *Chem Biol*, **7**, 793-803.
- Cohen, P. y Frame, S. (2001) The renaissance of GSK3. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 769-776.
- Condo, I., Ventura, N., Malisan, F., Tomassini, B. y Testi, R. (2006) A pool of extramitochondrial frataxin that promotes cell survival. *J Biol Chem*.
- Cory, S. y Adams, J.M. (2002) The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*, **2**, 647-656.
- Cossarizza, A., Baccarani-Contri, M., Kalashnikova, G. y Franceschi, C. (1993) A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). *Biochem Biophys Res Commun*, **197**, 40-45.
- Cossee, M., Puccio, H., Gansmuller, A., Koutnikova, H., Dierich, A., LeMeur, M., Fischbeck, K., Dolle, P. y Koenig, M. (2000) Inactivation of the Friedreich ataxia mouse gene leads to early embryonic lethality without iron accumulation. *Hum Mol Genet*, **9**, 1219-1226.
- Coulom, H. y Birman, S. (2004) Chronic exposure to rotenone models sporadic Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster*. *J Neurosci*, **24**, 10993-10998.
- Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M. y Hemmings, B.A. (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, **378**, 785-789.
- Cross, D.A., Culbert, A.A., Chalmers, K.A., Facci, L., Skaper, S.D. y Reith, A.D. (2001) Selective small-molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 activity protect primary neurones from death. *J Neurochem*, **77**, 94-102.
- Crowder, R.J. y Freeman, R.S. (2000) Glycogen synthase kinase-3 beta activity is critical for neuronal death caused by inhibiting phosphatidylinositol 3-kinase or Akt but not for death caused by nerve growth factor withdrawal. *J Biol Chem*, **275**, 34266-34271.

- Culbert, A.A., Brown, M.J., Frame, S., Hagen, T., Cross, D.A., Bax, B. y Reith, A.D. (2001) GSK-3 inhibition by adenoviral FRAT1 overexpression is neuroprotective and induces Tau dephosphorylation and beta-catenin stabilisation without elevation of glycogen synthase activity. *FEBS Lett*, **507**, 288-294.
- Culmsee, C. y Mattson, M.P. (2005) p53 in neuronal apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, **331**, 761-777.
- Chalecka-Franaszek, E. y Chuang, D.M. (1999) Lithium activates the serine/threonine kinase Akt-1 and suppresses glutamate-induced inhibition of Akt-1 activity in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 8745-8750.
- Chan, S.L., Fu, W., Zhang, P., Cheng, A., Lee, J., Kokame, K. y Mattson, M.P. (2004) Herp stabilizes neuronal Ca²⁺ homeostasis and mitochondrial function during endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem*, **279**, 28733-28743.
- Chan, S.L. y Mattson, M.P. (1999) Caspase and calpain substrates: roles in synaptic plasticity and cell death. *J Neurosci Res*, **58**, 167-190.
- Chantrel-Groussard, K., Geromel, V., Puccio, H., Koenig, M., Munnich, A., Rotig, A. y Rustin, P. (2001) Disabled early recruitment of antioxidant defenses in Friedreich's ataxia. *Hum Mol Genet*, **10**, 2061-2067.
- Chao, M.V. (2003) Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci*, **4**, 299-309.
- Chattopadhyay, M., Goss, J., Lacomis, D., Goins, W.C., Glorioso, J.C., Mata, M. y Fink, D.J. (2003) Protective effect of HSV-mediated gene transfer of nerve growth factor in pyridoxine neuropathy demonstrates functional activity of trkA receptors in large sensory neurons of adult animals. *Eur J Neurosci*, **17**, 732-740.
- Chattopadhyay, M., Wolfe, D., Huang, S., Goss, J., Glorioso, J.C., Mata, M. y Fink, D.J. (2002) In vivo gene therapy for pyridoxine-induced neuropathy by herpes simplex virus-mediated gene transfer of neurotrophin-3. *Ann Neurol*, **51**, 19-27.
- Chaturvedi, R., Cheng, Y., Asim, M., Bussiere, F.I., Xu, H., Gobert, A.P., Hacker, A., Casero, R.A., Jr. y Wilson, K.T. (2004) Induction of polyamine oxidase 1 by *Helicobacter pylori* causes macrophage apoptosis by hydrogen peroxide release and mitochondrial membrane depolarization. *J Biol Chem*, **279**, 40161-40173.
- Chaturvedi, R.K., Shukla, S., Seth, K. y Agrawal, A.K. (2006) Nerve growth factor increases survival of dopaminergic graft, rescue nigral dopaminergic neurons and restores functional deficits in rat model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett*.
- Chen, G., Zeng, W.Z., Yuan, P.X., Huang, L.D., Jiang, Y.M., Zhao, Z.H. y Manji, H.K. (1999) The mood-stabilizing agents lithium and valproate robustly increase the levels of the neuroprotective protein bcl-2 in the CNS. *J Neurochem*, **72**, 879-882.
- Chen, R.W. y Chuang, D.M. (1999) Long term lithium treatment suppresses p53 and Bax expression but increases Bcl-2 expression. A prominent role in neuroprotection against excitotoxicity. *J Biol Chem*, **274**, 6039-6042.
- Chi, M.M., Pusateri, M.E., Carter, J.G., Norris, B.J., McDougal, D.B., Jr. y Lowry, O.H. (1987) Enzymatic assays for 2-deoxyglucose and 2-deoxyglucose 6-phosphate. *Anal Biochem*, **161**, 508-513.
- Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Lane, B.R. y Dixit, V.M. (1997) Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: a molecular framework for cell death. *Science*, **275**, 1122-1126.

- Chipuk, J.E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N.M., Newmeyer, D.D., Schuler, M. y Green, D.R. (2004) Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science*, **303**, 1010-1014.
- da-Silva, W.S., Gomez-Puyou, A., de Gomez-Puyou, M.T., Moreno-Sanchez, R., De Felice, F.G., de Meis, L., Oliveira, M.F. y Galina, A. (2004) Mitochondrial bound hexokinase activity as a preventive antioxidant defense: steady-state ADP formation as a regulatory mechanism of membrane potential and reactive oxygen species generation in mitochondria. *J Biol Chem*, **279**, 39846-39855.
- Danial, N.N., Gramm, C.F., Scorrano, L., Zhang, C.Y., Krauss, S., Ranger, A.M., Datta, S.R., Greenberg, M.E., Licklider, L.J., Lowell, B.B., Gygi, S.P. y Korsmeyer, S.J. (2003) BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. *Nature*, **424**, 952-956.
- Danial, N.N. y Korsmeyer, S.J. (2004) Cell death: critical control points. *Cell*, **116**, 205-219.
- Dauer, W. y Przedborski, S. (2003) Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*, **39**, 889-909.
- Davidson, B.L. y Breakefield, X.O. (2003) Viral vectors for gene delivery to the nervous system. *Nat Rev Neurosci*, **4**, 353-364.
- Dawson, T.M. y Dawson, V.L. (2003) Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. *Science*, **302**, 819-822.
- De Michele, G., Coppola, G., Coccozza, S. y Filla, A. (2004) A pathogenetic classification of hereditary ataxias: is the time ripe? *J Neurol*, **251**, 913-922.
- DeGregorio-Rocasolano, N., Gasull, T. y Trullas, R. (2001) Overexpression of neuronal pentraxin 1 is involved in neuronal death evoked by low K(+) in cerebellar granule cells. *J Biol Chem*, **276**, 796-803.
- Degterev, A., Boyce, M. y Yuan, J. (2003) A decade of caspases. *Oncogene*, **22**, 8543-8567.
- Delatycki, M.B., Camakaris, J., Brooks, H., Evans-Whipp, T., Thorburn, D.R., Williamson, R. y Forrest, S.M. (1999) Direct evidence that mitochondrial iron accumulation occurs in Friedreich ataxia. *Ann Neurol*, **45**, 673-675.
- DeLuca, N.A., McCarthy, A.M. y Schaffer, P.A. (1985) Isolation and characterization of deletion mutants of herpes simplex virus type 1 in the gene encoding immediate-early regulatory protein ICP4. *J Virol*, **56**, 558-570.
- Diaz-Corrales, F.J., Asanuma, M., Miyazaki, I., Miyoshi, K. y Ogawa, N. (2005) Rotenone induces aggregation of gamma-tubulin protein and subsequent disorganization of the centrosome: relevance to formation of inclusion bodies and neurodegeneration. *Neuroscience*, **133**, 117-135.
- Diaz-Corrales, F.J., Asanuma, M., Miyazaki, I. y Ogawa, N. (2004) Rotenone induces disassembly of the Golgi apparatus in the rat dopaminergic neuroblastoma B65 cell line. *Neurosci Lett*, **354**, 59-63.
- Diaz-Nido, J., Serrano, L., Lopez-Otin, C., Vandekerckhove, J. y Avila, J. (1990) Phosphorylation of a neuronal-specific beta-tubulin isotype. *J Biol Chem*, **265**, 13949-13954.
- Digicaylioglu, M., Garden, G., Timberlake, S., Fletcher, L. y Lipton, S.A. (2004) Acute neuroprotective synergy of erythropoietin and insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 9855-9860.
- Doble, B.W. y Woodgett, J.R. (2003) GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci*, **116**, 1175-1186.
- Dominguez, I., Itoh, K. y Sokol, S.Y. (1995) Role of glycogen synthase kinase 3 beta as a negative regulator of dorsoventral axis formation in *Xenopus* embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 8498-8502.

- Donaire, V., Niso, M., Moran, J.M., Garcia, L., Gonzalez-Polo, R.A., Soler, G. y Fuentes, J.M. (2005) Heat shock proteins protect both MPP(+) and paraquat neurotoxicity. *Brain Res Bull*, **67**, 509-514.
- Douglas, M.W., Diefenbach, R.J., Homa, F.L., Miranda-Saksena, M., Rixon, F.J., Vittone, V., Byth, K. y Cunningham, A.L. (2004) Herpes simplex virus type 1 capsid protein VP26 interacts with dynein light chains RP3 and Tctex1 and plays a role in retrograde cellular transport. *J Biol Chem*, **279**, 28522-28530.
- Draghici, S., Khatri, P., Eklund, A.C. y Szallasi, Z. (2006) Reliability and reproducibility issues in DNA microarray measurements. *Trends Genet*, **22**, 101-109.
- Duchen, M.R. (2004) Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. *Mol Aspects Med*, **25**, 365-451.
- Duelli, R. y Kuschinsky, W. (2001) Brain glucose transporters: relationship to local energy demand. *News Physiol Sci*, **16**, 71-76.
- Dumas, T.C. y Sapolsky, R.M. (2001) Gene therapy against neurological insults: sparing neurons versus sparing function. *Trends Neurosci*, **24**, 695-700.
- Dux, E., Oschlies, U., Uto, A., Kusumoto, M., Siklos, L., Joo, F. y Hossmann, K.A. (1996) Serum prevents glutamate-induced mitochondrial calcium accumulation in primary neuronal cultures. *Acta Neuropathol (Berl)*, **92**, 264-272.
- Edinger, A.L. y Thompson, C.B. (2004) Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol*, **16**, 663-669.
- Ekshyyan, O. y Aw, T.Y. (2004) Apoptosis: a key in neurodegenerative disorders. *Curr Neurovasc Res*, **1**, 355-371.
- Elyaman, W., Yardin, C. y Hugon, J. (2002) Involvement of glycogen synthase kinase-3beta and tau phosphorylation in neuronal Golgi disassembly. *J Neurochem*, **81**, 870-880.
- Emerit, J., Edeas, M. y Bricaire, F. (2004) Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed Pharmacother*, **58**, 39-46.
- Encinas, M., Iglesias, M., Liu, Y., Wang, H., Muhaisen, A., Cena, V., Gallego, C. y Comella, J.X. (2000) Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *J Neurochem*, **75**, 991-1003.
- Enguita, M., DeGregorio-Rocasolano, N., Abad, A. y Trullas, R. (2005) Glycogen synthase kinase 3 activity mediates neuronal pentraxin 1 expression and cell death induced by potassium deprivation in cerebellar granule cells. *Mol Pharmacol*, **67**, 1237-1246.
- Epstein, A.L. (2005) HSV-1-derived recombinant and amplicon vectors for preventive or therapeutic gene transfer: an overview. *Gene Ther*, **12 Suppl 1**, S153.
- Epstein, A.L., Marconi, P., Argnani, R. y Manservigi, R. (2005) HSV-1-derived recombinant and amplicon vectors for gene transfer and gene therapy. *Curr Gene Ther*, **5**, 445-458.
- Eriksen, J.L., Wszolek, Z. y Petrucelli, L. (2005) Molecular pathogenesis of Parkinson disease. *Arch Neurol*, **62**, 353-357.
- Eslamboli, A., Georgievska, B., Ridley, R.M., Baker, H.F., Muzyczka, N., Burger, C., Mandel, R.J., Annett, L. y Kirik, D. (2005) Continuous low-level glial cell line-derived neurotrophic factor delivery using recombinant adeno-associated viral vectors provides neuroprotection and induces behavioral recovery in a primate model of Parkinson's disease. *J Neurosci*, **25**, 769-777.
- Evan, G. y Littlewood, T. (1998) A matter of life and cell death. *Science*, **281**, 1317-1322.

- Everall, I.P., Bell, C., Mallory, M., Langford, D., Adame, A., Rockenstein, E. y Masliah, E. (2002) Lithium ameliorates HIV-gp120-mediated neurotoxicity. *Mol Cell Neurosci*, **21**, 493-501.
- Facci, L., Stevens, D.A. y Skaper, S.D. (2003) Glycogen synthase kinase-3 inhibitors protect central neurons against excitotoxicity. *Neuroreport*, **14**, 1467-1470.
- Fadeel, B. y Orrenius, S. (2005) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J Intern Med*, **258**, 479-517.
- Fang, S., Jensen, J.P., Ludwig, R.L., Vousden, K.H. y Weissman, A.M. (2000) Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. *J Biol Chem*, **275**, 8945-8951.
- Fernandez, A.M., Carro, E.M., Lopez-Lopez, C. y Torres-Aleman, I. (2005) Insulin-like growth factor I treatment for cerebellar ataxia: addressing a common pathway in the pathological cascade? *Brain Res Brain Res Rev*, **50**, 134-141.
- Fernandez, A.M., de la Vega, A.G. y Torres-Aleman, I. (1998) Insulin-like growth factor I restores motor coordination in a rat model of cerebellar ataxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 1253-1258.
- Finch, C.E. y Tanzi, R.E. (1997) Genetics of aging. *Science*, **278**, 407-411.
- Fink, D.J. y Glorioso, J.C. (1997) Engineering herpes simplex virus vectors for gene transfer to neurons. *Nat Med*, **3**, 357-359.
- Fleming, J., Spinoulas, A., Zheng, M., Cunningham, S.C., Ginn, S.L., McQuilty, R.C., Rowe, P.B. y Alexander, I.E. (2005) Partial correction of sensitivity to oxidant stress in Friedreich ataxia patient fibroblasts by frataxin-encoding adeno-associated virus and lentivirus vectors. *Hum Gene Ther*, **16**, 947-956.
- Fleming, S.M., Zhu, C., Fernagut, P.O., Mehta, A., DiCarlo, C.D., Seaman, R.L. y Chesselet, M.F. (2004) Behavioral and immunohistochemical effects of chronic intravenous and subcutaneous infusions of varying doses of rotenone. *Exp Neurol*, **187**, 418-429.
- Forman, M.S., Trojanowski, J.Q. y Lee, V.M. (2004) Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs. *Nat Med*, **10**, 1055-1063.
- Fornai, F., Schluter, O.M., Lenzi, P., Gesi, M., Ruffoli, R., Ferrucci, M., Lazzeri, G., Busceti, C.L., Pontarelli, F., Battaglia, G., Pellegrini, A., Nicoletti, F., Ruggieri, S., Paparelli, A. y Sudhof, T.C. (2005) Parkinson-like syndrome induced by continuous MPTP infusion: convergent roles of the ubiquitin-proteasome system and alpha-synuclein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 3413-3418.
- Forno, L.S., DeLanney, L.E., Irwin, I. y Langston, J.W. (1993) Similarities and differences between MPTP-induced parkinsonism and Parkinson's disease. Neuropathologic considerations. *Adv Neurol*, **60**, 600-608.
- Fourie, A.M., Coles, F., Moreno, V. y Karlsson, L. (2003) Catalytic activity of ADAM8, ADAM15, and MDC-L (ADAM28) on synthetic peptide substrates and in ectodomain cleavage of CD23. *J Biol Chem*, **278**, 30469-30477.
- Foury, F. y Cazzalini, O. (1997) Deletion of the yeast homologue of the human gene associated with Friedreich's ataxia elicits iron accumulation in mitochondria. *FEBS Lett*, **411**, 373-377.
- Fraefel, C., Song, S., Lim, F., Lang, P., Yu, L., Wang, Y., Wild, P. y Geller, A.I. (1996) Helper virus-free transfer of herpes simplex virus type 1 plasmid vectors into neural cells. *J Virol*, **70**, 7190-7197.
- Frame, S. y Cohen, P. (2001) GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J*, **359**, 1-16.
- Frampton, A.R., Jr., Goins, W.F., Nakano, K., Burton, E.A. y Glorioso, J.C. (2005) HSV trafficking and development of gene therapy vectors with applications in the nervous system. *Gene Ther*, **12**, 891-901.

- Fukumoto, T., Morinobu, S., Okamoto, Y., Kagaya, A. y Yamawaki, S. (2001) Chronic lithium treatment increases the expression of brain-derived neurotrophic factor in the rat brain. *Psychopharmacology (Berl)*, **158**, 100-106.
- Fumagalli, F., Racagni, G. y Riva, M.A. (2006a) The expanding role of BDNF: a therapeutic target for Alzheimer's disease? *Pharmacogenomics J*, **6**, 8-15.
- Fumagalli, F., Racagni, G. y Riva, M.A. (2006b) Shedding light into the role of BDNF in the pharmacotherapy of Parkinson's disease. *Pharmacogenomics J*, **6**, 95-104.
- Furuya, S., Makino, A. y Hirabayashi, Y. (1998) An improved method for culturing cerebellar Purkinje cells with differentiated dendrites under a mixed monolayer setting. *Brain Res Brain Res Protoc*, **3**, 192-198.
- Galas, M.C., Bizat, N., Cuvelier, L., Bantubungi, K., Brouillet, E., Schiffmann, S.N. y Blum, D. (2004) Death of cortical and striatal neurons induced by mitochondrial defect involves differential molecular mechanisms. *Neurobiol Dis*, **15**, 152-159.
- Garcia-Perez, J., Avila, J. y Diaz-Nido, J. (1998) Implication of cyclin-dependent kinases and glycogen synthase kinase 3 in the phosphorylation of microtubule-associated protein 1B in developing neuronal cells. *J Neurosci Res*, **52**, 445-452.
- Garrido, J.J., Carnicero, E., Lim, F. y Schimmang, T. (1999) Differential effects on the survival of neuronal and non-neuronal cells after infection by herpes simplex virus type 1 mutants. *J Neurovirol*, **5**, 280-288.
- Gash, D.M., Zhang, Z., Ovadia, A., Cass, W.A., Yi, A., Simmerman, L., Russell, D., Martin, D., Lapchak, P.A., Collins, F., Hoffer, B.J. y Gerhardt, G.A. (1996) Functional recovery in parkinsonian monkeys treated with GDNF. *Nature*, **380**, 252-255.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y. y Ben-Sasson, S.A. (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*, **119**, 493-501.
- Geller, A.I. y Breakefield, X.O. (1988) A defective HSV-1 vector expresses Escherichia coli beta-galactosidase in cultured peripheral neurons. *Science*, **241**, 1667-1669.
- Geraghty, R.J., Krummenacher, C., Cohen, G.H., Eisenberg, R.J. y Spear, P.G. (1998) Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor. *Science*, **280**, 1618-1620.
- Giasson, B.I. y Lee, V.M. (2000) A new link between pesticides and Parkinson's disease. *Nat Neurosci*, **3**, 1227-1228.
- Gill, S.S., Patel, N.K., Hotton, G.R., O'Sullivan, K., McCarter, R., Bunnage, M., Brooks, D.J., Svendsen, C.N. y Heywood, P. (2003) Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease. *Nat Med*, **9**, 589-595.
- Gimenez-Cassina, A., Lim, F. y Diaz-Nido, J. (2006a) The differentiation of a human neuroblastoma into neuron-like cells increases their susceptibility to transduction by herpesviral vectors. *J Neurosci Res*, **In press**.
- Gimenez-Cassina, A., Lim, F. y Diaz-Nido, J. (2006b) Gene Transfer Into Purkinje Cells using Herpesviral Amplicon Vectors In Cerebellar Cultures. *Neurochemistry International*, **Submitted**.
- Glorioso, J.C. y Fink, D.J. (2004) Herpes vector-mediated gene transfer in treatment of diseases of the nervous system. *Annu Rev Microbiol*, **58**, 253-271.
- Glorioso, J.C., Mata, M. y Fink, D.J. (2003) Therapeutic gene transfer to the nervous system using viral vectors. *J Neurovirol*, **9**, 165-172.
- Goins, W.F., Wolfe, D., Krisky, D.M., Bai, Q., Burton, E.A., Fink, D.J. y Glorioso, J.C. (2004) Delivery using herpes simplex virus: an overview. *Methods Mol Biol*, **246**, 257-299.

- Gomez-Sebastian, S., Gimenez-Cassina, A., Diaz-Nido, J., Lim, F. y Wade-Martins, R. (2006) Infectious delivery and expression of a 135 kb human FRDA genomic DNA locus complements Friedreich's ataxia deficiency in human cells. **In preparation.**
- Gonzalez-Cabo, P., Vazquez-Manrique, R.P., Garcia-Gimeno, M.A., Sanz, P. y Palau, F. (2005) Frataxin interacts functionally with mitochondrial electron transport chain proteins. *Hum Mol Genet*, **14**, 2091-2098.
- Goodenough, S., Conrad, S., Skutella, T. y Behl, C. (2004) Inactivation of glycogen synthase kinase-3beta protects against kainic acid-induced neurotoxicity in vivo. *Brain Res*, **1026**, 116-125.
- Gorell, J.M., Johnson, C.C., Rybicki, B.A., Peterson, E.L. y Richardson, R.J. (1998) The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living. *Neurology*, **50**, 1346-1350.
- Goss, J.R., Natsume, A., Wolfe, D., Mata, M., Glorioso, J.C. y Fink, D.J. (2004) Delivery of herpes simplex virus-based vectors to the nervous system. *Methods Mol Biol*, **246**, 309-322.
- Gottlob, K., Majewski, N., Kennedy, S., Kandel, E., Robey, R.B. y Hay, N. (2001) Inhibition of early apoptotic events by Akt/PKB is dependent on the first committed step of glycolysis and mitochondrial hexokinase. *Genes Dev*, **15**, 1406-1418.
- Gould, T.D., Zarate, C.A. y Manji, H.K. (2004) Glycogen synthase kinase-3: a target for novel bipolar disorder treatments. *J Clin Psychiatry*, **65**, 10-21.
- Gratzner, H.G. (1982) Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science*, **218**, 474-475.
- Green, D.R. y Kroemer, G. (2004) The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*, **305**, 626-629.
- Green, D.R. y Reed, J.C. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science*, **281**, 1309-1312.
- Greenamyre, J.T., Betarbet, R. y Sherer, T.B. (2003) The rotenone model of Parkinson's disease: genes, environment and mitochondria. *Parkinsonism Relat Disord*, **9 Suppl 2**, S59-64.
- Greenamyre, J.T., Sherer, T.B., Betarbet, R. y Panov, A.V. (2001) Complex I and Parkinson's disease. *IUBMB Life*, **52**, 135-141.
- Grimes, C.A. y Jope, R.S. (2001) The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. *Prog Neurobiol*, **65**, 391-426.
- Gros-Louis, F., Gaspar, C. y Rouleau, G.A. (2006) Genetics of familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta*.
- Grune, T., Jung, T., Merker, K. y Davies, K.J. (2004) Decreased proteolysis caused by protein aggregates, inclusion bodies, plaques, lipofuscin, ceroid, and 'aggresomes' during oxidative stress, aging, and disease. *Int J Biochem Cell Biol*, **36**, 2519-2530.
- Gum, E.T., Swanson, R.A., Alano, C., Liu, J., Hong, S., Weinstein, P.R. y Panter, S.S. (2004) Human serum albumin and its N-terminal tetrapeptide (DAHK) block oxidant-induced neuronal death. *Stroke*, **35**, 590-595.
- Haarr, L., Shukla, D., Rodahl, E., Dal Canto, M.C. y Spear, P.G. (2001) Transcription from the gene encoding the herpesvirus entry receptor nectin-1 (HveC) in nervous tissue of adult mouse. *Virology*, **287**, 301-309.
- Hammond, E.N., Tetzlaff, W., Mestres, P. y Giehl, K.M. (1999) BDNF, but not NT-3, promotes long-term survival of axotomized adult rat corticospinal neurons in vivo. *Neuroreport*, **10**, 2671-2675.
- Hao, S., Mata, M., Wolfe, D., Huang, S., Glorioso, J.C. y Fink, D.J. (2003) HSV-mediated gene transfer of the glial cell-derived neurotrophic factor provides an antiallodynic effect on neuropathic pain. *Mol Ther*, **8**, 367-375.

- Harding, A.E. (1984) *The hereditary ataxias and related disorders*. Churchill Livingstone, Edinburgh; New York.
- Harman, D. (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*, **11**, 298-300.
- Hashimoto, R., Takei, N., Shimazu, K., Christ, L., Lu, B. y Chuang, D.M. (2002) Lithium induces brain-derived neurotrophic factor and activates TrkB in rodent cortical neurons: an essential step for neuroprotection against glutamate excitotoxicity. *Neuropharmacology*, **43**, 1173-1179.
- Hedden, T. y Gabrieli, J.D. (2004) Insights into the ageing mind: a view from cognitive neuroscience. *Nat Rev Neurosci*, **5**, 87-96.
- Heidemann, S.R., Joshi, H.C., Schechter, A., Fletcher, J.R. y Bothwell, M. (1985) Synergistic effects of cyclic AMP and nerve growth factor on neurite outgrowth and microtubule stability of PC12 cells. *J Cell Biol*, **100**, 916-927.
- Heidemann, S.R., Lamoureux, P. y Buxbaum, R.E. (1995) Cytomechanics of axonal development. *Cell Biochem Biophys*, **27**, 135-155.
- Hernandez, F., Borrell, J., Guaza, C., Avila, J. y Lucas, J.J. (2002) Spatial learning deficit in transgenic mice that conditionally over-express GSK-3beta in the brain but do not form tau filaments. *J Neurochem*, **83**, 1529-1533.
- Hetman, M., Cavanaugh, J.E., Kimelman, D. y Xia, Z. (2000) Role of glycogen synthase kinase-3beta in neuronal apoptosis induced by trophic withdrawal. *J Neurosci*, **20**, 2567-2574.
- Hetman, M., Kanning, K., Cavanaugh, J.E. y Xia, Z. (1999) Neuroprotection by brain-derived neurotrophic factor is mediated by extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem*, **274**, 22569-22580.
- Hinerfeld, D., Traini, M.D., Weinberger, R.P., Cochran, B., Doctrow, S.R., Harry, J. y Melov, S. (2004) Endogenous mitochondrial oxidative stress: neurodegeneration, proteomic analysis, specific respiratory chain defects, and efficacious antioxidant therapy in superoxide dismutase 2 null mice. *J Neurochem*, **88**, 657-667.
- Hoeflich, K.P., Luo, J., Rubie, E.A., Tsao, M.S., Jin, O. y Woodgett, J.R. (2000) Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation. *Nature*, **406**, 86-90.
- Hoglinger, G.U., Lannuzel, A., Khondiker, M.E., Michel, P.P., Duyckaerts, C., Feger, J., Champy, P., Prigent, A., Medja, F., Lombes, A., Oertel, W.H., Ruberg, M. y Hirsch, E.C. (2005) The mitochondrial complex I inhibitor rotenone triggers a cerebral tauopathy. *J Neurochem*, **95**, 930-939.
- Hsich, G., Sena-Esteves, M. y Breakefield, X.O. (2002) Critical issues in gene therapy for neurologic disease. *Hum Gene Ther*, **13**, 579-604.
- Huang, E.J. y Reichardt, L.F. (2001) Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci*, **24**, 677-736.
- Huang, X., Wu, D.Y., Chen, G., Manji, H. y Chen, D.F. (2003) Support of retinal ganglion cell survival and axon regeneration by lithium through a Bcl-2-dependent mechanism. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **44**, 347-354.
- Huang, Y., Cheung, L., Rowe, D. y Halliday, G. (2004) Genetic contributions to Parkinson's disease. *Brain Res Brain Res Rev*, **46**, 44-70.
- Hughes, K., Nikolakaki, E., Plyte, S.E., Totty, N.F. y Woodgett, J.R. (1993) Modulation of the glycogen synthase kinase-3 family by tyrosine phosphorylation. *Embo J*, **12**, 803-808.
- Inoue, R., Moghaddam, K.A., Ranasinghe, M., Saeki, Y., Chiocca, E.A. y Wade-Martins, R. (2004) Infectious delivery of the 132 kb CDKN2A/CDKN2B genomic DNA region results in correctly spliced gene expression and growth suppression in glioma cells. *Gene Ther*, **11**, 1195-1204.

- Ioannou, P.A., Amemiya, C.T., Ganes, J., Kroisel, P.M., Shizuya, H., Chen, C., Batzer, M.A. y de Jong, P.J. (1994) A new bacteriophage P1-derived vector for the propagation of large human DNA fragments. *Nat Genet*, **6**, 84-89.
- James, A.M., Cocheme, H.M., Smith, R.A. y Murphy, M.P. (2005) Interactions of mitochondria-targeted and untargeted ubiquinones with the mitochondrial respiratory chain and reactive oxygen species. Implications for the use of exogenous ubiquinones as therapies and experimental tools. *J Biol Chem*, **280**, 21295-21312.
- Jarvinen, A.K., Hautaniemi, S., Edgren, H., Auvinen, P., Saarela, J., Kallioniemi, O.P. y Monni, O. (2004) Are data from different gene expression microarray platforms comparable? *Genomics*, **83**, 1164-1168.
- Jia, W.W., Wang, Y., Qiang, D., Tufaro, F., Remington, R. y Cynader, M. (1996) A bcl-2 expressing viral vector protects cortical neurons from excitotoxicity even when administered several hours after the toxic insult. *Brain Res Mol Brain Res*, **42**, 350-353.
- Johnson-Farley, N.N., Travkina, T. y Cowen, D.S. (2006) Cumulative activation of akt and consequent inhibition of glycogen synthase kinase-3 by brain-derived neurotrophic factor and insulin-like growth factor-1 in cultured hippocampal neurons. *J Pharmacol Exp Ther*, **316**, 1062-1069.
- Jordan, J., Cena, V. y Prehn, J.H. (2003) Mitochondrial control of neuron death and its role in neurodegenerative disorders. *J Physiol Biochem*, **59**, 129-141.
- Kang, S.S., Lee, J.Y., Choi, Y.K., Kim, G.S. y Han, B.H. (2004) Neuroprotective effects of flavones on hydrogen peroxide-induced apoptosis in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Bioorg Med Chem Lett*, **14**, 2261-2264.
- Kapfhammer, J.P. (2004) Cellular and molecular control of dendritic growth and development of cerebellar Purkinje cells. *Prog Histochem Cytochem*, **39**, 131-182.
- Karthikeyan, G., Santos, J.H., Graziewicz, M.A., Copeland, W.C., Isaya, G., Van Houten, B. y Resnick, M.A. (2003) Reduction in frataxin causes progressive accumulation of mitochondrial damage. *Hum Mol Genet*, **12**, 3331-3342.
- Kelly, K.M., Nadon, N.L., Morrison, J.H., Thibault, O., Barnes, C.A. y Blalock, E.M. (2006) The neurobiology of aging. *Epilepsy Res*, **68 Suppl 1**, S5-20.
- King, T.D., Bijur, G.N. y Jope, R.S. (2001) Caspase-3 activation induced by inhibition of mitochondrial complex I is facilitated by glycogen synthase kinase-3beta and attenuated by lithium. *Brain Res*, **919**, 106-114.
- King, T.D. y Jope, R.S. (2005) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 protects cells from intrinsic but not extrinsic oxidative stress. *Neuroreport*, **16**, 597-601.
- Kitamura, Y., Inden, M., Miyamura, A., Kakimura, J., Taniguchi, T. y Shimohama, S. (2002) Possible involvement of both mitochondria- and endoplasmic reticulum-dependent caspase pathways in rotenone-induced apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett*, **333**, 25-28.
- Kivell, B.M., McDonald, F.J. y Miller, J.H. (2000) Serum-free culture of rat post-natal and fetal brainstem neurons. *Brain Res Dev Brain Res*, **120**, 199-210.
- Kivell, B.M., McDonald, F.J. y Miller, J.H. (2001) Method for serum-free culture of late fetal and early postnatal rat brainstem neurons. *Brain Res Brain Res Protoc*, **6**, 91-99.
- Klein, P.S. y Melton, D.A. (1996) A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 8455-8459.
- Kluck, R.M., Bossy-Wetzell, E., Green, D.R. y Newmeyer, D.D. (1997) The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*, **275**, 1132-1136.

- Koliatsos, V.E., Nauta, H.J., Clatterbuck, R.E., Holtzman, D.M., Mobley, W.C. y Price, D.L. (1990) Mouse nerve growth factor prevents degeneration of axotomized basal forebrain cholinergic neurons in the monkey. *J Neurosci*, **10**, 3801-3813.
- Kootstra, N.A. y Verma, I.M. (2003) Gene therapy with viral vectors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **43**, 413-439.
- Koutnikova, H., Campuzano, V., Foury, F., Dolle, P., Cazzalini, O. y Koenig, M. (1997) Studies of human, mouse and yeast homologues indicate a mitochondrial function for frataxin. *Nat Genet*, **16**, 345-351.
- Kranenburg, O., Scharnhorst, V., Van der Eb, A.J. y Zantema, A. (1995) Inhibition of cyclin-dependent kinase activity triggers neuronal differentiation of mouse neuroblastoma cells. *J Cell Biol*, **131**, 227-234.
- Krantic, S., Mechawar, N., Reix, S. y Quirion, R. (2005) Molecular basis of programmed cell death involved in neurodegeneration. *Trends Neurosci*, **28**, 670-676.
- Kresina, T.F. (ed.). (2001) *An introduction to molecular medicine and gene therapy*. Wiley-Liss, New York.
- Kroemer, G., Dallaporta, B. y Resche-Rigon, M. (1998) The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol*, **60**, 619-642.
- Kroemer, G., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Peter, M.E., Vaux, D., Vandenabeele, P., Zhivotovsky, B., Blagosklonny, M.V., Malorni, W., Knight, R.A., Piacentini, M., Nagata, S. y Melino, G. (2005) Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ*, **12 Suppl 2**, 1463-1467.
- Kroemer, G. y Martin, S.J. (2005) Caspase-independent cell death. *Nat Med*, **11**, 725-730.
- Kroemer, G., Zamzami, N. y Susin, S.A. (1997) Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today*, **18**, 44-51.
- Kuznetsov, A.V., Janakiraman, M., Margreiter, R. y Troppmair, J. (2004) Regulating cell survival by controlling cellular energy production: novel functions for ancient signaling pathways? *FEBS Lett*, **577**, 1-4.
- Kweon, G.R., Marks, J.D., Krencik, R., Leung, E.H., Schumacker, P.T., Hyland, K. y Kang, U.J. (2004) Distinct mechanisms of neurodegeneration induced by chronic complex I inhibition in dopaminergic and non-dopaminergic cells. *J Biol Chem*, **279**, 51783-51792.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lai, E.C., Felice, K.J., Festoff, B.W., Gawel, M.J., Gelinas, D.F., Kratz, R., Murphy, M.F., Natter, H.M., Norris, F.H. y Rudnicki, S.A. (1997) Effect of recombinant human insulin-like growth factor-I on progression of ALS. A placebo-controlled study. The North America ALS/IGF-I Study Group. *Neurology*, **49**, 1621-1630.
- Lai, J.S., Zhao, C., Warsh, J.J. y Li, P.P. (2006) Cytoprotection by lithium and valproate varies between cell types and cellular stresses. *Eur J Pharmacol*.
- Landrigan, P.J., Sonawane, B., Butler, R.N., Trasande, L., Callan, R. y Droller, D. (2005) Early environmental origins of neurodegenerative disease in later life. *Environ Health Perspect*, **113**, 1230-1233.
- Lang-Rollin, I.C., Rideout, H.J., Noticewala, M. y Stefanis, L. (2003) Mechanisms of caspase-independent neuronal death: energy depletion and free radical generation. *J Neurosci*, **23**, 11015-11025.
- Langston, J.W., Ballard, P., Tetrud, J.W. y Irwin, I. (1983) Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*, **219**, 979-980.

- Langston, J.W. y Ballard, P.A., Jr. (1983) Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *N Engl J Med*, **309**, 310.
- Lapointe, N., St-Hilaire, M., Martinoli, M.G., Blanchet, J., Gould, P., Rouillard, C. y Cicchetti, F. (2004) Rotenone induces non-specific central nervous system and systemic toxicity. *Faseb J*, **18**, 717-719.
- Lawrence, M.S., Ho, D.Y., Sun, G.H., Steinberg, G.K. y Sapolsky, R.M. (1996) Overexpression of Bcl-2 with herpes simplex virus vectors protects CNS neurons against neurological insults in vitro and in vivo. *J Neurosci*, **16**, 486-496.
- Lee, H.J., Shin, S.Y., Choi, C., Lee, Y.H. y Lee, S.J. (2002) Formation and removal of alpha-synuclein aggregates in cells exposed to mitochondrial inhibitors. *J Biol Chem*, **277**, 5411-5417.
- Lee, V.M. y Trojanowski, J.Q. (1999) Neurodegenerative tauopathies: human disease and transgenic mouse models. *Neuron*, **24**, 507-510.
- Leost, M., Schultz, C., Link, A., Wu, Y.Z., Biernat, J., Mandelkow, E.M., Bibb, J.A., Snyder, G.L., Greengard, P., Zaharevitz, D.W., Gussio, R., Senderowicz, A.M., Sausville, E.A., Kunick, C. y Meijer, L. (2000) Paullones are potent inhibitors of glycogen synthase kinase-3beta and cyclin-dependent kinase 5/p25. *Eur J Biochem*, **267**, 5983-5994.
- Levine, B. y Klionsky, D.J. (2004) Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell*, **6**, 463-477.
- Levine, B. y Yuan, J. (2005) Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest*, **115**, 2679-2688.
- Li, J., Spletter, M.L., Johnson, D.A., Wright, L.S., Svendsen, C.N. y Johnson, J.A. (2005) Rotenone-induced caspase 9/3-independent and -dependent cell death in undifferentiated and differentiated human neural stem cells. *J Neurochem*, **92**, 462-476.
- Li, N., Ragheb, K., Lawler, G., Sturgis, J., Rajwa, B., Melendez, J.A. y Robinson, J.P. (2003) Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *J Biol Chem*, **278**, 8516-8525.
- Li, R., Shen, Y. y El-Mallakh, R.S. (1994) Lithium protects against ouabain-induced cell death. *Lithium*, **5**, 211-216.
- Li, X., Bijur, G.N. y Jope, R.S. (2002) Glycogen synthase kinase-3beta, mood stabilizers, and neuroprotection. *Bipolar Disord*, **4**, 137-144.
- Lilley, C.E., Groutsi, F., Han, Z., Palmer, J.A., Anderson, P.N., Latchman, D.S. y Coffin, R.S. (2001) Multiple immediate-early gene-deficient herpes simplex virus vectors allowing efficient gene delivery to neurons in culture and widespread gene delivery to the central nervous system in vivo. *J Virol*, **75**, 4343-4356.
- Lim, F., Hartley, D., Starr, P., Lang, P., Song, S., Yu, L., Wang, Y. y Geller, A.I. (1996) Generation of high-titer defective HSV-1 vectors using an IE 2 deletion mutant and quantitative study of expression in cultured cortical cells. *Biotechniques*, **20**, 460-469.
- Lindahl, P.E. y Oberg, K.E. (1961) The effect of rotenone on respiration and its point of attack. *Exp Cell Res*, **23**, 228-237.
- Linnik, M.D., Zahos, P., Geschwind, M.D. y Federoff, H.J. (1995) Expression of bcl-2 from a defective herpes simplex virus-1 vector limits neuronal death in focal cerebral ischemia. *Stroke*, **26**, 1670-1674; discussion 1675.
- Linseman, D.A., Butts, B.D., Precht, T.A., Phelps, R.A., Le, S.S., Laessig, T.A., Bouchard, R.J., Florez-McClure, M.L. y Heidenreich, K.A. (2004) Glycogen synthase kinase-3beta phosphorylates Bax and promotes its mitochondrial localization during neuronal apoptosis. *J Neurosci*, **24**, 9993-10002.

- Loberg, R.D., Vesely, E. y Brosius, F.C., 3rd. (2002) Enhanced glycogen synthase kinase-3 β activity mediates hypoxia-induced apoptosis of vascular smooth muscle cells and is prevented by glucose transport and metabolism. *J Biol Chem*, **277**, 41667-41673.
- Lucas, J.J., Hernandez, F., Gomez-Ramos, P., Moran, M.A., Hen, R. y Avila, J. (2001) Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3 β conditional transgenic mice. *Embo J*, **20**, 27-39.
- Lum, J.J., Bauer, D.E., Kong, M., Harris, M.H., Li, C., Lindsten, T. y Thompson, C.B. (2005) Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell*, **120**, 237-248.
- Lundstrom, K. (2003) Latest development in viral vectors for gene therapy. *Trends Biotechnol*, **21**, 117-122.
- Lundstrom, K. y Boulikas, T. (2003) Viral and non-viral vectors in gene therapy: technology development and clinical trials. *Technol Cancer Res Treat*, **2**, 471-486.
- Lustig, B. y Behrens, J. (2003) The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. *J Cancer Res Clin Oncol*, **129**, 199-221.
- Maher, F., Vannucci, S.J. y Simpson, I.A. (1994) Glucose transporter proteins in brain. *Faseb J*, **8**, 1003-1011.
- Majewski, N., Nogueira, V., Bhaskar, P., Coy, P.E., Skeen, J.E., Gottlob, K., Chandel, N.S., Thompson, C.B., Robey, R.B. y Hay, N. (2004a) Hexokinase-mitochondria interaction mediated by Akt is required to inhibit apoptosis in the presence or absence of Bax and Bak. *Mol Cell*, **16**, 819-830.
- Majewski, N., Nogueira, V., Robey, R.B. y Hay, N. (2004b) Akt inhibits apoptosis downstream of BID cleavage via a glucose-dependent mechanism involving mitochondrial hexokinases. *Mol Cell Biol*, **24**, 730-740.
- Mandel, R.J., Manfredsson, F.P., Foust, K.D., Rising, A., Reimsnider, S., Nash, K. y Burger, C. (2006) Recombinant adeno-associated viral vectors as therapeutic agents to treat neurological disorders. *Mol Ther*, **13**, 463-483.
- Manfredi, G. y Xu, Z. (2005) Mitochondrial dysfunction and its role in motor neuron degeneration in ALS. *Mitochondrion*, **5**, 77-87.
- Manoukian, A.S. y Woodgett, J.R. (2002) Role of glycogen synthase kinase-3 in cancer: regulation by Wnts and other signaling pathways. *Adv Cancer Res*, **84**, 203-229.
- Mariani, E., Polidori, M.C., Cherubini, A. y Mecocci, P. (2005) Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **827**, 65-75.
- Mata, M., Glorioso, J.C. y Fink, D.J. (2002) Targeted gene delivery to the nervous system using herpes simplex virus vectors. *Physiol Behav*, **77**, 483-488.
- Matsuoka, N., Yukawa, H., Ishii, K., Hamada, H., Akimoto, M., Hashimoto, N. y Miyatake, S. (1999) Adenovirus-mediated gene transfer of Bcl-xL prevents cell death in primary neuronal culture of the rat. *Neurosci Lett*, **270**, 177-180.
- Mattson, M.P. (2000) Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **1**, 120-129.
- Mattson, M.P., Barger, S.W., Begley, J.G. y Mark, R.J. (1995) Calcium, free radicals, and excitotoxic neuronal death in primary cell culture. *Methods Cell Biol*, **46**, 187-216.
- Mattson, M.P. y Sherman, M. (2003) Perturbed signal transduction in neurodegenerative disorders involving aberrant protein aggregation. *Neuromolecular Med*, **4**, 109-132.

- Maurer, U., Charvet, C., Wagman, A.S., Dejardin, E. y Green, D.R. (2006) Glycogen Synthase Kinase-3 Regulates Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization and Apoptosis by Destabilization of MCL-1. *Mol Cell*, **21**, 749-760.
- McCarthy, A.M., McMahan, L. y Schaffer, P.A. (1989) Herpes simplex virus type 1 ICP27 deletion mutants exhibit altered patterns of transcription and are DNA deficient. *J Virol*, **63**, 18-27.
- McDowell, F., Lee, J.E., Swift, T., Sweet, R.D., Ogsbury, J.S. y Kessler, J.T. (1970) Treatment of Parkinson's syndrome with L dihydroxyphenylalanine (levodopa). *Ann Intern Med*, **72**, 29-35.
- Melino, G., Knight, R.A. y Nicotera, P. (2005) How many ways to die? How many different models of cell death? *Cell Death Differ*, **12 Suppl 2**, 1457-1462.
- Menegon, A., Board, P.G., Blackburn, A.C., Mellick, G.D. y Le Couteur, D.G. (1998) Parkinson's disease, pesticides, and glutathione transferase polymorphisms. *Lancet*, **352**, 1344-1346.
- Merlo-Pich, M., Deleonardi, G., Biondi, A. y Lenaz, G. (2004) Methods to detect mitochondrial function. *Exp Gerontol*, **39**, 277-281.
- Miranda, C.J., Santos, M.M., Ohshima, K., Smith, J., Li, L., Bunting, M., Cossee, M., Koenig, M., Sequeiros, J., Kaplan, J. y Pandolfo, M. (2002) Frataxin knockin mouse. *FEBS Lett*, **512**, 291-297.
- Miyashita, T. y Reed, J.C. (1995) Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*, **80**, 293-299.
- Mochizuki, S., Shimoda, M., Shiomi, T., Fujii, Y. y Okada, Y. (2004) ADAM28 is activated by MMP-7 (matrilysin-1) and cleaves insulin-like growth factor binding protein-3. *Biochem Biophys Res Commun*, **315**, 79-84.
- Molina-Jimenez, M.F., Sanchez-Reus, M.I., Andres, D., Cascales, M. y Benedi, J. (2004) Neuroprotective effect of fraxetin and myricetin against rotenone-induced apoptosis in neuroblastoma cells. *Brain Res*, **1009**, 9-16.
- Mora, A., Sabio, G., Gonzalez-Polo, R.A., Cuenda, A., Alessi, D.R., Alonso, J.C., Fuentes, J.M., Soler, G. y Centeno, F. (2001) Lithium inhibits caspase 3 activation and dephosphorylation of PKB and GSK3 induced by K⁺ deprivation in cerebellar granule cells. *J Neurochem*, **78**, 199-206.
- Mora, A., Sabio, G., Risco, A.M., Cuenda, A., Alonso, J.C., Soler, G. y Centeno, F. (2002) Lithium blocks the PKB and GSK3 dephosphorylation induced by ceramide through protein phosphatase-2A. *Cell Signal*, **14**, 557-562.
- Moreira, P.I., Custodio, J.B., Oliveira, C.R. y Santos, M.S. (2004) Hydroxytamoxifen protects against oxidative stress in brain mitochondria. *Biochem Pharmacol*, **68**, 195-204.
- Morfini, G., Pigino, G. y Brady, S.T. (2005) Polyglutamine expansion diseases: failing to deliver. *Trends Mol Med*, **11**, 64-70.
- Morrison, M.E. y Mason, C.A. (1998) Granule neuron regulation of Purkinje cell development: striking a balance between neurotrophin and glutamate signaling. *J Neurosci*, **18**, 3563-3573.
- Morstyn, G., Hsu, S.M., Kinsella, T., Gratzner, H., Russo, A. y Mitchell, J.B. (1983) Bromodeoxyuridine in tumors and chromosomes detected with a monoclonal antibody. *J Clin Invest*, **72**, 1844-1850.
- Munoz-Montano, J.R., Lim, F., Moreno, F.J., Avila, J. y Diaz-Nido, J. (1999a) Glycogen Synthase Kinase-3 Modulates Neurite Outgrowth in Cultured Neurons: Possible Implications for Neurite Pathology in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*, **1**, 361-378.
- Munoz-Montano, J.R., Moreno, F.J., Avila, J. y Diaz-Nido, J. (1997) Lithium inhibits Alzheimer's disease-like tau protein phosphorylation in neurons. *FEBS Lett*, **411**, 183-188.

- Munoz-Montano, J.R., Moreno, F.J., Avila, J. y Diaz-Nido, J. (1999b) Downregulation of glycogen synthase kinase-3beta (GSK-3beta) protein expression during neuroblastoma IMR-32 cell differentiation. *J Neurosci Res*, **55**, 278-285.
- Muthane, U., Ramsay, K.A., Jiang, H., Jackson-Lewis, V., Donaldson, D., Fernando, S., Ferreira, M. y Przedborski, S. (1994) Differences in nigral neuron number and sensitivity to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in C57/bl and CD-1 mice. *Exp Neurol*, **126**, 195-204.
- Muyrers, J.P., Zhang, Y., Benes, V., Testa, G., Rientjes, J.M. y Stewart, A.F. (2004) ET recombination: DNA engineering using homologous recombination in *E. coli*. *Methods Mol Biol*, **256**, 107-121.
- Muyrers, J.P., Zhang, Y. y Stewart, A.F. (2001) Techniques: Recombinogenic engineering--new options for cloning and manipulating DNA. *Trends Biochem Sci*, **26**, 325-331.
- Muyrers, J.P., Zhang, Y., Testa, G. y Stewart, A.F. (1999) Rapid modification of bacterial artificial chromosomes by ET-recombination. *Nucleic Acids Res*, **27**, 1555-1557.
- Nakano, K. y Vousden, K.H. (2001) PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell*, **7**, 683-694.
- Newmeyer, D.D. y Ferguson-Miller, S. (2003) Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell*, **112**, 481-490.
- Nordquist, D.T., Kozak, C.A. y Orr, H.T. (1988) cDNA cloning and characterization of three genes uniquely expressed in cerebellum by Purkinje neurons. *J Neurosci*, **8**, 4780-4789.
- Nosheny, R.L., Mocchetti, I. y Bachis, A. (2005) Brain-derived neurotrophic factor as a prototype neuroprotective factor against HIV-1-associated neuronal degeneration. *Neurotox Res*, **8**, 187-198.
- Nutt, L.K., Margolis, S.S., Jensen, M., Herman, C.E., Dunphy, W.G., Rathmell, J.C. y Kornbluth, S. (2005) Metabolic regulation of oocyte cell death through the CaMKII-mediated phosphorylation of caspase-2. *Cell*, **123**, 89-103.
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T. y Tanaka, N. (2000) Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science*, **288**, 1053-1058.
- Oehmig, A., Fraefel, C. y Breakefield, X.O. (2004) Update on herpesvirus amplicon vectors. *Mol Ther*, **10**, 630-643.
- Ohtsuka, T., Shiomi, T., Shimoda, M., Kodama, T., Amour, A., Murphy, G., Ohuchi, E., Kobayashi, K. y Okada, Y. (2006) ADAM28 is overexpressed in human non-small cell lung carcinomas and correlates with cell proliferation and lymph node metastasis. *Int J Cancer*, **118**, 263-273.
- Olschowka, J.A., Bowers, W.J., Hurley, S.D., Mastrangelo, M.A. y Federoff, H.J. (2003) Helper-free HSV-1 amplicons elicit a markedly less robust innate immune response in the CNS. *Mol Ther*, **7**, 218-227.
- Oltvai, Z.N., Millman, C.L. y Korsmeyer, S.J. (1993) Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, **74**, 609-619.
- Palau, F. (2001) Friedreich's ataxia and frataxin: molecular genetics, evolution and pathogenesis (Review). *Int J Mol Med*, **7**, 581-589.
- Pallotti, F. y Lenaz, G. (2001) Isolation and subfractionation of mitochondria from animal cells and tissue culture lines. *Methods Cell Biol*, **65**, 1-35.
- Pan, G., O'Rourke, K. y Dixit, V.M. (1998) Caspase-9, Bcl-XL, and Apaf-1 form a ternary complex. *J Biol Chem*, **273**, 5841-5845.
- Pandolfo, M. (2001) Molecular basis of Friedreich ataxia. *Mov Disord*, **16**, 815-821.
- Pandolfo, M. (2002a) Frataxin deficiency and mitochondrial dysfunction. *Mitochondrion*, **2**, 87-93.

- Pandolfo, M. (2002b) The molecular basis of Friedreich ataxia. *Adv Exp Med Biol*, **516**, 99-118.
- Pap, M. y Cooper, G.M. (1998) Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem*, **273**, 19929-19932.
- Pastorino, J.G. y Hoek, J.B. (2003) Hexokinase II: the integration of energy metabolism and control of apoptosis. *Curr Med Chem*, **10**, 1535-1551.
- Pastorino, J.G., Hoek, J.B. y Shulga, N. (2005) Activation of glycogen synthase kinase 3beta disrupts the binding of hexokinase II to mitochondria by phosphorylating voltage-dependent anion channel and potentiates chemotherapy-induced cytotoxicity. *Cancer Res*, **65**, 10545-10554.
- Pastorino, J.G., Shulga, N. y Hoek, J.B. (2002) Mitochondrial binding of hexokinase II inhibits Bax-induced cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem*, **277**, 7610-7618.
- Pei, W., Liou, A.K. y Chen, J. (2003) Two caspase-mediated apoptotic pathways induced by rotenone toxicity in cortical neuronal cells. *Faseb J*, **17**, 520-522.
- Penso, J. y Beitner, R. (2003) Lithium detaches hexokinase from mitochondria and inhibits proliferation of B16 melanoma cells. *Mol Genet Metab*, **78**, 74-78.
- Perez-Navarro, E., Gavaldà, N., Gratacos, E. y Alberch, J. (2005) Brain-derived neurotrophic factor prevents changes in Bcl-2 family members and caspase-3 activation induced by excitotoxicity in the striatum. *J Neurochem*, **92**, 678-691.
- Perez, M., Rojo, A.I., Wandosell, F., Diaz-Nido, J. y Avila, J. (2003) Prion peptide induces neuronal cell death through a pathway involving glycogen synthase kinase 3. *Biochem J*, **372**, 129-136.
- Perier, C., Tieu, K., Guegan, C., Caspersen, C., Jackson-Lewis, V., Carelli, V., Martinuzzi, A., Hirano, M., Przedborski, S. y Vila, M. (2005) Complex I deficiency primes Bax-dependent neuronal apoptosis through mitochondrial oxidative damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 19126-19131.
- Pianese, L., Tammaro, A., Turano, M., De Biase, I., Monticelli, A. y Coccozza, S. (2002) Identification of a novel transcript of X25, the human gene involved in Friedreich ataxia. *Neurosci Lett*, **320**, 137-140.
- Polster, B.M. y Fiskum, G. (2004) Mitochondrial mechanisms of neural cell apoptosis. *J Neurochem*, **90**, 1281-1289.
- Price, D.L., Tanzi, R.E., Borchelt, D.R. y Sisodia, S.S. (1998) Alzheimer's disease: genetic studies and transgenic models. *Annu Rev Genet*, **32**, 461-493.
- Proskuryakov, S.Y., Gabai, V.L. y Konoplyannikov, A.G. (2002) Necrosis is an active and controlled form of programmed cell death. *Biochemistry (Mosc)*, **67**, 387-408.
- Proskuryakov, S.Y., Konoplyannikov, A.G. y Gabai, V.L. (2003) Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp Cell Res*, **283**, 1-16.
- Przedborski, S. y Vila, M. (2003) The 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model: a tool to explore the pathogenesis of Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci*, **991**, 189-198.
- Przedborski, S., Vila, M. y Jackson-Lewis, V. (2003) Neurodegeneration: what is it and where are we? *J Clin Invest*, **111**, 3-10.
- Puccio, H., Simon, D., Cossee, M., Criqui-Filipe, P., Tiziano, F., Melki, J., Hindelang, C., Matyas, R., Rustin, P. y Koenig, M. (2001) Mouse models for Friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and Fe-S enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits. *Nat Genet*, **27**, 181-186.
- Radisky, D.C., Babcock, M.C. y Kaplan, J. (1999) The yeast frataxin homologue mediates mitochondrial iron efflux. Evidence for a mitochondrial iron cycle. *J Biol Chem*, **274**, 4497-4499.

- Ren, M., Senatorov, V.V., Chen, R.W. y Chuang, D.M. (2003) Postinsult treatment with lithium reduces brain damage and facilitates neurological recovery in a rat ischemia/reperfusion model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 6210-6215.
- Ristow, M., Pfister, M.F., Yee, A.J., Schubert, M., Michael, L., Zhang, C.Y., Ueki, K., Michael, M.D., 2nd, Lowell, B.B. y Kahn, C.R. (2000) Frataxin activates mitochondrial energy conversion and oxidative phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 12239-12243.
- Ritchie, K. y Lovestone, S. (2002) The dementias. *Lancet*, **360**, 1759-1766.
- Rotig, A., de Lonlay, P., Chretien, D., Foury, F., Koenig, M., Sidi, D., Munnich, A. y Rustin, P. (1997) Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia. *Nat Genet*, **17**, 215-217.
- Rotig, A., Sidi, D., Munnich, A. y Rustin, P. (2002) Molecular insights into Friedreich's ataxia and antioxidant-based therapies. *Trends Mol Med*, **8**, 221-224.
- Rustin, P., von Kleist-Retzow, J.C., Chantrel-Groussard, K., Sidi, D., Munnich, A. y Rotig, A. (1999) Effect of idebenone on cardiomyopathy in Friedreich's ataxia: a preliminary study. *Lancet*, **354**, 477-479.
- Ryu, E.J., Harding, H.P., Angelastro, J.M., Vitolo, O.V., Ron, D. y Greene, L.A. (2002) Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in cellular models of Parkinson's disease. *J Neurosci*, **22**, 10690-10698.
- Sacks, W.R., Greene, C.C., Aschman, D.P. y Schaffer, P.A. (1985) Herpes simplex virus type 1 ICP27 is an essential regulatory protein. *J Virol*, **55**, 796-805.
- Saeki, Y., Fraefel, C., Ichikawa, T., Breakefield, X.O. y Chiocca, E.A. (2001) Improved helper virus-free packaging system for HSV amplicon vectors using an ICP27-deleted, oversized HSV-1 DNA in a bacterial artificial chromosome. *Mol Ther*, **3**, 591-601.
- Salazar, M., Rojo, A.I., Velasco, D., de Sagarra, R.M. y Cuadrado, A. (2006) Glycogen synthase kinase-3 β inhibits the xenobiotic and antioxidant cell response by direct phosphorylation and nuclear exclusion of the transcription factor NRF2. *J Biol Chem*, **281**, 14841-14851.
- Sanchez Martin, C., Diaz-Nido, J. y Avila, J. (1998) Regulation of a site-specific phosphorylation of the microtubule-associated protein 2 during the development of cultured neurons. *Neuroscience*, **87**, 861-870.
- Sanchez, S., Sayas, C.L., Lim, F., Diaz-Nido, J., Avila, J. y Wandosell, F. (2001) The inhibition of phosphatidylinositol-3-kinase induces neurite retraction and activates GSK3. *J Neurochem*, **78**, 468-481.
- Sapolsky, R.M. (2003) Neuroprotective gene therapy against acute neurological insults. *Nat Rev Neurosci*, **4**, 61-69.
- Saravanan, K.S., Sindhu, K.M. y Mohanakumar, K.P. (2005) Acute intranigral infusion of rotenone in rats causes progressive biochemical lesions in the striatum similar to Parkinson's disease. *Brain Res*, **1049**, 147-155.
- Sarsero, J.P., Li, L., Holloway, T.P., Voullaire, L., Gazeas, S., Fowler, K.J., Kirby, D.M., Thorburn, D.R., Galle, A., Cheema, S., Koenig, M., Williamson, R. y Ioannou, P.A. (2004) Human BAC-mediated rescue of the Friedreich ataxia knockout mutation in transgenic mice. *Mamm Genome*, **15**, 370-382.
- Sarsero, J.P., Li, L., Wardan, H., Sitte, K., Williamson, R. y Ioannou, P.A. (2003) Upregulation of expression from the FRDA genomic locus for the therapy of Friedreich ataxia. *J Gene Med*, **5**, 72-81.
- Sastre, J., Pallardo, F.V. y Vina, J. (2003) The role of mitochondrial oxidative stress in aging. *Free Radic Biol Med*, **35**, 1-8.

- Sayas, C.L., Ariaens, A., Ponsioen, B. y Moolenaar, W.H. (2006) GSK-3 Is Activated by the Tyrosine Kinase Pyk2 during LPA1-mediated Neurite Retraction. *Mol Biol Cell*.
- Scapagnini, G., Foresti, R., Calabrese, V., Giuffrida Stella, A.M., Green, C.J. y Motterlini, R. (2002) Caffeic acid phenethyl ester and curcumin: a novel class of heme oxygenase-1 inducers. *Mol Pharmacol*, **61**, 554-561.
- Schapira, A.H. (2004) Disease modification in Parkinson's disease. *Lancet Neurol*, **3**, 362-368.
- Schober, A. (2004) Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res*, **318**, 215-224.
- Schoenfeld, R.A., Napoli, E., Wong, A., Zhan, S., Reutenauer, L., Morin, D., Buckpitt, A.R., Taroni, F., Lonnerdal, B., Ristow, M., Puccio, H. y Cortopassi, G.A. (2005) Frataxin deficiency alters heme pathway transcripts and decreases mitochondrial heme metabolites in mammalian cells. *Hum Mol Genet*, **14**, 3787-3799.
- Schriner, S.E., Linford, N.J., Martin, G.M., Treuting, P., Ogburn, C.E., Emond, M., Coskun, P.E., Ladiges, W., Wolf, N., Van Remmen, H., Wallace, D.C. y Rabinovitch, P.S. (2005) Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science*, **308**, 1909-1911.
- Schulz, J.B., Dehmer, T., Schols, L., Mende, H., Hardt, C., Vorgerd, M., Burk, K., Matson, W., Dichgans, J., Beal, M.F. y Bogdanov, M.B. (2000) Oxidative stress in patients with Friedreich ataxia. *Neurology*, **55**, 1719-1721.
- Schweighardt, B. y Atwood, W.J. (2001) Virus receptors in the human central nervous system. *J Neurovirol*, **7**, 187-195.
- Seidah, N.G., Mowla, S.J., Hamelin, J., Mamarbachi, A.M., Benjannet, S., Toure, B.B., Basak, A., Munzer, J.S., Marcinkiewicz, J., Zhong, M., Barale, J.C., Lazure, C., Murphy, R.A., Chretien, M. y Marcinkiewicz, M. (1999) Mammalian subtilisin/kexin isozyme SKI-1: A widely expressed proprotein convertase with a unique cleavage specificity and cellular localization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 1321-1326.
- Selkoe, D.J. (1997) Alzheimer's disease: genotypes, phenotypes, and treatments. *Science*, **275**, 630-631.
- Selkoe, D.J. (1998) The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol*, **8**, 447-453.
- Selkoe, D.J. (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev*, **81**, 741-766.
- Sena-Esteves, M., Saeki, Y., Fraefel, C. y Breakefield, X.O. (2000) HSV-1 amplicon vectors--simplicity and versatility. *Mol Ther*, **2**, 9-15.
- Senior, S.L. y Wade-Martins, R. (2005) Herpes simplex virus type 1 amplicon vectors for the infectious delivery and expression of genomic DNA loci. *Curr Opin Mol Ther*, **7**, 337-345.
- Seznec, H., Simon, D., Bouton, C., Reutenauer, L., Hertzog, A., Golik, P., Procaccio, V., Patel, M., Drapier, J.C., Koenig, M. y Puccio, H. (2005) Friedreich ataxia: the oxidative stress paradox. *Hum Mol Genet*, **14**, 463-474.
- Seznec, H., Simon, D., Monassier, L., Criqui-Filipe, P., Gansmuller, A., Rustin, P., Koenig, M. y Puccio, H. (2004) Idebenone delays the onset of cardiac functional alteration without correction of Fe-S enzymes deficit in a mouse model for Friedreich ataxia. *Hum Mol Genet*, **13**, 1017-1024.
- Shamoto-Nagai, M., Maruyama, W., Kato, Y., Isobe, K., Tanaka, M., Naoi, M. y Osawa, T. (2003) An inhibitor of mitochondrial complex I, rotenone, inactivates proteasome by oxidative modification and induces aggregation of oxidized proteins in SH-SY5Y cells. *J Neurosci Res*, **74**, 589-597.
- Sherer, T.B., Betarbet, R. y Greenamyre, J.T. (2001) Pesticides and Parkinson's disease. *ScientificWorldJournal*, **1**, 207-208.

- Sherer, T.B., Betarbet, R., Stout, A.K., Lund, S., Baptista, M., Panov, A.V., Cookson, M.R. y Greenamyre, J.T. (2002) An in vitro model of Parkinson's disease: linking mitochondrial impairment to altered alpha-synuclein metabolism and oxidative damage. *J Neurosci*, **22**, 7006-7015.
- Sherer, T.B., Betarbet, R., Testa, C.M., Seo, B.B., Richardson, J.R., Kim, J.H., Miller, G.W., Yagi, T., Matsuno-Yagi, A. y Greenamyre, J.T. (2003a) Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease. *J Neurosci*, **23**, 10756-10764.
- Sherer, T.B., Kim, J.H., Betarbet, R. y Greenamyre, J.T. (2003b) Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and alpha-synuclein aggregation. *Exp Neurol*, **179**, 9-16.
- Shih, A.Y., Imbeault, S., Barakauskas, V., Erb, H., Jiang, L., Li, P. y Murphy, T.H. (2005) Induction of the Nrf2-driven antioxidant response confers neuroprotection during mitochondrial stress in vivo. *J Biol Chem*, **280**, 22925-22936.
- Shizuya, H., Birren, B., Kim, U.J., Mancino, V., Slepak, T., Tachiiri, Y. y Simon, M. (1992) Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in Escherichia coli using an F-factor-based vector. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 8794-8797.
- Shoichet, S.A., Baumer, A.T., Stamenkovic, D., Sauer, H., Pfeiffer, A.F., Kahn, C.R., Muller-Wieland, D., Richter, C. y Ristow, M. (2002) Frataxin promotes antioxidant defense in a thiol-dependent manner resulting in diminished malignant transformation in vitro. *Hum Mol Genet*, **11**, 815-821.
- Simon, D.K., Lin, M.T., Zheng, L., Liu, G.J., Ahn, C.H., Kim, L.M., Mauck, W.M., Twu, F., Beal, M.F. y Johns, D.R. (2004) Somatic mitochondrial DNA mutations in cortex and substantia nigra in aging and Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*, **25**, 71-81.
- Sionov, R.V. y Haupt, Y. (1999) The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene*, **18**, 6145-6157.
- Smigrodzki, R., Parks, J. y Parker, W.D. (2004) High frequency of mitochondrial complex I mutations in Parkinson's disease and aging. *Neurobiol Aging*, **25**, 1273-1281.
- Smith, R.A., Porteous, C.M., Gane, A.M. y Murphy, M.P. (2003) Delivery of bioactive molecules to mitochondria in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 5407-5412.
- Somayajulu, M., McCarthy, S., Hung, M., Sikorska, M., Borowy-Borowski, H. y Pandey, S. (2005) Role of mitochondria in neuronal cell death induced by oxidative stress; neuroprotection by Coenzyme Q10. *Neurobiol Dis*, **18**, 618-627.
- Somervaille, T.C., Linch, D.C. y Khwaja, A. (2001) Growth factor withdrawal from primary human erythroid progenitors induces apoptosis through a pathway involving glycogen synthase kinase-3 and Bax. *Blood*, **98**, 1374-1381.
- Song, L., De Sarno, P. y Jope, R.S. (2002) Central role of glycogen synthase kinase-3beta in endoplasmic reticulum stress-induced caspase-3 activation. *J Biol Chem*, **277**, 44701-44708.
- Spierings, D., McStay, G., Saleh, M., Bender, C., Chipuk, J., Maurer, U. y Green, D.R. (2005) Connected to death: the (unexpurgated) mitochondrial pathway of apoptosis. *Science*, **310**, 66-67.
- Stadtman, E.R. y Berlett, B.S. (1997) Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Chem Res Toxicol*, **10**, 485-494.
- Stambolic, V., Ruel, L. y Woodgett, J.R. (1996) Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells. *Curr Biol*, **6**, 1664-1668.

- Starr, P.A., Lim, F., Grant, F.D., Trask, L., Lang, P., Yu, L. y Geller, A.I. (1996) Long-term persistence of defective HSV-1 vectors in the rat brain is demonstrated by reactivation of vector gene expression. *Gene Ther*, **3**, 615-623.
- Stefanis, L. (2005) Caspase-dependent and -independent neuronal death: two distinct pathways to neuronal injury. *Neuroscientist*, **11**, 50-62.
- Stehling, O., Elsasser, H.P., Bruckel, B., Muhlenhoff, U. y Lill, R. (2004) Iron-sulfur protein maturation in human cells: evidence for a function of frataxin. *Hum Mol Genet*, **13**, 3007-3015.
- Strehl, S., Glatt, K., Liu, Q.M., Glatt, H. y Lalonde, M. (1998) Characterization of two novel protocadherins (PCDH8 and PCDH9) localized on human chromosome 13 and mouse chromosome 14. *Genomics*, **53**, 81-89.
- Strittmatter, W.J., Saunders, A.M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G.S. y Roses, A.D. (1993) Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 1977-1981.
- Sturm, B., Bistrich, U., Schranzhofer, M., Sarsero, J.P., Rauen, U., Scheiber-Mojdehkar, B., de Groot, H., Ioannou, P. y Petrat, F. (2005a) Friedreich's ataxia, no changes in mitochondrial labile iron in human lymphoblasts and fibroblasts: a decrease in antioxidative capacity? *J Biol Chem*, **280**, 6701-6708.
- Sturm, B., Stupphann, D., Kaun, C., Boesch, S., Schranzhofer, M., Wojta, J., Goldenberg, H. y Scheiber-Mojdehkar, B. (2005b) Recombinant human erythropoietin: effects on frataxin expression in vitro. *Eur J Clin Invest*, **35**, 711-717.
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebbersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M. y Kroemer, G. (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, **397**, 441-446.
- Tabata, T., Sawada, S., Araki, K., Bono, Y., Furuya, S. y Kano, M. (2000) A reliable method for culture of dissociated mouse cerebellar cells enriched for Purkinje neurons. *J Neurosci Methods*, **104**, 45-53.
- Tabbaa, S., Corso, T.D., Jenkins, L., Tran, R.K., Bloom, D.C. y Stachowiak, M.K. (2005) In vivo gene transfer to the brain cortex using a single injection of HSV-1 vector into the medial septum. *Folia Morphol (Warsz)*, **64**, 273-281.
- Tada-Oikawa, S., Hiraku, Y., Kawanishi, M. y Kawanishi, S. (2003) Mechanism for generation of hydrogen peroxide and change of mitochondrial membrane potential during rotenone-induced apoptosis. *Life Sci*, **73**, 3277-3288.
- Takadera, T. y Ohyashiki, T. (2004) Glycogen synthase kinase-3 inhibitors prevent caspase-dependent apoptosis induced by ethanol in cultured rat cortical neurons. *Eur J Pharmacol*, **499**, 239-245.
- Takashima, A., Honda, T., Yasutake, K., Michel, G., Murayama, O., Murayama, M., Ishiguro, K. y Yamaguchi, H. (1998) Activation of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3beta by amyloid beta peptide (25-35) enhances phosphorylation of tau in hippocampal neurons. *Neurosci Res*, **31**, 317-323.
- Taroni, F. y DiDonato, S. (2004) Pathways to motor incoordination: the inherited ataxias. *Nat Rev Neurosci*, **5**, 641-655.
- Tatton, W.G., Greenwood, C.E., Seniuk, N.A. y Salo, P.T. (1992) Interactions between MPTP-induced and age-related neuronal death in a murine model of Parkinson's disease. *Can J Neurol Sci*, **19**, 124-133.

- Thomas, C.E., Ehrhardt, A. y Kay, M.A. (2003) Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet*, **4**, 346-358.
- Tolbert, D.L. y Clark, B.R. (2003) GDNF and IGF-I trophic factors delay hereditary Purkinje cell degeneration and the progression of gait ataxia. *Exp Neurol*, **183**, 205-219.
- Tolosa, E. (2003) Advances in the pharmacological management of Parkinson disease. *J Neural Transm Suppl*, 65-78.
- Tomac, A., Lindqvist, E., Lin, L.F., Ogren, S.O., Young, D., Hoffer, B.J. y Olson, L. (1995) Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF in vivo. *Nature*, **373**, 335-339.
- Tomomura, M., Rice, D.S., Morgan, J.I. y Yuzaki, M. (2001) Purification of Purkinje cells by fluorescence-activated cell sorting from transgenic mice that express green fluorescent protein. *Eur J Neurosci*, **14**, 57-63.
- Tong, L. y Perez-Polo, R. (1998) Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protects cultured rat cerebellar granule neurons against glucose deprivation-induced apoptosis. *J Neural Transm*, **105**, 905-914.
- Tseng, W.P. y Lin-Shiau, S.Y. (2002) Long-term lithium treatment prevents neurotoxic effects of beta-bungarotoxin in primary cultured neurons. *J Neurosci Res*, **69**, 633-641.
- Tuszynski, M.H., Thal, L., Pay, M., Salmon, D.P., U, H.S., Bakay, R., Patel, P., Blesch, A., Vahlsing, H.L., Ho, G., Tong, G., Potkin, S.G., Fallon, J., Hansen, L., Mufson, E.J., Kordower, J.H., Gall, C. y Conner, J. (2005) A phase 1 clinical trial of nerve growth factor gene therapy for Alzheimer disease. *Nat Med*, **11**, 551-555.
- Tuszynski, M.H., U, H.S., Amaral, D.G. y Gage, F.H. (1990) Nerve growth factor infusion in the primate brain reduces lesion-induced cholinergic neuronal degeneration. *J Neurosci*, **10**, 3604-3614.
- Uehara, Y., Nipper, V. y McCall, A.L. (1997) Chronic insulin hypoglycemia induces GLUT-3 protein in rat brain neurons. *Am J Physiol*, **272**, E716-719.
- Ulloa, L., Avila, J. y Diaz-Nido, J. (1993) Heterogeneity in the phosphorylation of microtubule-associated protein MAP1B during rat brain development. *J Neurochem*, **61**, 961-972.
- Vander Heiden, M.G., Plas, D.R., Rathmell, J.C., Fox, C.J., Harris, M.H. y Thompson, C.B. (2001) Growth factors can influence cell growth and survival through effects on glucose metabolism. *Mol Cell Biol*, **21**, 5899-5912.
- Vannucci, S.J., Maher, F. y Simpson, I.A. (1997) Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. *Glia*, **21**, 2-21.
- Vaux, D.L., Cory, S. y Adams, J.M. (1988) Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*, **335**, 440-442.
- Vazquez-Manrique, R.P., Gonzalez-Cabo, P., Ros, S., Aziz, H., Baylis, H.A. y Palau, F. (2006) Reduction of *Caenorhabditis elegans* frataxin increases sensitivity to oxidative stress, reduces lifespan, and causes lethality in a mitochondrial complex II mutant. *Faseb J*, **20**, 172-174.
- Vila, M. y Przedborski, S. (2003) Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*, **4**, 365-375.
- Virchow, R.L.K. y Chance, F. (1860) *Cellular pathology: as based upon physiological and pathological histology. Twenty lectures delivered in the Pathological institute of Berlin during the months of February, March and April, 1858.* R.M. De Witt, New York.
- Vlahos, C.J., Matter, W.F., Hui, K.Y. y Brown, R.F. (1994) A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem*, **269**, 5241-5248.

- Vousden, K.H. (2000) p53: death star. *Cell*, **103**, 691-694.
- Wade-Martins, R., Saeki, Y. y Chiocca, E.A. (2003) Infectious delivery of a 135-kb LDLR genomic locus leads to regulated complementation of low-density lipoprotein receptor deficiency in human cells. *Mol Ther*, **7**, 604-612.
- Wade-Martins, R., Smith, E.R., Tyminski, E., Chiocca, E.A. y Saeki, Y. (2001) An infectious transfer and expression system for genomic DNA loci in human and mouse cells. *Nat Biotechnol*, **19**, 1067-1070.
- Waldmeier, P.C. y Tatton, W.G. (2004) Interrupting apoptosis in neurodegenerative disease: potential for effective therapy? *Drug Discov Today*, **9**, 210-218.
- Wang, H., Cheng, E., Brooke, S., Chang, P. y Sapolsky, R. (2003) Over-expression of antioxidant enzymes protects cultured hippocampal and cortical neurons from necrotic insults. *J Neurochem*, **87**, 1527-1534.
- Wang, Q.M., Fiol, C.J., DePaoli-Roach, A.A. y Roach, P.J. (1994) Glycogen synthase kinase-3 beta is a dual specificity kinase differentially regulated by tyrosine and serine/threonine phosphorylation. *J Biol Chem*, **269**, 14566-14574.
- Wang, X., Yang, C., Chai, J., Shi, Y. y Xue, D. (2002) Mechanisms of AIF-mediated apoptotic DNA degradation in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, **298**, 1587-1592.
- Watabe, M. y Nakaki, T. (2004) Rotenone induces apoptosis via activation of bad in human dopaminergic SH-SY5Y cells. *J Pharmacol Exp Ther*, **311**, 948-953.
- Watanabe, S., Yoshimi, Y. y Ikekita, M. (2003) Neuroprotective effect of adenine on purkinje cell survival in rat cerebellar primary cultures. *J Neurosci Res*, **74**, 754-759.
- Watcharasi, P., Bijur, G.N., Song, L., Zhu, J., Chen, X. y Jope, R.S. (2003) Glycogen synthase kinase-3beta (GSK3beta) binds to and promotes the actions of p53. *J Biol Chem*, **278**, 48872-48879.
- Watcharasi, P., Bijur, G.N., Zmijewski, J.W., Song, L., Zmijewska, A., Chen, X., Johnson, G.V. y Jope, R.S. (2002) Direct, activating interaction between glycogen synthase kinase-3beta and p53 after DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 7951-7955.
- Wei, H., Qin, Z.H., Senatorov, V.V., Wei, W., Wang, Y., Qian, Y. y Chuang, D.M. (2001) Lithium suppresses excitotoxicity-induced striatal lesions in a rat model of Huntington's disease. *Neuroscience*, **106**, 603-612.
- Weisenborn, D.M., Roback, J., Young, A.N. y Wainer, B.H. (1999) Cellular aspects of trophic actions in the nervous system. *Int Rev Cytol*, **189**, 177-265.
- Wolfe, D., Niranjana, A., Trichel, A., Wiley, C., Ozuer, A., Kanal, E., Kondziolka, D., Krisky, D., Goss, J., Deluca, N., Murphey-Corb, M. y Glorioso, J.C. (2004) Safety and biodistribution studies of an HSV multigene vector following intracranial delivery to non-human primates. *Gene Ther*, **11**, 1675-1684.
- Wong, A., Yang, J., Cavadini, P., Gellera, C., Lonnerdal, B., Taroni, F. y Cortopassi, G. (1999) The Friedreich's ataxia mutation confers cellular sensitivity to oxidant stress which is rescued by chelators of iron and calcium and inhibitors of apoptosis. *Hum Mol Genet*, **8**, 425-430.
- Wong, L.F., Goodhead, L., Prat, C., Mitrophanous, K.A., Kingsman, S.M. y Mazarakis, N.D. (2006) Lentivirus-mediated gene transfer to the central nervous system: therapeutic and research applications. *Hum Gene Ther*, **17**, 1-9.
- Woodgett, J.R. (2003) Physiological roles of glycogen synthase kinase-3: potential as a therapeutic target for diabetes and other disorders. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*, **3**, 281-290.
- Wyllie, A.H. (1980) Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, **284**, 555-556.

- Xing, W., Baylink, D., Kesavan, C. y Mohan, S. (2004) HSV-1 amplicon-mediated transfer of 128-kb BMP-2 genomic locus stimulates osteoblast differentiation in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, **319**, 781-786.
- Yagi, T. y Takeichi, M. (2000) Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity. *Genes Dev*, **14**, 1169-1180.
- Yahr, M.D., Duvoisin, R.C., Shear, M.J., Barrett, R.E. y Hoehn, M.M. (1969) Treatment of parkinsonism with levodopa. *Arch Neurol*, **21**, 343-354.
- Yakovlev, A.G. y Faden, A.I. (2004) Mechanisms of neural cell death: implications for development of neuroprotective treatment strategies. *NeuroRx*, **1**, 5-16.
- Yanez-Munoz, R.J., Balaggan, K.S., Macneil, A., Howe, S.J., Schmidt, M., Smith, A.J., Buch, P., Maclaren, R.E., Anderson, P.N., Barker, S.E., Duran, Y., Bartholomae, C., von Kalle, C., Heckenlively, J.R., Kinnon, C., Ali, R.R. y Thrasher, A.J. (2006) Effective gene therapy with nonintegrating lentiviral vectors. *Nat Med*, **12**, 348-353.
- Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C.N., Ibrado, A.M., Cai, J., Peng, T.I., Jones, D.P. y Wang, X. (1997) Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*, **275**, 1129-1132.
- Yoon, T. y Cowan, J.A. (2004) Frataxin-mediated iron delivery to ferrochelatase in the final step of heme biosynthesis. *J Biol Chem*, **279**, 25943-25946.
- Zaidi, S.M. y Banu, N. (2004) Antioxidant potential of vitamins A, E and C in modulating oxidative stress in rat brain. *Clin Chim Acta*, **340**, 229-233.
- Zaman, K., Ryu, H., Hall, D., O'Donovan, K., Lin, K.I., Miller, M.P., Marquis, J.C., Baraban, J.M., Semenza, G.L. y Ratan, R.R. (1999) Protection from oxidative stress-induced apoptosis in cortical neuronal cultures by iron chelators is associated with enhanced DNA binding of hypoxia-inducible factor-1 and ATF-1/CREB and increased expression of glycolytic enzymes, p21(waf1/cip1), and erythropoietin. *J Neurosci*, **19**, 9821-9830.
- Zamzami, N., Brenner, C., Marzo, I., Susin, S.A. y Kroemer, G. (1998) Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins. *Oncogene*, **16**, 2265-2282.
- Zeevalk, G.D. y Bernard, L.P. (2005) Energy status, ubiquitin proteasomal function, and oxidative stress during chronic and acute complex I inhibition with rotenone in mesencephalic cultures. *Antioxid Redox Signal*, **7**, 662-672.
- Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J. y Korsmeyer, S.J. (1996) Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell*, **87**, 619-628.
- Zhan, Q., Fan, S., Bae, I., Guillouf, C., Liebermann, D.A., O'Connor, P.M. y Fornace, A.J., Jr. (1994) Induction of bax by genotoxic stress in human cells correlates with normal p53 status and apoptosis. *Oncogene*, **9**, 3743-3751.
- Zhang, Y., Lyver, E.R., Knight, S.A., Lesuisse, E. y Dancis, A. (2005) Frataxin and mitochondrial carrier proteins, Mrs3p and Mrs4p, cooperate in providing iron for heme synthesis. *J Biol Chem*, **280**, 19794-19807.
- Zhang, Y., Muylers, J.P., Testa, G. y Stewart, A.F. (2000) DNA cloning by homologous recombination in Escherichia coli. *Nat Biotechnol*, **18**, 1314-1317.
- Zimmermann, A.K., Loucks, F.A., Le, S.S., Butts, B.D., Florez-McClure, M.L., Bouchard, R.J., Heidenreich, K.A. y Linseman, D.A. (2005) Distinct mechanisms of neuronal apoptosis are triggered by antagonism of Bcl-2/Bcl-x(L) versus induction of the BH3-only protein Bim. *J Neurochem*, **94**, 22-36.

Anexo I

Material Suplementario

Resultados obtenidos del análisis por microarrays de ADN tras la inhibición crónica de la GSK-3

El análisis del patrón de expresión génica en células sometidas a inhibición crónica de GSK-3 se realizó de la siguiente manera: células SH-SY5Y diferenciadas fueron infectadas a MOI 2 con los amplicones pHSVlac, pHSVGSK3^{WT} o pHSVGSK3^{K85R}. Tres días después de la infección se aisló el ARN y se procesó para su hibridación con *microarrays* de ADN.

Tal y como se detalla en la sección *Materiales y Métodos*, para la selección de genes neuroprotectores candidatos como consecuencia de la inhibición crónica de GSK-3 empleamos dos criterios. El primero era la comparación entre células que sobreexpresaban la forma silvestre o la forma mutada de GSK-3 con respecto al control, seleccionando los transcritos que cambiasen (tanto por sobreexpresión como por represión) en las muestras expresando el mutante dominante negativo, y no cambiasen, o cambiasen en sentido contrario, en células expresando la forma silvestre. El segundo criterio fue la comparación directa entre las muestras expresando la forma silvestre y la forma mutada. El umbral de sobreexpresión o represión establecido para la selección de genes candidatos fue de al menos 2 veces con respecto a la muestra con que se comparaba.

Los genes candidatos seleccionados se han dividido en 18 tablas, en función del proceso o procesos biológicos generales con los que estén relacionados y según estén reprimidos o sobreexpresados. Además, están en caracteres normales si fueron identificados de acuerdo al primer criterio, o en cursiva si lo fueron atendiendo al segundo criterio.

Tabla S1. Genes reprimidos tras inhibición crónica de GSK-3 relacionados con procesos metabólicos.

Nombre del gen	Símbolo	Nº de acceso
NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 3, 9kDa	NDUFA3	NM_004542.1
acyl-Coenzyme A dehydrogenase, short/branched chain	ACADSB	NM_001609.2
NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 1, 7.5kDa	NDUFA1	NM_004541.2
ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, ϵ subunit	ATP5E	NM_006886.2
NADH-Ubiquinone Oxidorreductase MNLL Subunit	NDUFB1	NM_004545.3
ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit f, isoform 2	ATP5J2	NM_004889.1
<i>COX17 homolog, cytochrome c oxidase assembly protein (yeast)</i>	<i>COX17</i>	<i>NM_005694.1</i>
<i>cytochrome c oxidase subunit VIc</i>	<i>COX6C</i>	<i>NM_004374.2</i>
<i>serine dehydratase-like</i>	<i>SDSL</i>	<i>NM_138432.2</i>
<i>cytochrome c oxidase subunit VIIc</i>	<i>COX7C</i>	<i>NM_001867.2</i>

Tabla S2. Genes sobreexpresados tras inhibición crónica de GSK-3 relacionados con procesos metabólicos.

Nombre del gen	Símbolo	Nº de acceso
dihydroorotate dehydrogenase	DHODH	NM_001361.2
<i>crystallin, zeta (quinone reductase)-like 1</i>	<i>CRYZL1; DONSON</i>	<i>NM_145311.1</i>
<i>Cyt P450 4F11</i>	<i>CYP4F11</i>	<i>NM_021187.1</i>

<i>Cyt P450 3A5</i>	<i>CYP3A5</i>	<i>NM_000777.2</i>
<i>Cyt P450 21A2</i>	<i>CYP21A2</i>	<i>NM_000500.4</i>

Tabla S3. Genes reprimidos tras inhibición crónica de GSK-3 relacionados con procesos de transducción de señales.

Nombre del gen	Símbolo	Nº de acceso
Src-like-adaptor	<i>SLA</i>	<i>NM_006748.1</i>
nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor-like 2	<i>NFKBIL2</i>	<i>NM_013432.3</i>
<i>interleukin 2 receptor, gamma (severe combined immunodeficiency)</i>	<i>IL2RG</i>	<i>NM_000206.1</i>
<i>chemokine-like receptor 1</i>	<i>CMKLR1</i>	<i>NM_004072.1</i>
<i>protein phosphatase 1, regulatory subunit 3D</i>	<i>PPP1R3D</i>	<i>NM_006242.3</i>
<i>S100 calcium binding protein A6 (calcyclin)</i>	<i>S100A6</i>	<i>NM_014624.2</i>
<i>phosphoinositide-3-kinase, catalytic, beta polypeptide</i>	<i>PIK3CB</i>	<i>NM_006219.1</i>
<i>endothelin receptor type A</i>	<i>EDNRA</i>	<i>NM_001957.1</i>
<i>epidermal growth factor receptor</i>	<i>EGFR</i>	<i>NM_005228.3</i>
<i>extracellular signal-regulated kinase 8</i>	<i>ERK8</i>	<i>NM_139021.1</i>
<i>olfactomedin 1</i>	<i>OLFM1</i>	<i>NM_014279.2</i>

Tabla S4. Genes sobreexpresados tras inhibición crónica de GSK-3 relacionados con procesos de transducción de señales.

Nombre del gen	Símbolo	Nº de acceso
tumor-associated calcium signal transducer 1	<i>TACSTD1</i>	<i>NM_002354.1</i>
dehydrogenase/reductase (SDR family) member 9	<i>DHRS9</i>	<i>NM_005771.3</i>
taste receptor, type 2, member 4	<i>TAS2R4</i>	<i>NM_016944.1</i>
<i>phospholipase A2, group 1B (pancreas)</i>	<i>PLA2G1B</i>	<i>NM_000928.2</i>
<i>fibroblast growth factor receptor 3</i>	<i>FGFR3</i>	<i>NM_022965.1</i>
<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 2</i>	<i>CXCL2</i>	<i>NM_002089.1</i>
<i>secreted frizzled-related protein 4</i>	<i>SFRP4</i>	<i>NM_003014.2</i>
<i>insulin-like growth factor binding protein 7</i>	<i>IGFBP7</i>	<i>NM_001553.1</i>
<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase 11</i>	<i>MAP3K11</i>	<i>NM_002419.2</i>
<i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 14 (herpesvirus entry mediator)</i>	<i>TNFRSF14</i>	<i>NM_003820.2</i>

Tabla S5. Genes reprimidos tras inhibición crónica de GSK-3 relacionados con procesos de proteólisis y recambio de proteínas.

Nombre del gen	Símbolo	Nº de acceso
proprotein convertase subtilisin/kexin type 1 inhibitor	<i>PCSK1N</i>	<i>NM_013271.2</i>
<i>proprotein convertase subtilisin/kexin type 9</i>	<i>PCSK9</i>	<i>NM_174936.2</i>
<i>calpain 10</i>	<i>CAPN10</i>	<i>NM_023089.1</i>

Tabla S6. Genes reprimidos tras inhibición crónica de GSK-3 relacionados con procesos de proteólisis y recambio de proteínas.

Nombre del gen	Símbolo	Nº de acceso
a disintegrin and metalloproteinase domain 28	ADAM28	NM_021778.1
<i>Mdm2, transformed 3T3 cell double minute 2, p53 binding protein (mouse)</i>	<i>MDM2</i>	<i>NM_006881.2</i>

Tabla S7. Genes sobreexpresados tras inhibición crónica de GSK-3 relacionados con procesos de plegamiento de proteínas y chaperonas.

Nombre del gen	Símbolo	Nº de acceso
heat shock 70kDa protein 14	HSPA14	NM_016299.1
<i>endoplasmic reticulum chaperone SIL1</i>	<i>SIL1</i>	<i>NM_022464.3</i>

Tabla S8. Genes sobreexpresados tras inhibición crónica de GSK-3 relacionados con procesos de ciclo celular, desarrollo, oncogénesis o procesamiento del ADN.

Nombre del gen	Símbolo	Nº de acceso
<i>growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma</i>	<i>GADD45G</i>	<i>NM_006705.2</i>
<i>reelin</i>	<i>RELN</i>	<i>NM_173054.1</i>
<i>cysteine-rich motor neuron 1</i>	<i>CRIM1</i>	<i>NM_016441.1</i>
<i>fem-1 homolog c (C.elegans)</i>	<i>FEM1C</i>	<i>NM_020177.2</i>

Tabla S9. Genes sobreexpresados tras inhibición crónica de GSK-3 relacionados con funciones estructurales y procesos de adhesión y/o motilidad celular.

Nombre del gen	Símbolo	Nº de acceso
protocadherin 8	PCDH8	NM_032949.1
pregnancy specific beta-1-glycoprotein 4	PSG4	NM_213633.1
src homology 3 domain-containing protein HIP-55	HIP-55	NM_014063.4

Tabla S10. Genes reprimidos tras inhibición crónica de GSK-3 relacionados con funciones de inmunidad y defensa.

Nombre del gen	Símbolo	Nº de acceso
<i>lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3)</i>	<i>LTB</i>	<i>NM_002341.1</i>

Tabla S11. Genes sobreexpresados tras inhibición crónica de GSK-3 relacionados con funciones de inmunidad y defensa.

Nombre del gen	Símbolo	Nº de acceso
interleukin 16 (lymphocyte chemoattractant factor)	IL16	NM_004513.3
C-reactive protein, pentraxin-related	CRP	NM_000567.1
interleukin 23, alpha subunit p19	IL23A	NM_016584.2
<i>CD207 antigen, langerin</i>	<i>CD207</i>	<i>NM_015717.1</i>

<i>interleukin 7</i>	<i>IL7</i>	<i>NM_000880.2</i>
----------------------	------------	--------------------

Tabla S12. Genes reprimidos tras inhibición crónica de GSK-3 relacionados con transcripción, regulación de la expresión génica y remodelación de cromatina.

Nombre del gen	Símbolo	Nº de acceso
histone 1, H4b	HIST1H4B	NM_003544.2
putative nucleic acid binding protein RY-1;MAX dimerization protein 1	RY1;MAD	NM_002357.1
histone 1, H4j	HIST1H4J	NM_021968.3
histone 1, H4f	HIST1H4F	NM_003540.3
chromobox homolog 3 (HP1 gamma homolog, <i>Drosophila</i>)	CBX3	NM_007276.3
<i>Sp4 transcription factor</i>	<i>SP4</i>	<i>NM_003112.2</i>
<i>nuclear factor I/X (CCAAT-binding transcription factor)</i>	<i>NFIX</i>	<i>NM_002501.1</i>
<i>nuclear factor of activated T-cells 5, tonicity-responsive</i>	<i>NFAT5</i>	<i>NM_173215.1</i>
<i>TEA domain family member 1 (SV40 transcriptional enhancer factor)</i>	<i>TEAD1</i>	<i>NM_021961.2</i>

Tabla S13. Genes sobreexpresados tras inhibición crónica de GSK-3 relacionados con transcripción, regulación de la expresión génica y remodelación de cromatina.

Nombre del gen	Símbolo	Nº de acceso
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	HNRPF	NM_004966.2
zinc finger protein 257	ZNF257	NM_033468.1
nuclear RNA export factor 1	NXF1	NM_006362.3
<i>Angiogenin;RNase4</i>	<i>ANG;RNASE4</i>	<i>NM_002937.3</i>
<i>Fer3-like (Drosophila)</i>	<i>FERD3L</i>	<i>NM_152898.2</i>
<i>msh homeo box homolog 1 (Drosophila)</i>	<i>MSX1</i>	<i>NM_002448.1</i>
<i>transcription factor A, mitochondrial</i>	<i>TFAM</i>	<i>NM_012251.1</i>
<i>early B-cell factor</i>	<i>EBF</i>	<i>NM_024007.2</i>
<i>hematopoietically expressed homeobox</i>	<i>HHEX</i>	<i>NM_002729.2</i>

Tabla S14. Genes reprimidos tras inhibición crónica de GSK-3 que codifican canales iónicos o proteínas relacionadas con transporte o tráfico intracelular.

Nombre del gen	Símbolo	Nº de acceso
Vacuolar protein VP24	VP24	AK026962.1
translocase of outer mitochondrial membrane 7 homolog	TOMM7	NM_019059.2
<i>transferrin</i>	<i>TF</i>	<i>NM_001063.2</i>
<i>ATX1 antioxidant protein 1 homolog (yeast)</i>	<i>ATOX1</i>	<i>NM_004045.2</i>
<i>solute carrier family 12 (potassium/chloride transporters), member 6</i>	<i>SLC12A6</i>	<i>NM_005135.1</i>

Tabla S15. Genes sobreexpresados tras inhibición crónica de GSK-3 que codifican canales iónicos o proteínas relacionadas con transporte o tráfico intracelular.

Nombre del gen	Símbolo	Nº de acceso
<i>exportin 4</i>	<i>XPO4</i>	<i>NM_022459.3</i>
<i>solute carrier family 12 (potassium/chloride transporters), member 7</i>	<i>SLC12A7</i>	<i>NM_006598.1</i>

Tabla S16. Genes reprimidos tras inhibición crónica de GSK-3 relacionados con procesos de síntesis de proteínas.

Nombre del gen	Símbolo	Nº de acceso
Peptide chain release factor	FLJ38663	NM_152269.1
<i>Pseudouridine synthase-related</i>	<i>FKSG32</i>	<i>NM_031307.2</i>
<i>Peptidyl-glycine alpha-amidating monooxygenase</i>	<i>PAM</i>	<i>NM_138766.1</i>

Tabla S17. Genes reprimidos tras inhibición crónica de GSK-3 de función desconocida.

Nombre del gen	Símbolo	Nº de acceso
translocase of outer mitochondrial membrane 7 homolog (yeast)	TOMM7	NM_019059.2
beta-casein-like protein	BCLP	NM_033504.2
host cell factor C1 regulator 1 (XPO1 dependant)	HCFC1R1	NM_017885.1
Tularik gene 1	T1	NM_031466.3
<i>TLH29 protein precursor</i>	<i>FAM14A</i>	<i>NM_032036.1</i>

Tabla S18. Genes sobreexpresados tras inhibición crónica de GSK-3 de función desconocida.

Nombre del gen	Símbolo	Nº de acceso
ankyrin repeat and SOCS box-containing 11	ASB11	NM_080873.1
tripartite motif-containing 46	TRIM46	NM_025058.3
cell surface glycoprotein receptor CD200	CD200R	NM_138940.1
NICE-4 protein	NICE-4	NM_014847.2
<i>insulinoma-associated 1</i>	<i>INSM1</i>	<i>NM_002196.2</i>
<i>spermatogenesis associated, serine-rich 1</i>	<i>SPATS1</i>	<i>NM_145026.2</i>

Anexo II

Publicaciones

Relación de publicaciones del doctorando

Bhat RV, Xue Y, Berg S, Hellberg S, Ormo M, Nilsson Y, Radesater AC, Jerning E, Markgren PO, Borgegard T, Nylof M, **Gimenez-Cassina A**, Hernandez F, Lucas JJ, Diaz-Nido J, Avila J. **“Structural insights and biological effects of glycogen synthase kinase 3 specific inhibitor AR-A014418”**. *J. Biol. Chem.*, 2003, 278(46):45937-45945

Gimenez-Cassina A, Lim F, Diaz-Nido J. **“The Differentiation Of A Human Neuroblastoma Into Neuron-Like Cells Increases Their Susceptibility To Transduction By Herpes-Viral Vectors”**. *Journal of Neuroscience Research*, Aceptado para publicación, abril 2006.

Gimenez-Cassina A, Lim F, Diaz-Nido J. **“Gene Transfer Into Purkinje Cells using Herpesviral Amplicon Vectors In Cerebellar Cultures”**. Enviado a publicación a *Neurochemistry International*, mayo 2006.