



FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

TESIS DOCTORAL

**PAPEL DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN ATF5 EN LA  
ENFERMEDAD DE HUNTINGTON**

**Ivó Hernández Hernández**

Madrid, 2018



FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

*Memoria de Investigación presentada por*

***Ivó Hernández Hernández***

*Graduado en Biología*

*Para optar al grado de **Doctor***

*Por la **Universidad Autónoma de Madrid***

## **PAPEL DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN ATF5 EN LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON**

*Trabajo codirigido por el Dr. José Javier Lucas Lozano,*

*Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC),*

*y la Dra. M<sup>a</sup> José Pérez Álvarez,*

*Profesora Contratada Doctora en la Universidad Autónoma de Madrid (UAM)*

*La presente tesis ha sido realizada en el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, centro mixto CSIC-UAM, y en el Departamento de Biología de la Universidad Autónoma de Madrid*

*Los dos directores también forman parte del Centro de Investigación Biomédica en Red para Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED)*



***“γνωθι σεαυτόν”***

**A mis seres queridos**

## Agradecimientos

*Estam@s acostumbrad@s a que haya una sección de agradecimientos en las publicaciones científicas, es lo normal. Nos resultaría extraño no encontrar las líneas de "Acknowledgement" en un gran trabajo, o en uno modesto. Ello se debe a que tod@s damos por supuesto que siempre hay muchas personas a las que estar agradecid@s. Parece que, al culminar con un gran proyecto, como es la tesis doctoral, nos sentimos henchid@s de gratitud por todo lo recibido.*

*Yo espero sinceramente haberlo hecho mejor. Lo que realmente hay detrás de todo gran o pequeño trabajo es un incansable y abnegado apoyo proveniente de los que nos quieren y están alrededor todos los días de nuestra vida. Creo que debemos hacer un esfuerzo por apreciar lo que recibimos de estas personas en cada momento y no únicamente al final.*

*En mi caso particular, muchas son las personas que me han ayudado a llegar hasta aquí hoy. Por supuesto mi familia ha sido el soporte sin el cual hubiera sido imposible superar las tremendas dificultades que un@ se encuentra en el camino. Por ello y con especial cariño, les dedico a mis padres y a mis hermanas este modesto trabajo. Mis padres siempre han sido y serán mi faro en las tinieblas. Esto mismo aplica para mi pareja en la vida: Olalla, perdóname por tanto castigo, pero de no ser por ti habría dejado la ciencia unas mil veces. Gracias.*

*A mi gran amigo Gonzalo, gracias por tu locura, tan necesaria en una vida condenada a la cordura.*

*A lo largo de 6 años he tenido el privilegio de conocer a grandes personas y grandes científic@s en los me he apoyado para crecer y evolucionar. Antes de terminar la carrera ya estaba aprendiendo a hacer cultivos con mi mentor Jesús. Con Parras aprendí las buenas y malas prácticas que resultan imprescindibles para adquirir la suficiencia investigadora, y comencé a mantener una higiene bucodental impecable. Agradezco mucho a Martita su buena disposición con mis preguntas y no tanto sus maquinaciones con Parras para tomarme el pelo. Por supuesto, agradezco a la mejor técnica del mundo, Miriam, su grandísima ayuda durante estos años y sus cariñosos apelativos: Moreno, Amore, Bichito.... Pronto llegó la incansable María que me enseñó la eficiencia en el trabajo y la buena cocina. Otra de mis inspiraciones la encontré en JR, que siempre me contagió su entusiasmo por la ciencia, la música clásica y los Bee Gees. Acogimos a una estudiante llamada Sara, que, by the way, es el primer nombre que aparece en la Biblia, y nos hizo a todos un poquito más felices. El laboratorio se puso las pilas y como queríamos ser progresistas encargamos RNA-seq y contratamos a Ainara.*

*Para entender este movimiento progresista, empleamos a Nacho que conoce un programa para cada necesidad y si no “pregúntaselo a Google”.*

*Además de mis compañeros de laboratorio, he tenido la oportunidad de trabajar al lado de grupos magníficos como el 208, el 206, el 226 y muchos otros a los que tengo que agradecer su ayuda y sus reactivos.*

*Gracias a mis colegas en los partidos de fútbol, pádel y vóley porque es imprescindible combinar el deporte con este trabajo que tiende a absorber toda la energía vital.*

*Además, quisiera agradecer a todo el personal del CBM que hace posible nuestra actividad investigadora, desde los chic@s del animalario, hasta el personal que trabaja sobre parqué y l@s profesionales de la limpieza.*

*Gracias a mi magnífica codirectora de tesis M<sup>a</sup> José, por contagiarme su espíritu luchador y su serena visión de los problemas. Bendita sea tu esperanza a prueba de balas.*

*Uno nunca sabe qué va a pasar en la vida, pero puede que la vida del investigad@r sea la genuina ejemplificación del principio de incertidumbre de Heisenberg. Tengo que agradecer a mi jefe y mentor, José, el haberme enseñado a pensar en el presente sin por ello perder de vista el futuro. Su inestimable ayuda me ha permitido desarrollar aptitudes para ser autosuficiente en el planteamiento de preguntas interesantes para la ciencia: un@ siempre debe tener clara la pregunta. Gracias por tu infinita paciencia con la arrogancia e ignorancia de la juventud.*

## **ÍNDICE**

---

<b>I. ABREVIATURAS.....</b>	<b>19</b>
<b>II. RESUMEN/SUMMARY.....</b>	<b>23</b>
<b>III. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>27</b>
<b>1. LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON.....</b>	<b>29</b>
1.1. Descripción general de la enfermedad de Huntington.....	29
1.1.1. El gen detrás de la enfermedad.....	29
1.1.2. Sintomatología.....	29
1.1.3. Neuropatología.....	30
1.2. Expansión de CAG y poliglutamina.....	33
1.3. Función normal de la huntingtina.....	33
1.4. Mecanismos patogénicos de la enfermedad de Huntington.....	34
1.4.1. Pérdida de la función normal de la huntingtina.....	34
1.4.2. Toxicidad de la proteína.....	35
1.5. Alteración de la proteostasis en la enfermedad de Huntington.....	36
1.6. Estrés de retículo endoplasmático.....	37
1.6.1. Descripción del ERE.....	37
1.6.2. Agentes causantes del ERE en la enfermedad de Huntington.....	38
1.6.3. Respuesta a proteínas mal plegadas.....	39
<b>2. FACTOR ACTIVADOR DE LA TRANSCRIPCIÓN 5 (ATF5).....</b>	<b>41</b>
2.1. Descripción general de ATF5.....	41
2.2. Papel de ATF5 en el ERE neuronal.....	42
<b>IV. OBJETIVOS.....</b>	<b>43</b>
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>47</b>

<b>1. MUESTRAS DE TEJIDO CEREBRAL HUMANO Y MODELOS ANIMALES</b> .....	<b>49</b>
1.1. Muestras de pacientes.....	49
1.2. Modelos animales utilizados.....	50
1.2.1. Modelo transgénico de la enfermedad de Huntington (R6/1).....	50
1.2.2. <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	51
1.2.3. Ratones Tg-mATF5.....	51
1.2.3.1. Clonación del gen <i>Atf5</i> en el plásmido pBI-3.....	51
1.2.3.2. Generación de ratones Tg-mATF5.....	51
<b>2. TÉCNICAS EMPLEADAS</b> .....	<b>52</b>
2.1. Genotipado de los animales.....	52
2.1.1. Obtención de ADN genómico.....	52
2.1.2. Amplificación de ADN genómico y genotipado.....	52
2.2. Análisis del nivel de ARN mediante PCR cuantitativa.....	52
2.2.1. RT-PCR relativa.....	53
2.2.2. RT-PCR absoluta.....	53
2.3. Análisis del nivel de proteína por <i>Western blot</i> .....	53
2.4. Análisis histológico de los tejidos.....	54
2.4.1. Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.....	54
<b>3. ANÁLISIS DE LA EVOLUCIÓN DEL FENOTIPO DE LOS RATONES</b> .....	<b>56</b>
3.1. Peso corporal.....	56
3.2. Prueba de campo abierto ( <i>Open field</i> ).....	56
3.3. Rotarod.....	56
3.4. Prueba contextual ( <i>Fear conditioning</i> ).....	56
3.5. Prueba de la fuerza de agarre ( <i>Grip strength</i> ).....	57



<b>4. CULTIVO CELULAR.....</b>	<b>57</b>
4.1. Cultivo primario de neuronas.....	57
4.2. Líneas celulares.....	57
<b>5. ANÁLISIS DE DATOS.....</b>	<b>58</b>
<b>VI. RESULTADOS.....</b>	<b>59</b>
<b>1. ANÁLISIS DEL PATRÓN Y LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE ATF5 EN CEREBRO DEL MODELO R6/1 Y EN PACIENTES DE EH.....</b>	<b>61</b>
1.1. ATF5 es secuestrado en las inclusiones neuronales de poliglutmina en ratones R6/1 y en tejido de pacientes de EH.....	61
1.2. Los niveles de ATF5 disminuyen en corteza y estriado de ratones R6/1 y pacientes de EH.....	63
1.3. Los niveles de ARNm de ATF5 no explican la bajada en los niveles de proteína observados.....	65
<b>2. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE LA DIANA TRANSCRIPCIONAL DE ATF5, MCL1, EN CORTEZA Y ESTRIADO DE R6/1 Y PACIENTES DE EH.....</b>	<b>65</b>
<b>3. EFECTO DELETÉREO DE LA DEFICIENCIA DE <i>atf-5</i> EN UN MODELO DE <i>C. ELEGANS</i> DE TOXICIDAD DE LA POLIGLUTAMINA EXPANDIDA.....</b>	<b>66</b>
<b>4. RATONES DE SOBREENPRESIÓN CONDICIONAL DE ATF5 EN CEREBRO ANTERIOR.....</b>	<b>68</b>
4.1. Generación y análisis del plásmido de sobreexpresión de ATF5.....	68
4.2. Generación de ratones transgénicos de ATF5.....	69
4.3. Caracterización de la transactivación en ratones dobles transgénicos.....	69
<b>5. RATONES TRIPLES TRANSGÉNICOS R6/1BI2.....</b>	<b>73</b>
5.1. Caracterización bioquímica de ratones R6/1BI2.....	73
5.2. Caracterización fenotípica de ratones R6/1BI2.....	74

<b>6. RATONES DE SOBREENPRESIÓN CONDICIONAL DE ATF5 EN ASTROCITOS.....</b>	<b>76</b>
<b>7. ATF5 PROTEGE FRENTE A LA APOPTOSIS INDUCIDA POR LA POLIGLUTAMINA EXPANDIDA EN UN MODELO CELULAR DE EH.....</b>	<b>77</b>
<b>VII. DISCUSIÓN.....</b>	<b>81</b>
<b>VIII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>89</b>
<b>IX. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>93</b>
<b>X. ANEXO.....</b>	<b>101</b>

## **I. ABREVIATURAS**

- ADN:** deoxyribonucleic acid / ácido desoxirribonucleico
- ARNm:** Messenger ribonucleic acid / ácido ribonucleico mensajero
- ATF4:** activating transcription factor 4 / factor activador de la transcripción 4
- ATF5:** activating transcription factor 5 / factor activador de la transcripción 5
- ATF6:** activating transcription factor 6 / factor activador de la transcripción 6
- ATP:** adenosine triphosphate / adenosina trifosfato
- BCL-2:** B-cell lymphoma 2 / linfoma 2 de células B
- BDNF:** brain derived neurotrophic factor / factor neurotrófico derivado de cerebro
- β-Gal:** β-galactosidase / β-galactosidasa
- BSA:** bovine serum albumin / albúmina de suero bovino
- C. elegans:** *Caenorhabditis elegans*
- CamK:** calcium/calmodulin-dependent protein kinase / proteína quinasa dependiente de calcio/calmodulina
- CFP:** cyan fluorescent protein / proteína fluorescente cian
- CREB:** cAMP response element-binding protein / proteína de unión al elemento de respuesta de cAMP
- Cx:** cortex / corteza cerebral
- D1:** dopamine receptor type-1 / receptor de dopamina tipo 1
- D2:** dopamine receptor type-2 / receptor de dopamina tipo 2
- DAB:** diaminobenzidine / diaminobencidina
- ECL:** enhanced chemiluminiscent / sustrato quimioluminiscente
- EDTA:** ethylenediaminetetracetic acid / ácido etilendiaminotetracético
- EGTA:** ethyleneglycoltetracetic acid / ácido etilenglicoltetracético
- HD/EH:** Huntington's disease / Enfermedad de Huntington
- eIF2α:** eukaryotic initiation factor-2 / factor eucariótico de iniciación de la transcripción 2
- FBS:** fetal bovine serum / suero fetal bovino
- GPe:** external globus pallidus / globo pálido externo
- GPI:** internal globus pallidus / globo pálido interno
- Hc:** hippocampus / hipocampo
- HEAT:** Huntingtin, elongation factor 3, protein phosphatase 2A, yeast kinase TOR1 / Huntingtina, factor de elongación 3, proteína fosfatasa 2A, kinasa de levadura TOR1
- HEPES:** N-(2-hydroxyetil)-piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid) / N-(2-hidroxietil)-piperacina-N'-(2-ácido etanosulfónico)
- HTT:** huntingtin / huntingtina
- IBs:** inclusion bodies / cuerpos de inclusión

- INI:** intranuclear neuronal inclusions / inclusiones neuronales intranucleares
- IPM:** *post-mortem* interval / intervalo *post mortem*
- KDa:** kilodalton
- MCL1:** myeloid cell leukemia-1 / leucemia de célula mieloide 1
- mHTT:** mutant huntingtin / huntingtina mutante
- MSSNs:** medium-sized spiny neurons / neuronas espinosas de tamaño medio
- NES:** nuclear export signal / señal de exportación nuclear
- NLS:** nuclear localization signal / señal de localización nuclear
- PBS:** phosphate buffered saline / tampón fosfato salino
- PCR:** polymerase chain reaction / reacción en cadena de la polimerasa
- PFA:** paraformaldehyde / paraformaldehído
- poliP:** poly-proline / poliprolina
- poliQ:** poly-glutamine / poliglutamina
- ROS:** reactive oxygen species / especies reactivas de oxígeno
- SDS:** sodium dodecyl sulphate / dodecil sulfato de sodio
- SDS-PAGE:** SDS-polyacrilamide electrophoresis gel / gel de electroforesis de poliacrilamida con SDS
- SEM:** standard error of the mean / error estándar de la media
- SNC:** central nervous system / sistema nervioso central
- SNpc:** substantia nigra pars compacta / sustancia negra parte compacta
- SNpr:** substantia nigra pars reticulata / sustancia negra parte reticulada
- STN:** subthalamic nucleus / núcleo subtalámico
- TM:** tunicamycin / tunicamicina
- tTA:** transactivator / transactivador
- uORF:** upstream open reading frame / marco de lectura abierta aguas arriba
- UTR:** untranslated region / región no traducida
- WB:** western blot
- Wt:** wild type / silvestre
- XBP1:** X-box binding protein / proteína de unión a la caja X

## **II. RESUMEN/SUMMARY**

El factor activador de la transcripción 5 (ATF5) está implicado en la respuesta a estrés que se induce en presencia de diferentes agentes estresantes como el ayuno, la privación de aminoácidos, el cadmio o el arsénico. ATF5 también forma parte de la respuesta a proteínas mal plegadas (RPM) inducida como reacción al estrés de retículo endoplasmático (ERE). Como mediador de la RPM, induce la transcripción de factores proteostáticos y antiapoptóticos, como *MCL1*. En el cerebro se detectan niveles altos de ATF5 en gliomas y también en progenitores neurales, y la expresión en ellos ha de disminuir para promover su diferenciación a neuronas maduras o glía. Esto llevó a la creencia inicial de que ATF5 no se expresa en neuronas adultas. Recientemente, en nuestro laboratorio hemos descrito la expresión basal de ATF5 en neuronas de ratones adultos y una inducción neuroprotectora de este factor durante la ejecución de la RPM en un modelo murino de *status epilepticus*. En el presente trabajo decidimos explorar si ATF5 también se expresa en neuronas de cerebro humano adulto tanto en condiciones basales como en la enfermedad de Huntington (EH), en la que se ha descrito una inducción crónica del ERE y una ejecución de la RPM parcialmente impedida debido al procesamiento defectuoso de ATF6.

Además de confirmar que ATF5, de hecho, se expresa en neuronas humanas, en este trabajo demostramos una acumulación de ATF5 en las características inclusiones de HTT mutante observadas tanto en cerebro de pacientes de EH como en el modelo murino R6/1 de EH. Esto correlaciona con la bajada en los niveles de la proteína ATF5 soluble y los de su diana antiapoptótica MCL1. Posteriormente confirmamos que la delección de *atf5* en un modelo de *Caenorabditis elegans* exacerba la toxicidad inducida por la poliQ expandida. Además, se han generado dos líneas de ratón transgénico de sobreexpresión condicional de ATF5 en neuronas de cerebro anterior o en astrocitos. En este caso, a pesar de conseguir una buena inducción del ARNm de ATF5, no observamos acumulación de la proteína en ninguna de las estructuras analizadas ni en los tiempos estudiados. La inducción de ERE en cultivos primarios de neuronas obtenidas de ratones transgénicos tampoco indujo acumulación de la proteína transgénica. El cruce de ratones transgénicos de ATF5 con ratones R6/1 no provocó mejora aparente del fenotipo característico de este modelo. Finalmente, tanto la sobreexpresión de ATF5, como de MCL1 por separado atenuaron la apoptosis inducida en un modelo celular de EH.

Estos datos en conjunto reflejan que la bajada de los niveles de ATF5, probablemente secundaria a su secuestro en inclusiones de poliQ expandida, induce una mayor vulnerabilidad ante la apoptosis inducida por la huntingtina mutante, y que terapias dirigidas a aumentar los niveles de ATF5 podrían tener un efecto beneficioso en el tratamiento de la EH.

Activating transcription factor-5 (ATF5) is a stress-response transcription factor induced upon different cell stressors like fasting, amino-acid limitation, cadmium or arsenite. ATF5 is also an effector of the unfolded protein response (UPR), a cellular reaction to endoplasmic reticulum stress (ERS). As a mediator of the UPR, ATF5 induces transcription of proteostatic and anti-apoptotic factors, like MCL1. In the brain, high ATF5 levels are found in gliomas and in neural progenitor cells, which need to decrease their ATF5 levels to differentiate into mature neurons or glia. This initially led to believe that ATF5 is not expressed in adult neurons. More recently, we reported basal neuronal ATF5 expression in adult mouse brain and its neuroprotective induction during UPR in a mouse model of *status epilepticus*. Here we aimed to explore whether ATF5 is also expressed by neurons in human brain both in basal conditions and in Huntington's disease (HD), where UPR has been described to be partially impaired due to defective ATF6 processing.

Apart from confirming that ATF5 is present in human adult neurons, here we report accumulation of ATF5 within the characteristic polyglutamine-containing neuronal nuclear inclusions in brains of HD patients and R6/1 mice. This correlates with decreased levels of soluble ATF5 and of its anti-apoptotic target MCL1. We then confirmed the deleterious effect of ATF5 deficiency in a *Caenorhabditis elegans* model of polyglutamine-induced toxicity.

We also report the generation of two transgenic mouse lines for the conditional overexpression of ATF5 in adult neurons or astrocytes. However, despite a visible induction of transgenic mRNA we failed to observe an accumulation of the recombinant protein in any of the structures or times analyzed. Induction of ERS in transgenic primary neurons did not induce accumulation of the exogenous protein. Additionally, crossbreeding of transgenic animals and R6/1 mice was not effective in the induction of recombinant ATF5 overexpression nor the attenuation of pathologic phenotype. Finally, both the transfection of ATF5 and the transfection of MCL1 separately reduced apoptosis in a cellular model of HD.

These results reflect that decreased ATF5 in HD, probably secondary to sequestration into inclusions, renders neurons more vulnerable to mutant huntingtin-induced apoptosis and that ATF5-increasing interventions might have therapeutic potential for HD.



### **III.INTRODUCCIÓN**

---

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

### **1.1. Descripción general de la Enfermedad de Huntington**

#### **1.1.1 El gen detrás de la enfermedad**

La Enfermedad de Huntington (EH) es una enfermedad neurodegenerativa severa, con un patrón de herencia monogénica autosómica dominante y clínicamente caracterizada por movimientos involuntarios, trastornos psiquiátricos y demencia. Afecta a 4-7 personas de cada 100.000 (Castilhos et al., 2016). Esta enfermedad fue descrita inicialmente por el médico americano George Huntington en 1872. La base genética de esta enfermedad fue descrita en 1993 con la identificación del gen responsable que inicialmente se denominó *IT15* (HDCRG, 1993). Actualmente el nombre oficial del gen que origina la enfermedad es *HTT* y así se referirá en este trabajo.

#### **1.1.2 Sintomatología**

Clínicamente, la EH se asocia con una variedad de síntomas que progresan inevitablemente y que abarcan déficits motores como la corea, distonía, bradicinesia y mioclono, declive cognitivo y síntomas psiquiátricos. La mayoría de los pacientes que padecen EH muestran los primeros síntomas con edades entre 30 y 40 años (Vonsattel and DiFiglia, 1998), aunque éstos pueden aparecer antes o después. De hecho algunos pacientes pueden debutar alrededor de los 20 años de edad con una sintomatología más agresiva (Nance and Myers, 2001; Ruocco et al., 2006). Dentro de las alteraciones del movimiento que se dan en esta enfermedad existen problemas en el desarrollo del movimiento involuntario y en la ejecución del movimiento voluntario. Son comunes los movimientos involuntarios continuos, bruscos y espasmódicos que se conocen como corea (la EH también se conoce como corea de Huntington). Este síntoma característico aparece en combinación con la rigidez y contracción muscular involuntaria (distonía), disfagia, anormalidades en el movimiento ocular, la postura, la locomoción, el equilibrio y el habla. Todo ello acarrea una grave incapacidad a los pacientes, que les impone una gran dependencia.

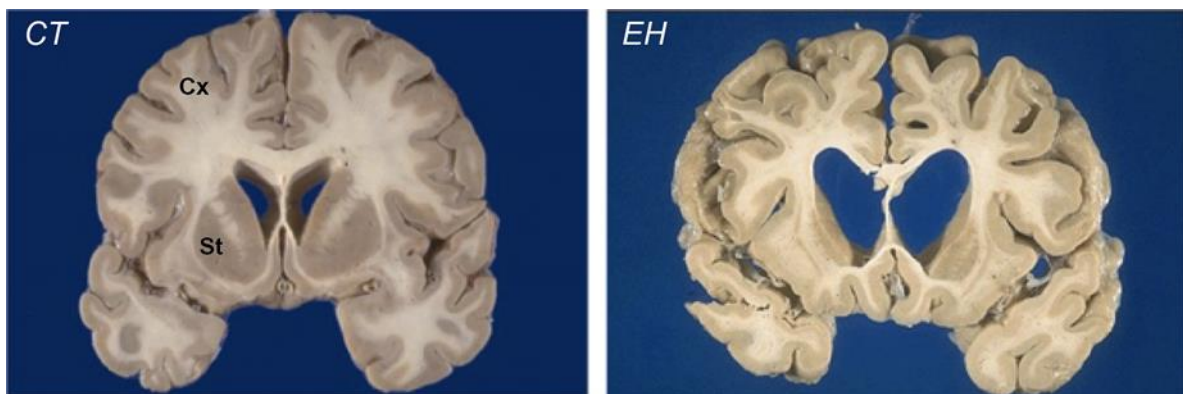
La manifestación psiquiátrica más común entre los pacientes de EH es la depresión, aunque también son frecuentes la irritabilidad, la tristeza y la apatía. (Rosenblatt, 2007). Otros trastornos típicos son el insomnio, la fatiga y pérdida de energía, la progresiva pérdida de contacto social, el trastorno obsesivo-compulsivo, manía y trastorno bipolar. Finalmente, los pacientes de EH pierden peso a medida que la enfermedad avanza y los pensamientos sobre muerte y suicidio se hacen frecuentes.

Los trastornos cognitivos normalmente incluyen la dificultad en aprender nuevos conceptos, en priorizar o concentrarse en tareas específicas, tendencia al estancamiento en un pensamiento, comportamiento o acción y falta de inhibición de los impulsos, lo que puede resultar en promiscuidad sexual.

Los pacientes de EH mueren entre 5 y 20 años después del inicio de los síntomas normalmente a causa de complicaciones respiratorias.

### 1.1.3 Neuropatología

El examen macroscópico de los cerebros de pacientes con EH revela una notable y característica atrofia bilateral del estriado (núcleo caudado y putamen) (Fig. 1), aunque otras regiones se ven también afectadas especialmente en etapas avanzadas de la enfermedad como la corteza con predominio frontal y parietal. En menor medida la sustancia blanca, el tálamo y el globo pálido también se ven afectados (Kassubek et al., 2004; Politis et al., 2008).



**Figura 1. Atrofia de estructuras cerebrales en pacientes de la EH.** Comparación de un corte coronal de cerebro de un humano sano (izquierda) y de un paciente de EH (derecha). El corte de EH muestra la marcada atrofia del estriado (St) y también de la corteza cerebral (Cx). (Imagen adaptada de CENTER FOR NEURODEGENERATION AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS).

Como medida de la severidad de la EH, se emplea el grado de degeneración del estriado utilizando la escala del Sistema Vonsattel. Existe una degeneración progresiva del núcleo caudado y del putamen que avanza desde la cola del caudado al cuerpo y cabeza del mismo en dirección caudo-rostral y dorso-ventral. A medida que avanza la enfermedad, la forma del estriado cambia de una superficie convexa a una cóncava (Fig.1). Esta degeneración se debe principalmente a la pérdida selectiva de neuronas espinosas de tamaño medio (MSSN), sus árboles dendríticos y sus proyecciones.

El sistema Vonsattel subdivide a los pacientes en cinco categorías o grados (0-5). El cuerpo estriado de un paciente en grado 0 es comparable al de uno sano; sin embargo, mediante análisis histológico se observa una pérdida neuronal de un 30-40% sin reactividad astrocitaria. El estriado de pacientes en grado 1 presenta una considerable atrofia de la cola y el cuerpo del núcleo caudado mientras que la cabeza y el putamen aún pueden parecer normales. La pérdida neuronal aparece principalmente en la cola del caudado. En estadio 2 existe un alto grado de pérdida de sustancia blanca y atrofia generalizada del estriado. A pesar de que en este estadio el volumen de los ventrículos aumenta considerablemente, la superficie convexa de la superficie del estriado en la zona ventricular se mantiene. En este punto se observa astrogliosis y pérdida neuronal en el núcleo caudado y putamen. Además, comienza a degenerar el globo pálido. En grado 3, la atrofia alcanza la cabeza del núcleo caudado y la astrogliosis es generalizada. Finalmente, en grado 4, el estriado está gravemente atrofiado y cóncavo, con una pérdida del 95% de las células estriatales (Vonsattel et al., 1985).

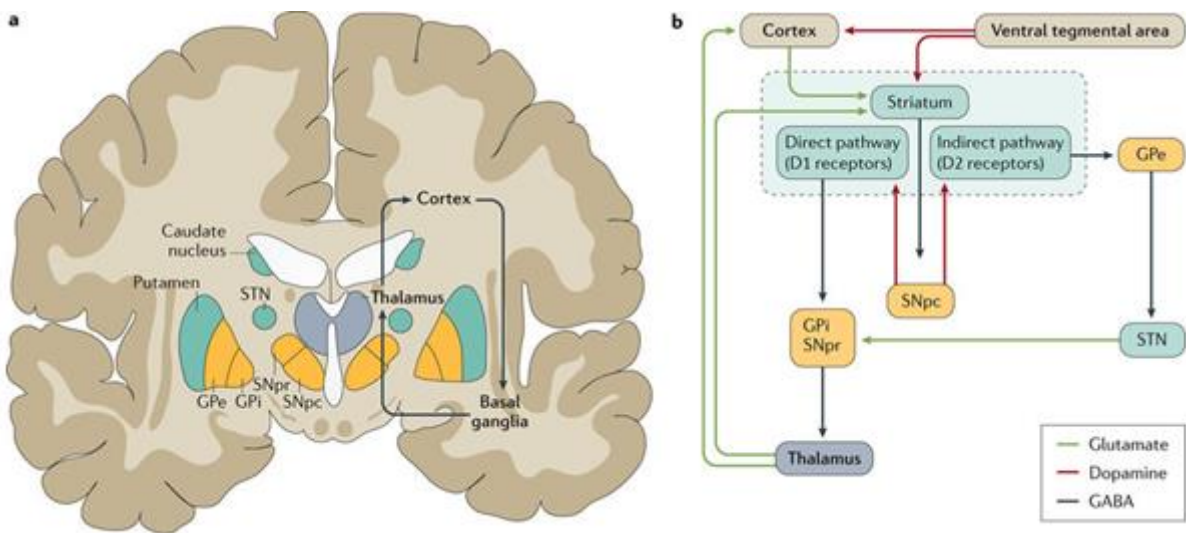
La EH se clasifica dentro del grupo de enfermedades con afectación del bucle motor de los ganglios basales (Fig. 2). Se trata de un grupo de núcleos subcorticales que intervienen en multitud de procesos en los que destaca el control de las funciones motoras.

El bucle lo conforman el cuerpo estriado (núcleo caudado y putamen), el globo pálido externo (GPe) e interno (GPi), la sustancia negra (SN), parte reticulada (SNpr) y parte compacta (SNpc), el núcleo subtalámico (STN) y el tálamo (núcleos motores del tálamo: núcleo ventral anterior y núcleo ventral lateral). La aferencia más importante que llega a los ganglios basales procede de la corteza cerebral, sobre todo de áreas de asociación (corteza frontal, parietal, temporal, insular, cingular). Los axones de las neuronas corticales que proyectan información al estriado forman la vía cortico-estriatal que está constituida por neuronas dopaminérgicas y glutamatérgicas. Estas proyecciones sinaptan con las dendritas de las neuronas más abundantes del núcleo estriado, denominadas neuronas espinosas de tamaño medio (MSSM). Estas neuronas constituyen el 95% de la población neuronal del estriado y se caracterizan por ser GABAérgicas. Las MSSM son la población de neuronas que degenera principalmente en la EH.

Desde el cuerpo estriado, la información puede seguir dos rutas distintas: la vía directa y la vía indirecta. La vía directa es responsable de la activación de los movimientos voluntarios y es la que pasa por menos estaciones de relevo. En ella, las MSSNs, que expresan el receptor de dopamina D1 y sustancia P, contactan con el GPi. Desde allí la señal se proyecta al tálamo, que envía información procesada de nuevo a la corteza, cerrando el bucle.

En este punto las eferencias motoras parten hacia los músculos para controlar el movimiento. La vía indirecta, responsable de la inhibición de componentes involuntarios del movimiento, implica a una mayor cantidad de núcleos. Comparte con la vía directa el inicio en la corteza y la proyección al estriado. En este caso la subpoblación de MSSNs implicada, que expresa receptores de dopamina D2 y encefalina, proyecta hacia el GPe. Desde allí salen conexiones que sinaptan con el STN y después con la SNpr. Una vez modulada la señal en estos núcleos, la información vuelve al GPi y, al igual que en la vía directa, otra vez al tálamo hasta la corteza motora (Albin et al., 1989; Alexander and Crutcher, 1990).

Es el equilibrio entre ambas vías lo que permite un diseño adecuado de la estrategia motora y la correcta ejecución del movimiento. En la EH, las neuronas GABAérgicas del estriado implicadas en la vía indirecta están más afectadas que las neuronas que contienen sustancia P, implicadas en la vía directa (Reiner et al., 1988). Como se ha mencionado previamente, la vía indirecta está implicada en la inhibición de los movimientos involuntarios, por lo que se ha propuesto que este evento neuropatológico es el responsable de la corea en la EH (Waldvogel et al., 2014).



**Figura 2. Circuito de los ganglios basales.** Representación estructural y esquemática de las vías directa e indirecta del bucle motor de los ganglios basales. (Imagen adaptado de (Sorolla et al., 2008).  
**a)** Representación anatómica del bucle de los ganglios basales sobre un corte coronal de cerebro humano.  
**b)** Representación esquemática del bucle de los ganglios basales que incluye vía directa e indirecta.

## 1.2. Expansión de CAG y poliglutamina

La EH está causada por una mutación localizada en el exón 1 del gen de la huntingtina (*HTT*) en la región p16.3 del cromosoma 4 (HDCRG,1993). La mutación causante consiste en una expansión del número de repeticiones de un codón formado por CAG que se traduce en el aminoácido glutamina. El rango normal de repeticiones se encuentra entre 6 y 35. La penetrancia de la EH en individuos con más de 35 repeticiones es virtualmente del 100%. Existe una correlación inversa entre el número de repeticiones CAG y la severidad de la enfermedad de forma que, a mayor número, antes se manifiestan los síntomas de la enfermedad y éstos se presentan con mayor severidad.

Esta región de ADN, con un elevado número de repeticiones en tándem, es propensa a generar errores durante el proceso de replicación. La consecuencia directa es que progenitores asintomáticos con un número de repeticiones comprendido entre 27 y 35 puedan transmitir la enfermedad a sus hijos, por un fenómeno conocido como “anticipación génica” (Ranen et al., 1995). Debido a que el riesgo de expansión es mayor en la espermatogénesis que en la ovogénesis, la anticipación génica es más habitual cuando se da herencia por vía paterna.

El gen *HTT* da lugar a la proteína huntingtina (*HTT*) que en condiciones normales se traduce con una pequeña secuencia de poliglutamina (poliQ) en su extremo N-terminal. Cuando el gen muta da lugar a una proteína aberrante con una secuencia de poliQ anormalmente larga.

## 1.3. Función normal de la Huntingtina

La *HTT* es una proteína soluble de 384 KDa que se expresa en todas las células del organismo, pero con diferentes niveles según el tipo celular. Presenta niveles elevados en las neuronas del SNC y los testículos. Esta proteína puede encontrarse asociada con varios orgánulos como el aparato de Golgi, el retículo endoplasmático y el núcleo. También se observa en neuritas y sinapsis donde se une a vesículas y microtúbulos (Liu and Zeitlin, 2017).

Estructuralmente, la característica más reconocible es la secuencia de poliQ en el extremo N-terminal con una media de 23 repeticiones en individuos sanos. Aunque no existe una función clara descrita para la región de poliQ, se ha observado que mantiene a la proteína en un estado compacto pero intrínsecamente desordenado (Bates et al., 2015). La *HTT* presenta una serie de dominios separados por regiones desorganizadas. Principalmente cuenta con dominios HEAT (*Huntingtin, elongation factor 3, protein phosphatase 2A and TOR1*) de unión a macromoléculas (Bates et al., 2015).

Las regiones desorganizadas son diana para una gran variedad de modificaciones postraduccionales, principalmente corte proteolítico, fosforilación y glicosilación. La modificación más relevante es el corte proteolítico por las caspasas 2, 3, 6, y 7, así como por la calpaína y aspartil-proteasas. El corte proteolítico genera fragmentos N-terminales que alteran la homeostasis celular. Esta proteína también contiene una señal de exportación nuclear (NES) y una señal de localización nuclear (NLS) y se ha descrito que participa en el transporte de moléculas núcleo-citoplasma (Xia et al., 2003).

Desde un punto de vista funcional, la HTT es necesaria en el desarrollo embrionario ya que ratones *knockout* para HTT (Hdh<sup>-/-</sup>) son inviables al darse un defecto en la formación del tejido extraembrionario (Duyao et al., 1995; Nasir et al., 1995). La pérdida parcial de función produce defectos en la formación del epiblasto, lo que indica que la HTT es necesaria para el desarrollo correcto del SNC (White et al., 1997). Por otro lado, un aumento en los niveles de HTT induce protección frente a estímulos tóxicos en progenitores neurales (Rigamonti et al., 2000). La HTT también controla la producción de BDNF, una neurotrofina importante para la supervivencia de neuronas estriatales y para mantener la actividad de la sinapsis cortico-estriatales (Zuccato and Cattaneo, 2007).

## **1.4. Mecanismos patogénicos de la Enfermedad de Huntington**

### **1.4.1. Pérdida de la función normal de la Huntingtina**

Existen evidencias de que la pérdida de función normal de la huntingtina es suficiente, por sí sola, para inducir toxicidad. Individuos homocigotos para la mutación manifiestan una variante más severa de la enfermedad que los heterocigotos (Squitieri et al., 2003). Las consecuencias de disminuir los niveles de HTT endógena se han podido observar en el ratón YAC128, modelo de EH. Este modelo presenta una pérdida de neuronas y una atrofia cerebral ligera junto con un leve déficit motor. Al disminuir los niveles de HTT endógena en estos ratones se observa un aumento de la toxicidad y del déficit de las habilidades motoras (Van Raamsdonk et al., 2005). Por otra parte, en un modelo de toxicidad por poliQ expandida, generado en *Drosophila melanogaster*, la reducción de HTT acelera el fenotipo de neurodegeneración (Zhang et al., 2009).

#### 1.4.2. Toxicidad de la proteína

Aunque no se conoce el mecanismo exacto por el cual la huntingtina mutante (mHTT) induce neurodegeneración, se ha descrito que presenta ganancia de función tóxica mediante varios procesos. En primer lugar, la poliQ expandida altera la estructura conformacional de la proteína (Shao and Diamond, 2007; Tobin and Signer, 2000) confiriendo a la mHTT capacidad para interferir en numerosos procesos celulares (Fig. 3).

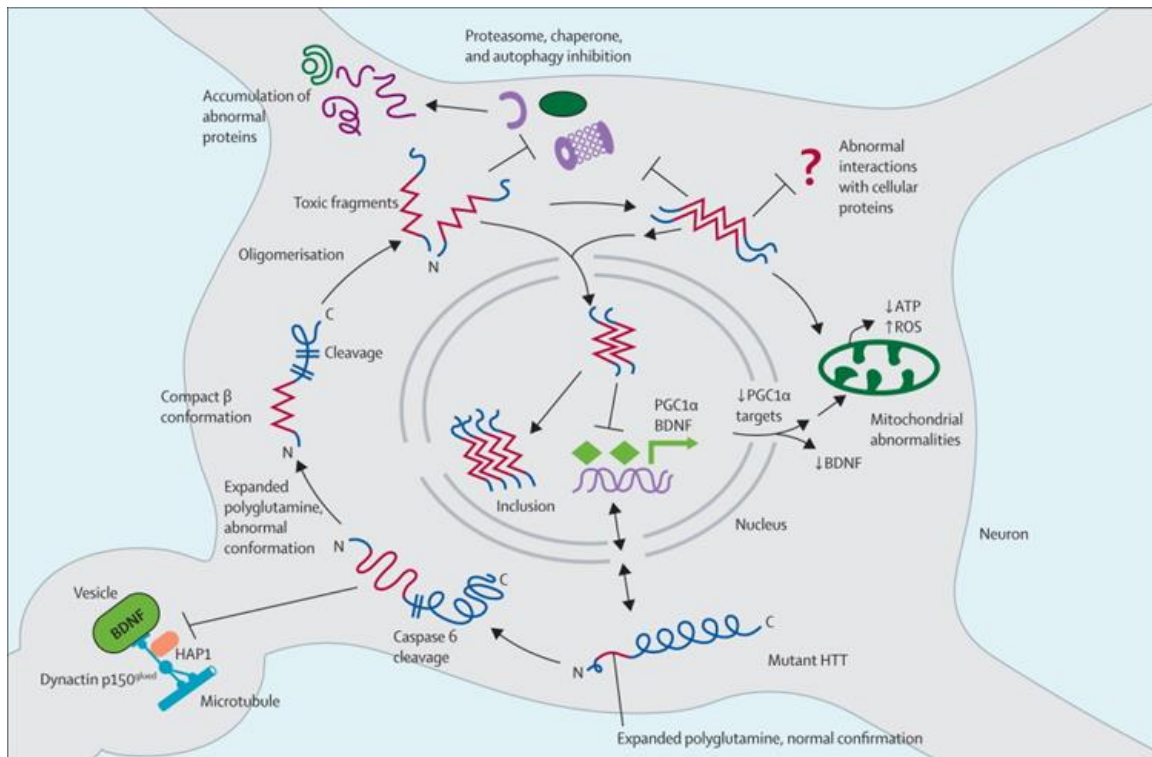
Como se ha mencionado, la mHTT puede ser cortada por numerosas proteasas en el citoplasma (DiFiglia et al., 2007; Landles et al., 2010; Schilling et al., 2007), generando fragmentos tóxicos N-terminales que contienen la expansión de poliQ. Una proporción de estos fragmentos es eliminada por el proteasoma. Sin embargo, puesto que el sistema ubiquitina-proteasoma está alterado en la EH (Ortega and Lucas, 2014), un alto porcentaje de fragmentos N-terminales de la mHTT se acumula en el citoplasma e interacciona con muchas proteínas afectando a sus rutas de señalización. Esta proteólisis, es un evento muy temprano en el desarrollo de la enfermedad ya que se ha detectado en ratones modelo de EH en estadios presintomáticos (Landles et al., 2010). En condiciones normales las neuronas presentan mayores niveles de HTT que los astrocitos. En consecuencia, cuando el gen HTT muta, las neuronas presentan mayores niveles de fragmentos N-terminales de mHTT. Esto podría explicar la mayor vulnerabilidad que presentan las neuronas frente a los astrocitos en la EH (Landwehrmeyer et al., 1995).

Otra parte de estos fragmentos se trasloca al núcleo, donde alteran la transcripción de numerosos genes como PGC1 $\alpha$ , CREB o TAF130. Un gen muy relevante cuya transcripción se ve alterada es el BDNF. Como se ha mencionado, esta neurotrofina es esencial para el mantenimiento de las MSSN y se ha visto reducida en los pacientes de EH (Ferrer et al., 2000; Zuccato et al., 2008).

La mHTT también afecta directamente la función mitocondrial: altera su localización al interferir en el transporte axonal de las mismas; desregula la homeostasis del calcio; en el núcleo modifica la expresión de algunos de los genes implicados en el correcto funcionamiento del orgánulo (Jin and Johnson, 2010). Por otro lado, la mutación en HTT altera las funciones motoras del citoesqueleto, incluyendo el transporte y el reciclaje vesicular (Caviston and Holzbaur, 2009) mediante la interacción de la mHTT con HAP1, HAP40 (*Huntingtin associated protein of 40KDa*) y la dineína (Ravikumar et al., 2008).

Finalmente, y de especial relevancia en este trabajo, la HTT mutada provoca la alteración de la proteostasis celular a diferentes niveles como se detallará en la próxima sección.





**Figura 3. Mecanismos patogénicos propuestos en la Enfermedad de Huntington.** La huntingtina mutante (representada en azul y rojo) interfiere con la maquinaria celular a diferentes niveles. En el citoplasma entorpece el funcionamiento de la neurotrofina BDNF, el proceso de degradación de proteínas e interfiere con el metabolismo mitocondrial. Los fragmentos cortados entran en el núcleo donde modifican la transcripción. Imagen adaptada de (Ross and Tabrizi, 2011).

### 1.5. Alteración de la proteostasis en la enfermedad de Huntington

Las enfermedades neurodegenerativas comparten como marca patológica la formación de agregados proteicos en el cerebro. En el caso de la EH, se ha descrito que la mHTT adquiere la capacidad de organizarse en agregómeros progresivamente más complejos hasta formar los cuerpos de inclusión característicos de la enfermedad. Existe controversia en relación al efecto neurotóxico en las diferentes fases, aunque cada vez más evidencias indican que son las estructuras intermedias, los oligómeros, los principales agentes tóxicos (Leitman et al., 2013). Además de las alteraciones provocadas por los fragmentos N-terminales mencionadas previamente, los agregados de mHTT y los oligómeros afectan a la regulación proteostática celular por diferentes mecanismos (Koyuncu et al., 2017).

El sistema de ubiquitina-proteasoma (UPS) constituye una importante maquinaria de degradación de proteínas que se ve alterada en la EH. Datos provenientes de diferentes estudios indican que los oligómeros, pero no los cuerpos de inclusión, tienen la capacidad de

interferir con la actividad del proteasoma (Ortega and Lucas, 2014). Como consecuencia de esto, se van acumulando progresivamente proteínas mal plegadas en las neuronas.

Es también conocido que la mHTT interactúa con miembros de diversas familias de chaperonas, como HSP90, HSP70, TCP-1 y DNAJ, y entorpece su funcionamiento normal (Shirasaki et al., 2012). Así, se ha comprobado que las estrategias dirigidas a elevar los niveles de chaperonas en modelos de EH revierten la toxicidad de la mHTT (Muchowski and Wacker, 2005). Además de favorecer el plegamiento correcto de las nuevas proteínas no procesadas por el proteasoma, las chaperonas intervienen en diferentes puntos del proceso de agregación de la mHTT para impedir la generación de formas tóxicas (Balchin et al., 2016). Otro de los mecanismos por los que en la EH se ve alterada la proteostasis es la ejecución aberrante de la autofagia. Ha sido ampliamente descrito que tanto el reconocimiento de los *cargos* por los autofagosomas, como el posterior transporte y degradación de los substratos están afectados en la EH (Harding and Tong, 2018).

En conjunto, los anteriores eventos provocan un colapso global de la proteostasis celular resultando en la acumulación de proteínas inmaduras y mal plegadas. Una de las consecuencias más prominentes de este fenómeno, que reviste especial interés para nuestro grupo, es la inducción de “estrés de retículo endoplasmático” (ERE) y la puesta en marcha de una reacción fisiológica a este estrés denominada “respuesta a proteínas mal plegadas” (RPM) (Hetz and Mollereau, 2014) que desarrollaré en las próximas secciones.

## **1.6. Estrés de retículo endoplasmático**

### **1.6.1. Descripción del ERE**

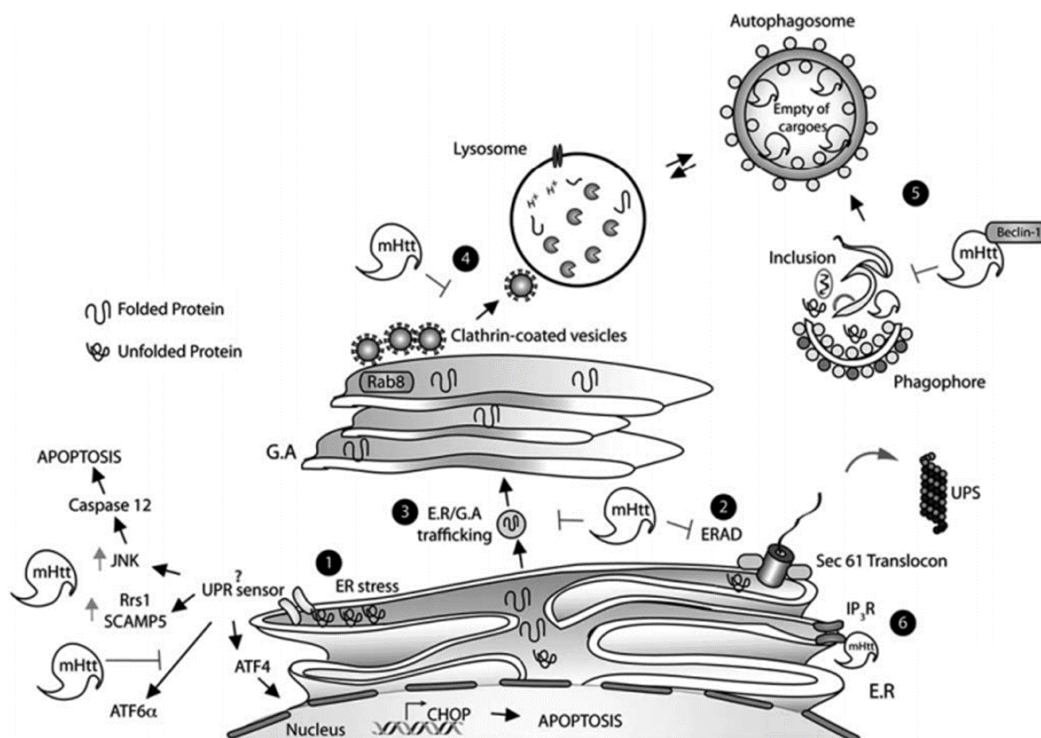
El retículo endoplasmático (RE) es el orgánulo principal de síntesis de esteroides y fosfolípidos, relevantes en la formación de membranas biológicas. Se trata del mayor almacén de  $\text{Ca}^{2+}$  de la célula, de modo que juega un papel importante en su homeostasis celular. Además de las anteriores, el RE desempeña una función esencial en la síntesis, plegamiento adecuado, modificación postraduccional y transporte de las proteínas nacientes a diferentes destinos (Paschen and Mengesdorf, 2005; Remondelli and Renna, 2017; Roussel et al., 2013). De esta forma el RE actúa a modo de control de calidad de las nuevas proteínas garantizando su incorporación al funcionamiento normal de la célula.

Cualquier estímulo fisiológico o patológico que provoque una alteración o que dificulte estas funciones induce un estado celular de ERE (Hetz and Mollereau, 2014).

### 1.6.2. Agentes causantes del ERE en la EH

El ERE es característico de numerosas patologías y está especialmente descrito en las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la EH (Halliday and Mallucci, 2014). Se han descrito numerosos procesos por los que la mHTT es capaz de entorpecer el funcionamiento del RE. La mHTT dificulta el funcionamiento correcto del complejo ERAD que trasloca proteínas mal plegadas desde el lumen del RE al citoplasma para su degradación por el proteasoma (Duennwald and Lindquist, 2008) (Fig.4). La mHTT altera el sistema de secreción vesicular en varios puntos. En primer lugar dificulta el tráfico vesicular desde el RE al aparato de Golgi, lo que favorece la acumulación de proteínas inmaduras en el lumen del RE (del Toro et al., 2006) (Fig. 4).

La degradación lisosomal también se ve afectada en la EH ya que la mHTT impide el reconocimiento de las vesículas portadoras del material a degradar (Martinez-Vicente et al., 2010). También se ha descrito el papel de la mHTT en la homeostasis y señalización del  $Ca^{2+}$  al interactuar con los canales P2X7 (Diaz-Hernandez et al., 2009) y los receptores de  $IP_3$  (Tang et al., 2005) (Fig. 4).



**Figura 4. Inducción del estrés de retículo endoplasmático en la EH.** 1) Hiperactivación de los sensores PERK y IRE1 $\alpha$ . 2) Entorpecimiento del sistema ERAD de degradación de proteínas. 3) Alteración del transporte RE-Golgi. 4) Disrupción del tráfico de vesículas de clatrina y la degradación lisosomal. 5) Afectación del reconocimiento del cargo. 6) Entorpecimiento de la actividad de los canales de calcio  $IP_3R$ . Imagen adaptada de (Vidal et al., 2011).

### 1.6.3. Respuesta a proteínas mal plegadas

Esta situación de malfuncionamiento del RE conlleva la acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del orgánulo, poniendo en marcha un mecanismo de respuesta muy conservado que tiene por objetivo recuperar la proteostasis celular. Como se ha mencionado previamente, este mecanismo se conoce como RPM (Morris et al., 2018). Se trata de un conjunto de tres vías canónicas de señalización que parten desde el RE y progresan hacia el núcleo donde ponen en marcha un programa transcripcional específico.

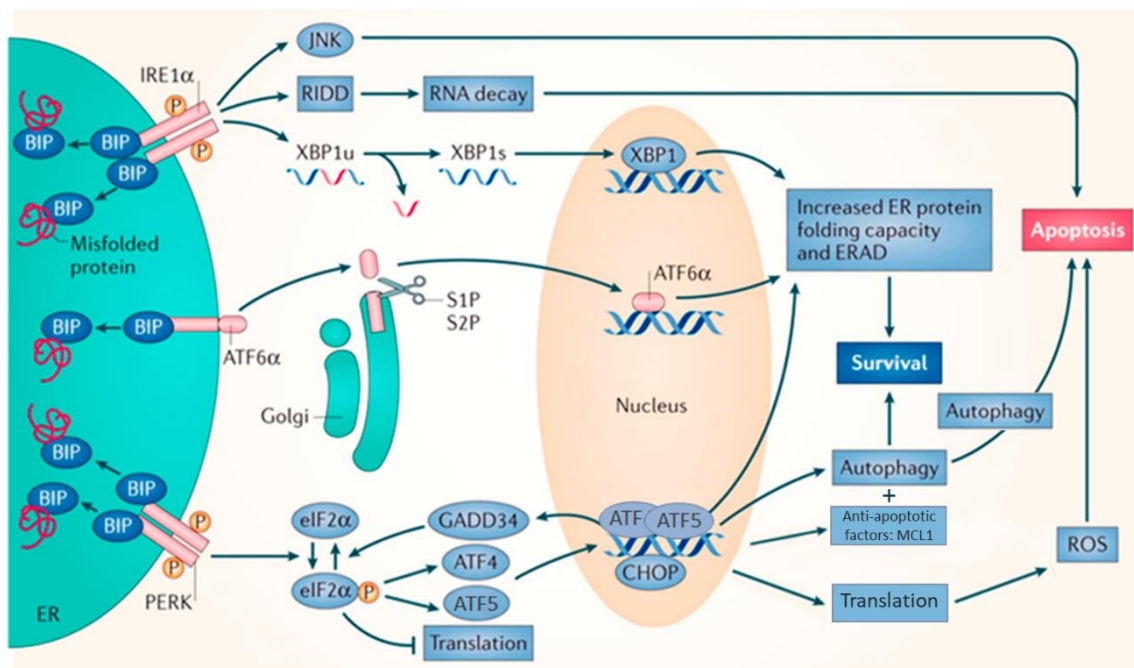
Las proteínas mal plegadas acumuladas en el RE son reconocidas por la chaperona BiP, que se desliga de los sensores canónicos IRE1 $\alpha$  (*Inositol requiring enzyme 1*), PERK (*PKR-like endoplasmic reticulum kinase*) y ATF6 (*Activating Transcription Factor 6*). Estas proteínas inician tres rutas de señalización diferentes entre las que puede haber interacción (Fig. 5).

La vía de IRE1 $\alpha$  es la más conservada. Tras la inducción de ERE, el dominio RNasa citosólico de IRE1 $\alpha$  cataliza el *splicing* no convencional del ARNm de XBP1 dando lugar a un factor de transcripción tipo bZIP denominado XBP1s. Esta proteína facilita la recuperación de la proteostasis celular mediante la transcripción de genes específicos de UPR que intervienen en diferentes procesos como la biogénesis del RE, la traslocación de proteínas al lumen del RE y el plegamiento de proteínas (Hetz and Papa, 2018). Además, XBP1s induce la expresión de componentes de la maquinaria ERAD, proteínas de autofagia y del metabolismo redox (Remondelli and Renna, 2017). Si el ERE es muy intenso o se cronifica IRE1 $\alpha$  puede poner en marcha mecanismos proapoptóticos. A través de su dominio RNasa cataliza la degradación de moléculas de ARNm asociadas al RE en un proceso conocido como RIDD (del inglés: *regulated IRE1-dependent decay*), lo que finalmente dificulta la generación de nueva maquinaria para el plegamiento proteico. Por otra parte, se ha descrito que la poliQ expandida, hiperactiva la ruta de IRE1 $\alpha$ -TRAF2-ASK1-JNK y el mayor procesamiento de caspasa 12 a su forma activa, induciendo apoptosis (Nishitoh et al., 2002).

Otra de las rutas de respuesta a ERE es la de ATF6. Se trata de una proteína transmembrana del RE que en respuesta a ERE es traslocada al aparato de Golgi donde es proteolizada secuencialmente por las endopeptidasas S1P y S2P. El fragmento N-terminal resultante es un factor de transcripción tipo bZIP que se libera al citosol. Una vez llega al núcleo, induce la expresión de XBP1 y de genes implicados en ERAD y en plegamiento de proteínas (Hoozemans and Scheper, 2012). Al mismo tiempo ATF6 activa la expresión de CHOP, un factor de transcripción proapoptótico (Haze et al., 1999). Resultados previos de nuestro grupo demuestran que esta ruta de señalización se ve impedida en la EH

probablemente debido a un secuestro del factor en inclusiones de mHTT (Fernandez-Fernandez et al., 2011).

Por último, la tercera ruta canónica de la RPM comienza con la activación de PERK en la membrana del RE y la subsiguiente fosforilación del factor de inicio de la transcripción eIF2 $\alpha$ . Esto ocasiona un descenso generalizado de la traducción en la célula para frenar la acumulación de proteínas mal plegadas en el RE. Paradójicamente, en esta situación se ve favorecida la expresión de algunos genes, como el factor de transcripción canónico ATF4 (*activating transcription factor 4*) y el menos conocido ATF5 (*activating transcription factor 5*). De forma similar a IRE1 $\alpha$  y ATF6, ATF4 puede jugar papeles opuestos, promoviendo tanto supervivencia (a través de genes implicados en el control de redox, metabolismo de aminoácidos, autofagia y plegamiento de proteínas) como muerte celular (induciendo la expresión de CHOP, ROS y miembros proapoptóticos de la familia de BCL-2) (Pitale et al., 2017). Resultados en modelos animales indican que existe sobreactivación de PERK y una consecuente inducción de CHOP en la EH, promoviendo así la apoptosis (Vidal et al., 2011).



**Figura 5. Respuesta a proteínas mal plegadas.** La acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del RE induce el desligamiento de BiP de los sensores de ERE, IRE1 $\alpha$ , ATF6 y PERK. Cada uno inicia una ruta de señalización que da lugar a un aumento de la capacidad de plegamiento, transporte y degradación de proteínas mal plegadas al mismo tiempo que se reducen los niveles globales de traducción. Imagen adaptada de (Wang and Kaufman, 2014).

## 2. FACTOR ACTIVADOR DE LA TRANSCRIPCIÓN 5 (ATF5)

### 2.1. Descripción general de ATF5

ATF5 es una proteína de la familia de factores de transcripción tipo bZIP, a la que también pertenecen proteínas más conocidas como ATF6, ATF4, CREB-1 y NRF2. Posee tanto un dominio C-terminal de cremallera de leucina/valina, que le permite formar homodímeros y heterodímeros, como un dominio N-terminal de unión al DNA. ATF5 se clasifica dentro de la subfamilia de ATF4 en base a propiedades de dimerización, existiendo además homología de alta identidad entre sus secuencias (Hansen et al., 2002). Como cabría esperar, estos dos factores comparten vías de regulación y controlan procesos similares. El gen *ATF5* presenta dos transcritos denominados *ATF5 $\alpha$*  y *ATF5 $\beta$* . La 5'-UTR de *ATF5 $\alpha$*  porta uORFs que, de forma similar a ATF4, disminuyen la expresión de ATF5 en condiciones normales a través de la competencia por el factor *elf2 $\alpha$* , pero reactivan la expresión bajo ciertos tipos de estrés celular (Hatano et al., 2013).

Como factor de transcripción, ATF5 activa la expresión de genes que fomentan la supervivencia celular como los antiapoptóticos *BCL2* y *MCL1*, y los codificadores de las chaperonas HSP27, HSP60 y HSP70. Se ha descrito la participación de ATF5 en una amplia variedad de tumores, como los de mama, y en varios carcinomas: rectal, de pulmón, renal, hepático, leucemia, linfomas y gliomas (Greene et al., 2009). ATF5 suele presentar una elevada expresión en todos estos tumores en los que promueve supervivencia, migración, radioresistencia y la síntesis de aminoácidos. Se ha propuesto a ATF5 como una posible diana terapéutica en cáncer al existir evidencias de que su inhibición induce apoptosis selectiva en células tumorales (Persengiev et al., 2002).

Una amplia variedad de resultados ha probado el papel de ATF5 en la diferenciación de diversos tipos celulares. En el caso del sistema nervioso, ATF5 promueve la división de los progenitores neurales y su expresión debe verse reducida para iniciar el compromiso de éstos hacia células maduras. Esto llevó a algunos autores a postular que las neuronas adultas no expresan ATF5 y que la expresión de este factor sólo se reactiva en caso de proliferación maligna como el glioma (Angelastro et al., 2003).

Sin embargo, resultados previos de nuestro grupo demuestran expresión basal de ATF5 en neuronas de ratones adultos que se induce en condiciones de ERE (ver apartado siguiente) (Torres-Peraza et al., 2013).



## **2.2. Papel de ATF5 en el ERE neuronal**

Es de especial relevancia para este trabajo la participación de ATF5 en el ERE neuronal. Resultados previos de nuestro grupo indican que ATF5 juega un papel importante en la supervivencia neuronal al actuar como un factor antiapoptótico inducible en respuesta al ERE propio de un modelo de epilepsia (Torres-Peraza et al., 2013). En este modelo se inyecta kainato en la amígdala de ratones adultos y se observa un aumento de la expresión de ATF5 en el hipocampo, que es la zona principalmente afectada. La administración de salubrinal, un compuesto que inhibe la acción de la fosfatasa GADD34 manteniendo niveles altos de P-eIF2 $\alpha$ , permite mantener una elevada expresión de ATF5 en el tiempo y disminuye la muerte celular inducida por el kainato. En este mismo trabajo se sobreexpresó ATF5 en cultivos primarios de neuronas de corteza tratadas con tunicamicina, un clásico inductor de ERE. Se observó un rescate de la muerte celular inducida por tunicamicina confirmando a ATF5 un papel neuroprotector en este contexto (Torres-Peraza et al., 2013). Estos datos demostraron por primera vez la participación de ATF5 en el conjunto ERE-RPM neuronal.

En base a los antecedentes presentados nos planteamos la siguiente hipótesis de trabajo:

El factor de transcripción ATF5 tiene una función importante en el mantenimiento de la supervivencia celular frente a la toxicidad que deriva de la acumulación de proteínas mal plegadas en la enfermedad de Huntington.

---

## **IV. OBJETIVOS**



## OBJETIVOS

**1-Evaluar los patrones y niveles de expresión del factor de transcripción ATF5 en el modelo animal R6/1 y en pacientes de la enfermedad de Huntington (EH).**

**2-Explorar niveles de dianas transcripcionales del factor de transcripción ATF5 que puedan ser relevantes en la patogénesis de la EH.**

**3-Analizar las consecuencias de la manipulación de los niveles de ATF5 en modelos animales y celulares:**

-Analizar los efectos de la delección de ATF5 en *Caenorhabditis elegans* como modelo de toxicidad inducida por poliglutamina expandida.

-Examinar el posible efecto beneficioso del restablecimiento de los niveles de ATF5 en ratones R6/1, modelo de EH.

-Analizar el efecto de la sobreexpresión de ATF5 en un modelo celular de toxicidad por poliglutamina expandida.

## **V. MATERIALES Y MÉTODOS**

---

## 1. MUESTRAS DE TEJIDO CEREBRAL HUMANO Y MODELOS ANIMALES

### 1.1. Muestras de pacientes

Las muestras de corteza y estriado de cerebro de pacientes de EH fueron suministradas por el Banco de Cerebros del Instituto de Neuropatología (HUB-ICO-IDIBELL, Hospitalet de Llobregat, España), el Banco de Tejidos Neurológicos del Biobanco IDIBAPS (Barcelona, España), el Banco de Tejidos Fundación Cien (BT-CIEN, Madrid, España) y el Banco de Cerebros de Holanda (Amsterdam, Holanda). Todas ellas tienen el correspondiente consentimiento informado por escrito por parte de los donantes de cerebro y/o familiares para su extracción después de la muerte y para ser usadas con propósitos de diagnóstico e investigación. Los procedimientos fueron aprobados por el Subcomité de Bioética del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Madrid, España). El intervalo de tiempo *post mortem* (IPM) desde la muerte del paciente hasta la extracción de las muestras oscila entre 3,75 y 23,5 horas. El examen neuropatológico de los casos de la EH reveló el diagnóstico de los grados de la EH siguiendo los criterios Vonsattel (Vonsattel et al., 1985) que variaban de 0-1 a 4 (Tabla 1).

#### *Muestras de EH*

Código	Sexo	Edad	IPM	Nº CAGs	Grado Vonsattel
BCPA0138	M	43	n/a	n/a	n/a
S99-227	M	49	5:45	54	n/a
S03-134	F	50	5:40	47	2-3
CS1294	M	53	7:00	45 +/- 2	3
BCPA0112	F	53	n/a	n/a	n/a
BCPA0324	M	55	n/a	n/a	n/a
S95-143	M	57	7:30	46	3
S08-126	M	59	5:05	44	1
BK-801	M	59	5:30	n/a	n/a
BCPA0079	M	61	n/a	n/a	n/a
S09-212	F	64	5:00	n/a	4
BK-518	M	65	15:00	n/a	n/a
BK-539	F	68	4:00	n/a	n/a
BK-413	F	71	10:15	n/a	n/a
CS1334	M	73	7:00	40 +/- 2	1
CS1438	M	85	5:30	40	3

**Muestras Control**

Código	Sexo	Edad	IPM
BK-1074	M	31	17:30
S11-044	M	51	7:45
S11-081	M	55	7:30
A08-039	M	56	3:45
BC1546	F	57	1:00
A07-024	F	60	15:30
BC1325	M	68	8:00
S11-96	F	70	6:15
S11-91	M	76	6:45
BC1298	M	79	19:00
BK-810	F	81	23:30

**Tabla 1. Casos de pacientes de EH y controles usados en este trabajo.** En la tabla se muestran tanto el código de la muestra como otros datos relevantes de la misma: sexo, edad del paciente, IPM, nº de repeticiones CAG y grado de EH en la escala Vonsattel.

**1.2. Modelos animales utilizados**

Todos los animales utilizados en esta tesis, se criaron en el animalario del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”. Los ratones se dispusieron en cajas con un máximo de 4 animales, con comida y agua *ad libitum*, y fueron mantenidos en un ambiente con la temperatura controlada y con ciclos luz-oscuridad 12/12h. El mantenimiento de los animales se realizó siguiendo la guía del Council of Europe Convention ETS123, revisada como indica en la Directiva 86/609/EEC. Los experimentos con animales se realizaron bajo los protocolos (P15/P16/P18/P22) aprobados por el Comité de Cuidado y Utilización Animal del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (Comité de Ética de Experimentación Animal del CBM, CEEA-CBM), Madrid, España (PROEX 293/15). Se utilizaron ratones R6/1 transgénicos para el exón 1 del gen de la huntingtina humana (Mangiarini et al., 1996), un modelo transgénico de *C. elegans* y ratones transgénicos de sobreexpresión de ATF5 generados en este trabajo.

**1.2.1. Modelo transgénico de la Enfermedad de Huntington (R6/1).**

Este ratón fue generado mediante la inserción en el genoma del animal de un fragmento N-terminal que contiene la región 5'UTR, el exón 1 con una expansión de 116 tripletes CAG y, las primeras 262 pares de bases del intrón 1 del gen de la HTT humana. Se expresa de forma ubicua bajo control del promotor de la HTT humana.

Este ratón presenta un fenotipo neurológico progresivo y severo similar a muchos de los síntomas que presentan los pacientes de la EH (Mangiarini et al., 1996).

### 1.2.2. *Caenorhabditis elegans*

El mantenimiento de las distintas cepas de *C. elegans* se llevó a cabo de acuerdo a los estándares publicados previamente (Stiernagle, 2006). Los gusanos se mantuvieron a 20 °C en placas de agar NGM (*Nematode Growth Medium*), constituido por NaCl 50 mM, bactoagar (17 g/L), peptona (2,5 g/L), colesterol 13 mM, etanol al 0,095%, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgSO<sub>4</sub> 1 mM, tampón KPO<sub>4</sub> 0,2 M y pH 6,0. El medio se reparte asépticamente en placas de Petri, sobre las que se siembra una solución de *E. coli* OP50. Se emplearon las cepas N2 (cepa silvestre *DR* subclonada a partir de la cepa *CB* original), LD1325, *atf-5(tm4397) X* (Ferraz et al., 2016), VZ531 = *vzEx173 [Punc-54::Q40::yfp]*, VZ533 = *vzEx175 [Punc-54::Q40::yfp]*, VZ534 = *atf-5(tm4397) X; vzEx173 [Punc-54::Q40::yfp]* y VZ535 = *atf-5(tm4397) X; vzEx175 [Punc-54::Q40::yfp]*. Todas las cepas transgénicas VZ y la cepa LD1325 se retrocruzaron 6 y 7 veces respectivamente con la cepa N2.

### 1.2.3. Ratones Tg-mATF5

#### 1.2.3.1. Clonación del gen *Atf5* en el plásmido pBI-3

Partimos del vector pcDNA-3-mATF5 que fue utilizado por nuestro grupo previamente (Torres-Peraza et al., 2013). Para generar el plásmido pcDNA3-mATF5, Torres-Peraza y colaboradores obtuvieron el cDNA de *Atf5* mediante PCR a partir de ADN genómico de ratón de la cepa C57BL/6J. Para insertar la secuencia mATF5 en el plásmido pBI-3 primero se cortó pcDNA3-mATF5 con las enzimas HindIII y NotI y la secuencia de interés se clonó en el plásmido pCRII para dotarla de dianas de restricción flanqueantes adicionales y así facilitar su posterior inserción en el plásmido pBI-3 (Baron et al., 1995). El plásmido pCRII-mATF5 se cortó con NsiI/NotI y el fragmento resultante fue insertado en pBI-3, previamente digerido con PstI/NotI, resultando así el plásmido pBI-3-mATF5.

#### 1.2.3.2. Generación de ratones Tg-mATF5

La construcción pBI-3-mATF5 fue digerida con AseI/SapI y el fragmento resultante de 7,5 Kb (que contiene el promotor bidireccional, los cDNAs de β-Gal y mATF5 y sus correspondientes secuencias estabilizadoras del ARNm) fue purificado por *Gene Clean* (Bio101). Se pasó por filtros RPM101 y se diluyó a una concentración de 2-5 ng/μl en tampón de microinyección: Tris 7,5 mM y pH 7,4; EDTA 0,2 mM. Esta solución de DNA se microinyectó en oocitos fecundados de la cepa CBAx57BL/6J en el estadio de una célula con dos pronúcleos. Los ratones fundadores se retrocruzaron con ratones Wt C57BL/6J resultando la

línea transgénica TetO/mATF5. Los ratones TetO/mATF5 se cruzaron con ratones de la línea CamKII-tTA (Mayford et al., 1996) o GFAP-tTA (Jackson Laboratory; B6.Cg-Tg(GFAP-tTa)110Pop/J no. 005964) para obtener ratones dobles transgénicos con expresión condicional de ATF5 específicamente en neuronas adultas o astrocitos respectivamente: Tg-mATF5.

## 2. TÉCNICAS EMPLEADAS

### 2.1. Genotipado de los animales

#### 2.1.1. Obtención de ADN genómico

Para extraer ADN genómico de los animales, se cortaron trozos de cola y se lisaron en tampón de lisis (Tris HCl 100 mM pH 7,8; EDTA 5 mM pH 8; SDS 0,1%; NaCl 200 mM) más 2  $\mu$ l de proteinasa K (Merck) a 60°C hasta su completa lisis. A continuación, se extrajo el ADN de cada muestra mediante adición de NaCl 6 M. Se centrifugó 10 min a 13200 rpm y al sobrenadante se le añadió isopropanol puro. Seguidamente, se volvió a centrifugar 10 min a 13200 rpm y al precipitado se le añadió etanol al 70%. Se centrifugó 2 min a 13200 rpm, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el pellet. Finalmente, el pellet se disolvió en agua.

#### 2.1.2. Amplificación de ADN genómico y genotipado

Para amplificar el ADN mediante la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) (Mullis and Faloona, 1987) se utilizó un termociclador. El volumen de reacción fue 50  $\mu$ L para los oligos A, B, C, F y 12  $\mu$ L para los oligos 92 y 96. Se utilizó 1 U de polimerasa del kit comercial Go-Taq<sup>R</sup> Flexi DNA polymerase (Promega) por mezcla de reacción. Como iniciadores de la PCR se emplearon los diferentes oligos descritos en la tabla 2 a una concentración final de 1  $\mu$ g/ $\mu$ l.

### 2.2. Análisis del nivel de ARN mediante RT-PCR cuantitativa

Se extrajo ARN total de estriado y corteza de muestras de pacientes de EH y de controles. Además, a modo comparativo se obtuvo RNA total de la corteza, el estriado y el hipocampo de ratones. Para ello se utilizó el Kit Maxwell<sup>®</sup> 16 LEV con el método *simplyRNA* para tejido (Promega). El ARN total resultante (750 ng) se usó para la síntesis de cDNA con el kit Super Script III First-Strand Synthesis SuperMix de Invitrogene (PN 11752250) con el siguiente protocolo de amplificación: 30" a 95°C + (5" a 95°C + 5" a 60°C) x 40 ciclos + (5" a 60°C + 5" a 95°C). La cuantificación se realizó mediante PCR a tiempo real usando el Sistema CFX 384 (Bio-Rad) combinado con SsoFast Eva Green (Bio-Rad) siguiendo el protocolo del fabricante y usando 1  $\mu$ L de cada pareja de oligonucleótidos. Los datos se analizaron usando el *software* GenEx 5.3.7 (Multid Analyses AB).

**2.2.1. RT-PCR relativa**

Los niveles de ARNm de ATF5 (oligos en tabla 3) fueron normalizados primero respecto a la cantidad total de ARN y después respecto a los niveles de expresión de los genes que codifican la subunidad 18S del ribosoma, GAPDH,  $\beta$ -actina y  $\beta$ -tubulina para cada muestra. Los resultados están expresados de forma relativa a la media del grupo control.

**2.2.2. RT-PCR absoluta**

En las muestras de ratones transgénicos Tg-mATF5, para determinar con precisión la proporcionalidad entre *Atf5* y el reportero *LacZ*, tuvimos que cuantificar exactamente la cantidad de ambos transcritos. Para ello se empleó el plásmido pBI-3-mATF5 usado para generar el ratón transgénico y los oligos descritos en la tabla 3. Este plásmido pBI-3-mATF5, que contenía una copia de cada amplicón mencionado, fue digerido con la enzima de restricción AseI y se hicieron diluciones seriadas para generar una curva de calibración de modo que, con esta curva, podíamos determinar exactamente el contenido total de *Atf5* y *LacZ* para cada muestra. Como se esperaba, la eficiencia de la reacción de PCR y la curva de *melting* para cada pareja de oligos fue la misma usando el plásmido standard pBI-3-mATF5 o las muestras de ARNm de ratón.

Animal genotipado	Nombre del oligonucleótido	Secuencia	Programa
R6/1	92 (Directo)	5'-TGGGACGCAAGGCGCCGTG-3'	35 x 95 °C, 1 min 62 °C, 1 min 72 °C 1 min
	96 (Reverso)	5'-TGGAGGGACTTGAGGGACTC-3'	
tTA	C (Directo)	5'-ACTAAGTCATCGCGATGGAGC-3'	35 x 95 °C, 1 min 53 °C, 1 min 72 °C 1,5 min
	F (Reverso)	5'-CGAAATCGTCTAGCGTTCGG-3'	
TetO/mATF5	A (Directo)	5-CATGGTCAGGTCATGGATGACC-3'	35 x 95 °C, 1 min 58,5 °C, 1 min 72 °C 0,5 min
	B (Reverso)	5'-TAATCAGCCACTGATCCACCAG-3'	

**Tabla 2. Oligonucleótidos empleados en el genotipado de los modelos animales usados.**

Transgén	Nombre del oligonucleótido	Secuencia
mATF5	J1 (Directo)	5'-ACTTGACAGACGTACGTCCGATC-3'
	J1 (Reverso)	5'-ACGACTGACGTGTCAAACGTGC-3'
LacZ	LacZ (Directo)	5'-TTGACGACGTTGACGACCACAG-3'
	LacZ (Reverso)	5'-GAGCTGCAGACCACGTGTCAGTCG-3'

**Tabla 3. Oligonucleótidos empleados en RT-PCR absoluta de los transgenes mATF5 y LacZ.**

### 2.3. Análisis del nivel de proteína por *Western blot*

Las diferentes regiones del cerebro de humanos, que estaban guardadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , fueron pulverizadas en un mortero evitando su descongelación con ayuda de nitrógeno líquido generando un ambiente helado. En el caso de los ratones, se extrajo el cerebro y el hemisferio derecho se diseccionó rápidamente en sus diferentes estructuras cerebrales sobre una placa fría. Los extractos fueron preparados mediante la homogenización de las diferentes áreas cerebrales en tampón de homogenización frío compuesto por HEPES 20 mM y pH 7,4, NaCl 100 mM, NaF 20 mM, Triton x-100 1%,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  1mM, ácido okadaico  $1\ \mu\text{M}$ , pirofosfato de sodio 5 mM,  $\beta$ -glicerofosfato 30 mM, EDTA 5 mM e inhibidores de proteasas (PMSF 2 mM, aprotinina  $10\ \mu\text{g/ml}$ , leupeptina  $10\ \mu\text{g/ml}$  y pepstatina  $10\ \mu\text{g/ml}$ ).

Los lisados se centrifugaron a 13200 rpm durante 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante resultante fue recogido y se determinó el contenido de proteína mediante el método "Bradford" (Biorad Protein Assay, Biorad). Para la electroforesis se utilizaron  $15\ \mu\text{g}$  de proteínas totales y se corrieron en un gel del 10% de SDS-poliacrilamida. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Seguidamente las membranas se bloquearon en TBS-T (NaCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM y pH 7,5, y Tween-20 0,05%) con leche al 5% y se incubaron con el anticuerpo primario a  $4^{\circ}\text{C}$  durante la noche en tampón TBS-T complementado con leche al 5%. Seguidamente se lavaron y se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugada con HRP (P0447 de DAKO Cytomation) o anti-IgG de conejo conjugada con HRP (P0448 de DAKO Cytomation). Para el revelado posterior se usó el kit ECL de detección (Perkin Elmer). Se emplearon los anticuerpos primarios anti-ATF5 (Aviva, ARP30970. 1:1000), anti-MCL1 (Santa Cruz, sc-819. 1:1000) y anti- $\beta$ -Gal (Promega, Z3781. 1:2000).

### 2.4. Análisis histológico de los tejidos

#### 2.4.1. Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

En el caso de los pacientes de EH y sus respectivos controles, las secciones se obtuvieron de los diferentes bancos de tejidos preparadas sobre portaobjetos e incluidas en parafina. Para su análisis histológico se desparafinaron mediante el tratamiento con xileno y se rehidrataron con baños de etanol en porcentaje decreciente (100%; 96%; 70%).

En el caso de los ratones, el hemisferio izquierdo del cerebro previamente extraído fue utilizado para análisis de histología. Para ello, se fijaron por inmersión en paraformaldehído al



4% preparado en el tampón fosfato Sorensen pH 7,4 durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, tras lavarlos en PBS, se sumergieron en sacarosa al 30% en PBS durante 72 h para su crioprotección. Posteriormente, las muestras fueron incluidas en medio OCT (Sakura Finetek Europe), congeladas y guardadas a -80°C hasta su uso. Los hemisferios se cortaron en secciones de 30 µm en el plano sagital usando un criostato. Las secciones se mantuvieron en flotación en tampón glicol (glicerol 30% y glicol-etileno 30% en tampón fosfato 0,02 M) a -20 °C hasta su uso. Para la tinción inmunohistoquímica, tanto las muestras humanas como las de los ratones fueron incubadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.3% en metanol durante 30 min para inactivar la actividad peroxidasa endógena. Algunos anticuerpos requirieron un tratamiento previo al bloqueo para hacer un desmascaramiento de epítomos con solución de citrato de sodio (Citrato de sodio 1,92 g/L en agua destilada a pH 5,9). Las secciones se bloquearon en tampón de bloqueo (PBS suplementado con suero fetal bovino al 0.5%, Triton X-100 0.3% y BSA al 1%) durante 1 hora a temperatura ambiente (TA). Las secciones se incubaron con anti-ATF5 de conejo (Aviva, ARP30970. 1:1000) a 4°C durante toda la noche en tampón de bloqueo.

Finalmente, las secciones cerebrales se incubaron con el complejo avidina-biotina usando el kit Elite Vectastain (Vector Laboratories). El revelado se realizó con diaminobencidina (SIGMAFAST™ DAB, Sigma) durante 10 min. Las secciones se montaron en portaobjetos y cubreobjetos con Mowiol (Calbiochem). Para terminar, en el caso del tejido humano, las secciones se incubaron con Sudan Black durante 10 min y se montaron en portaobjetos con medio DePeX (Serva). Las imágenes se tomaron usando un microscopio Olympus BX41 con una cámara DP-70 (Olympus Denmark A/S).

Para la inmunofluorescencia, las secciones fueron pretratadas con Triton X-100 0.1% en PBS durante 15 min, Glicina 1M durante 30 min y solución de bloqueo (BSA 1% y Triton X-100 0.1%) durante 1 hora a TA. Las secciones se incubaron durante la noche a 4°C con los correspondientes anticuerpos primarios en solución de bloqueo: anti-ATF5 de conejo (Aviva, ARP30970. 1:500) y anti-HTT de ratón (Millipore, MAB5374. 1:500). Al día siguiente, las secciones se lavaron con PBS y se incubaron en primer lugar con el anticuerpo secundario biotinilado anti-conejo durante 1 hora. Después de lavar con PBS se incubó con streptavidina-Alexa 488 (Invitrogen), para amplificar la señal de ATF5, y anticuerpo secundario anti-ratón Alexa 555 (Invitrogen) durante 1 hora. Los núcleos fueron contrateñidos con DAPI (Calbiochem). Las secciones semontaron en Mowiol (Calbiochem) y se mantienen a 4°C. Las imágenes se adquirieron con sistema de láser confocal LSM710 acoplado a un microscopio invertido con objetivo de aceite de inmersión 63x y apertura numérica 1.4 usando el software Zen2010B sp1 (Carl Zeiss). Las imágenes se procesaron usando el programa ImageJ 1.45s.

### 3. ANÁLISIS DE LA EVOLUCIÓN DEL FENOTIPO DE LOS RATONES

Para el análisis de la evolución del fenotipo de los animales generados se siguió la evolución del peso corporal y se realizaron diferentes pruebas de comportamiento en las que se evaluaron diferentes habilidades de los animales. En estos análisis, se utilizaron indistintamente machos y hembras como sujetos de experimentación.

#### 3.1. Peso Corporal

Los ratones fueron pesados cada 2 semanas desde el primer mes de edad hasta la muerte del último ratón relevante para el estudio.

#### 3.2. Prueba de campo abierto (*Open Field Locomotion*)

La actividad locomotora se midió en cajas transparentes de plexiglás (43.2 cm x 43.2 cm), equipadas con unos sensores que monitorizan tanto la actividad horizontal como la actividad vertical de los animales. Los niveles de actividad se registraron en un ordenador y se analizaron mediante el software MED Associates' Activity Monitor Data Analysis. Para llevar a cabo esta prueba, los animales se sitúan en una esquina de la caja y se les deja que se muevan libremente. Los parámetros que se midieron incluyen: saltos, la distancia ambulatoria (cm), estereotipias y las cuentas verticales. Este test mide el grado de actividad de los ratones, de forma que valores bajos en estos parámetros indican hipoactividad. Los datos se recogen para cada animal durante 15 min.

#### 3.3. Rotarod

Esta prueba se realizó con el aparato de aceleración Rotarod (Ugo Basile). Se entrenaron los ratones durante dos días. El primer día se pone al animal sobre un rodillo que gira a 4 rpm a velocidad constante durante 1 min 4 veces. El segundo día se programa para que el rodillo gire 2 minutos, el primero a 4 rpm y el segundo a 8 rpm 4 veces. El día de la prueba, el Rotarod se programa para que acelere de forma progresiva de 4 a 40 rpm en 5 min y, los ratones se someten a la prueba 4 veces. Se mide el tiempo hasta que los ratones caen del rodillo.

#### 3.4. Prueba Contextual (*Fear conditioning*)

El test se realizó utilizando el aparato Startfear 1.06 de Panlab. Durante el entrenamiento se sitúa el ratón en la cámara durante 6:30 min. Después de 2 minutos de exploración, se emite un sonido de 85 dB durante 30 seg y, en los dos últimos segundos del

sonido, se les da un choque eléctrico a 0,2 mA (esto se repite 3 veces). Pasados 30 seg del último choque, el ratón se saca y se devuelve a su jaula.

24 horas después de la sesión condicional, la memoria condicionada al miedo dependiente de hipocampo fue medida introduciendo de nuevo el ratón en la misma cámara. El índice que se utiliza para cuantificar la memoria es el *freezing*, que es el tiempo que el ratón está inmóvil (con total ausencia de movimiento, excepto la debida a la respiración) ante el recuerdo del estímulo condicionado, la cámara donde sufrió el choque eléctrico. Se analiza el *freezing* durante 6 minutos en ausencia de tonos o estímulos eléctricos.

### **3.5. Prueba de la fuerza de agarre (*Grip strength*)**

Este test se realizó empleando el aparato Bioseb GRIP TEST. Para llevarlo a cabo se sitúa el aparato horizontalmente y los ratones se depositan sobre la rejilla de agarre de forma que apoyen las patas delanteras. Una vez los animales han agarrado la rejilla se les tira de la cola en el plano horizontal y se toma el dato de la tensión ejercida justo en el momento en que el ratón se suelta, que se considera el máximo. Cada medida se realizó por triplicado y se aplicó la media para la obtención del dato final.

## **4. CULTIVO CELULAR**

### **4.1. Cultivo primario de neuronas**

Para los ensayos con cultivos primarios de neuronas se emplearon ratones en estado embrionario E18 de la cepa C57BL/6J. Se sacrificaron las madres por inyección de 50 µl de pentobarbital sódico (Dolethal®). Se extrajo el útero y se diseccionó el cerebro de los embriones en MEM a 37°C para extraer la corteza. Las cortezas se tripsinizaron (tripsina 0,025%) y se sembraron 10<sup>6</sup> células por pocillo de placas M6 (Falcon®) con Neurobasal™ (Thermo Fischer) suplementado con GlutaMAX 0,5 mM (Thermo Fischer) y 2% B27 (v/v) (Gibco®). Los tratamientos se realizaron tras 5 días de cultivo en incubador en condiciones estándar: 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>.

### **4.2. Líneas celulares**

Para los ensayos de transfección se empleó la línea de neuroblastoma de ratón Neuro-2a (ATCC®-CCL-131™), la línea SH-SY5Y neuroblastoma de humano (ATCC®-CRL-2266™). En ambos casos se mantuvieron en DMEM con 10% de FBS y antibióticos (streptomicina y penicilina), a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Las transfecciones se llevaron a cabo en medio Opti-MEM™ (Gibco™) con Lipofectamine® 2000 (Thermo Fischer) de acuerdo a las instrucciones del

fabricante. Para los ensayos de inhibición de expresión se empleó una concentración final de 2 ug/ml de tetraciclina (Merck) y el volumen correspondiente de DMSO en la condición control.

## 5. ANÁLISIS DE DATOS

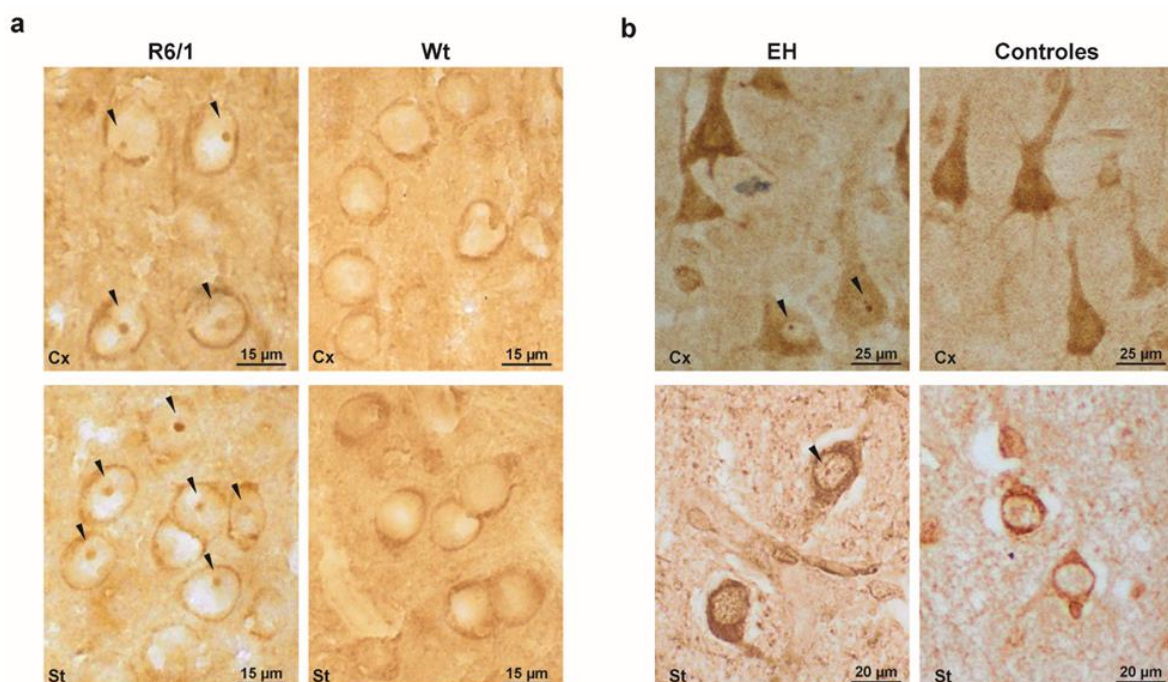
Los análisis estadísticos se realizaron usando SPSS 19.0 (SPSS® Statistic IBM®). Los datos se han representado como media  $\pm$  SEM. Para determinar la normalidad de los datos se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk. Para comprobar la existencia de diferencias significativas entre dos grupos ( $p < 0.05$ ), se utilizó prueba de la T de Student cuando los datos se distribuyen de forma normal (paramétricos) o la prueba de U de Mann-Whitney cuando los datos no se distribuyen de manera normal (no paramétricos). Para comparaciones entre más de dos grupos, los datos que se distribuyen normalmente se analizaron mediante la prueba de ANOVA seguida por las pruebas *post hoc* DMS cuando las varianzas fueron iguales, o la prueba *post hoc* Games-Howell cuando las varianzas no eran iguales. Para determinar si las varianzas eran iguales se utilizó el test de Levene. Para realizar comparaciones por pares en las variables no paramétricas se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis seguido de la prueba de U de Mann-Whitney. El nivel de significancia mínimo aceptado ha sido  $p < 0.05$ .

## **VI. RESULTADOS**

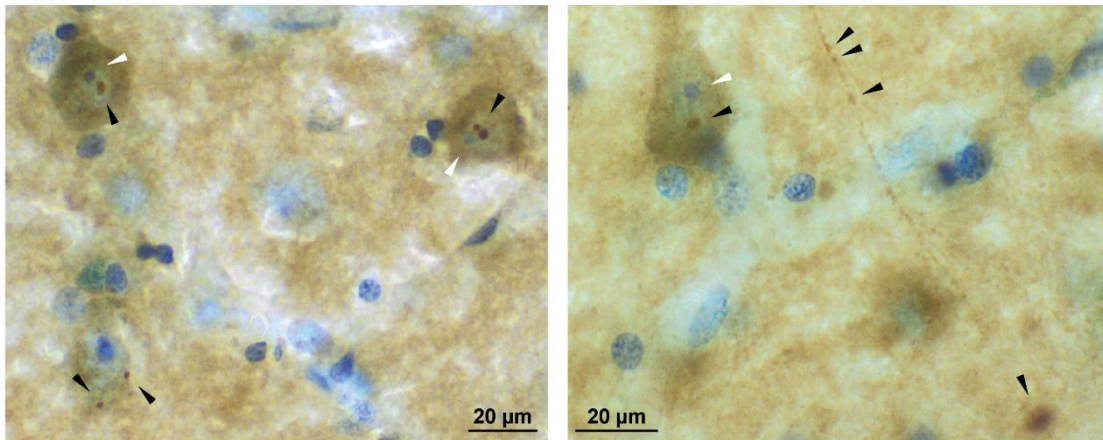
## 1. Análisis del patrón y los niveles de expresión de ATF5 en cerebro del modelo R6/1 y en pacientes de EH

### 1.1. ATF5 es secuestrado en las inclusiones neuronales de poliglutamina en ratones R6/1 y en tejido de pacientes

En primer lugar, se llevó a cabo un ensayo de inmunohistoquímica (IHQ) en secciones de cerebro de ratones de un modelo murino de EH y de sus respectivos controles. Concretamente, se empleó el ratón transgénico R6/1, ampliamente usado como modelo de EH. Se prestó especial atención a la corteza y al estriado, ya que son las estructuras principalmente afectadas en la EH. En estas secciones la principal observación fue una notable acumulación de inmunoreactividad de ATF5 en inclusiones neuronales intranucleares (INI) tanto en corteza como en estriado de R6/1, y obviamente no así en los ratones control (Fig. 6a). Estas acumulaciones de ATF5 se observaron desde los 3,5 meses de edad, cuando el modelo se encuentra en un estadio de inicio de los síntomas. Posteriormente se realizó IHQ en secciones de tejido de pacientes y controles. Esto demostró, por primera vez, la expresión de ATF5 en neuronas humanas adultas, tal y como habíamos descrito previamente en ratón (Torres-Peraza et al., 2013). Así mismo, la tinción mostró la existencia de agregados intranucleares que recordaban a las características inclusiones nucleares de mHTT propias de la EH (Fig. 6b). Curiosamente, además de estas inclusiones nucleares, también se observaron inclusiones citoplasmáticas en el soma y las neuritas, e inclusiones en el neuropilo (Fig. 6c). Estos datos sugieren que ATF5 es secuestrado por las inclusiones de poliQ expandida.



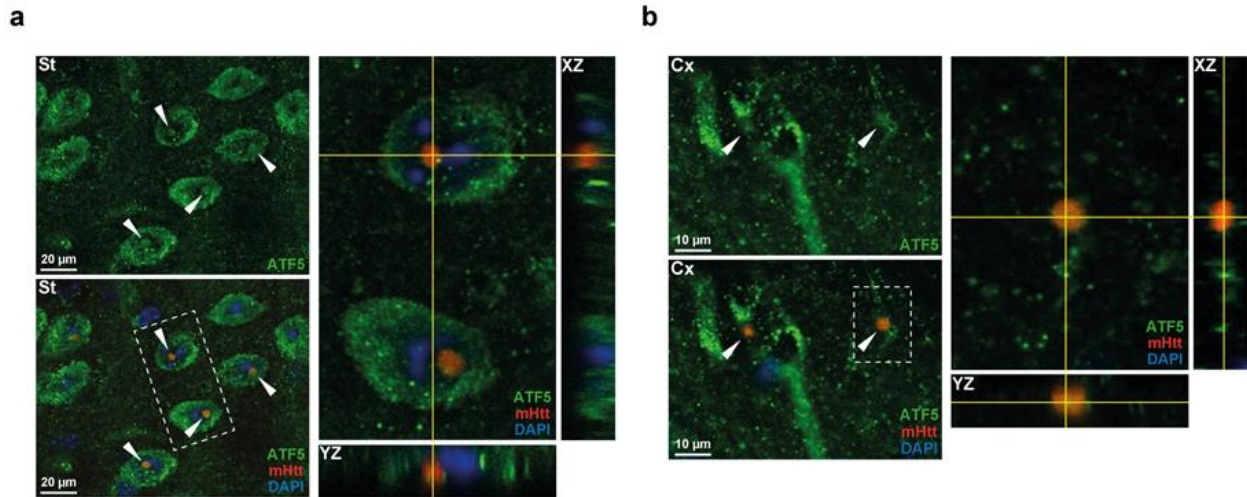
c



**Figura 6.** ATF5 se expresa en neuronas humanas adultas y se acumula en las características inclusiones nucleares de la EH en pacientes y ratones R6/1. **a)** Inmunohistoquímica con anticuerpo de ATF5 en corteza (Cx; arriba) y estriado (St; abajo) de ratones R6/1 de 3,5 meses de edad y ratones silvestres (Wt). Las puntas de flecha negra en los paneles de R6/1 (izquierda) indican acumulación de ATF5 en cuerpos de inclusión en Cx y St. **b)** Inmunohistoquímica con anticuerpo de ATF5 en Cx (arriba) y St (abajo) de tejido post mortem de pacientes de EH y controles. Las puntas de flecha negra en los paneles de EH (izquierda) indican acumulación de ATF5 en cuerpos de inclusión en Cx y St. **c)** Inmunohistoquímica de ATF5 y contratinción nuclear con Sudan Black en Cx de tejido post mortem de pacientes de EH. Las puntas de flecha negra indican que ATF5 puede encontrarse en inclusiones nucleares (ambos paneles), en inclusiones citoplasmáticas en el soma (panel izquierdo), en inclusiones neuríticas (panel derecho) y en inclusiones de neuropilo (panel derecho). Las puntas de flecha blancas apuntan a nucléolos para mostrar que no coinciden con las inclusiones intranucleares.

Para confirmar que ATF5 es, de hecho, secuestrado en las inclusiones neuronales de poliQ expandida, realizamos ensayos de doble inmunofluorescencia con anticuerpos de ATF5 y de la región N-terminal de la mHTT. Tal y como se muestra en la Figura 7, la señal positiva de ATF5 en las inclusiones colocaliza con las inclusiones de mHTT tanto en los R6/1 como en tejido humano de EH (Coeficiente de correlación de Pearson = 0,78).





**Figura 7. Las inclusiones nucleares de ATF5 colocalizan con las características inclusiones de poliQ en ratones de EH y tejido humano. Doble inmunofluorescencia con anticuerpos de ATF5 (verde) y HTT (rojo) en St de ratones R6/1 de 3,5 meses de edad (a) y Cx de pacientes de EH (b). Las puntas de flecha blancas indican inclusiones intranucleares positivas para ATF5. Las imágenes ortogonales (paneles de la derecha en a y b) muestran la colocalización de las señales de ATF5 y mHTT proyectada en los ejes YZ y XZ. Los núcleos se contratiñeron con DAPI (azul).**

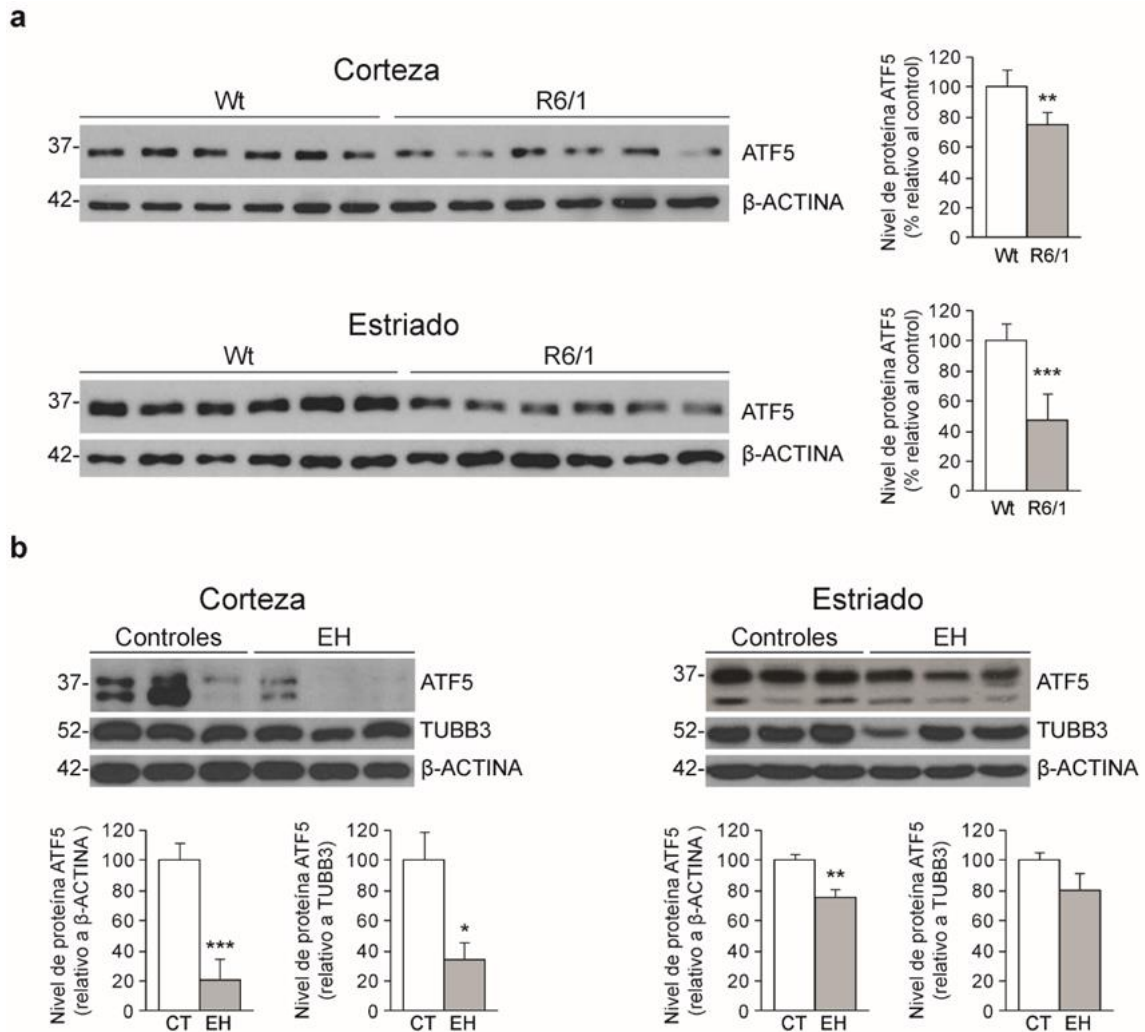
### 1.2. Los niveles de ATF5 disminuyen en corteza y estriado de ratones R6/1 y de pacientes de EH

Seguidamente, hicimos análisis de *Western blot* (WB) para determinar si la acumulación de ATF5 en las inclusiones de mHTT correlacionaba con una bajada en los niveles de la proteína ATF5 monomérica soluble. El análisis de la cantidad de proteína en los primeros estadios de la enfermedad (3,5 meses), en los que apenas existe atrofia estriatal o pérdida neuronal, reveló una reducción del 40,5% en los niveles de ATF5 en el estriado de los ratones R6/1 respecto a los animales control ( $p = 0,0003$ ) (Fig. 8a). En la corteza del modelo R6/1 también observamos una bajada significativa, aunque menos pronunciada de los niveles de ATF5 (18,9%,  $p < 0,05$ ).

El análisis en tejido *post mortem* de pacientes de EH mostró una bajada significativa de los niveles de ATF5 en ambas estructuras (Cx y St) respecto a las muestras control. En este caso, la caída en los niveles en corteza fue más pronunciada (bajada del 78,5%,  $p = 0,0001$ ) que en estriado (bajada del 24,7%,  $p = 0,006$ ). Tomando en consideración el hecho de que el estriado de los pacientes de EH sufre una pérdida neuronal significativa en estadios avanzados, decidimos normalizar la bajada de ATF5 con el marcador neuronal beta-III-tubulina (TUBB3).



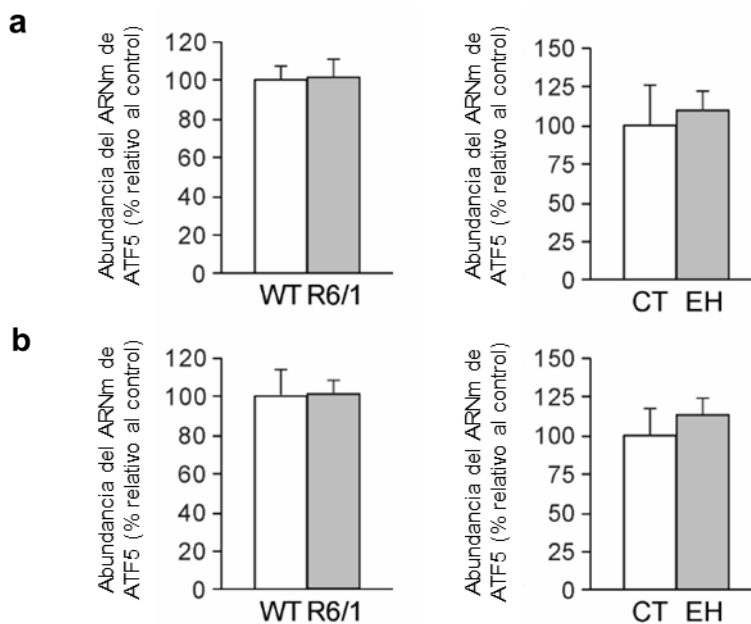
Al realizar esta corrección para la pérdida neuronal, la disminución de ATF5 seguía siendo significativa en corteza (66,2% de bajada,  $p = 0,04$ ), mientras que en estriado se quedaba en una marcada tendencia. Este dato sugiere que la bajada de ATF5 observada en estriado de pacientes se debe en parte a la reducción en contenido neuronal.



**Figura 8. Disminución de los niveles de ATF5 en estriado y corteza de ratones R6/1 y pacientes de EH. a)** Western blots representativos de los niveles de ATF5 en Cx y St de ratones R6/1 de 3,5 meses de edad ( $n=9$ ) y ratones Wt ( $n=9$ ). **b)** Western blots representativos de los niveles de ATF5 en Cx y St de pacientes de EH ( $n=9$ ) en comparación con los controles ( $n=9$ ). ATF5 es normalizado con  $\beta$ -ACTINA en todas las muestras, pero también con TUBB3 en las muestras humanas. Los histogramas muestran la cuantificación de la abundancia de ATF5 respecto al control (prueba de T de Student,  $*p<0,05$ ,  $**p<0,01$ ,  $***p<0,001$ ). Los datos representan la media  $\pm$  SEM.

### 1.3. Los niveles de ARNm de ATF5 no explican la bajada en los niveles de proteína observados

Para determinar si la bajada en los niveles de la proteína ATF5 se debe a una bajada en los niveles de su ARNm codificante, realizamos un análisis de los niveles de ARNm total de ATF5 por RT-PCR. Los datos indicaron que los niveles de ARNm permanecían invariables al comparar ratones R6/1 y pacientes de EH con sus respectivos controles (Fig. 9a-b). Este dato concuerda con la hipótesis de que la bajada en los niveles de proteína ATF5 se debe al secuestro en las inclusiones de poliQ expandida.

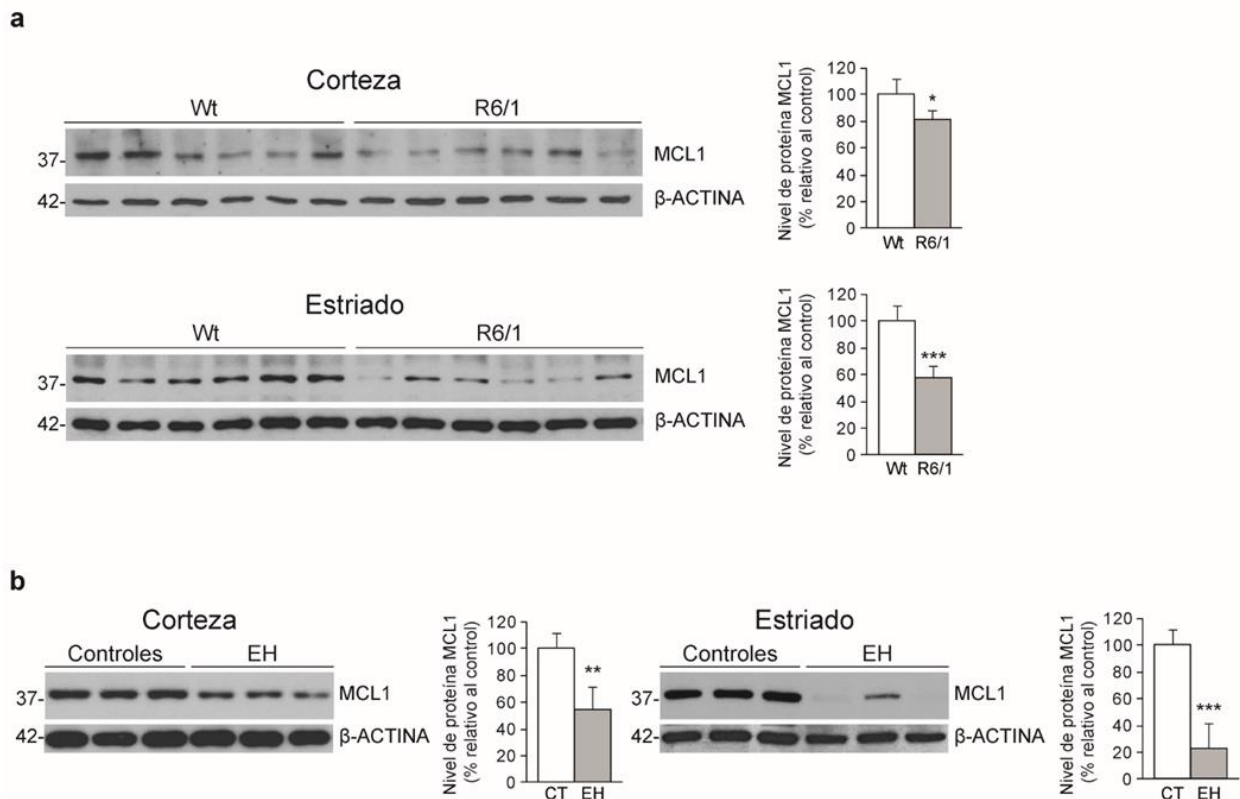


**Figura 9. Los niveles de ARNm de ATF5 no explica la bajada del nivel de proteína.** Histogramas que muestran la cuantificación de ARNm de *Atf5* en corteza (a) y estriado (b) de ratones R6/1 de 7 meses de edad con respecto a WT, y de pacientes de EH con respecto a los controles (CT). En ambas especies se observan niveles comparables de ARNm de *Atf5* que no reflejan las diferencias observadas a nivel de proteína. Los datos representan la media  $\pm$  SEM.

## 2. Análisis de los niveles de la diana transcripcional de ATF5, MCL1, en corteza y estriado de R6/1 y pacientes de EH

Posteriormente nos preguntamos si la disminución observada en los niveles de ATF5 correlacionaría con una bajada en su diana transcripcional MCL1, que se ha propuesto como un importante efector del papel antiapoptótico descrito para ATF5 (Izumi et al., 2012; Sheng et al., 2010). Para ello, analizamos por WB los niveles de proteína de MCL1 en R6/1 y tejido de pacientes.

Tal y como cabía esperar, se observó una marcada reducción en los niveles de MCL1 en estriado (53,1%,  $p < 0,0001$ ) y corteza (47,4%,  $p = 0,016$ ) de ratones R6/1 en estadios tempranos de la enfermedad (3,5 meses) con respecto a los animales control (Fig. 10). Resultados similares se obtuvieron en estriado (77,7%,  $p < 0,0001$ ) y corteza (55%,  $p = 0,002$ ) de pacientes de EH respecto a los controles (Fig. 10).



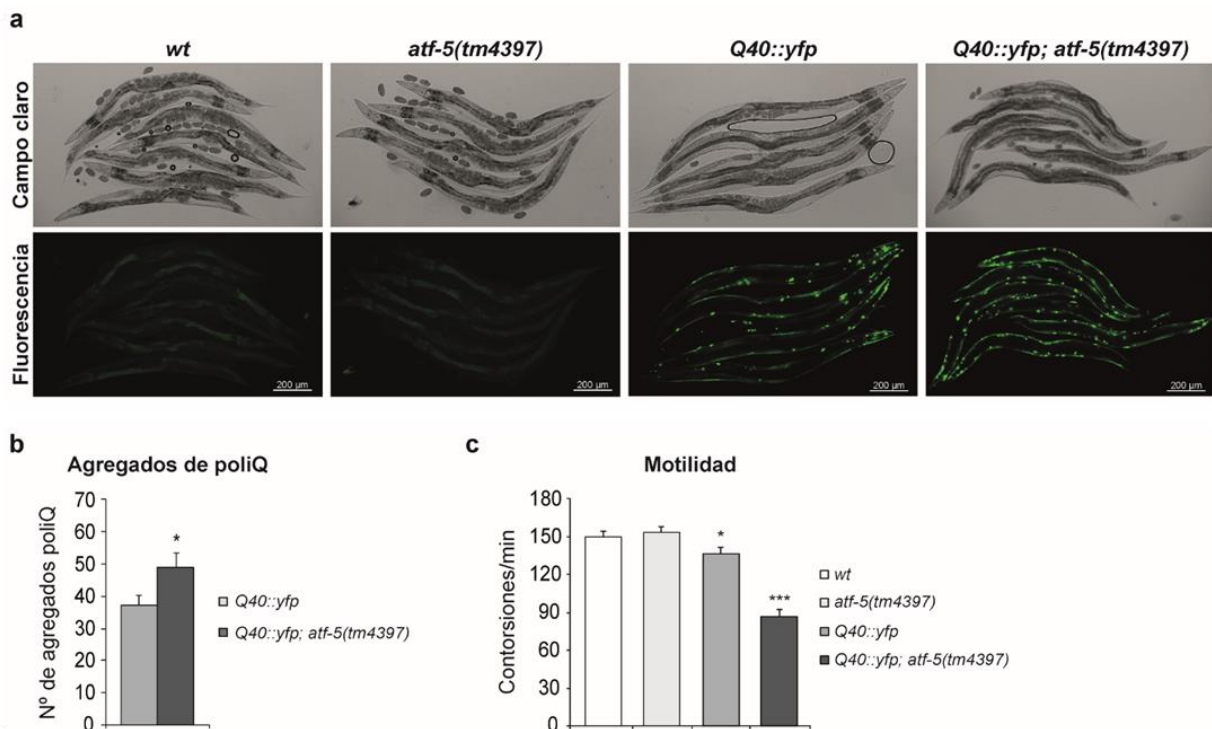
**Figura 10. Disminución de los niveles de MCL1 en estriado y corteza de R6/1 y tejido humano. a)** Western blots representativos de los niveles de MCL1 en Cx y St de ratones R6/1 de 3,5 meses de edad ( $n=7$ ) y ratones Wt ( $n=7$ ). **b)** Western blots representativos de los niveles de MCL1 en Cx y St de pacientes de EH ( $n=7$ ) en comparación con los controles ( $n=7$ ). Los histogramas muestran la cuantificación de la abundancia de MCL1 respecto al control (prueba de T de Student,  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$ ). Los datos representan la media  $\pm$  SEM.

### 3. Efecto deletéreo de la deficiencia de *atf-5* en un modelo de *C. elegans* de toxicidad de la poliglutamina expandida

Para profundizar en la cuestión del potencial efecto deletéreo de una deficiencia de ATF5 en un contexto *in vivo* de toxicidad inducida por poliQ, decidimos emplear cepas de *C. elegans* que expresan la proteína de fusión Q40::YFP en células musculares. En este caso la expresión de Q40::yfp es controlada por el promotor del gen *unc-54* que codifica la cadena

pesada de la miosina. La expresión de esta forma expandida del tracto de poliQ resulta en la formación de cuerpos agregados que aumentan en tamaño y complejidad con el tiempo y que resultan en una deficiencia motora (Morley et al., 2002).

Así pues, generamos la cepa que contenía el transgén *vzEx173 [Punc-54::Q40::yfp]* sobre un fondo *atf-5(tm4397)* mutante, deficiente en la expresión de ATF5. El análisis de esta cepa reveló que la carencia de *atf-5* provoca un aumento en el número de agregados de Q40::YFP (Fig 11a-b). Por sí sola, la mutación *atf-5(tm4397)* no causó efecto alguno; sin embargo, en combinación con el fondo *Q40::YFP* indujo una marcada disminución de la motilidad con respecto a los individuos *wt* (Fig. 11c). Esta disminución en la capacidad motora fue significativamente mayor que la inducida exclusivamente por la acumulación de Q40::YFP (Fig. 11c). Resultados similares fueron obtenidos con la cepa independiente *vzEx175[Punc-54::Q40::YFP]* (resultados no mostrados). Estas evidencias indican que la disminución en los niveles de ATF5 exagera la toxicidad de la poliQ expandida *in vivo*.

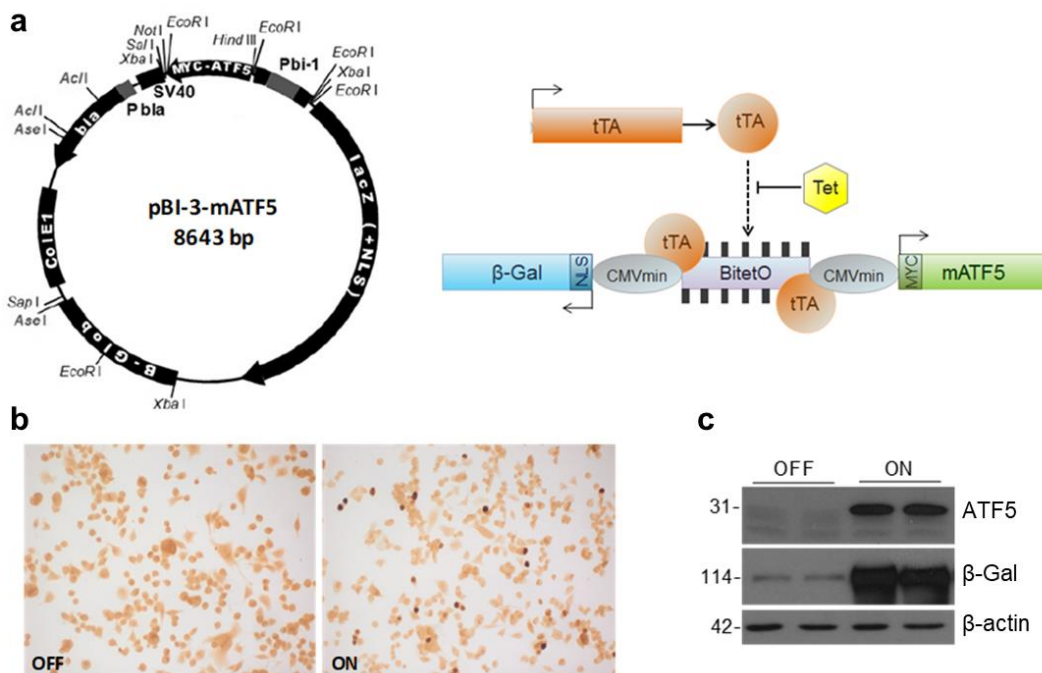


**Figura 11. La deficiencia de *atf-5* en un modelo de *C. elegans* tiene un efecto deletéreo en la motilidad. a)** Imágenes representativas de campo claro y fluorescencia de la cepa silvestre *wt* y de las cepas modificadas *atf-5(tm4397)*, *Q40::yfp* y *Q40::yfp; atf-5(tm4397)*. **b)** Cuantificación mediante imágenes de inmunofluorescencia del número de agregados Q40::YFP en las cepas *Q40::yfp* y *Q40::yfp; atf-5(tm4397)* ( $n=20$ ; Prueba de la T de Student;  $*p<0,05$ ). **c)** Cuantificación del número de contorsiones corporales por minuto en las cepas *wt*, *atf-5(tm4397)*, *Q40::yfp* y *Q40::yfp; atf-5(tm4397)* ( $n=20$ ). Análisis de la varianza (ANOVA), seguido de diferencia significativa mínima o Games-Howell,  $*p<0,05$ ,  $***p<0,001$ . Los datos representan la media  $\pm$  SEM.

## 4. Ratones de sobreexpresión condicional de ATF5 en cerebro anterior

### 4.1. Generación y análisis del plásmido de sobreexpresión de ATF5

La bajada en los niveles de ATF5 y de su diana antiapoptótica MCL1, en combinación con el efecto deletéreo de la deficiencia de *atf-5* en cepas de *C. elegans* que expresan poliQ expandida, sugiere que un aumento de los niveles de ATF5 podría resultar beneficioso posiblemente mediante una atenuación de la muerte celular que induce la poliQ. Así pues, con objeto de evaluar esta hipótesis, decidimos generar un ratón transgénico de sobreexpresión condicional de ATF5 en neuronas de cerebro anterior. Para ello, clonamos la secuencia mATF5 en el plásmido pBI-3 empleando las dianas PstI/NotI. El plásmido resultante, pBI-3-mATF5 porta un promotor mínimo transactivable y bidireccional que dirige la expresión simultánea de ATF5 y del gen reportero *LacZ*, que se traduce en  $\beta$ -Galactosidasa ( $\beta$ -Gal). Este promotor es transactivado por tTA, lo que se puede inhibir por tetraciclina (Fig. 12a). Para verificar el correcto funcionamiento del plásmido se llevaron a cabo transfecciones en la línea de neuroblastoma murino N2a-tTA, que expresa constitutivamente el transactivador tTA. Los resultados mostraron acumulación de la proteína transgénica ATF5 y de  $\beta$ -Gal (Fig. 12b-c).

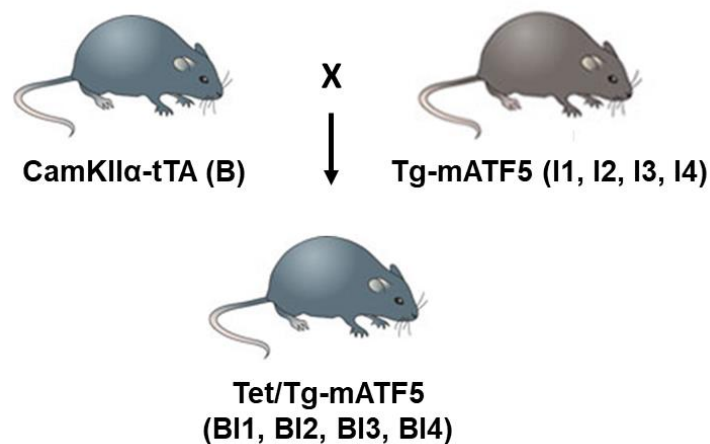


**Figura 12.** El plásmido pBI-3-mATF5 dirige la sobreexpresión de ATF5 correctamente al transfectarlo en la línea celular N2a-tTA. **a)** Representación esquemática del vector pBI-3-mATF5 (izquierda) y del sistema Tet-OFF de expresión regulada por tetraciclina (Tet) (derecha). **b)** Imágenes representativas de inmunocitoquímica de ATF5 en células N2a-tTA transfectadas con pBI-3-mATF5 y tratadas con tetraciclina (OFF) o con vehículo (ON). **c)** Western blot representativo que muestra los niveles de ATF5 y  $\beta$ -Gal en células N2a-tTA transfectadas con pBI-3-mATF5 OFF u ON (n=2).

#### 4.2. Generación de ratones transgénicos de ATF5

Posteriormente el plásmido se digirió con las enzimas AseI/SapI para eliminar secuencias procariontas innecesarias y el fragmento restante se microinyectó en embriones de ratones CBAXC57BL/6J en estado de dos pronúcleos. Se obtuvieron cuatro fundadores portadores del transgén, que denominamos como I1, I2, I3 e I4. Los fundadores transmitieron los genes recombinantes a la descendencia en proporciones mendelianas. No se observó letalidad perinatal en ninguna de las líneas.

Por sí solos estos ratones no expresan las proteínas recombinantes. Para obtener ratones de sobreexpresión de ATF5 en neuronas de cerebro anterior cruzamos cada una de las cuatro líneas con ratones de la línea CamKII $\alpha$ -tTA, que llamaremos B. Estos ratones expresan el transactivador tTA en neuronas de cerebro anterior. La descendencia de estos cruces presentó un patrón mendeliano. No se observó ningún defecto aparente en el desarrollo de los ratones dobles transgénicos, que denominamos BI1-BI4 (Fig. 13).



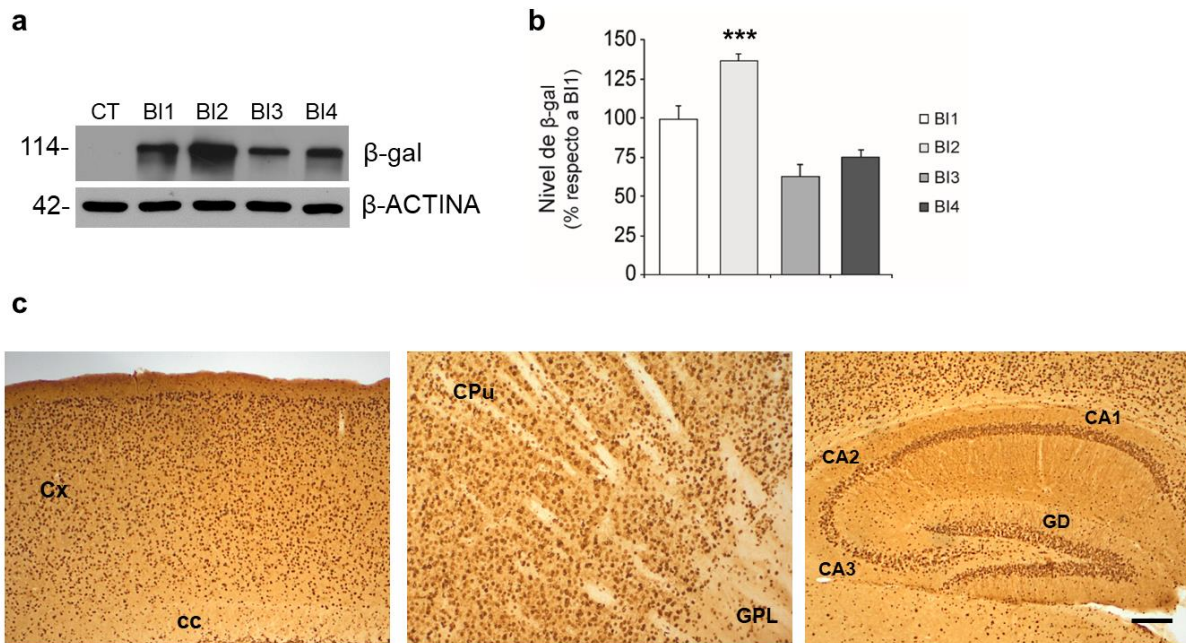
**Figura 13. Generación del ratón condicional Tet/Tg-mATF5.** Esquema del cruce realizado con cada una de las cuatro líneas fundadoras Tg-mATF5 (ratones I1, I2, I3 e I4) con ratones que expresan tTA bajo el promotor de la CamKII $\alpha$  (ratones B) resultando en las líneas dobles transgénicas BI1-BI4.

#### 4.3. Caracterización de la transactivación en ratones dobles transgénicos

Posteriormente, hicimos análisis de WB y IHQ para comprobar el nivel y patrones de expresión del reportero  $\beta$ -Gal y así seleccionar la línea con mejor grado de transactivación. Comparativamente, la línea BI2 mostró el grado más elevado de transactivación al analizar por WB un *pool* de lisados de proteínas totales en las estructuras del cerebro anterior más relevantes en nuestro caso de estudio: corteza cerebral, estriado e hipocampo (Fig. 14a-b).

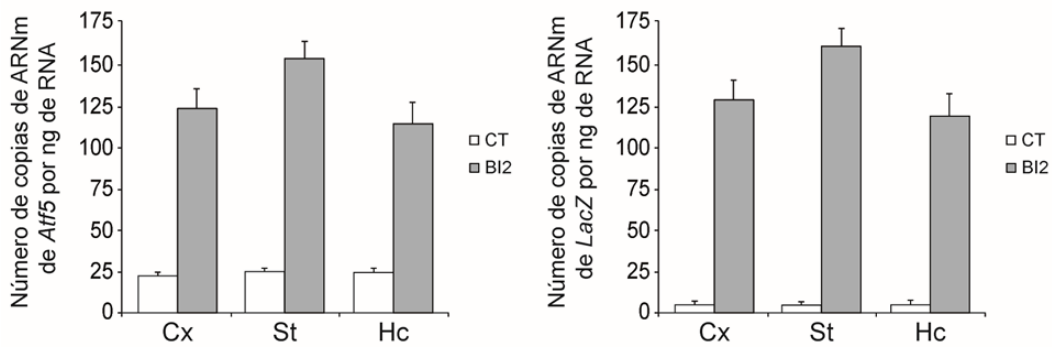


El patrón observado en la IHQ fue muy similar al observado en líneas transgénicas previamente generadas en el laboratorio (Fernandez-Nogales et al., 2015) (Fig. 14c), que corresponde con el patrón de expresión de CamKII $\alpha$  (Wang et al., 2013). Así pues, la línea BI2 fue seleccionada para análisis ulteriores.



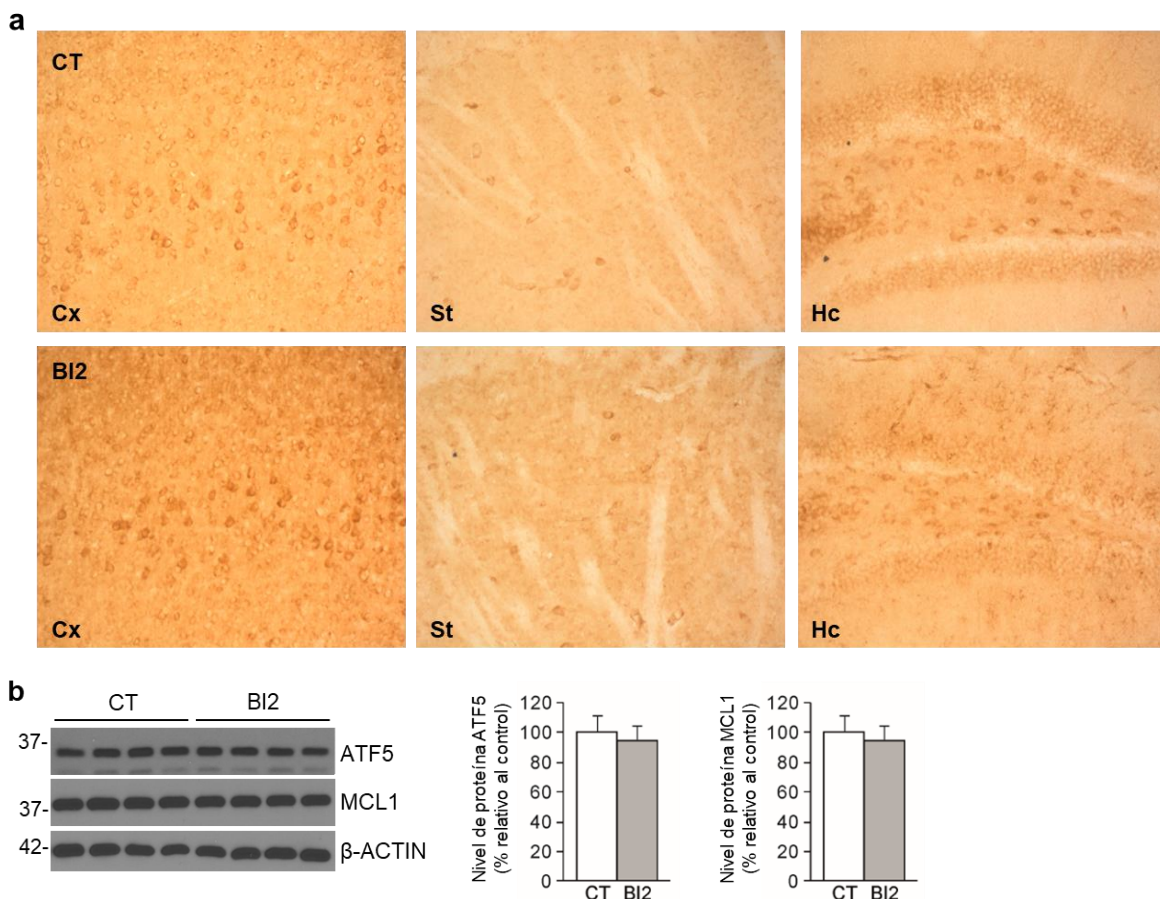
**Figura 14. La línea BI2 presenta el nivel más elevado de transactivación. a)** Western blot representativo de los niveles de  $\beta$ -Gal en cerebro anterior de las líneas transgénicas BI1, BI2, BI3 y BI4. **b)** Cuantificación del nivel de  $\beta$ -Gal en cerebro anterior de las líneas BI1, BI2, BI3 y BI4. Los datos representan la media  $\pm$  SEM (n=3). **c)** Imágenes representativas de inmunohistoquímica de  $\beta$ -Gal que muestran una distribución homogénea en corteza (Cx), cuerpo calloso (cc), caudado-putamen (Cpu), globo pálido lateral (GPL) regiones CA1, CA2 y CA3 de hipocampo, y giro dentado (GD). La barra de escala representa 200  $\mu$ m.

A continuación, decidimos hacer un análisis de RT-PCR para verificar la expresión del ARNm de ATF5 en las tres estructuras más relevantes para nuestra investigación: la corteza, el estriado y el hipocampo. Encontramos un incremento significativo de la cantidad total con respecto a los controles en las tres estructuras que es comparable a otros modelos transgénicos previamente generados por nuestro grupo (Fernandez-Nogales et al., 2015; Parras et al., 2018). La expresión del reportero *LacZ* se detectó en los animales BI2, y muy ligeramente en los controles, lo que atribuimos a la unión inespecífica de los oligos (Fig. 15). Estos datos indican una expresión simétrica y abundante de ambos transgenes en las diferentes estructuras, lo que nos permite concluir que existe una correcta operatividad de la construcción *in vivo*.

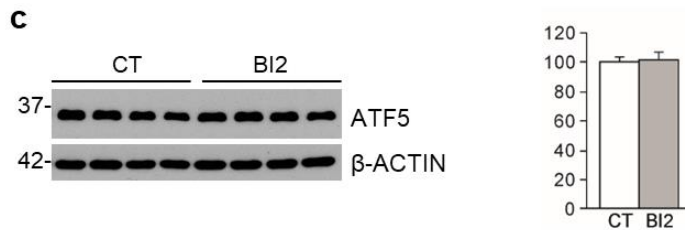


**Figura 15. RT-PCR de *Atf5* y *LacZ* en estructuras cerebrales de ratones transgénicos BI2.** Niveles de expresión de *Atf5* total (endógeno y transgénico) y de *LacZ* en corteza (Cx), estriado (St) e hipocampo (Hc) de BI2 (n=6) con respecto a los controles (n=6). Los datos representan la media  $\pm$  SEM.

Paradójicamente, no encontramos el correspondiente aumento de la proteína ATF5, ni de su diana MCL1, en de las estructuras analizadas en los ratones BI2 de 1,5 meses de edad (Fig 16a-b). Ante este resultado postulamos en primer lugar, un posible artefacto a nivel del neurodesarrollo. Teniendo en cuenta que los progenitores neurales son más permisivos para la expresión de ATF5 y que luego ésta debe disminuir para permitir la diferenciación, pensamos que los progenitores que expresaban Tg-ATF5 podían haber resultado inviables en el proceso de maduración. Por ello decidimos analizar la transactivación en estado embrionario (E18). Sin embargo, tampoco pudimos observar acumulación de la proteína en este estadio (Fig. 16c).

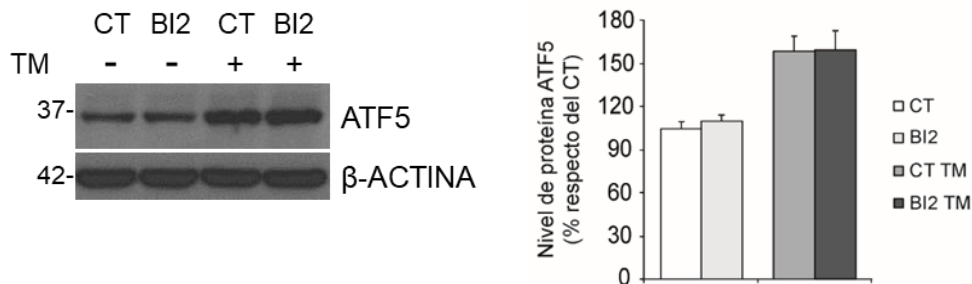






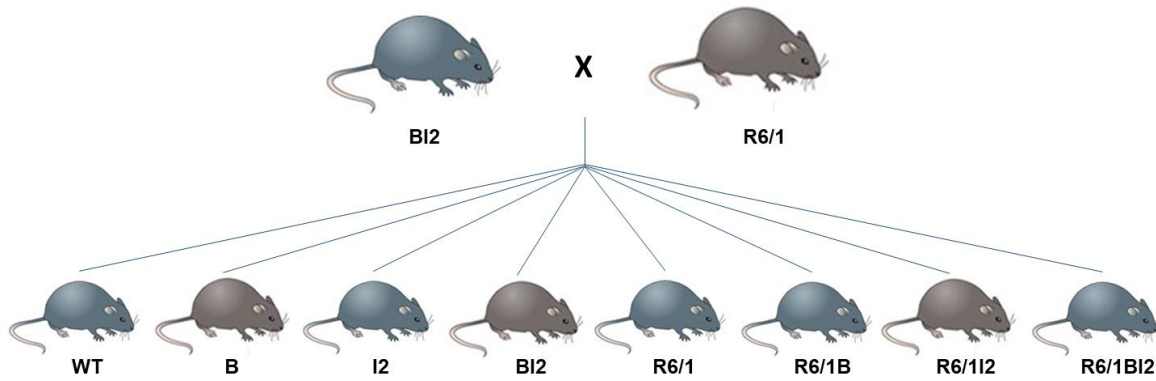
**Figura 16. La proteína ATF5 no se acumula en los ratones transgénicos BI2.** *a)* Imágenes de inmunohistoquímica de ATF5 en Corteza (Cx), estriado (St) e hipocampo (Hc) de animales control (CT) y BI2. *b)* Western blot representativo y cuantificación de niveles de expresión de ATF5 y MCL1 en un pool de lisados obtenidos de corteza, estriado e hipocampo de ratones BI2 con respecto a los CT, de 1,5 meses de edad (n=6). *c)* Western blot representativo y cuantificación de ATF5 en cerebro anterior de controles y BI2 en estado embrionario E18 (n=6). Los datos representan la media  $\pm$  SEM.

Esto nos llevó a pensar que quizá serían necesarias determinadas condiciones de estrés celular, como el ERE, para permitir la acumulación de ATF5. Así, decidimos inducir ERE en modelos *in vitro* e *in vivo*. En primer lugar, obtuvimos cultivos primarios de neuronas de corteza de animales BI2 y los tratamos con un inductor clásico de ERE, la tunicamicina (Torres-Peraza et al., 2013). Se aplicó una concentración final de tunicamicina de 6  $\mu$ g/ml y se dejó actuar durante 16 horas. El análisis de los niveles de ATF5 mediante WB reveló un incremento debido a la tunicamicina de igual magnitud entre las muestras control y BI2 (Fig. 17).



**Figura 17. La tunicamicina induce niveles comparables de ATF5 en ratones control y BI2.** Western blot representativo y cuantificación de niveles de ATF5 en cultivo primario de neuronas de animales control (CT) y transgénicos (BI2) tratadas con tunicamicina 6  $\mu$ g/ml (TM +) o con vehículo (TM -) (n=3). Los datos representan la media  $\pm$  SEM.

En segundo lugar, decidimos cruzar el ratón BI2 con los ratones R6/1 (Fig. 18), un modelo en el que se ha descrito una activación parcial de la UPR (Fernandez-Fernandez et al., 2011). Esta estrategia nos permitió abordar, al mismo tiempo, nuestro objetivo principal de analizar los efectos de un posible restablecimiento de ATF5 en la EH.

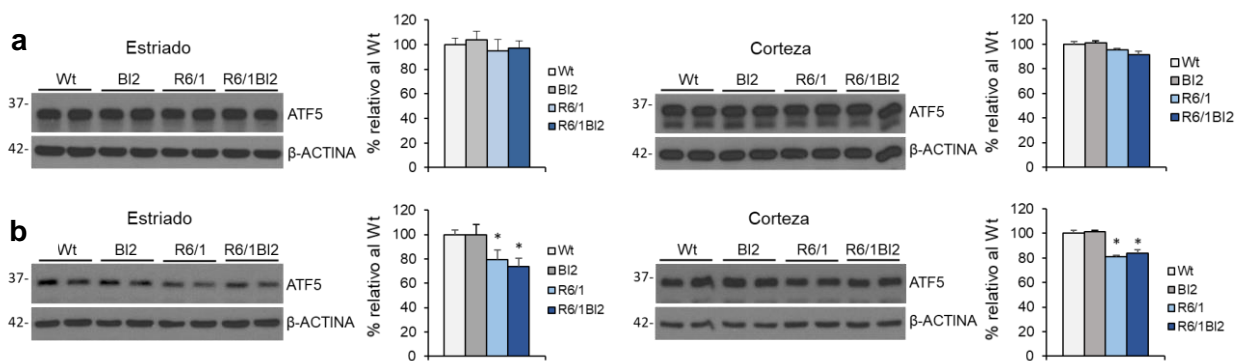


**Figura 18.** Esquema de los genotipos resultantes del cruce de ratones BI2 y R6/1. Al cruzar el ratón doble transgénico BI2 con el ratón R6/1 se esperan, a priori, los ocho genotipos resultantes en proporciones mendelianas.

## 5. Ratones triples transgénicos R6/1BI2

### 5.1. Caracterización bioquímica de ratones R6/1BI2

Con el objetivo de analizar el efecto del restablecimiento de ATF5 en ratones modelo de la EH, cruzamos ratones R6/1 con BI2 y obtuvimos un patrón de herencia mendeliano. Llevamos a cabo análisis de IHQ (no mostrado) y WB, y observamos niveles comparables de ATF5 en los ratones R6/1BI2 y en los controles a 1,5 meses de edad (Fig. 19a). Esto nos indica que el ERE propio del modelo R6/1 no es suficiente para permitir la acumulación del Tg-ATF5. Tampoco se observó un restablecimiento de los niveles de ATF5 en R6/1BI2 a 3,5 meses de edad comparado con el R6/1 (Fig. 19b).



**Figura 19.** La proteína transgénica ATF5 no se acumula en los ratones R6/1BI2. Western blot representativos y cuantificaciones de niveles de ATF5 en corteza y estriado de animales silvestres (Wt), BI2, R6/1 y R6/1BI2 a 1,5 meses (a) y 3,5 meses (b) de edad (n=4). Los datos representan la media  $\pm$  SEM.

## 5.2. Caracterización fenotípica de ratones R6/1BI2

Ante la posibilidad de que los animales R6/1BI2 sobreexpresaran pequeñas cantidades de ATF5 no detectables por las técnicas empleadas, pero con posibles efectos funcionales, decidimos analizar distintas funciones controladas por el SNC mediante ensayos de comportamiento a diferentes edades. Estas funciones están directamente relacionadas con las estructuras afectadas en el modelo de EH, R6/1, que también degeneran en los pacientes. Concretamente se analizó la función motora (mediante test de Rotarod, campo abierto y fuerza de agarre) y la memoria condicionada (prueba contextual *Fear conditioning*). También se analizó la evolución del peso corporal hasta la muerte cada dos semanas. Finalmente se estudió la supervivencia acumulada por grupos de animales.

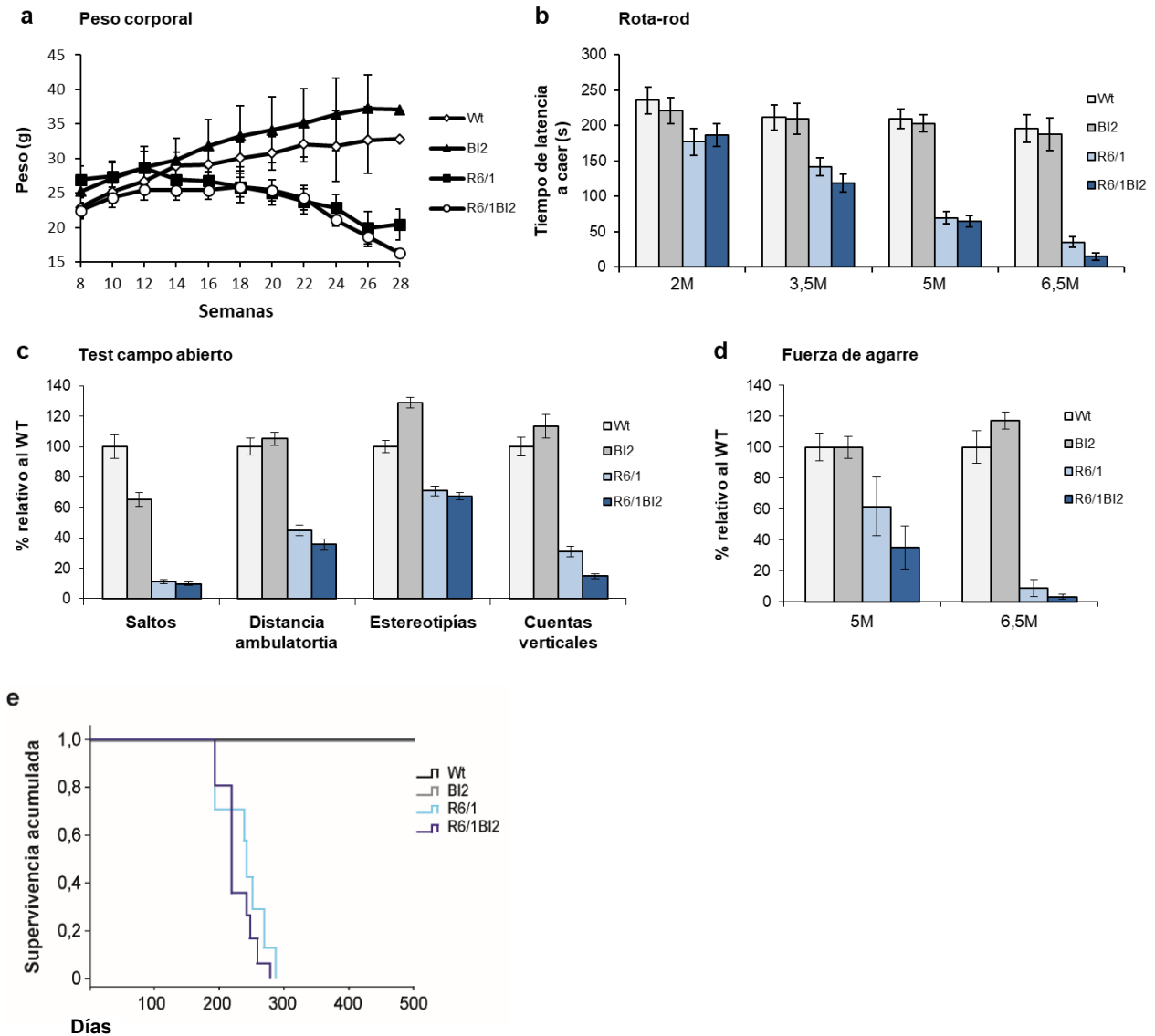
En primer lugar, el análisis de la coordinación motora mediante el test de Rotarod demostró una degeneración gradual en los ratones R6/1BI2 similar, o incluso más acentuada, a la observada en los R6/1. Por su parte, los ratones transgénicos BI2 ejecutaron esta prueba de forma comparable al Wt (Fig 20b). Los resultados indicaron que la edad de 3,5 meses podría ser la ventana temporal más interesante para observar diferencias significativas entre los ratones triples transgénicos R6/1BI2 y los R6/1, ya que se encuentran en un estadio de inicio de los síntomas en el que la degeneración es evidente pero no excesiva. Por ello se muestran los resultados del test de campo abierto a 3,5 meses de edad de los ratones.

Los parámetros analizados en el test de campo abierto no mostraron diferencias significativas entre los ratones triples transgénicos R6/1BI2 y los ratones R6/1 (Fig. 20c). Al igual que los ratones R6/1, los triples transgénicos mostraron un alto grado de hipoactividad con respecto a los Wt y los ratones BI2. Se observaron menos saltos en los ratones BI2 con respecto a los Wt, fenotipo que se compensó con el mayor número de estereotipias.

El test de fuerza de agarre se analizó a los 5 y 6,5 meses de edad en base a resultados previos del laboratorio. No se observó mejora del fenotipo en los ratones R6/1BI2 con respecto a los R6/1. Los dos grupos control Wt y BI2 tampoco mostraron diferencias (Fig. 20d).

El análisis del peso corporal reveló una evolución muy similar entre ratones R6/1BI2 y R6/1 por un lado, y entre Wt y BI2 por otro (Fig. 20a). La supervivencia acumulada de los grupos R6/1BI2 y R6/1 no mostró diferencias, al igual que entre Wt y BI2 (Fig. 20e).

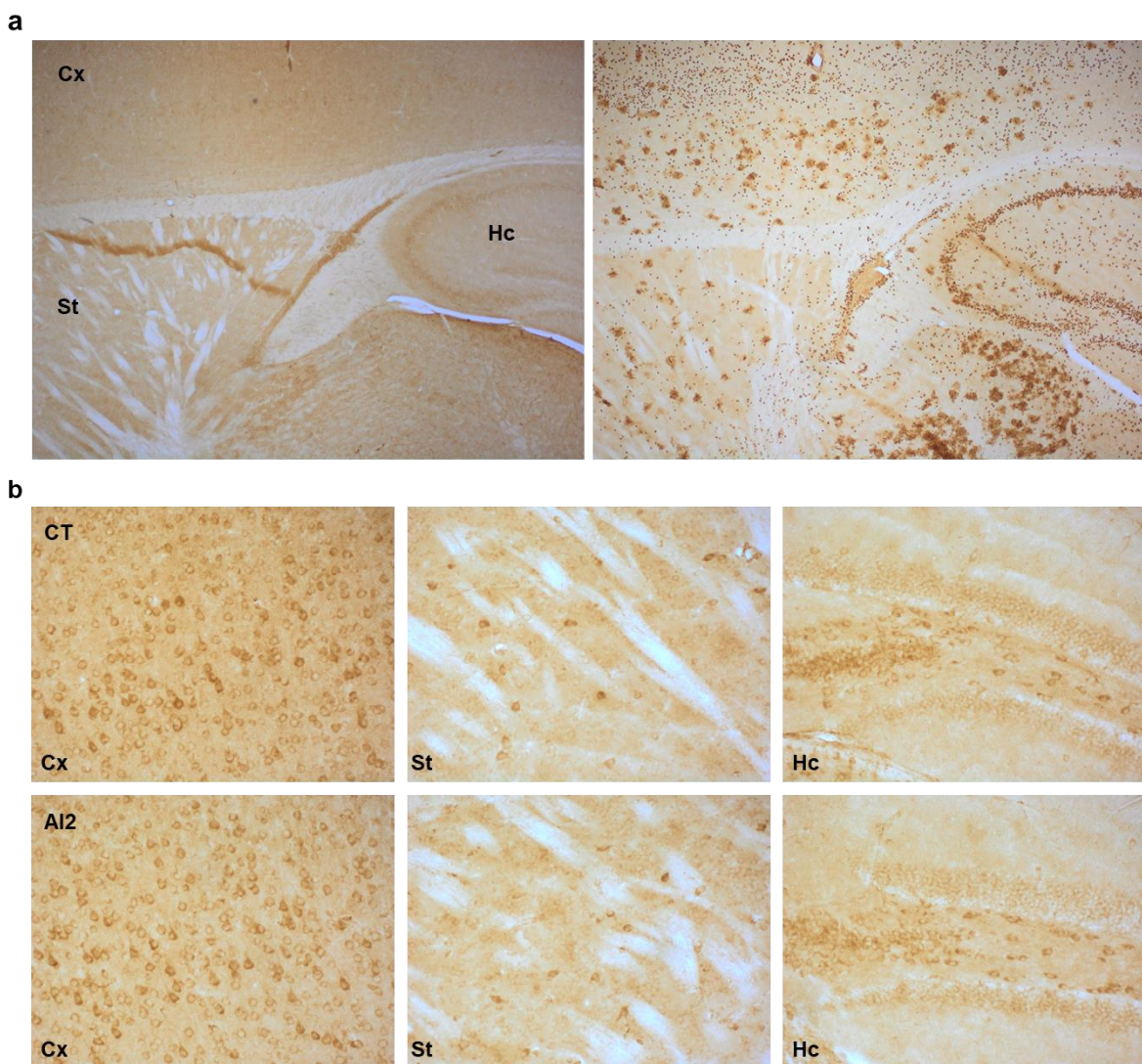
Estos datos indican que la manipulación genética llevada a cabo en los ratones BI2 no conlleva un efecto evidente en el fenotipo en comparación con ratones Wt. Tampoco supone una mejora del fenotipo característico de los ratones R6/1 al compararlos con los R6/1BI2.



**Figura 20. Caracterización fenotípica de los ratones transgénicos R6/1BI2.** **a)** Gráfico que muestra la evolución del peso corporal en gramos por semanas. **b)** Gráfico que muestra el tiempo de latencia desde el inicio de la prueba de Rotarod hasta que el animal cae del rodillo. Los resultados representan la media de tiempo de latencia de 8 individuos de cada grupo experimental (Wt, BI2, R6/1 y R6/1BI2) a 2, 3.5, 5 y 6.5 meses de edad. **c)** Resultados obtenidos en el test de campo abierto. Se midieron cuatro parámetros: saltos, distancia ambulatoria, estereotipias y cuentas verticales. Las barras representan las medidas en porcentaje con respecto al genotipo Wt (n=8). **d)** Test de fuerza de agarre realizado sobre los grupos Wt, BI2, R6/1 y R6/1BI2 a 5 y 6.5 meses de edad. Las barras representan la fuerza máxima ejercida en porcentaje respecto al grupo Wt (n=8). **e)** Representación de la supervivencia acumulada, medida en días, de los genotipos Wt, BI2, R6/1 y R6/1BI2 (n=8). En todos los casos los datos representan la media  $\pm$  SEM.

## 6. Ratones de sobreexpresión condicional de ATF5 en astrocitos

Trabajos previos han descrito el papel que juega ATF5 en la reactivación glial (Angelastro et al., 2006) y en vista de los datos anteriores decidimos evaluar si existía acumulación de la proteína dirigiendo la expresión del transgén específicamente a los astrocitos, que quizá provean un entorno más permisivo para la expresión de ATF5. Para ello cruzamos los ratones I2 con ratones de expresión condicional del transactivador tTA bajo el promotor de la GFAP. Denominamos a los dobles transgénicos resultantes AI2. De manera análoga a los BI2, evaluamos la expresión del reportero  $\beta$ -Gal (Fig. 21a) y de ATF5 (Fig. 21b). Los resultados indicaron niveles comparables de ATF5 entre AI2 y controles (Fig. 21b).



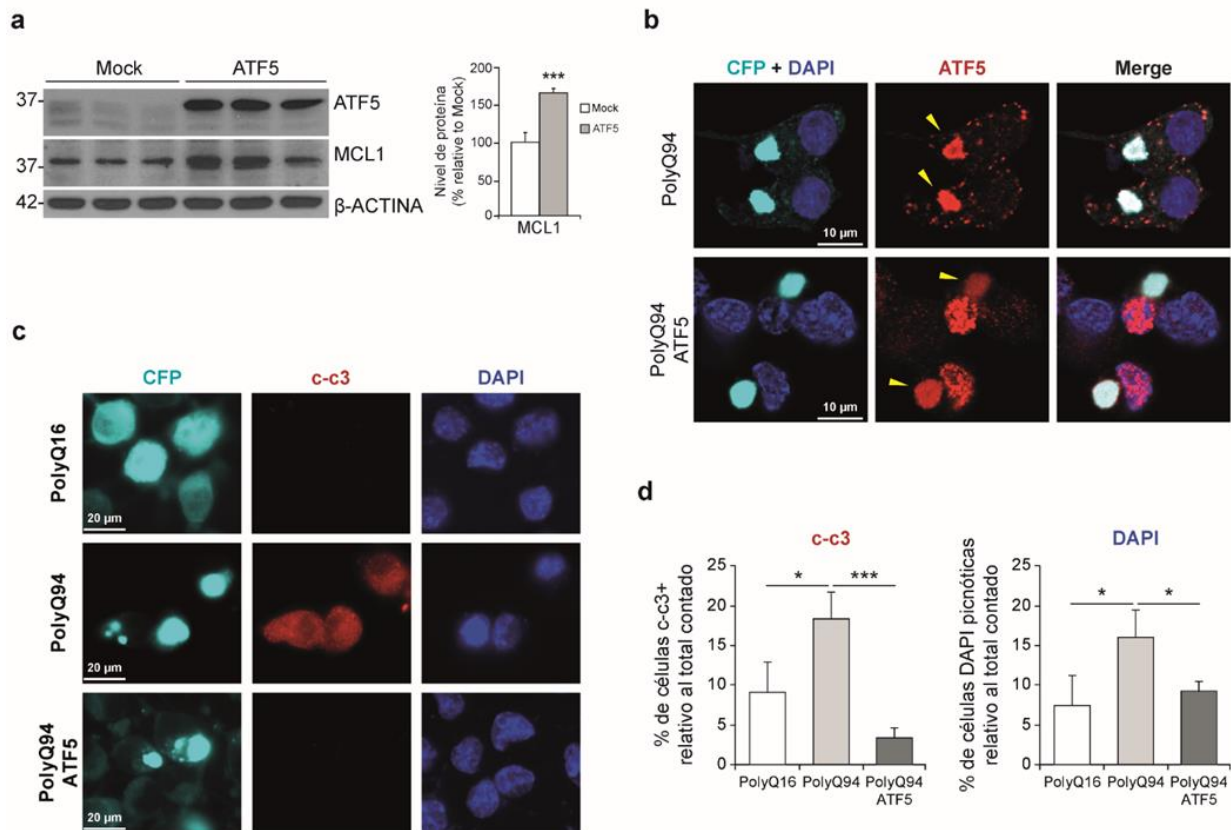
**Figura 21. Los ratones AI2 de expresión condicional en astrocitos no acumulan la proteína ATF5. a)** Imágenes de secciones sagitales de IHQ utilizando anticuerpo contra  $\beta$ -Gal en animales control (izquierda) y AI2 (derecha) de 3,5 meses de edad. Los campos muestran corteza (Cx), estriado (St) e hipocampo (Hc). **b)** IHQ de ATF5 en Cx, St y Hc de animales control (CT) y AI2 de 3,5 meses de edad.

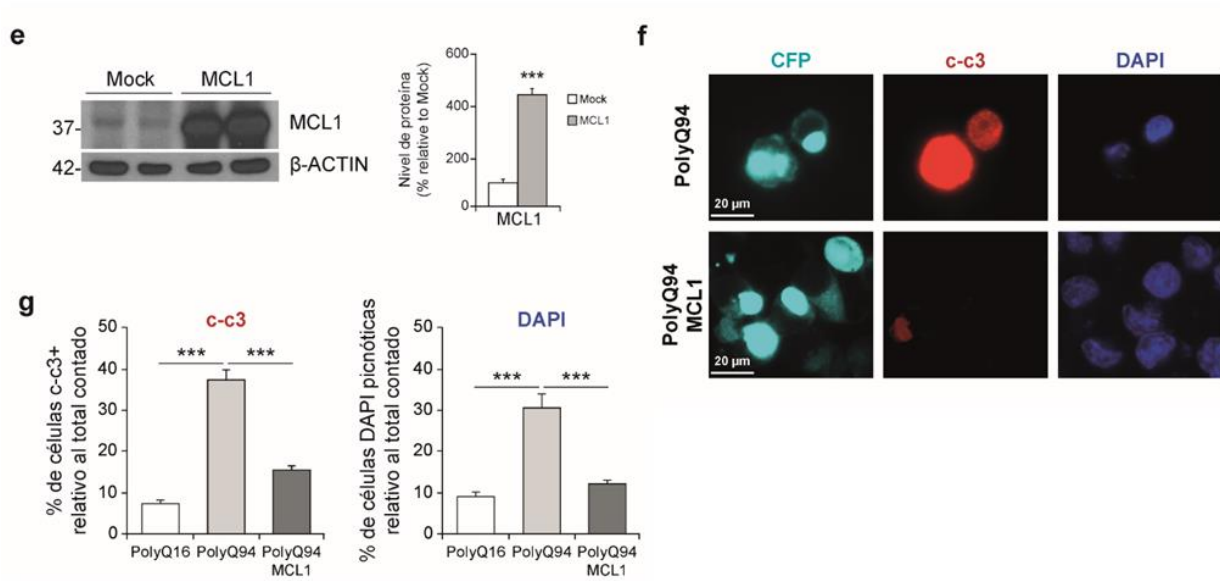


## 7. ATF5 protege frente a la apoptosis inducida por la poliglutamina expandida en un modelo celular de EH

Al no poder testar *in vivo* la hipótesis según la cual un incremento de ATF5 sería beneficioso en la EH, decidimos emplear un modelo celular de toxicidad de poliQ expandida para tratar de responder a esta pregunta. En primer lugar, verificamos que la transfección de mHTT, fusionada a la proteína reportera fluorescente CFP (PolyQ94), resultaba en la formación de inclusiones intranucleares, mientras que la parte N-terminal de la HTT fusionada a CFP (Q16-CFP) no forma estos agregados (Fig. 22c).

Adicionalmente, la forma PolyQ94 indujo un aumento significativo de la apoptosis detectable tanto por inmunofluorescencia de caspasa 3 activa como por morfología nuclear con DAPI (Fig. 22c). La transfección de ATF5, por su parte, indujo un incremento de la proteína MCL1 (Fig. 22a). Al co-transfectar ATF5 y PoliQ94 aumentaron los niveles de ATF5 difuso a pesar de también acumularse en las inclusiones (Fig. 22b). Al mismo tiempo, pudimos observar una disminución significativa de la apoptosis en las células PoliQ94+ATF5 en comparación con las PolyQ94 que se sitúa en los niveles observados en las células PoliQ16 (Fig. 22d). Estos datos demuestran un efecto neuroprotector de la sobreexpresión de ATF5 frente a la muerte celular inducida por poliQ expandida.





**Figura 22. ATF5 protege frente a la apoptosis inducida por poliQ en un modelo celular de EH. a)** Western blot de niveles de ATF5 y MCL1 en células de neuroblastoma N2a transfectadas con pcDNA3-mATF5. A la derecha se representa el histograma que muestra la cuantificación del aumento de MCL1 en células N2a transfectadas con respecto al control (Mock) ( $n=6$ ; Prueba de T de Student). **b)** Imágenes de inmunofluorescencia donde se muestra el patrón de distribución de ATF5 en células N2a transfectadas sólo con la forma tóxica PolyQ94-CFP (PolyQ94) o en combinación con ATF5 (PolyQ94+ATF5). En ambas condiciones se observa acumulación de ATF5 en inclusiones de poliQ (puntas de flecha amarillas). La sobreexpresión de ATF5 induce un incremento de la señal difusa en el núcleo. **c)** Imágenes de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo frente a caspasa 3 activa (c-c3, rojo), DAPI (azul) y CFP (cian) que muestra una inducción de apoptosis medida por c-c3 en células N2a transfectadas con PolyQ16, PolyQ94 o PolyQ94+ATF5. **d)** Cuantificación de la apoptosis, medido como porcentaje de células c-c3 positivas o con núcleo apoptótico por DAPI, en N2a PolyQ16, PolyQ94 y PolyQ94+ATF5 con respecto al total de células ( $n=300$ ). Análisis de la varianza (ANOVA), seguido de diferencia significativa mínima o Games-Howell. **e)** Western blot representativo de los niveles de MCL1 en células N2a transfectadas con el plásmido p3XFlag-CMV10-Flag-mMcl-1 (MCL1). El histograma muestra la cuantificación de MCL1 en células transfectadas con respecto al control (Mock) ( $n=2$ ; Prueba de la T de Student). **f)** Imágenes de inmunofluorescencia de células N2a transfectadas con PolyQ16, PolyQ94 o PolyQ94+MCL1 teñidas con anticuerpos contra caspasa 3 (c-c3) y DAPI que muestran una inducción de la apoptosis cuantificada por c-c3. **g)** Cuantificación de la apoptosis por medición de porcentaje de células c-c3 positivas y porcentaje de células con núcleo apoptótico por DAPI en N2a transfectadas con PolyQ16, PolyQ94 o PolyQ94+MCL1 con respecto al total de células ( $n=700$ ). Análisis of variance (ANOVA), seguido de diferencia significativa mínima o Games-Howell. Los datos representan la media  $\pm$  SEM.

Posteriormente quisimos comprobar el efecto de la transfección directa de MCL1 sobre la toxicidad de la PolyQ94. De forma similar a lo ocurrido con ATF5, la sobreexpresión de MCL1 resultó en una disminución de la apoptosis inducida por PolyQ94, hasta niveles comparables a los observados en las células PolyQ16 (Fig. 22a-g). Este resultado sugiere que el incremento de MCL1 inducido por la sobreexpresión de ATF5 media, al menos en parte, el efecto neuroprotector de ATF5.





## **VII. DISCUSIÓN**



La enfermedad de Huntington es una patología neurodegenerativa para la que no existe ningún tratamiento que prevenga o reduzca el avance inexorable de los síntomas, que invariablemente culminan con la muerte del paciente. Se trata de una enfermedad rara, aunque dentro de esta categoría es de las más frecuentes. Sus efectos devastadores a nivel motor y cognitivo impulsan a la comunidad científica a buscar y comprender los mecanismos por los que la mutación por expansión de poliglutamina causa el desarrollo de esta patología. Uno de estos mecanismos propuestos y muy estudiado en los últimos años es el estrés de retículo endoplasmático crónico y la disfunción en la ejecución de la respuesta a proteínas mal plegadas. Gracias al gran esfuerzo colectivo por comprender cómo se activan, en la EH, las diferentes rutas de señalización que intervienen en estos dos procesos celulares, se han descrito activaciones crónicas en algunas vías de señalización y defectos en otras (Vidal et al., 2011) conformando así un entramado complejo que va creciendo a medida que se descubren nuevos efectores.

En los últimos años, un nuevo factor ha ido sumando evidencias que lo relacionan con el ERE y la RPM. Se trata del factor de transcripción ATF5, una proteína muy similar al canónico ATF4, vastamente implicado en enfermedades neurodegenerativas con eventos patogénicos similares a la EH (Pitale et al., 2017). En el ámbito del sistema nervioso, ATF5 se había descrito como un factor que interviene en la multiplicación de los progenitores neurales y cuya expresión debe verse disminuida para permitir la diferenciación de estos progenitores hacia células maduras (Angelastro et al., 2003). Esto llevó a algunos autores a asumir que ATF5 no se expresaba en tejido cerebral adulto. Contrariamente a esta noción, nuestro grupo demostró, en un trabajo previo, la expresión basal de ATF5 en neuronas adultas de ratón. Al mismo tiempo observamos una inducción neuroprotectora de ATF5 en respuesta a ERE. Estas evidencias junto con el conocimiento de que existen alteraciones del ERE y la RPM en la EH, nos llevaron a considerar a ATF5 como un factor de interés para nuestra investigación.

#### **Secuestro de ATF5 en inclusiones de poliglutamina en pacientes y modelos de la EH**

En primer lugar observamos una acumulación de ATF5 en corteza y estriado de ratones transgénicos R6/1, modelo de la EH, con un patrón típico de agregados. Este mismo patrón se observó en tejido *post mortem* de pacientes humanos de la EH, en ambas regiones cerebrales. Además, estos experimentos de inmunotinción nos permitieron demostrar por primera vez la expresión difusa de ATF5 en neuronas humanas adultas, muy similar a la observada en ratón. Ensayos posteriores demostraron una colocalización del marcaje de ATF5 y de mHTT en las

inclusiones detectadas en núcleo, soma, neuritas y neuropilo. Estos datos sugerían que la mHTT estaba secuestrando al ATF5 difuso en las inclusiones.

Existen diferentes mecanismos por los que ATF5 podría acumularse en las inclusiones de poliglutamina en pacientes y en el modelo murino. En primer lugar, se sabe que muchos factores de transcripción se unen a los tractos de poliglutamina y se ven secuestrados en los cuerpos de inclusión (Okazawa, 2003). Esto incluye a CBP (*CREB-binding protein*), SP1, TBP, p53 (Okazawa, 2003) y muchos otros como el factor de transcripción tipo bZIP C/EBP $\alpha$  (Chiang et al., 2007). Puesto que los factores de transcripción que contienen el dominio bZIP poseen la habilidad de formar heterodímeros (Hai and Hartman, 2001), es posible que ATF5 alcanzara las inclusiones de poliglutamina indirectamente a través de su interacción con otros factores con tropismo por las inclusiones de mHTT. Alternativamente, se ha descrito que ATF5 tiene tendencia a la autoagregación *in vitro* (Ciaccio and Laurence, 2009; Ciaccio et al., 2012). Por ello sería posible que ATF5 pudiera autoagregar en una patología como la EH en la que los mecanismos de control de calidad de proteínas y la proteostasis se ven comprometidos (Cortes and La Spada, 2014; Ortega et al., 2007; Vidal et al., 2011). Estos microagregados de ATF5 podrían después coalescer en cuerpos de inclusión maduros (Kopito, 2000) como los que contienen agregados nucleados por mHTT.

#### **Disminución de los niveles de ATF5 en pacientes de EH y R6/1**

El análisis de los niveles de proteína de ATF5 por WB puso en evidencia una bajada de la forma soluble en corteza y estriado de pacientes de EH, así como del modelo R6/1 en los primeros estadios de la enfermedad. Este dato correlaciona con el secuestro de ATF5 en las inclusiones de mHTT, confirmando robustez a la hipótesis según la cual un nuevo mecanismo patogénico en la EH dejaría a la célula con menor disposición de ATF5 desde etapas tempranas en el desarrollo de la patología.

En este trabajo sugerimos que la bajada en los niveles de ATF5 soluble podría ser una consecuencia de su secuestro en los cuerpos de inclusión. Los niveles comparables de ARNm de ATF5 que, tanto pacientes como R6/1, muestran con respecto a sus controles son un fuerte indicador en favor de esta hipótesis. Así pues, la disminución de la proteína podría deberse a dos mecanismos diferentes: por un lado a una menor traducción, y por otro, a una menor vida media de la proteína soluble, como consecuencia de su secuestro en agregados. Existen, de hecho, numerosos ejemplos de disminución de la proteína soluble y pérdida de función por secuestro en inclusiones de mHTT (Fujita et al., 2013; McCampbell et al., 2000), que apoyan nuestra hipótesis.

### **Disminución de los niveles de MCL1 en pacientes de EH y R6/1**

La bajada de ATF5 correlaciona fuertemente con la disminución observada en los niveles de su diana transcripcional MCL1. Esta proteína es un factor antiapoptótico, perteneciente a la familia BCL2, que se había relacionado previamente con ATF5 en un ensayo con células de gliomas en los que se sabe que ATF5 juega un papel importante (Sheng et al., 2010). Posteriormente se estableció esta relación en un contexto de ERE otorgando a la ruta CREB3L2-ATF5-MCL1 un papel estimulador de la supervivencia celular (Izumi et al., 2012). A pesar de que esta ruta no se ha descrito formalmente en neuronas adultas, nuestros resultados sugieren fuertemente que al menos la relación ATF5-MCL1 también existe en sistema nervioso y que se ve afectado en la EH.

### **La delección de *atf-5* en un modelo de *C. elegans* incrementa la toxicidad inducida por poliglutamina**

En este trabajo aportamos evidencias experimentales de que la disminución de ATF5 en un sistema *in vivo* resulta deletérea en un contexto de toxicidad de poliglutamina. Probablemente esto se deba a una mayor deficiencia en la ejecución de la RPM que existe en la EH, como ocurre en la ruta de ATF6. Como se ha comentado, este defecto tendrá un impacto en la apoptosis ya que correlaciona con los niveles de la diana anti-apotótica MCL1. Curiosamente, la simple delección de *atf-5* no redundaba en ningún efecto negativo para la viabilidad del gusano. Esto sugiere que ATF5 en este modelo tiene un papel específico en la respuesta al daño inducido por poliQ expandida.

### **Generación de ratones de sobreexpresión de ATF5**

A la vista de la disminución de ATF5 soluble en los ratones R6/1, decidimos hacer un ratón que nos permitiera restablecer los niveles disminuidos de ATF5 en dichos ratones para comprobar sus posibles efectos beneficiosos. Desafortunadamente, no hemos sido capaces de detectar acumulación de la proteína ATF5 en los ratones BI2 de expresión condicional en neuronas de cerebro anterior. Entendemos que esto ocurre debido a un mecanismo de estabilidad de la proteína ya que los análisis de ARNm indicaron un buen nivel de transcripción del transgén. Este mecanismo debe ser específico del sistema *in vivo* ya que la transfección en N2a del plásmido que dirige la expresión de ATF5 resultó en acumulación visible de la proteína.

Los intentos por estimular esta acumulación han sido infructuosos, como se detallará a continuación, ya sea forzando el ERE en cultivo primario de corteza de ratones BI2, dirigiendo

la expresión a un sistema posiblemente más permisivo como los astrocitos en los ratones AI2 o cruzando los ratones BI2 con los R6/1, en los que existe ERE naturalmente.

La tunicamicina es un clásico inductor del ERE (Torres-Peraza et al., 2013). Al ser ATF5 un efector de la RPM cuya traducción se ve favorecida en condiciones de ERE, pensamos que quizá la tunicamicina proveería un nicho adecuado para la estabilización de la proteína. Sin embargo, el tratamiento directo sobre neuronas primarias de BI2 no consiguió inducir una acumulación de la proteína transgénica más allá de la inducción endógena.

Como estrategia alternativa para comprender la razón subyacente a este fenómeno decidimos generar un ratón de sobreexpresión de ATF5 en astrocitos. Resultados del grupo de J. Angelastro demostraron que ATF5 incrementa notablemente sus niveles en proliferaciones malignas de astrocitos (gliomas), lo que nos hizo pensar que quizá los astrocitos fueran más permisivos para la acumulación de esta proteína. Pese a ello, no fuimos capaces de detectar la sobreexpresión de ATF5 en los animales AI2. Sólo ha faltado forzar una reactivación astrocitaria, en la que sí podrían darse las condiciones para la estabilización de ATF5. Sería interesante emplear algún inductor de esta respuesta y observar cómo evoluciona la expresión de ATF5.

Finalmente decidimos cruzar ratones BI2 con R6/1 para comprobar si el ERE que se da naturalmente en este modelo proporcionaba las circunstancias adecuadas para la sobreexpresión de ATF5 y al mismo tiempo observar el efecto de esta posible inducción en el desarrollo de la patología. Sin embargo, no hemos conseguido reestablecer los niveles de ATF5 en el modelo por lo que este bloque permanece inconcluso. Tal y como se ha descrito, la EH es una patología en la que no existe una respuesta al ERE canónica. El trabajo de Fernández-Fernández y colaboradores demostró un déficit de la vía de PERK en R6/1. Esto sugiere que podría existir una alteración en la ejecución de esta ruta, tal y como se ha descrito para las vías de IRE1 y ATF6 en la EH (Angelastro et al., 2003; Vidal et al., 2011). Como esperábamos con estos resultados, no fuimos capaces mejorar el fenotipo patológico de los R6/1, incluidas las habilidades motoras, la memoria, la evolución del peso corporal y la esperanza de vida.

En definitiva, no hemos sido capaces de esclarecer por qué la sobreexpresión del ARNm de ATF5 en neuronas de los ratones BI2 o en astrocitos de ratones AI2 no va acompañada de la correspondiente subida de la proteína. Pensamos que podría haber un mecanismo que regule los niveles máximos de proteína, por ejemplo podría ser mediante unión a otra proteína que lo estabilice, pero esta idea es puramente especulativa.

### **La sobreexpresión de ATF5 en un modelo celular de EH rescata la muerte inducida por poliglutamina**

Los resultados obtenidos en el bloque de transfección celular indicaron una disminución significativa de la apoptosis inducida en un modelo de toxicidad por poliglutamina expandida. La sobreexpresión de ATF5 en N2a indujo, en primer lugar, un aumento de los niveles de MCL1 que resultó en unos niveles comparables de apoptosis, medida por porcentaje de células positivas para caspasa 3 activa y morfología nuclear con DAPI, entre las células PoliQ16 y PoliQ94+ATF5. La sobreexpresión de MCL1 tuvo un efecto similar a la transfección de ATF5. Estos datos nos indican que la activación de MCL1 dependiente de ATF5 podría ser suficiente para inducir un efecto neuroprotector en la EH. Por ello cualquier intervención farmacológica que tenga por objetivo incrementar los niveles de ATF5 en la EH podría tener valor terapéutico. Los compuestos salubrinal, guanabenz y sefina 1 son drogas de pequeño tamaño molecular que mantienen niveles elevados de P-eIF2 $\alpha$  inhibiendo la fosfatasa PPP1R15A (GADD34) y, por tanto, modulan la RPM (Das et al., 2015; Tsaytler et al., 2011). Así, el salubrinal incrementa los niveles de ATF5 en cultivo primario de neuronas y atenúa la muerte celular inducida por tunicamicina (Torres-Peraza et al., 2013) y por el segmento N-terminal de la mHTT (Reijonen et al., 2008). Esto sugiere que los compuestos inhibidores de GADD34 podrían resultar beneficiosos en la EH. Sin embargo, pueden existir efectos no deseados ya que se ha descrito que la administración del salubrinal *in vivo* en un modelo murino de neurodegeneración inducida por prión resulta tóxica (Moreno et al., 2012).

En resumen, en este trabajo reportamos que la bajada en los niveles de ATF5, probablemente secundaria a su secuestro en las inclusiones neuronales de mHTT correlaciona con una caída de la proteína antiapoptótica MCL1, una diana transcripcional de ATF5. También ofrecemos evidencias del efecto deletéreo de una caída en los niveles de ATF5 en un contexto de toxicidad inducida por poliglutamina. Finalmente, un incremento de ATF5 es suficiente para rescatar la apoptosis inducida por la poliglutamina. A pesar de que nuestros resultados en modelos *in vivo* indican que aún existe un profundo desconocimiento sobre la regulación de este factor, las intervenciones farmacológicas para aumentar los niveles de ATF5 ofrecen un nuevo campo de exploración terapéutica en la enfermedad de Huntington.

Todos los resultados anteriormente expuestos han dado lugar a una publicación en la revista científica *Acta Neuropathologica*, que puede consultarse en la sección "Anexo". Así mismo, se incluyen las referencias a otras publicaciones, no directamente relacionadas con el tema de tesis, fruto de mi actividad investigadora durante este período predoctoral.





## **VIII. CONCLUSIONES**

---



1. El nivel del factor de transcripción ATF5 está disminuido en el tejido *post mortem* de pacientes de la Enfermedad de Huntington (EH) en las regiones más afectadas: el estriado y la corteza.
2. En el ratón R6/1, modelo de la EH, se reproduce la disminución de ATF5 observada en pacientes, tanto en estriado como en corteza.
3. Tanto en los pacientes como en el modelo murino ATF5 se ve secuestrado en las inclusiones de huntingtina mutante, sugiriendo un mecanismo para la disminución de este factor de transcripción.
4. Los cambios observados en ATF5 correlacionan con la disminución del factor anti-apotótico MCL1 en cerebros *post mortem* de pacientes y en el modelo R6/1, que puede hacer más vulnerables a las neuronas frente a la toxicidad de la mHTT.
5. La delección de *atf-5* en un modelo de *C. elegans* agrava la toxicidad inducida por la poliglutamina expandida.
6. La proteína ATF5 no se acumula en los ratones Tg-mATF5, en los que sí se detecta claramente un aumento de la cantidad del ARNm correspondiente, por lo que debe existir un mecanismo molecular desconocido que impida la acumulación de la proteína ATF5 por encima de los niveles fisiológicos.
7. Los niveles de ATF5 no se restablecen en los ratones R6/1BI2, cuyo fenotipo tampoco mejora en comparación al de los ratones R6/1.
8. La sobreexpresión de ATF5 en un modelo celular de EH rescata la apoptosis inducida por poliglutamina expandida, probablemente debido a la inducción secundaria de su diana transcripcional MCL1.
9. Los datos aportados en este trabajo sugieren que cualquier estrategia dirigida a incrementar los niveles de ATF5 podría resultar beneficiosa para la Enfermedad de Huntington.



## **IX. BIBLIOGRAFÍA**



- Albin, R.L., Young, A.B., and Penney, J.B. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends in neurosciences* 12, 366-375.
- Alexander, G.E., and Crutcher, M.D. (1990). Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends in neurosciences* 13, 266-271.
- Angelastro, J.M., Canoll, P.D., Kuo, J., Weicker, M., Costa, A., Bruce, J.N., and Greene, L.A. (2006). Selective destruction of glioblastoma cells by interference with the activity or expression of ATF5. *Oncogene* 25, 907-916.
- Angelastro, J.M., Ignatova, T.N., Kukekov, V.G., Steindler, D.A., Stengren, G.B., Mendelsohn, C., and Greene, L.A. (2003). Regulated expression of ATF5 is required for the progression of neural progenitor cells to neurons. *J Neurosci* 23, 4590-4600.
- Balchin, D., Hayer-Hartl, M., and Hartl, F.U. (2016). In vivo aspects of protein folding and quality control. *Science* 353, aac4354.
- Baron, U., Freundlieb, S., Gossen, M., and Bujard, H. (1995). Co-regulation of two gene activities by tetracycline via a bidirectional promoter. *Nucleic Acids Res* 23, 3605-3606.
- Bates, G.P., Dorsey, R., Gusella, J.F., Hayden, M.R., Kay, C., Leavitt, B.R., Nance, M., Ross, C.A., Scahill, R.I., Wetzel, R., *et al.* (2015). Huntington disease. *Nat Rev Dis Primers* 1, 15005.
- Castilhos, R.M., Augustin, M.C., Santos, J.A., Perandones, C., Saraiva-Pereira, M.L., Jardim, L.B., and Rede, N. (2016). Genetic aspects of Huntington's disease in Latin America. A systematic review. *Clin Genet* 89, 295-303.
- Caviston, J.P., and Holzbaur, E.L. (2009). Huntingtin as an essential integrator of intracellular vesicular trafficking. *Trends in cell biology* 19, 147-155.
- Ciaccio, N.A., and Laurence, J.S. (2009). Effects of disulfide bond formation and protein helicity on the aggregation of activating transcription factor 5. *Mol Pharm* 6, 1205-1215.
- Ciaccio, N.A., Reynolds, T.S., Middaugh, C.R., and Laurence, J.S. (2012). Influence of the valine zipper region on the structure and aggregation of the basic leucine zipper (bZIP) domain of activating transcription factor 5 (ATF5). *Mol Pharm* 9, 3190-3199.
- Cortes, C.J., and La Spada, A.R. (2014). The many faces of autophagy dysfunction in Huntington's disease: from mechanism to therapy. *Drug Discov Today* 19, 963-971.
- Chiang, M.C., Chen, H.M., Lee, Y.H., Chang, H.H., Wu, Y.C., Soong, B.W., Chen, C.M., Wu, Y.R., Liu, C.S., Niu, D.M., *et al.* (2007). Dysregulation of C/EBPalpha by mutant Huntingtin causes the urea cycle deficiency in Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 16, 483-498.
- Das, I., Krzyzosiak, A., Schneider, K., Wrabetz, L., D'Antonio, M., Barry, N., Sigurdardottir, A., and Bertolotti, A. (2015). Preventing proteostasis diseases by selective inhibition of a phosphatase regulatory subunit. *Science* 348, 239-242.
- del Toro, D., Canals, J.M., Gines, S., Kojima, M., Egea, G., and Alberch, J. (2006). Mutant huntingtin impairs the post-Golgi trafficking of brain-derived neurotrophic factor but not its Val66Met polymorphism. *J Neurosci* 26, 12748-12757.
- Diaz-Hernandez, M., Diez-Zaera, M., Sanchez-Nogueiro, J., Gomez-Villafuertes, R., Canals, J.M., Alberch, J., Miras-Portugal, M.T., and Lucas, J.J. (2009). Altered P2X7-receptor level and function in mouse models of Huntington's disease and therapeutic efficacy of antagonist administration. *FASEB J* 23, 1893-1906.
- DiFiglia, M., Sena-Esteves, M., Chase, K., Sapp, E., Pfister, E., Sass, M., Yoder, J., Reeves, P., Pandey, R.K., Rajeev, K.G., *et al.* (2007). Therapeutic silencing of mutant huntingtin with siRNA attenuates striatal and cortical neuropathology and behavioral deficits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 17204-17209.
- Duennwald, M.L., and Lindquist, S. (2008). Impaired ERAD and ER stress are early and specific events in polyglutamine toxicity. *Genes Dev* 22, 3308-3319.



- Duyao, M.P., Auerbach, A.B., Ryan, A., Persichetti, F., Barnes, G.T., McNeil, S.M., Ge, P., Vonsattel, J.P., Gusella, J.F., Joyner, A.L., *et al.* (1995). Inactivation of the mouse Huntington's disease gene homolog Hdh. *Science* 269, 407-410.
- Fernandez-Fernandez, M.R., Ferrer, I., and Lucas, J.J. (2011). Impaired ATF6alpha processing, decreased Rheb and neuronal cell cycle re-entry in Huntington's disease. *Neurobiol Dis* 41, 23-32.
- Fernandez-Nogales, M., Hernandez, F., Miguez, A., Alberch, J., Gines, S., Perez-Navarro, E., and Lucas, J.J. (2015). Decreased glycogen synthase kinase-3 levels and activity contribute to Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 24, 5040-5052.
- Ferraz, R.C., Camara, H., De-Souza, E.A., Pinto, S., Pinca, A.P., Silva, R.C., Sato, V.N., Castilho, B.A., and Mori, M.A. (2016). IMPACT is a GCN2 inhibitor that limits lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *BMC Biol* 14, 87.
- Ferrer, I., Goutan, E., Marin, C., Rey, M.J., and Ribalta, T. (2000). Brain-derived neurotrophic factor in Huntington disease. *Brain research* 866, 257-261.
- Fujita, K., Nakamura, Y., Oka, T., Ito, H., Tamura, T., Tagawa, K., Sasabe, T., Katsuta, A., Motoki, K., Shiwaku, H., *et al.* (2013). A functional deficiency of TERA/VCP/p97 contributes to impaired DNA repair in multiple polyglutamine diseases. *Nat Commun* 4, 1816.
- Greene, L.A., Lee, H.Y., and Angelastro, J.M. (2009). The transcription factor ATF5: role in neurodevelopment and neural tumors. *J Neurochem* 108, 11-22.
- Hai, T., and Hartman, M.G. (2001). The molecular biology and nomenclature of the activating transcription factor/cAMP responsive element binding family of transcription factors: activating transcription factor proteins and homeostasis. *Gene* 273, 1-11.
- Halliday, M., and Mallucci, G.R. (2014). Targeting the unfolded protein response in neurodegeneration: A new approach to therapy. *Neuropharmacology* 76 Pt A, 169-174.
- Hansen, M.B., Mitchelmore, C., Kjaerulff, K.M., Rasmussen, T.E., Pedersen, K.M., and Jensen, N.A. (2002). Mouse *Atf5*: molecular cloning of two novel mRNAs, genomic organization, and odorant sensory neuron localization. *Genomics* 80, 344-350.
- Harding, R.J., and Tong, Y.F. (2018). Proteostasis in Huntington's disease: disease mechanisms and therapeutic opportunities. *Acta Pharmacol Sin* 39, 754-769.
- Hatano, M., Umemura, M., Kimura, N., Yamazaki, T., Takeda, H., Nakano, H., Takahashi, S., and Takahashi, Y. (2013). The 5'-untranslated region regulates ATF5 mRNA stability via nonsense-mediated mRNA decay in response to environmental stress. *FEBS J* 280, 4693-4707.
- Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., and Mori, K. (1999). Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell* 10, 3787-3799.
- Hetz, C., and Mollereau, B. (2014). Disturbance of endoplasmic reticulum proteostasis in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 15, 233-249.
- Hetz, C., and Papa, F.R. (2018). The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control. *Mol Cell* 69, 169-181.
- Hoozemans, J.J., and Scheper, W. (2012). Endoplasmic reticulum: the unfolded protein response is tangled in neurodegeneration. *Int J Biochem Cell Biol* 44, 1295-1298.
- Izumi, S., Saito, A., Kanemoto, S., Kawasaki, N., Asada, R., Iwamoto, H., Oki, M., Miyagi, H., Ochi, M., and Imaizumi, K. (2012). The endoplasmic reticulum stress transducer BBF2H7 suppresses apoptosis by activating the ATF5-MCL1 pathway in growth plate cartilage. *J Biol Chem* 287, 36190-36200.
- Jin, Y.N., and Johnson, G.V. (2010). The interrelationship between mitochondrial dysfunction and transcriptional dysregulation in Huntington disease. *J Bioenerg Biomembr* 42, 199-205.
- Kassubek, J., Juengling, F.D., Kioschies, T., Henkel, K., Karitzky, J., Kramer, B., Ecker, D., Andrich, J., Saft, C., Kraus, P., *et al.* (2004). Topography of cerebral atrophy in early

- Huntington's disease: a voxel based morphometric MRI study. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 75, 213-220.
- Kopito, R.R. (2000). Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol* 10, 524-530.
- Koyuncu, S., Fatima, A., Gutierrez-Garcia, R., and Vilchez, D. (2017). Proteostasis of Huntingtin in Health and Disease. *Int J Mol Sci* 18.
- Landles, C., Sathasivam, K., Weiss, A., Woodman, B., Moffitt, H., Finkbeiner, S., Sun, B., Gafni, J., Ellerby, L.M., Trotter, Y., *et al.* (2010). Proteolysis of mutant huntingtin produces an exon 1 fragment that accumulates as an aggregated protein in neuronal nuclei in Huntington disease. *The Journal of biological chemistry* 285, 8808-8823.
- Landwehrmeyer, G.B., McNeil, S.M., Dure, L.S.t., Ge, P., Aizawa, H., Huang, Q., Ambrose, C.M., Duyao, M.P., Bird, E.D., Bonilla, E., *et al.* (1995). Huntington's disease gene: regional and cellular expression in brain of normal and affected individuals. *Ann Neurol* 37, 218-230.
- Leitman, J., Ulrich Hartl, F., and Lederkremer, G.Z. (2013). Soluble forms of polyQ-expanded huntingtin rather than large aggregates cause endoplasmic reticulum stress. *Nat Commun* 4, 2753.
- Liu, J.P., and Zeitlin, S.O. (2017). Is Huntingtin Dispensable in the Adult Brain? *J Huntingtons Dis* 6, 1-17.
- Mangiarini, L., Sathasivam, K., Seller, M., Cozens, B., Harper, A., Hetherington, C., Lawton, M., Trotter, Y., Lehrach, H., Davies, S.W., *et al.* (1996). Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* 87, 493-506.
- Martinez-Vicente, M., Tallozy, Z., Wong, E., Tang, G., Koga, H., Kaushik, S., de Vries, R., Arias, E., Harris, S., Sulzer, D., *et al.* (2010). Cargo recognition failure is responsible for inefficient autophagy in Huntington's disease. *Nat Neurosci* 13, 567-576.
- Mayford, M., Bach, M.E., Huang, Y.Y., Wang, L., Hawkins, R.D., and Kandel, E.R. (1996). Control of memory formation through regulated expression of a CaMKII transgene. *Science* 274, 1678-1683.
- McCampbell, A., Taylor, J.P., Taye, A.A., Robitschek, J., Li, M., Walcott, J., Merry, D., Chai, Y., Paulson, H., Sobue, G., *et al.* (2000). CREB-binding protein sequestration by expanded polyglutamine. *Hum Mol Genet* 9, 2197-2202.
- Moreno, J.A., Radford, H., Peretti, D., Steinert, J.R., Verity, N., Martin, M.G., Halliday, M., Morgan, J., Dinsdale, D., Ortori, C.A., *et al.* (2012). Sustained translational repression by eIF2alpha-P mediates prion neurodegeneration. *Nature* 485, 507-511.
- Morley, J.F., Brignull, H.R., Weyers, J.J., and Morimoto, R.I. (2002). The threshold for polyglutamine-expansion protein aggregation and cellular toxicity is dynamic and influenced by aging in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 10417-10422.
- Morris, G., Puri, B.K., Walder, K., Berk, M., Stubbs, B., Maes, M., and Carvalho, A.F. (2018). The Endoplasmic Reticulum Stress Response in Neuroprogressive Diseases: Emerging Pathophysiological Role and Translational Implications. *Mol Neurobiol*.
- Muchowski, P.J., and Wacker, J.L. (2005). Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones. *Nat Rev Neurosci* 6, 11-22.
- Mullis, K.B., and Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155, 335-350.
- Nance, M.A., and Myers, R.H. (2001). Juvenile onset Huntington's disease--clinical and research perspectives. *Mental retardation and developmental disabilities research reviews* 7, 153-157.
- Nasir, J., Floresco, S.B., O'Kusky, J.R., Diewert, V.M., Richman, J.M., Zeisler, J., Borowski, A., Marth, J.D., Phillips, A.G., and Hayden, M.R. (1995). Targeted disruption of the

- Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes. *Cell* **81**, 811-823.
- Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Tobiume, K., Saegusa, K., Takeda, K., Inoue, K., Hori, S., Kakizuka, A., and Ichijo, H. (2002). ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev* **16**, 1345-1355.
- Okazawa, H. (2003). Polyglutamine diseases: a transcription disorder? *Cell Mol Life Sci* **60**, 1427-1439.
- Ortega, Z., Diaz-Hernandez, M., and Lucas, J.J. (2007). Is the ubiquitin-proteasome system impaired in Huntington's disease? *Cell Mol Life Sci* **64**, 2245-2257.
- Ortega, Z., and Lucas, J.J. (2014). Ubiquitin-proteasome system involvement in Huntington's disease. *Frontiers in molecular neuroscience* **7**, 77.
- Parras, A., Anta, H., Santos-Galindo, M., Swarup, V., Elorza, A., Nieto-Gonzalez, J.L., Pico, S., Hernandez, I.H., Diaz-Hernandez, J.I., Belloc, E., *et al.* (2018). Autism-like phenotype and risk gene mRNA deadenylation by CPEB4 mis-splicing. *Nature* **560**, 441-446.
- Paschen, W., and Mengesdorf, T. (2005). Endoplasmic reticulum stress response and neurodegeneration. *Cell Calcium* **38**, 409-415.
- Persengiev, S.P., Devireddy, L.R., and Green, M.R. (2002). Inhibition of apoptosis by ATFx: a novel role for a member of the ATF/CREB family of mammalian bZIP transcription factors. *Genes Dev* **16**, 1806-1814.
- Pitale, P.M., Gorbatyuk, O., and Gorbatyuk, M. (2017). Neurodegeneration: Keeping ATF4 on a Tight Leash. *Front Cell Neurosci* **11**, 410.
- Politis, M., Pavese, N., Tai, Y.F., Tabrizi, S.J., Barker, R.A., and Piccini, P. (2008). Hypothalamic involvement in Huntington's disease: an in vivo PET study. *Brain : a journal of neurology* **131**, 2860-2869.
- Ranen, N.G., Stine, O.C., Abbott, M.H., Sherr, M., Codori, A.M., Franz, M.L., Chao, N.I., Chung, A.S., Pleasant, N., Callahan, C., *et al.* (1995). Anticipation and instability of IT-15 (CAG)<sub>n</sub> repeats in parent-offspring pairs with Huntington disease. *American journal of human genetics* **57**, 593-602.
- Ravikumar, B., Imarisio, S., Sarkar, S., O'Kane, C.J., and Rubinsztein, D.C. (2008). Rab5 modulates aggregation and toxicity of mutant huntingtin through macroautophagy in cell and fly models of Huntington disease. *Journal of cell science* **121**, 1649-1660.
- Reijonen, S., Putkonen, N., Norremolle, A., Lindholm, D., and Korhonen, L. (2008). Inhibition of endoplasmic reticulum stress counteracts neuronal cell death and protein aggregation caused by N-terminal mutant huntingtin proteins. *Exp Cell Res* **314**, 950-960.
- Reiner, A., Albin, R.L., Anderson, K.D., D'Amato, C.J., Penney, J.B., and Young, A.B. (1988). Differential loss of striatal projection neurons in Huntington disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**, 5733-5737.
- Remondelli, P., and Renna, M. (2017). The Endoplasmic Reticulum Unfolded Protein Response in Neurodegenerative Disorders and Its Potential Therapeutic Significance. *Front Mol Neurosci* **10**, 187.
- Rigamonti, D., Bauer, J.H., De-Fraja, C., Conti, L., Sipione, S., Sciorati, C., Clementi, E., Hackam, A., Hayden, M.R., Li, Y., *et al.* (2000). Wild-type huntingtin protects from apoptosis upstream of caspase-3. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **20**, 3705-3713.
- Rosenblatt, A. (2007). Understanding the psychiatric prodrome of Huntington disease. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* **78**, 913.
- Ross, C.A., and Tabrizi, S.J. (2011). Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *The Lancet Neurology* **10**, 83-98.

- Roussel, B.D., Kruppa, A.J., Miranda, E., Crowther, D.C., Lomas, D.A., and Marciniak, S.J. (2013). Endoplasmic reticulum dysfunction in neurological disease. *Lancet Neurol* 12, 105-118.
- Ruocco, H.H., Lopes-Cendes, I., Laurito, T.L., Li, L.M., and Cendes, F. (2006). Clinical presentation of juvenile Huntington disease. *Arquivos de neuro-psiquiatria* 64, 5-9.
- Schilling, G., Klevytska, A., Tebbenkamp, A.T., Juenemann, K., Cooper, J., Gonzales, V., Slunt, H., Poirer, M., Ross, C.A., and Borchelt, D.R. (2007). Characterization of huntingtin pathologic fragments in human Huntington disease, transgenic mice, and cell models. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 66, 313-320.
- Shao, J., and Diamond, M.I. (2007). Polyglutamine diseases: emerging concepts in pathogenesis and therapy. *Human molecular genetics* 16 *Spec No. 2*, R115-123.
- Sheng, Z., Li, L., Zhu, L.J., Smith, T.W., Demers, A., Ross, A.H., Moser, R.P., and Green, M.R. (2010). A genome-wide RNA interference screen reveals an essential CREB3L2-ATF5-MCL1 survival pathway in malignant glioma with therapeutic implications. *Nat Med* 16, 671-677.
- Shirasaki, D.I., Greiner, E.R., Al-Ramahi, I., Gray, M., Boontheung, P., Geschwind, D.H., Botas, J., Coppola, G., Horvath, S., Loo, J.A., *et al.* (2012). Network organization of the huntingtin proteomic interactome in mammalian brain. *Neuron* 75, 41-57.
- Sorolla, M.A., Reverter-Branchat, G., Tamarit, J., Ferrer, I., Ros, J., and Cabiscol, E. (2008). Proteomic and oxidative stress analysis in human brain samples of Huntington disease. *Free radical biology & medicine* 45, 667-678.
- Squitieri, F., Gellera, C., Cannella, M., Mariotti, C., Cislighi, G., Rubinsztein, D.C., Almqvist, E.W., Turner, D., Bachoud-Levi, A.C., Simpson, S.A., *et al.* (2003). Homozygosity for CAG mutation in Huntington disease is associated with a more severe clinical course. *Brain: a journal of neurology* 126, 946-955.
- Stiernagle, T. (2006). Maintenance of *C. elegans*. *WormBook*, 1-11.
- Tang, T.S., Slow, E., Lupu, V., Stavrovskaya, I.G., Sugimori, M., Llinas, R., Kristal, B.S., Hayden, M.R., and Bezprozvanny, I. (2005). Disturbed Ca<sup>2+</sup> signaling and apoptosis of medium spiny neurons in Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 2602-2607.
- The HD CRG (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 72, 971-983.
- Tobin, A.J., and Signer, E.R. (2000). Huntington's disease: the challenge for cell biologists. *Trends in cell biology* 10, 531-536.
- Torres-Peraza, J.F., Engel, T., Martin-Ibanez, R., Sanz-Rodriguez, A., Fernandez-Fernandez, M.R., Esgleas, M., Canals, J.M., Henshall, D.C., and Lucas, J.J. (2013). Protective neuronal induction of ATF5 in endoplasmic reticulum stress induced by status epilepticus. *Brain* 136, 1161-1176.
- Tsaytler, P., Harding, H.P., Ron, D., and Bertolotti, A. (2011). Selective inhibition of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 restores proteostasis. *Science* 332, 91-94.
- Van Raamsdonk, J.M., Pearson, J., Rogers, D.A., Bissada, N., Vogl, A.W., Hayden, M.R., and Leavitt, B.R. (2005). Loss of wild-type huntingtin influences motor dysfunction and survival in the YAC128 mouse model of Huntington disease. *Human molecular genetics* 14, 1379-1392.
- Vidal, R., Caballero, B., Couve, A., and Hetz, C. (2011). Converging pathways in the occurrence of endoplasmic reticulum (ER) stress in Huntington's disease. *Curr Mol Med* 11, 1-12.
- Vonsattel, J.P., and DiFiglia, M. (1998). Huntington disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 57, 369-384.
- Vonsattel, J.P., Myers, R.H., Stevens, T.J., Ferrante, R.J., Bird, E.D., and Richardson, E.P., Jr. (1985). Neuropathological classification of Huntington's disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 44, 559-577.
- Waldvogel, H.J., Kim, E.H., Tippett, L.J., Vonsattel, J.P., and Faull, R.L. (2014). The Neuropathology of Huntington's Disease. *Current topics in behavioral neurosciences*.

- Wang, M., and Kaufman, R.J. (2014). The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development. *Nat Rev Cancer* 14, 581-597.
- Wang, X., Zhang, C., Szabo, G., and Sun, Q.Q. (2013). Distribution of CaMKIIalpha expression in the brain in vivo, studied by CaMKIIalpha-GFP mice. *Brain Res* 1518, 9-25.
- White, J.K., Auerbach, W., Duyao, M.P., Vonsattel, J.P., Gusella, J.F., Joyner, A.L., and MacDonald, M.E. (1997). Huntingtin is required for neurogenesis and is not impaired by the Huntington's disease CAG expansion. *Nature genetics* 17, 404-410.
- Xia, J., Lee, D.H., Taylor, J., Vandelft, M., and Truant, R. (2003). Huntingtin contains a highly conserved nuclear export signal. *Human molecular genetics* 12, 1393-1403.
- Zhang, S., Feany, M.B., Saraswati, S., Littleton, J.T., and Perrimon, N. (2009). Inactivation of *Drosophila* Huntingtin affects long-term adult functioning and the pathogenesis of a Huntington's disease model. *Disease models & mechanisms* 2, 247-266.
- Zuccato, C., and Cattaneo, E. (2007). Role of brain-derived neurotrophic factor in Huntington's disease. *Progress in neurobiology* 81, 294-330.
- Zuccato, C., Marullo, M., Conforti, P., MacDonald, M.E., Tartari, M., and Cattaneo, E. (2008). Systematic assessment of BDNF and its receptor levels in human cortices affected by Huntington's disease. *Brain pathology* 18, 225-238.





## **RELACIÓN DE PUBLICACIONES DEL DOCTORANDO**

**Hernández, I.H.**, Torres-Peraza, J., Santos-Galindo, M., Ramos-Morón, E., Fernández-Fernández, MR., Pérez-Álvarez, M.J., Miranda-Vizueté, A. and Lucas, J.J. (2017). The neuroprotective transcription factor ATF5 is decreased and sequestered into polyglutamine inclusions in Huntington's disease. **Acta Neuropathol** 134, 839-850.

Fernández-Nogales, M., Santos-Galindo, M., **Hernández, I.H.**, Cabrera, J.R. and Lucas, J.J. (2016). Faulty splicing and cytoskeleton abnormalities in Huntington's disease. **Brain Pathol** 26, 772-778.


de Diego García, L., Sebastián-Serrano, Á., **Hernández, I.H.**, Pintor, J., Lucas, J.J. and Díaz-Hernández, M., (2018). The regulation of proteostasis in glial cells by nucleotide receptors is key in acute neuroinflammation. **FASEB J.** 32, 3020-3032.

Parras, A., Anta, H., Santos-Galindo, M., Swarup, V., Elorza, A., Nieto-González, J.L., Picó, S., **Hernández, I.H.**, Belloc, E., Rodolosse, A., Parikshak, N.N., Peñagarikano, O., Fernández-Chacón, R., Irimia, M., Navarro, P., Geschwind, D.H., Méndez, R. and Lucas, J.J. (2018). Autism-like phenotype and risk gene-RNA deadenylation by CPEB4 mis-splicing. **Nature** 560, 441-446.





# The neuroprotective transcription factor ATF5 is decreased and sequestered into polyglutamine inclusions in Huntington's disease

Ivó H. Hernández<sup>1,2,3</sup> · Jesús Torres-Peraza<sup>1,2,5</sup> · María Santos-Galindo<sup>1,2</sup> · Eloísa Ramos-Morón<sup>4</sup> · M. Rosario Fernández-Fernández<sup>1,2</sup> · María J. Pérez-Álvarez<sup>1,2,3</sup> · Antonio Miranda-Vizueté<sup>4</sup> · José J. Lucas<sup>1,2</sup> 

Received: 20 June 2017 / Revised: 3 August 2017 / Accepted: 21 August 2017 / Published online: 31 August 2017  
© Springer-Verlag GmbH Germany 2017

**Abstract** Activating transcription factor-5 (ATF5) is a stress-response transcription factor induced upon different cell stressors like fasting, amino-acid limitation, cadmium or arsenite. ATF5 is also induced, and promotes transcription of anti-apoptotic target genes like *MCL1*, during the unfolded protein response (UPR) triggered by endoplasmic reticulum stress. In the brain, high ATF5 levels are found in gliomas and also in neural progenitor cells, which need to decrease their ATF5 levels for differentiation into mature neurons or glia. This initially led to believe that ATF5 is not expressed in adult neurons. More recently, we reported basal neuronal ATF5 expression in adult mouse brain and its neuroprotective induction during UPR in a mouse model of status epilepticus. Here we aimed to explore whether ATF5 is also expressed by neurons in human brain both in basal conditions and in Huntington's disease (HD), where UPR has

been described to be partially impaired due to defective ATF6 processing. Apart from confirming that ATF5 is present in human adult neurons, here we report accumulation of ATF5 within the characteristic polyglutamine-containing neuronal nuclear inclusions in brains of HD patients and mice. This correlates with decreased levels of soluble ATF5 and of its antiapoptotic target *MCL1*. We then confirmed the deleterious effect of ATF5 deficiency in a *Caenorhabditis elegans* model of polyglutamine-induced toxicity. Finally, ATF5 overexpression attenuated polyglutamine-induced apoptosis in a cell model of HD. These results reflect that decreased ATF5 in HD—probably secondary to sequestration into inclusions—renders neurons more vulnerable to mutant huntingtin-induced apoptosis and that ATF5-increasing interventions might have therapeutic potential for HD.

**Keywords** Huntington's disease · ATF5 · *MCL1* · ER stress · UPR · Neuroprotection

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00401-017-1770-2) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ José J. Lucas  
jjlucas@cbm.csic.es  
<http://www.cbm.uam.es/lineas/lucasgroup.htm>

- 1 Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO) CSIC/UAM, Madrid, Spain
- 2 Networking Research Center on Neurodegenerative Diseases (CIBERNED), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain
- 3 Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain
- 4 Instituto de Biomedicina de Sevilla, Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla, Seville, Spain
- 5 Present Address: Gerència d'Atenció Primària del Servei de Salut de les Illes Balears (IB-SALUT), Palma, Spain

## Introduction

Activating transcription factor-5 (ATF5) [31] is a basic valine/leucine zipper (bZIP) transcription factor that belongs to the ATF/cAMP response-element binding protein (CREB) family [45]. Also known as ATFx or ATF7 [15], ATF5 is a stress-response transcription factor [16] as it is induced by different cell stressors such as fasting [38], amino acid limitation [48], cadmium chloride or sodium arsenite [43]. In line with this, and similar to the related transcription factors ATF4 and ATF6 [17], ATF5 is induced as part of the unfolded protein response (UPR) to cope with the stress induced by the accumulation of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum (ER stress) [19, 41, 47, 49]. Such

ATF5 induction upon ER stress has been reported to be due to increased transcription [19, 37] and/or to selective translation upon eIF2 $\alpha$ -phosphorylation [47, 49]. Essentially, ATF5 plays a pro-survival role as it promotes transcription of anti-apoptotic genes such as *MCL1* [10, 19, 37]. Accordingly, ATF5 is necessary for survival of many different cell types such as lymphocytes [35] or cardiomyocytes [46]. ATF5 protein expression decreases in cells undergoing apoptosis following growth factor deprivation [35] while its levels are increased and promote apoptotic resistance in a variety of human malignancies, including glioblastoma, breast, pancreatic, lung, and colon cancers [20, 27].

In the brain, highest ATF5 levels are detected in gliomas [1, 27, 37]. In non-pathological brain, high levels are also important for proliferation of neural progenitor cells and a significant decrease in their ATF5 levels is required for their differentiation into mature neurons or glial cells [2, 3, 24]. This led to the notion of ATF5 not being expressed in adult neurons [14]. However, we have demonstrated that mouse adult neurons maintain a steady state level of ATF5 expression which increases upon UPR-triggering stimuli such as tunicamycin or the status epilepticus caused by intra-amygdala injection of kainic acid [41]. This neuronal ATF5 induction is believed to be neuroprotective as ATF5 overexpression attenuates ER stress-induced apoptosis in neurons [41].

Huntington's disease (HD) is the most common genetically determined neurodegenerative disease and belongs to the group of neurological disorders caused by expanded CAG triplet repeats encoding self-aggregating poly-glutamine (polyQ) tracts in their respective proteins [33]. HD is characterized by marked atrophy in the caudate and putamen and to a lesser extent in the cortex and by the presence of polyQ-containing inclusions bodies (IBs). ER stress activation and/or impairment is a common feature of most neurodegenerative diseases including HD [18] and we and others have previously reported impaired UPR execution in HD due to diminished processing of ATF6 [11, 30]. In view of the putative neuroprotective role of ATF5 upon ER stress induction and its constitutive expression in mouse adult neurons [41], we decided to explore the status of ATF5 in HD mouse models and human tissue.

## Materials and methods

### Human brain tissue samples

Brain specimens used in this study from frontal cortex and striatum of HD patients and controls were provided by Institute of Neuropathology (HUB-ICO-IDIBELL) Brain Bank (Hospitalet de Llobregat, Spain), the Neurological Tissue Bank of the IDIBAPS Biobank (Barcelona, Spain), the Banco de Tejidos Fundación Cien (BT-CIEN, Madrid,

Spain), and the Netherlands Brain Bank (Amsterdam, The Netherlands). Written informed consent for brain removal after death for diagnostic and research purposes was obtained from brain donors and/or next of kin. Procedures, information and consent forms have been approved by the Bioethics Subcommittee of Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC, Madrid, Spain). When available, the neuropathological examination of HD cases to assign HD grade from 0–1 to 4 following Vonsattel's criteria, and the number of CAG repeats is shown in Supplementary Table 1. The postmortem interval in tissue processing is also indicated in Supplementary Table 1.

### Mice

R6/1 transgenic mice for the human *exon-1-HTT* gene [23] in B6CBAF1 background were housed at the Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” animal facility. Mice were housed four per cage with food and water available ad libitum and maintained in a temperature-controlled environment on a 12/12 h light–dark cycle with light onset at 0800 hours. Animal housing and maintenance protocols followed the guidelines of Council of Europe Convention ETS123. Animal experiments were performed under protocols (PROEX293/15) approved by the Centro de Biología Molecular Severo Ochoa Institutional Animal Care and Utilization Committee (Comité de Ética de Experimentación Animal del CBM, CEEA-CBM), Madrid, Spain.

### *Caenorhabditis elegans*

The standard methods used for culturing and maintenance of *C. elegans* were as previously described [40]. The strains used in this work are: N2, *wild type DR subclone of CB original (Tc1 pattern I)*, LD1325, *atf-5(tm4397) X* [12], VZ531 = *vzEx173 [Punc-54::Q40::yfp]*, VZ533 = *vzEx175 [Punc-54::Q40::yfp]*, VZ534 = *atf-5(tm4397) X*; *vzEx173 [Punc-54::Q40::yfp]* and VZ535 = *atf-5(tm4397) X*; *vzEx175 [Punc-54::Q40::yfp]*. All experiments were performed at 20 °C unless otherwise noted. All VZ strains are 6 $\times$  backcrossed and LD1325 is 7 $\times$  backcrossed with N2 *wild type*.

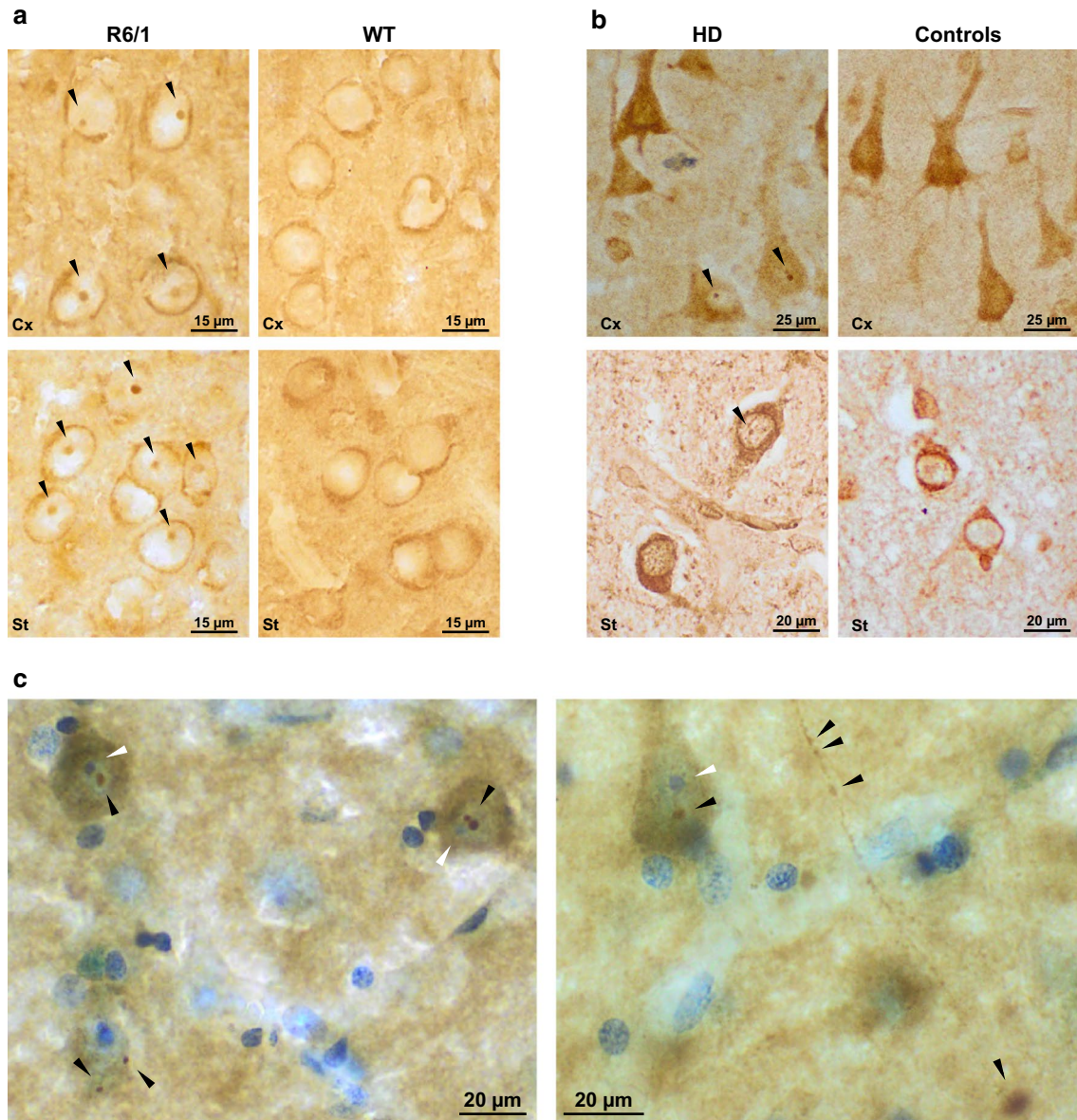
### Cell culture and transfection

Neuro-2a neuroblastoma cells were cultured in 10% FBS (GIBCO) supplemented DMEM at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The day before transfection 3  $\times$  10<sup>5</sup> cells per condition were placed in a six well plate (Falcon), with or without glass coverslips, and allowed to attach to the plate. N2a cells were transfected (Lipofectamine 2000, Thermo Fisher) with the following construct combinations: PolyQ16 and pcDNA3; PolyQ94 and pcDNA3;

PolyQ94 and pcDNA3-MYC-mATF5; PolyQ94 and p3XFlag-CMV10-Flag-mMcl-1. PolyQ16, PolyQ94, pcDNA3-MYC-mATF5 and p3XFlag-CMV10-Flag-mMcl-1 plasmids were previously described [25, 39, 41]. After transfection for 48 h, the transfected cells were used for subsequent assays.

### Tissue preparation

For human samples, formalin-fixed (4%, 24 h), paraffin-embedded tissue from cortex and striatum were used. Sections (5- $\mu$ m thick) were mounted on superfrost-plus tissue slides (Menzel-Gläser) and deparaffinized. Peroxidase activity was quenched with 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in methanol for 30 min,



**Fig. 1** As in rodents, ATF5 is expressed by adult human neurons and it accumulates in the characteristic HD nuclear inclusions in both species. **a** Immunohistochemistry with ATF5 antibody in cortex (Cx; top) and striatum (St; bottom) of 3.5 month-age R6/1 and wild-type (WT) mice. *Black arrowheads* in R6/1 panels (left) show ATF5 accumulation into inclusion bodies in Cx and St. **b** Immunohistochemistry with ATF5 antibody in Cx (top) and St (bottom) postmortem tissue of HD patients and control subjects. *Black arrowheads* in HD panels

(left) show ATF5 accumulation into inclusion bodies in Cx and St. **c** ATF5 immunohistochemistry and nuclear counterstaining in Cx post-mortem tissue of HD patients. *Black arrowheads* indicate that ATF5 can be found not only in nuclear inclusions (both panels) but also in cytoplasmic inclusions in the soma (left panel), in neuritic inclusions (right panel), and in neuropil inclusions (right panel). *White arrowheads* point to nucleoli to show that they are not coincident with the nuclear inclusions



followed by antigen retrieval with 10 mM pH 6.0 citrate buffer heated by microwave for 15 min.

Mice euthanasia was performed using CO<sub>2</sub>. Brains were immediately removed and dissected on an ice-cold plate and left hemispheres, processed for histology, placed in 4% paraformaldehyde in Sorensen's phosphate buffer overnight and then immersed in 30% sucrose in PBS for 72 h. Once cryoprotected, samples were included in optimum cutting temperature (OCT) compound (Tissue-Tek, Sakura Finetek Europe, ref. 4583), frozen and stored at −80 °C before use. 30 μm sagittal sections were cut on a cryostat (Thermo Scientific), collected and stored free floating in glycol containing buffer (30% glycerol, 30% ethylene glycol in 0.02 M phosphate buffer) at −20 °C.

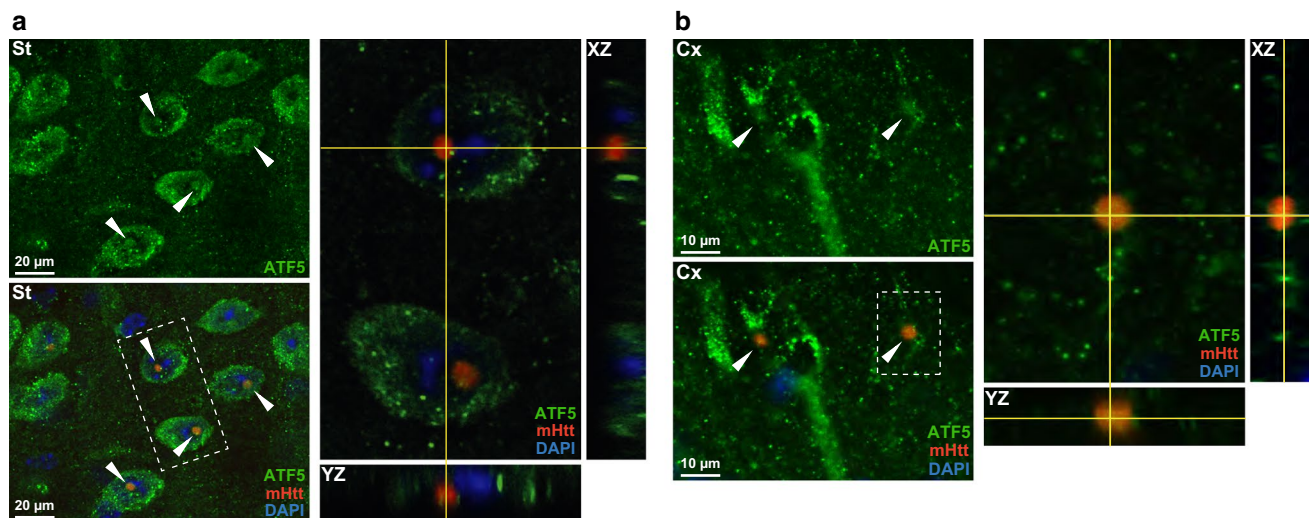
### Immunohistochemistry and immunofluorescence

*For immunohistochemical staining*, sections were first washed with PBS and immersed in 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS for 45 min to quench endogenous peroxidase activity. Sections were then immersed for 1 h in blocking solution (PBS containing 0.5% Fetal Bovine Serum, 0.3% Triton X-100 and 1% BSA) and incubated overnight at 4 °C with rabbit anti-ATF5 (1:1000, AVIVA, ARP30970) diluted in blocking solution. After washing, brain sections were incubated first with biotinylated goat anti-rabbit secondary antibody and then with avidin–biotin complex using the Elite Vectastain kit (Vector Laboratories, PK-6101-2). Chromogen reactions were performed with diaminobenzidine (SIGMA-FAST DAB, Sigma, D4293) for 10 min. Mouse sections

were mounted on glass slides and coverslipped with Mowiol (Calbiochem, Cat. 475904) while human sections were first dehydrated and then mounted with DePex (SERVA). Images were captured using an Olympus BX41 microscope with an Olympus camera DP-70 (Olympus Denmark A/S).

*For immunofluorescence*, brain sections and N2a coverslips were pretreated with 0.1% Triton X-100 for 30 min, 1 M glycine for 15 min and blocking solution (1% BSA, 0.3% FBS and 0.1% Triton X-100) for 1 h. Sections were then incubated overnight at 4 °C with rabbit anti-ATF5 (1:1000, AVIVA, ARP30970) and goat anti-huntingtin (1:200, N-18 Santa Cruz, sc-8767) in blocking solution.

The following day, sections were washed in PBS and incubated with secondary antibodies for 1 h: anti-goat Alexa 555 (1:500, ThermoFisher, A-21432) and anti-rabbit Alexa 488 (1:500, ThermoFisher, A-21206). After washing, nuclei were counterstained with DAPI (1:5000, Calbiochem, 28718-90-3) for 3 min. Finally, sections were mounted on glass slides, coverslipped with Mowiol (Calbiochem, 475904) and maintained at 4 °C. N2a coverslips were co-incubated with rabbit anti-cleaved caspase 3 (1:100, Cell Signaling, 9579) and goat anti-ATF5 (1:1000, Santa Cruz, sc-377168) for 1 h at room temperature. Coverslips were then washed with PBS and co-incubated with anti-goat Alexa 555 (A-21432) and anti-rabbit Alexa 647 (A-31573) for 1 h. Nuclei were counterstained as with tissue sections. Coverslips were mounted in FluorSave (Calbiochem, Merck KGaA). Images were acquired with a laser confocal LSM710 system coupled to the invert Axioobserver microscope with a 63×, 1.4 numerical aperture oil-immersion objective using



**Fig. 2** ATF5-positive neuronal nuclear inclusions colocalize with the characteristic polyQ-containing inclusions in HD mice and human tissue. Double immunofluorescence with ATF5 (green) and HTT (EM48, red) antibodies in St of 3.5 month-age R6/1 mice (a) and in Cx of HD patients (b). White arrowheads show ATF5 positive intra-

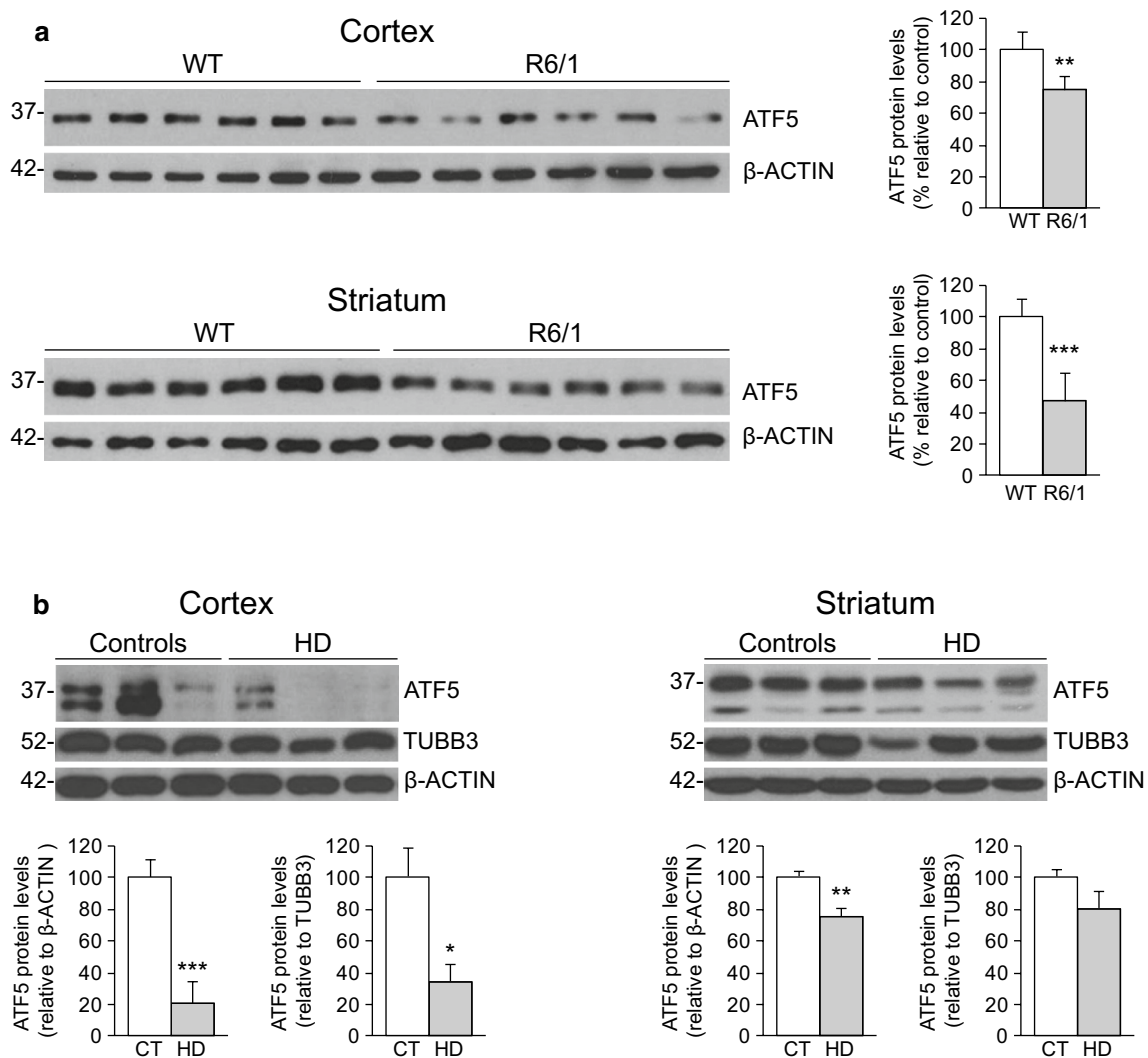
nuclear inclusion bodies. Dashed lines delimit the regions taken for magnification and colocalization analysis. Orthogonal images (right panels) show colocalization of ATF5 and mHTT immunofluorescence projected in YZ and XZ axis. Nuclei were counterstained with DAPI (blue)

the Zen2010B sp1 software (Carl Zeiss). Sequential optic sections (1  $\mu$ m) were acquired in z stacks. Images were processed using ImageJ 1.45s.

### Western blot

Samples from human brain were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  and ground with a mortar in a frozen environment with liquid nitrogen to prevent thawing of the samples, resulting in tissue powder. Mouse brains were quickly dissected on an ice-cold plate and the different structures stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Human and mouse protein extracts were prepared by homogenizing brain structures in ice-cold extraction buffer [20 mM HEPES pH 7.4, 100 mM NaCl,

20 mM NaF, 1% Triton X-100, 1 mM sodium orthovanadate, 1  $\mu$ M okadaic acid, 5 mM sodium pyrophosphate, 30 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 5 mM EDTA, protease inhibitors (Complete, Roche, Cat. No 11697498001)]. Homogenates were centrifuged at 15,000 rpm for 15 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . The resulting supernatant was collected, and protein content determined by Quick Start Bradford Protein Assay (Bio-Rad, 500-0203). 20  $\mu$ g of total protein were electrophoresed on 10% SDS–polyacrylamide gel, transferred to a nitrocellulose blotting membrane (Amersham Protran 0.45  $\mu$ m, GE Healthcare Life Sciences, 10600002) and blocked in TBS-T (150 mM NaCl, 20 mM Tris–HCl, pH 7.5, 0.1% Tween 20) supplemented with 5% non-fat dry milk. Membranes were incubated overnight



**Fig. 3** Decreased ATF5 levels in striatum and cortex of HD mouse model and human tissue. **a** Representative western blots of ATF5 protein levels in Cx and St of 3.5 month-age R6/1 mice ( $n = 9$ ) and WT mice ( $n = 9$ ). **b** Representative western blots of ATF5 protein levels in Cx and St of HD patients ( $n = 9$ ) compared to their respective con-

trols ( $n = 9$ ). ATF5 is normalized by  $\beta$ -ACTIN in all samples and also by TUBB3 in human samples. Histograms show quantification of ATF5 protein abundance with respect to control (Student's  $t$  test; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ). Data represent mean  $\pm$  SEM

at 4 °C with either rabbit anti-ATF5 (1:1000, AVIVA, ARP30970), rabbit anti-MCL1 (1:1000, Santa Cruz, sc-819), mouse anti-TUBB3 (1:5000; Novus Biologicals, NB120-11314) or mouse anti- $\beta$ -ACTIN (1:50,000, SIGMA, A2066) in TBS-T supplemented with 5% non-fat dry milk, washed with TBS-T and next incubated with HRP-conjugated anti-rabbit IgG (1:2000, DAKO, P0448) and developed using the ECL detection kit (PerkinElmer, NEL105001EA).

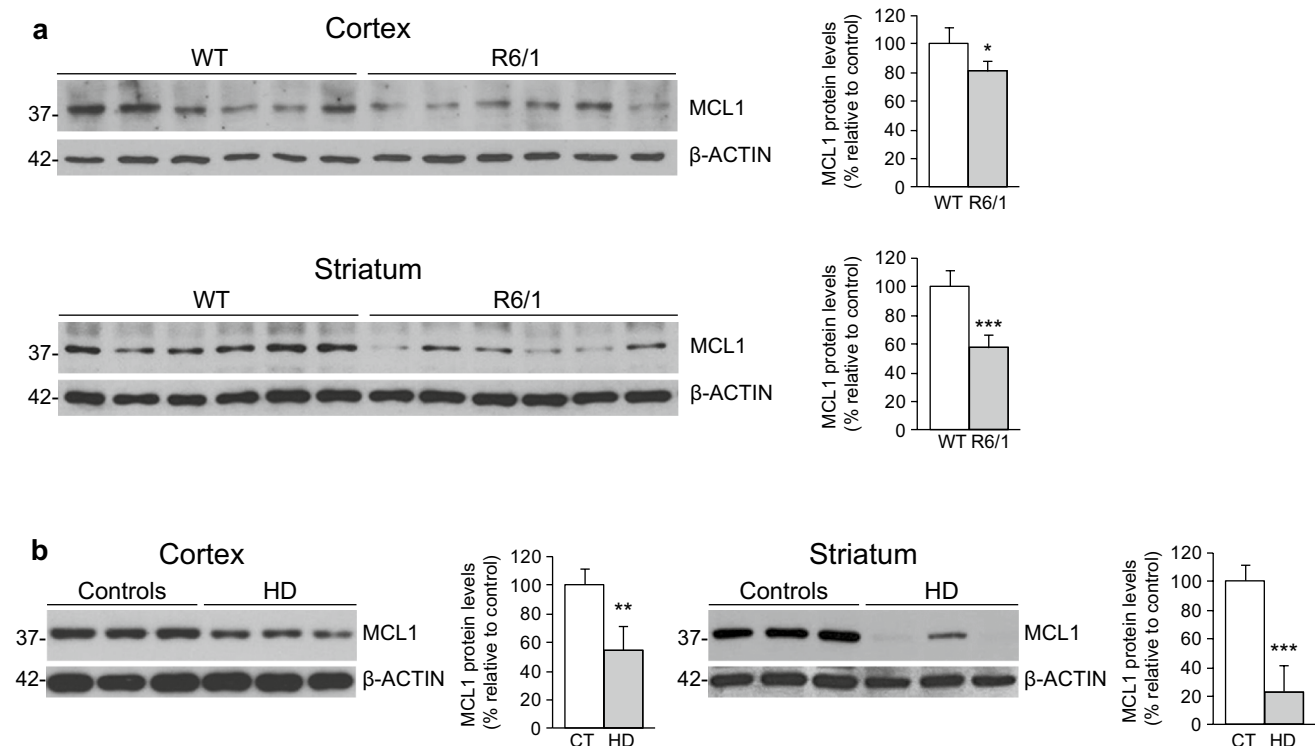
### Data analysis

Statistical analysis was performed with SPSS 21.0 (SPSS® Statistic IBM®). Data are represented as Mean  $\pm$  SEM (standard error of the mean). The normality of the data was analyzed by Shapiro–Wilk or Kolmogorov–Smirnov tests. For two-group comparison, two-tailed *t* Student's test was performed. For multiple comparisons, data were analyzed by one way-ANOVA test followed by an LSD or a Games–Howell post hoc test. A critical value for significance of  $p < 0.05$  was used throughout the study.

## Results

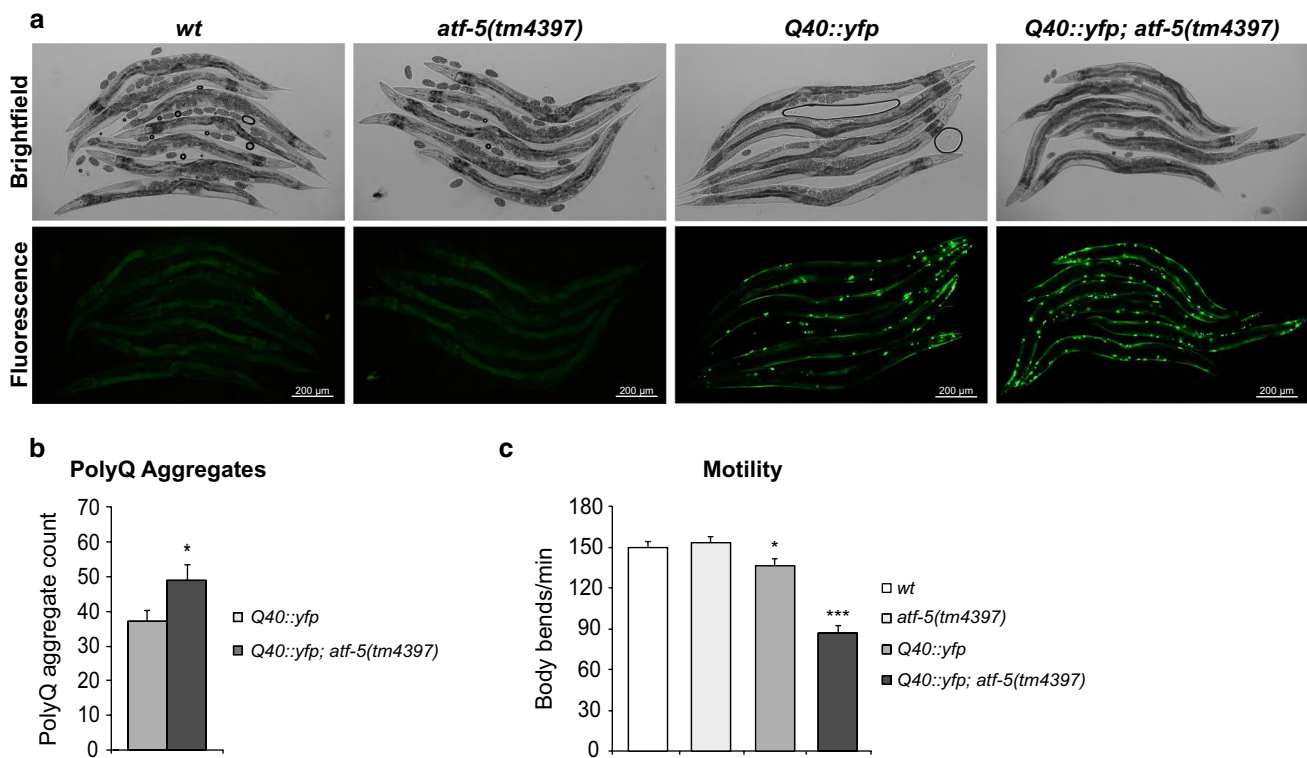
### ATF5 is sequestered into neuronal polyQ inclusions in HD mouse model and human tissue

We first performed ATF5 immunohistochemistry (IHC) on brain sections from an HD mouse model and matching wild type mice. More precisely, we analyzed the widely used R6/1 transgenic mouse model of expanded CAG/polyQ disease that ubiquitously expresses N-terminal huntingtin (*HTT*) with 115 CAG repeats [23]. Cortex and striatum were analyzed as these are the most affected brain regions in HD and the most salient feature was the bold accumulation of ATF5 immunoreactivity in neuronal nuclear inclusion bodies (IBs) in both brain regions of R6/1 but not in wild type mice (Fig. 1a). Interestingly, this accumulation of ATF5 in IBs of R6/1 mice is an early event as it can be observed from an early-symptomatic age (3.5 months). We then performed ATF5 IHC on human HD and control tissue which for the first time demonstrated expression of ATF5 in human adult neurons (Fig. 1b) in line with our previous observations in mouse tissue [41]. Furthermore, ATF5 immunostaining also confirmed accumulation of ATF5 into neuronal nuclear



**Fig. 4** Decreased levels of the antiapoptotic protein MCL1 in striatum and cortex of HD mouse model and human tissue. **a** Representative western blots of MCL1 protein levels in Cx and St of 3.5 month-age R6/1 mice ( $n = 7$ ) and WT mice ( $n = 7$ ). **b** Representative western blots of MCL1 protein levels in Cx and St of HD patients

( $n = 7$ ) compared to their respective controls ( $n = 7$ ). Histograms show quantification of MCL1 protein abundance with respect to control (Student's *t* test; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ). Data represent mean  $\pm$  SEM



**Fig. 5** Deleterious effect of ATF5 deficiency in a *C. elegans* model of polyQ toxicity. **a** Brightfield and fluorescence images of *wt*, *atf-5(tm4397)*, *Q40::yfp* and *Q40::yfp; atf-5(tm4397)* worms. **b** Quantification of the number of Q40::YFP aggregates in *Q40::yfp* and *Q40::yfp; atf-5(tm4397)* animals ( $n = 20$ ; Student's *t*

test;  $*p < 0.05$ ). **c** Quantification of the number of body bends/min in *wt*, *atf-5(tm4397)*, *Q40::yfp* and *Q40::yfp; atf-5(tm4397)* worms ( $n = 20$ ). Analysis of variance (ANOVA), followed by minimum significant difference or Games–Howell,  $*p < 0.05$ ,  $***p < 0.001$ . Data represent mean  $\pm$  SEM

aggregates that resemble the characteristic polyQ IBs in HD brains (Fig. 1b). Apart from nuclear inclusions, HD patients also show inclusions in the soma and neurites and, interestingly, ATF5 can also be found in cytoplasmic inclusions in the soma, in neuritic inclusions, and in neuropil inclusions (Fig. 1c).

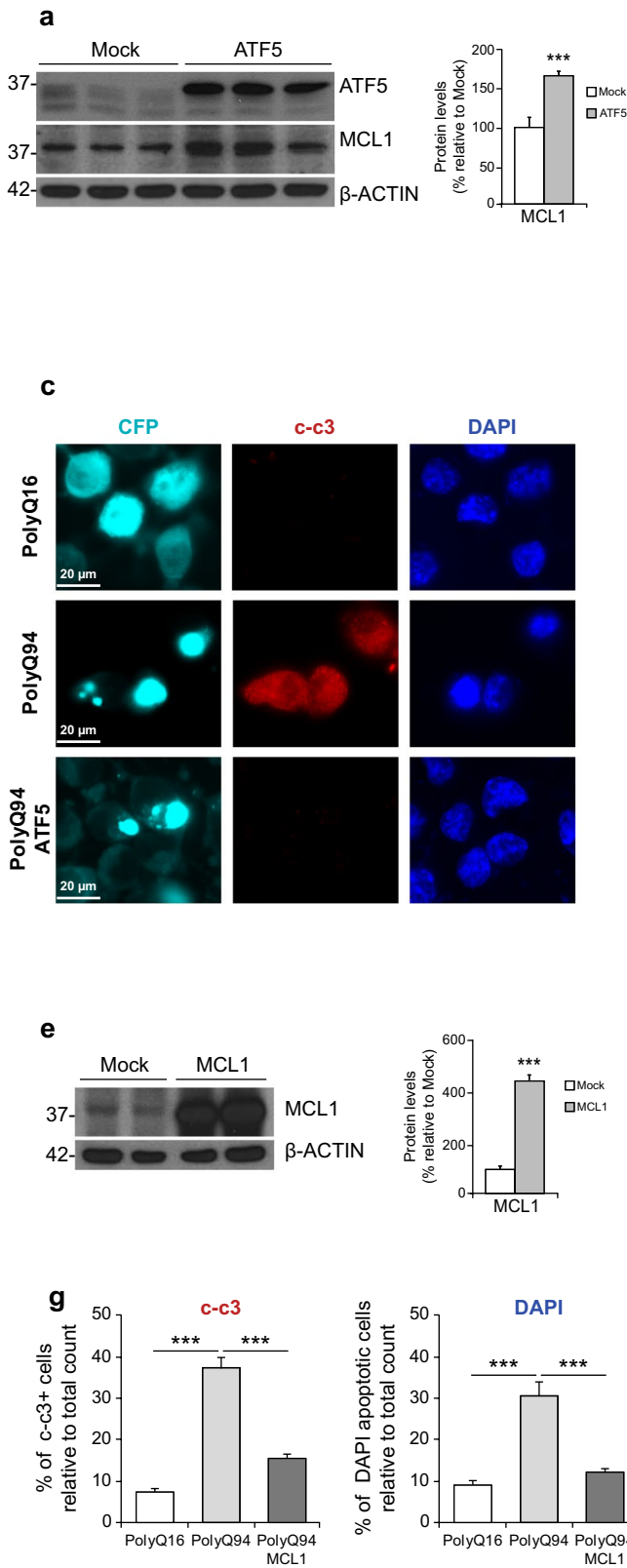
To confirm that ATF5 is in fact being sequestered into the polyQ-containing neuronal nuclear IBs, we performed double immunofluorescence with antibodies against ATF5 and N-terminal mutant HTT (mHTT). As shown in Fig. 2, ATF5-positive nuclear inclusions colocalized with mHTT nuclear inclusions both in R6/1 mouse tissue (Fig. 2a) (Pearson correlation coefficient = 0.7) and in human HD tissue (Fig. 2b) (Pearson correlation coefficient = 0.78).

#### Decreased ATF5 levels in striatum and cortex of HD mouse model and human tissue

We then performed Western blot analysis to test whether accumulation of ATF5 within mHTT IBs correlates with decreased levels of soluble monomeric ATF5. We

decided to analyze R6/1 mice at the age of 3.5 months when they are pre- or early-symptomatic with very little striatal atrophy and neuronal loss [22] and we observed a 40.5% reduction of ATF5 levels in the striatum respect to wild type ( $p = 0.0003$ ) (Fig. 3a). In cortex of R6/1 mice, we also observed a significant although less pronounced decrease in the levels of ATF5 (18.9% decrease,  $p < 0.05$ ) (Fig. 3a). In HD patient postmortem brains, we also observed decreased ATF5 levels both in cortex and caudate/putamen, with respect to samples from control subjects (Fig. 3b). In this case, the decrease was more pronounced and more significant in cortex (78.5% decrease,  $p = 0.0001$ ) than in striatal nuclei (24.7% decrease,  $p = 0.006$ ). Since HD patient postmortem striatum do show significant neuronal loss, we decided to normalize the levels of ATF5 to the level of the neuronal marker beta-III tubulin (TUBB3) [4]. When applying this correction for the effect of neuronal loss, the ATF5 decrease is still significant in cortex (66.2% decrease,  $p = 0.04$ ) while only a tendency in striatum. This suggests that, at least in part, neuronal loss contributes to the decreased striatal ATF5 levels observed respect to total protein content.





**Fig. 6** ATF5 protects against polyQ-induced apoptosis in a cell model of HD. **a** Representative western blot of ATF5 and MCL1 protein levels upon pcDNA-MYC-mATF5 (ATF5) transfection of N2a neuroblastoma cells. The histogram shows the abundance of MCL1 protein in transfected cells with respect to the control (Mock) ( $n = 6$ ; Student's  $t$  test). **b** Immunofluorescence analysis of ATF5 pattern in N2a cells transfected with toxic PolyQ94-CFP only (PolyQ94) or in combination with ATF5 (PolyQ94 and ATF5) shows accumulation of ATF5 within polyQ-containing inclusions (yellow arrowheads) in both paradigms and that ATF5 overexpression results also in increased diffuse ATF5 staining in PolyQ94 and ATF5. **c** Apoptosis induction analysis by immunofluorescence of cleaved caspase-3 (c-c3) and nuclear morphology (DAPI) in N2a cells transfected with either PolyQ16, PolyQ94 or PolyQ94 and ATF5. **d** Quantification of apoptotic cell death in N2a cells transfected with either PolyQ16, PolyQ94 or PolyQ94 and ATF5 with respect to the total number of cells counted ( $n = 300$ ). Analysis of variance (ANOVA), followed by minimum significant difference or Games–Howell. **e** Western blot analysis of MCL1 protein levels upon p3XFlag-CMV10-Flag-mMcl-1 (MCL1) transfection of N2a cells. The histogram shows the abundance of MCL1 protein in transfected cells with respect to the control (Mock) ( $n = 2$ ; Student's  $t$  test). **f** Apoptosis induction analysis by immunofluorescence of cleaved caspase-3 (c-c3) and nuclear morphology (DAPI) in N2a cells transfected with either PolyQ16, PolyQ94 or PolyQ94 and MCL1. **g** Quantification of apoptotic cell death in N2a cells transfected with either PolyQ16, PolyQ94 or PolyQ94 and MCL1 with respect to the total number of cells counted ( $n = 700$ ). Analysis of variance (ANOVA), followed by minimum significant difference or Games–Howell,  $*p < 0.05$ ,  $***p < 0.001$ . Data represent mean  $\pm$  SEM

### Decreased levels of the antiapoptotic ATF5 target MCL1 in striatum and cortex of HD mouse model and human tissue

We then wondered whether decreased levels of ATF5 would correlate with decreased levels of its target MCL1 which has been proposed to play an important role in the antiapoptotic actions of ATF5 [19, 37]. For this, we performed Western blot analysis of MCL1 on HD mouse model and human tissue samples. As expected, a marked decrease in MCL1 levels was observed in striatum (53.1% decrease,  $p < 0.0001$ ) and in cortex (47.4% decrease,  $p = 0.016$ ) of 3.5 month old R6/1 mice with respect to age-matched wild type controls (Fig. 4a). Similar results of decreased MCL1 levels were also observed in striatum (77.7% decrease,  $p < 0.0001$ ) and cortex (55% decrease,  $p = 0.002$ ) of HD patients respect to control subjects (Fig. 4b).

### Deleterious effect of ATF5 deficiency in a *C. elegans* model of polyQ toxicity

To gain insight into the potential deleterious effect of decreased ATF5 in an in vivo context of polyQ-induced toxicity, we moved to the nematode model *C. elegans*. Specifically, we used a *C. elegans* strain that carries the

transgene *vzEx173 [Punc-54::Q40::yfp]* resulting in the expression of a fusion protein Q40::YFP in worm muscle cells (*Q40::yfp* expression is controlled by the *unc-54* myosin heavy chain gene promoter), causing an age-dependent aggregation phenotype whose readout is a progressive motility deficit [29]. Thus, we generated worms expressing the *vzEx173 [Punc-54::Q40::yfp]* transgene in an *atf-5(tm4397)* null mutant background and found that lack of *atf-5* causes an increase in the number of Q40::YFP aggregates (Fig. 5a, b). Interestingly, while *atf-5* deficiency does not provoke any motility defect in otherwise wild type worms, we found a marked decrease in motility when the *atf-5* mutation was introduced in the Q40::YFP expressing background (Fig. 5c). Similar results were obtained when using another independent transgene *vzEx175 [Punc-54::Q40::yfp]* (data not shown). Together, these results indicate that decreased ATF5 levels exacerbate polyQ-toxicity in vivo.

### ATF5 protects from polyglutamine-induced apoptosis in a cell model of HD

The decreased levels of ATF5 and of its antiapoptotic target MCL1 in the brain of the R6/1 HD mouse model and patients, together with the deleterious effect of *atf-5* deficiency in polyQ-expressing *C. elegans* strains, suggest that increasing ATF5 levels might be beneficial through attenuation of polyQ-induced apoptosis. To test this, we performed experiments on N2a neuroblastoma cells.

First, we verified that transfection of an ATF5 expression vector increased both ATF5 and MCL1 protein levels (Fig. 6a). Then, we verified that transfection of mHTT fused to CFP (PolyQ94), but not wild type N-terminal HTT fused to CFP (PolyQ16), resulted in IB formation (Fig. 6b, c) and in polyQ-induced apoptosis as evidenced by cleaved caspase-3 immunofluorescence or by DAPI nuclear counterstaining (Fig. 6c, d). Co-transfection of ATF5 with PolyQ94 resulted in increased diffuse ATF5 levels despite accumulation of ATF5 within polyQ inclusions (Fig. 6b). Besides, we observed that the incidence of apoptosis in PolyQ94 + ATF5 cells was much lower than in PolyQ94 cells and comparable to that in PolyQ16 cells (Fig. 6c, d), thus demonstrating that ATF5 overexpression is protective against polyQ-induced apoptosis. We also assayed the effect of the sole overexpression of MCL1 on polyQ94-induced apoptosis. As shown in Fig. 6e–g, MCL1 overexpression by itself also significantly reduced the rate of apoptosis induced by PolyQ94 to levels comparable to those in PolyQ16 cells. This confirms that the increased MCL1 levels induced by ATF5 overexpression contribute to the neuroprotective effect of ATF5.

## Discussion

Here we first report accumulation of ATF5 within the characteristic neuronal polyQ-containing IBs in the brain of HD mice starting at early-symptomatic ages and also in postmortem human HD brain tissue. This sequestration of ATF5 into IBs correlates with a decrease in the level of soluble ATF5 in both mouse and human HD tissue and with decreased levels of the antiapoptotic ATF5 target MCL1. Here we also analyze a nematode model of polyQ-induced toxicity which confirmed the deleterious effect of ATF5 deficiency. Finally, we show that ATF5 overexpression attenuates polyQ-induced apoptosis in a neuroblastoma cell model of HD. Together these results indicate that decreased levels of ATF5 in HD brain—probably secondary to its sequestration into polyQ IBs—render neurons more vulnerable to mutant huntingtin-induced apoptosis.

We have previously shown that, contrary to the previous notion of adult neurons not expressing ATF5 [14], adult mice do show steady state levels of ATF5 expression in neurons [41]. Now, by showing ATF5 accumulation into neuronal IBs in human HD brain together with the diffuse ATF5 immunostaining in neurons of control and HD brains, we here extend to humans the previous observation of ATF5 being expressed by adult neurons.

There are different possible mechanisms by which ATF5 could accumulate into polyQ-containing IBs in brains of HD patients and mouse models. For instance, it is known that many transcription factors bind expanded polyQ stretches and are often found sequestered into IBs [32]. These include CREB-binding protein (CBP), SP1, TBP, p53 [32] and many others such as the bZIP transcription factor C/EBP $\alpha$  [8]. Since bZIP containing transcription factors have the ability to form heterodimers [15], it is possible that ATF5 could reach the polyQ IBs through indirect interaction with any of the transcription factors previously reported to accumulate into polyQ IBs. Alternatively, it is known that ATF5 has by itself propensity to aggregate in vitro [5, 6]. It is therefore possible that ATF5 could self-aggregate in vivo in pathological conditions such as HD in which proteostasis and quality control mechanisms are compromised [7, 34, 44]. Such ATF5 microaggregates could then coalesce into mature IBs [21] such as those containing other polyQ-driven aggregates.

We have mentioned that the decrease in soluble ATF5 might be secondary to its sequestration into IBs. An indicator in favor of this possibility is that the decrease in ATF5 protein levels in brain of HD mice and patients takes place without a matching decrease in its mRNA levels (data not shown). Therefore, the decrease in protein levels will most likely be secondary to decreased translation or to diminished half-life of the soluble protein, for instance because

it gets aggregated. In fact, there are multiple examples of proteins whose sequestration into polyQ-IBs correlates with decreased soluble levels and loss of function [13, 26].

Regardless of the mechanism by which it takes place, we here provide evidence of decreased ATF5 being deleterious, probably, because it contributes to a deficient execution of the UPR in HD in line with the previously reported deficient processing of ATF6 in HD patients and mouse models [11, 30]. Such deficient UPR execution will have proapoptotic effect as we show here that it is paralleled by a decrease in the levels of MCL1, a well-established target of ATF5 with antiapoptotic actions. Therefore, in line with the here shown neuroprotective effect of ATF5 overexpression in a cell model of HD, any pharmacological intervention able to increase ATF5 levels in HD might be of therapeutic value. In this regard, salubrinal, guanabenz and sephin1 are small drugs that prolong eIF2 $\alpha$  phosphorylation by inhibiting PPP1R15A (GADD34) and therefore modulate the UPR [9, 42]. Accordingly, salubrinal increases ATF5 levels in primary neuronal cultures [41] and it has been shown to attenuate cell death induced by the ER stress inducer tunicamycin [41] and also by N-terminal mutant HTT [36]. This suggests that salubrinal or any other of the PPP1R15A inhibitors might be beneficial in HD. However, there might also be unwanted effects as in vivo administration of salubrinal has been reported to increase toxicity in a mouse model of prion-induced neurodegeneration [28].

In summary, here we report that reduced levels of ATF5 in brain of HD patients, probably due to its sequestration into the characteristic PolyQ containing neuronal IBs, correlates with decreased levels of the antiapoptotic protein MCL1, a transcriptional target of ATF5. We also provide evidence of decreased ATF5 being deleterious by rendering neurons more vulnerable to polyQ-induced apoptosis, thus suggesting that ATF5-increasing pharmacological interventions might open future therapeutic opportunities for HD.

**Acknowledgements** This work was supported by CiberNed-ISCIII collaborative Grants PI2013/09-2 and PI2015-2/06-3 and by grants from Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO): SAF2009-08233 and SAF2015-65371-R to JLL, by Fundación BBVA and by Fundación Ramón Areces. Human tissue was obtained from Institute of Neuropathology (HUB-ICO-IDIBELL) Brain Bank, the Neurological Tissue Bank of the IDIBAPS Biobank, the Banco de Tejidos Fundación CIEN, and the Netherlands Brain Bank. We thank Prof. Keith Blackwell for providing the LD1325 *C. elegans* strain. We also thank excellent technical assistance by Miriam Lucas and by the following core facilities: CBMSO-Genomics and Massive Sequencing and CBMSO-Animal Facility.

### Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

1. Angelastro JM, Canoll PD, Kuo J, Weicker M, Costa A, Bruce JN, Greene LA (2006) Selective destruction of glioblastoma cells by interference with the activity or expression of ATF5. *Oncogene* 25:907–916
2. Angelastro JM, Ignatova TN, Kukekov VG, Steindler DA, Stengren GB, Mendelsohn C, Greene LA (2003) Regulated expression of ATF5 is required for the progression of neural progenitor cells to neurons. *J Neurosci* 23:4590–4600
3. Angelastro JM, Mason JL, Ignatova TN, Kukekov VG, Stengren GB, Goldman JE, Greene LA (2005) Downregulation of activating transcription factor 5 is required for differentiation of neural progenitor cells into astrocytes. *J Neurosci* 25:3889–3899
4. Caccamo DV, Herman MM, Frankfurter A, Katsetos CD, Collins VP, Rubinstein LJ (1989) An immunohistochemical study of neuropeptides and neuronal cytoskeletal proteins in the neuroepithelial component of a spontaneous murine ovarian teratoma. Primitive neuroepithelium displays immunoreactivity for neuropeptides and neuron-associated beta-tubulin isotype. *Am J Pathol* 135:801–813
5. Ciaccio NA, Laurence JS (2009) Effects of disulfide bond formation and protein helicity on the aggregation of activating transcription factor 5. *Mol Pharm* 6:1205–1215
6. Ciaccio NA, Reynolds TS, Middaugh CR, Laurence JS (2012) Influence of the valine zipper region on the structure and aggregation of the basic leucine zipper (bZIP) domain of activating transcription factor 5 (ATF5). *Mol Pharm* 9:3190–3199
7. Cortes CJ, La Spada AR (2014) The many faces of autophagy dysfunction in Huntington's disease: from mechanism to therapy. *Drug Discov Today* 19:963–971
8. Chiang MC, Chen HM, Lee YH, Chang HH, Wu YC, Soong BW, Chen CM, Wu YR, Liu CS, Niu DM et al (2007) Dysregulation of C/EBPalpha by mutant huntingtin causes the urea cycle deficiency in Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 16:483–498
9. Das I, Krzyzosiak A, Schneider K, Wrabetz L, D'Antonio M, Barry N, Sigurdardottir A, Bertolotti A (2015) Preventing proteostasis diseases by selective inhibition of a phosphatase regulatory subunit. *Science (New York, NY)* 348:239–242
10. Dluzen D, Li G, Tselosky D, Moreau M, Liu DX (2011) BCL-2 is a downstream target of ATF5 that mediates the prosurvival function of ATF5 in a cell type-dependent manner. *J Biol Chem* 286:7705–7713
11. Fernandez-Fernandez MR, Ferrer I, Lucas JJ (2011) Impaired ATF6alpha processing, decreased Rheb and neuronal cell cycle re-entry in Huntington's disease. *Neurobiol Dis* 41:23–32
12. Ferraz RC, Camara H, De-Souza EA, Pinto S, Pinca AP, Silva RC, Sato VN, Castilho BA, Mori MA (2016) IMPACT is a GCN2 inhibitor that limits lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *BMC Biol* 14:87. doi:10.1186/s12915-016-0301-2
13. Fujita K, Nakamura Y, Oka T, Ito H, Tamura T, Tagawa K, Sasabe T, Katsuta A, Motoki K, Shiwaku H et al (2013) A functional deficiency of TERA/VCP/p97 contributes to impaired DNA repair in multiple polyglutamine diseases. *Nat Commun* 4:1816
14. Greene LA, Lee HY, Angelastro JM (2009) The transcription factor ATF5: role in neurodevelopment and neural tumors. *J Neurochem* 108:11–22
15. Hai T, Hartman MG (2001) The molecular biology and nomenclature of the activating transcription factor/cAMP responsive element binding family of transcription factors: activating transcription factor proteins and homeostasis. *Gene* 273:1–11
16. Hatano M, Umemura M, Kimura N, Yamazaki T, Takeda H, Nakano H, Takahashi S, Takahashi Y (2013) The 5'-untranslated region regulates ATF5 mRNA stability via nonsense-mediated mRNA decay in response to environmental stress. *FEBS J* 280:4693–4707
17. Hetz C (2012) The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13:89–102
18. Hetz C, Mollereau B (2014) Disturbance of endoplasmic reticulum proteostasis in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 15:233–249
19. Izumi S, Saito A, Kanemoto S, Kawasaki N, Asada R, Iwamoto H, Oki M, Miyagi H, Ochi M, Imaizumi K (2012) The endoplasmic reticulum stress transducer BBF2H7 suppresses apoptosis by activating the ATF5-MCL1 pathway in growth plate cartilage. *J Biol Chem* 287:36190–36200
20. Karpel-Massler G, Horst BA, Shu C, Chau L, Tsujiuchi T, Bruce JN, Canoll P, Greene LA, Angelastro JM, Siegelin MD (2016) A synthetic cell-penetrating dominant-negative ATF5 peptide exerts anticancer activity against a broad spectrum of treatment-resistant cancers. *Clin Cancer Res* 22:4698–4711
21. Kopito RR (2000) Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol* 10:524–530
22. Li JY, Popovic N, Brundin P (2005) The use of the R6 transgenic mouse models of Huntington's disease in attempts to develop novel therapeutic strategies. *NeuroRx J Am Soc Exp NeuroTher* 2:447–464. doi:10.1602/neurorx.2.3.447
23. Mangiarini L, Sathasivam K, Seller M, Cozens B, Harper A, Hetherington C, Lawton M, Trotter Y, Lehrach H, Davies SW et al (1996) Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* 87:493–506
24. Mason JL, Angelastro JM, Ignatova TN, Kukekov VG, Lin G, Greene LA, Goldman JE (2005) ATF5 regulates the proliferation and differentiation of oligodendrocytes. *Mol Cell Neurosci* 29:372–380
25. Maynard CJ, Bottcher C, Ortega Z, Smith R, Florea BI, Diaz-Hernandez M, Brundin P, Overkleeft HS, Li JY, Lucas JJ et al (2009) Accumulation of ubiquitin conjugates in a polyglutamine disease model occurs without global ubiquitin/proteasome system impairment. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:13986–13991
26. McCampbell A, Taylor JP, Taye AA, Robitschek J, Li M, Walcott J, Merry D, Chai Y, Paulson H, Sobue G et al (2000) CREB-binding protein sequestration by expanded polyglutamine. *Hum Mol Genet* 9:2197–2202
27. Monaco SE, Angelastro JM, Szabolcs M, Greene LA (2007) The transcription factor ATF5 is widely expressed in carcinomas, and interference with its function selectively kills neoplastic, but not nontransformed, breast cell lines. *Int J Cancer* 120:1883–1890
28. Moreno JA, Radford H, Peretti D, Steinert JR, Verity N, Martin MG, Halliday M, Morgan J, Dinsdale D, Ortori CA et al (2012) Sustained translational repression by eIF2alpha-P mediates prion neurodegeneration. *Nature* 485:507–511
29. Morley JF, Brignull HR, Weyers JJ, Morimoto RI (2002) The threshold for polyglutamine-expansion protein aggregation and cellular toxicity is dynamic and influenced by aging in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:10417–10422
30. Naranjo JR, Zhang H, Villar D, Gonzalez P, Dopazo XM, Moron-Oset J, Higuera E, Oliveros JC, Arrabal MD, Prieto A et al (2016) Activating transcription factor 6 derepression mediates neuroprotection in Huntington disease. *J Clin Invest* 126:627–638
31. Nishizawa M, Nagata S (1992) cDNA clones encoding leucine zipper proteins which interact with G-CSF gene promoter element 1-binding protein. *FEBS Lett* 299:36–38
32. Okazawa H (2003) Polyglutamine diseases: a transcription disorder? *Cell Mol Life Sci* 60:1427–1439
33. Orr HT, Zoghbi HY (2007) Trinucleotide repeat disorders. *Annu Rev Neurosci* 30:575–621



34. Ortega Z, Diaz-Hernandez M, Lucas JJ (2007) Is the ubiquitin-proteasome system impaired in Huntington's disease? *Cell Mol Life Sci* 64:2245–2257
35. Persengiev SP, Devireddy LR, Green MR (2002) Inhibition of apoptosis by ATFx: a novel role for a member of the ATF/CREB family of mammalian bZIP transcription factors. *Genes Dev* 16:1806–1814
36. Reijonen S, Putkonen N, Norremolle A, Lindholm D, Korhonen L (2008) Inhibition of endoplasmic reticulum stress counteracts neuronal cell death and protein aggregation caused by N-terminal mutant huntingtin proteins. *Exp Cell Res* 314:950–960
37. Sheng Z, Li L, Zhu LJ, Smith TW, Demers A, Ross AH, Moser RP, Green MR (2010) A genome-wide RNA interference screen reveals an essential CREB3L2-ATF5-MCL1 survival pathway in malignant glioma with therapeutic implications. *Nat Med* 16:671–677
38. Shimizu YI, Morita M, Ohmi A, Aoyagi S, Ebihara H, Tonaki D, Horino Y, Iijima M, Hirose H, Takahashi S et al (2009) Fasting induced up-regulation of activating transcription factor 5 in mouse liver. *Life Sci* 84:894–902
39. Stewart DP, Koss B, Bathina M, Perciavalle RM, Bisanz K, Opferman JT (2010) Ubiquitin-independent degradation of antiapoptotic MCL-1. *Mol Cell Biol* 30:3099–3110. doi:10.1128/MCB.01266-09
40. Stiernagle T (2006) Maintenance of *C. elegans*. In: *WormBook, The C. elegans Research Community*, eds., pp 1–11. doi:10.1895/wormbook.1.101.1. <http://www.wormbook.org>
41. Torres-Peraza JF, Engel T, Martin-Ibanez R, Sanz-Rodriguez A, Fernandez-Fernandez MR, Esgleas M, Canals JM, Henshall DC, Lucas JJ (2013) Protective neuronal induction of ATF5 in endoplasmic reticulum stress induced by status epilepticus. *Brain* 136:1161–1176
42. Tsaytler P, Harding HP, Ron D, Bertolotti A (2011) Selective inhibition of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 restores proteostasis. *Science (New York, NY)* 332:91–94
43. Uekusa H, Namimatsu M, Hiwatashi Y, Akimoto T, Nishida T, Takahashi S, Takahashi Y (2009) Cadmium interferes with the degradation of ATF5 via a post-ubiquitination step of the proteasome degradation pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 380:673–678
44. Vidal R, Caballero B, Couve A, Hetz C (2011) Converging pathways in the occurrence of endoplasmic reticulum (ER) stress in Huntington's disease. *Curr Mol Med* 11:1–12
45. Vinson C, Myakishev M, Acharya A, Mir AA, Moll JR, Bonovich M (2002) Classification of human B-ZIP proteins based on dimerization properties. *Mol Cell Biol* 22:6321–6335
46. Wang H, Lin G, Zhang Z (2007) ATF5 promotes cell survival through transcriptional activation of Hsp27 in H9c2 cells. *Cell Biol Int* 31:1309–1315
47. Watatani Y, Ichikawa K, Nakanishi N, Fujimoto M, Takeda H, Kimura N, Hirose H, Takahashi S, Takahashi Y (2008) Stress-induced translation of ATF5 mRNA is regulated by the 5'-untranslated region. *J Biol Chem* 283:2543–2553
48. Watatani Y, Kimura N, Shimizu YI, Akiyama I, Tonaki D, Hirose H, Takahashi S, Takahashi Y (2007) Amino acid limitation induces expression of ATF5 mRNA at the post-transcriptional level. *Life Sci* 80:879–885
49. Zhou D, Palam LR, Jiang L, Narasimhan J, Staschke KA, Wek RC (2008) Phosphorylation of eIF2 directs ATF5 translational control in response to diverse stress conditions. *J Biol Chem* 283:7064–7073