

NOUS MECANISMES IMPLICATS EN ELS DÈFICITS TRANSCRIPCIONALS I LA PÈRDUA DEL BDNF EN LA MALALTIA DE HUNTINGTON: DESCRIPCIÓ DE NOVES DIANES TERAPÈUTIQUES

Laura Vidal Sancho

Per citar o enllaçar aquest document:

Para citar o enlazar este documento:

Use this url to cite or link to this publication:

<http://hdl.handle.net/10803/663460>

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



TESI DOCTORAL

**NOUS MECANISMES IMPLICATS EN ELS DÈFICITS
TRANSCRIPCIONALS I LA PÈRDUA DEL BDNF EN LA
MALALTIA DE HUNTINGTON: DESCRIPCIÓ DE NOVES
DIANES TERAPÈUTIQUES**

Laura Vidal Sancho

2017



TESI DOCTORAL

**NOUS MECANISMES IMPLICATS EN ELS DÈFICITS
TRANSCRIPCIONALS I LA PÈRDUA DEL BDNF EN LA
MALALTIA DE HUNTINGTON: DESCRIPCIÓ DE NOVES
DIANES TERAPÈUTIQUES**

Laura Vidal Sancho

2017

PROGRAMA DE DOCTORAT EN BIOLOGIA MOLECULAR, BIOMEDICINA I SALUT

Dirigida per:

Dr. Francesc Xavier Xifró Collsamata

Tutor:

Dr. Enric Verdú Navarro

Memòria presentada per optar al títol de doctor/a per la Universitat de Girona

A Cris i al Iaio

Per fer-me ser qui sóc. Sempre crítica, sempre humanista.

A la meva família.

Per creure en mi abans que jo ho pogués fer.

A Jon.

Per aparèixer, quedar-te i ser el meu company de vida.

Amb tu tot és possible.

De vegades es guanya, d'altres s'aprèn.

Refrany popular

Normalment no es tracta de fer possible l'impossible,

sinó de no fer impossible el possible.

Alicia Sánchez. L'ofici de viure

Agraïments

Durant diferents moments al llarg d'aquests anys he pensat en aquest moment, en el moment en que estaria gairebé tot fet i només quedaria agrair. La veritat és que mai vaig pensar que estaria tant nerviosa i emocionada per posar en paraules tot allò que gràcies a vosaltres he pogut fer i sentir.

Primer que tot, abans que agrair res vull mostrar la més profunda admiració a tota la gent que hem estat treballant aquests anys al laboratori. El treball científic, com tots sabem, és molt gratificant i emocionant però també, com tots sabem i hem experimentat, és dur i frustrant. En cada nou experiment ens enfrontem a la incertesa i la incertesa és un estat que per definició costa d'aguantar als éssers humans. A més, som un grup nombrós que hem de compartir espais i eines. Tot i això, no hi ha hagut ni un sol dia que hagi entrat per la porta del laboratori i no hagi trobat un somriure de complicitat i paraules amables. En tot moment, cadascú de vosaltres heu estat generosos per escoltar-me i donar-me la vostra opinió. Crec que aquestes emocions i aquesta forma de treballar s'encomanen, ja que tot i tenir un dia dur o un dia en que les coses no han anat com esperaves sempre estàs disposat a escoltar a l'altre.

A partir d'aquí us vull contar la història de la meva tesi. Tot va començar amb una trucada administrativa com qualsevol altra, jo estava matriculada al màster però per uns imprevistos d'últim moment no tenia grup per a realitzar les pràctiques. Així que vaig decidir trucar a la directora del màster, l'Esther Pérez, per explicar-li la problemàtica i per saber com havia de procedir. El que no m'esperava és que ella em digués: "doncs mira, si vols busca informació del nostre grup i puja a parlar amb mi". Crec que sempre recordaré aquella primera reunió. Em va agradar molt la determinació i les ganes que posava a l'hora d'explicar els projectes que estaven fent i també em va passar un full on s'explicava perfectament el projecte que jo havia de fer i els objectius que teníem. A més a més, tenia la paret plena de fotografies de familiars i amics. I vaig pensar: "jo vull treballar amb una persona així. Li agrada fer ciència i té vida!" Esther estic molt contenta d'haver pogut realitzar el treball de màster amb tu i de tot el que m'has ensenyat. Gràcies per tots els comentaris fets als seminaris i per sempre haver-te mostrat disposada a ajudar-me i mostrar-te tan propera.

Al cap del temps quan ja estava prou ben instal·lada al laboratori i casi finalitzant el màster, una tarda xerrant tranquil·lament sobre que faria un cop acabat el màster, recordo que vaig afirmar: "Doncs m'agradaria molt fer un doctorat però amb el difícil que és aconseguir finançament cada cop ho veig més difícil". I de sobte, el Xavi Xifró, amb el qual encara no havia

intercanviat massa paraules, em va respondre: “no perdís l’esperança, no saps mai el que pot passar”. I així va ser, gràcies Xavi per haver-me donat l’oportunitat de realitzar aquesta tesi. Gràcies a aquesta tesi he crescut en molts aspectes de la meua vida. Sobretot et vull agrair la teua alegria i capacitat per fer les coses fàcils i el teu gran optimisme.

Un cop començat el doctorat, el Xavi em va informar que al llarg del doctorat ens havíem de reunir amb el Jordi Alberch per anar explicant-li com progressava el projecte. Jordi, gràcies per estar sempre present al llarg d’aquesta tesi i obrir-me la porta i donar-me la teua opinió més sincera sobre les qüestions que et proposava. Crec que has entès la meua manera de treballar i sempre m’has donat consells molt útils i que m’han donat molta empenta per seguir endavant.

I després, començats els projectes venia el moment d’exposar al grup els nostres resultats. Gràcies Silvia, per que en tots els meus seminaris has fet aportacions que valoro molt i molt i m’ha agradat poder aprendre seminari rere seminari del teu anàlisi científic i de la teua capacitat crítica. També et vull agrair la teua alegria i proximitat. Cristina Malagelada, també recordaré sempre les teves intervencions als seminaris, la teua forma tant curiosa d’encarar els problemes científics i el teu humor. Admiro molt el vostre treball i el de l’Esther perquè tot i que no hauria de ser així avui en dia encara es difícil ser dona i científica. És veritat que cada cop estem trencant més barreres però encara hem de seguir endavant. Al poc temps d’acabar la carrera vaig anar a unes xerrades de portes obertes d’un centre científic prou important on un dels directius va dir la gran frase: “Noies correu, la carrera científica es una carrera contra els vostres òvuls”. I d’això no fa tant, per això crec que es tan important tenir exemples com vosaltres.

També agrair al Pep totes les opinions i aportacions que ha fet al meu treball i les seves ganes de debatre amb arguments científics. I finalment, gràcies Phill, sempre recordaré com després d’un seminari, em vas enviar un *mail* amb un protocol i em vas dir que si necessitava qualsevol cosa podia baixar a parlar amb tu. Llavors vaig veure el teu escriptori i em vaig adornar que eres una persona realment interessant ja que tenies penjats diferents retalls. El que més em va cridar l’atenció és una llista de coses que ha de fer un bon científic, la única frase que recordo és: “les preguntes difícils són les que has de resoldre primer”.

Ah, per cert, un factor important per entendre completament la història d’aquesta tesi es saber que ha estat vinculada a la ciutat de Barcelona i a la de Girona. No puc oblidar la contribució de l’Enric Verdú en el meu treball i els consells i idees compartides. També vull agrair

a l'equip de Girona la seva amabilitat i ajuda tots els cops que he pujat, m'han fet sentir com una més.

Al principi de començar el doctorat no crec que siguis del tot conscient, però una de les coses que incorpores és la capacitat de gestió administrativa i burocràtica. Crec que sense la Núria i la Carme aquest treball d'aprenentatge burocràtic no hagués estat possible. Moltes gràcies per tots els tràmits que m'heu ajudat a fer.

I finalment una de les parts més importants d'aquesta història és la forma en què vaig aconseguir agafar la rutina i el dia a dia al laboratori. Com no començar aquest paràgraf amb tu Maite? Sense tu no hi hauria rutina ni dia a dia al laboratori. Gràcies per la teva organització i per tenir-ho tot sempre al dia. Sempre estàs allí per al que necessitem, ja sigui preparar una dilució, buscar un producte, ajudar-nos a organitzar coses o simplement escoltar-nos. Ha estat un plaer compartir aquest trajecte amb tu. M'encanta arribar al laboratori i que ens posem al dia i xerrar de xafarderies o mirar vestits per a la boda de la meva cunyada, poc a poc t'has anat convertint en una amiga més.

M'agradaria fer una menció als de la primera generació, no vaig compartir molt de temps de rutina però guardo un gran record dels moments viscuts amb vosaltres. Pot ser degut a que jo era la nova i vosaltres ja éreu un grup consolidat, a part ja teníeu experiència en allò de la ciència i per tant éreu un referent. Gràcies Laura Rué, ja que tot i que vam coincidir poc, el meu treball de màster el vaig heretar de tu i el primer que vaig fer quan vaig arribar al laboratori va ser llegir-me la teva tesi. Em va semblar una cosa extraordinària i meravellosa. Adrià, gràcies pel teu sentit de l'humor i pels moments divertits que em vas fer viure al laboratori. I finalment Marta Anglada, estic molt agraïda i feliç d'haver pogut participar en un dels projectes que vas dissenyar tu i que és una part molt important de la meva tesi i del meu aprenentatge com a científica. T'admiro molt per la teva creativitat i criteri científic. Moltes gràcies per tot.

I com no fer menció als altres grans referents i pilars de qualsevol predoc: els postdocs. Allò que igual arribes a ser tu algun dia, persones que ja han passat pel que tu encara has de passar i han sobreviscut. Durant aquests anys he tingut la sort de poder conèixer a grans postdocs. Albert Giralte, de quan vaig començar recordo molt el teu sentit de l'humor; a més eres una llegenda, l'home que havia publicat no sé quants milers de *papers*. M'ha agradat molt que retornessis al laboratori i poder tornar a xerrar amb tu. Vero, et vull agrair tots els *feedbacks* que m'has donat als seminaris i l'interès que sempre m'has mostrat. Ana Saavedra, gràcies pels teus consells i el teu rigor científic. Sempre que t'ho he demanat m'has escoltat, dona molta

calma tenir-te al laboratori i saber que estàs allí per a preguntar-te qualsevol cosa. Admiro molt la teva forma tant organitzada de treballar i la calma que transmetes. Mercè, recordo molt la teva arribada al laboratori i el nou aire que vas portar. Vas posar ordre a moltes coses i ens vas ensenyar altres maneres de treballar. Moltes gràcies per haver-me escoltat sempre i ajudat a dissenyar els meus experiments de comportament. Has estat un gran suport per a mi. Glòria, quina gran sort haver pogut coincidir amb tu i que m'hagis aconsellat. Ets una alegria de persona, enèrgica i divertida. Gràcies a tu vam començar el projecte Voleibol que tantes alegries ens ha donat. Ets una joia. I finalment, el meu postdoc estrella: Gràcies Gari per tot. Des del minut zero va néixer una gran complicitat entre nosaltres i vaig decidir que seriem amics i així ha estat. M'has ajudat científicament, filosòficament, èticament, personalment, artísticament i tots els "–ments" que facin falta!

Una altra part important del dia a dia al nostre laboratori ha estat el grup dels Gustavos. Júlia gràcies per les xerrades i moments compartits. Laura, el que uneix ser de les terres de l'Ebre no ho pot separar ningú. Desprems ganes per aprendre i treballar bé. El teu grup té molta sort de comptar amb tu. I com no els estudiants, aquest concepte d'estudiant és bastant curiós, ja que no t'adones de quan passes de ser estudiant a tenir estudiants a qui ensenyar i al mateix temps tu ets estudiant, tot una mica complicat, però gràcies a aquesta cadena tot funciona i tots aprenem. És un gran treball de cooperació científica que enriqueix molt. Silvia Cases, Sara Martínez, Marc, Anna Guisado, m'ha encantat poder coincidir amb vosaltres.

També recordo quan vaig descobrir el laboratori de la tercera. Evidentment va ser per anar a parlar sobre ratolins amb l'Ana López. Gràcies Ana per tot el que fas per nosaltres, per intentar arreglar tot el que necessitem i sobretot per la teva forma de ser. Transmetes una calma i una confiança increïbles i admirables. I allà al costat de la teva taula: Mònica, Andrea, Inés i Georgina. Totes despreneu amabilitat, simpatia i bon rotllo. M'alegra molt i molt cada cop que us veig. Mònica ara fa temps que no coincidim però em va encantar poder conèixer la teva feina i estar a la teva tesi. Andrea ets un remolí d'energia, estàs súper implicada i ho dones tot pel teu treball. Inés, recordo molt com en la última època que vam compartir al laboratori em vaig sentir molt còmplice amb tu. Ets perseverant i tens una capacitat zen increïble. Georgina gràcies per ser com ets, ets d'aquest tipus de persona que dona energia positiva i que fa falta a qualsevol grup social. Em sento molt afortunada d'haver pogut compartir cigarrets i birres amb tu!

I una part paral·lela però fonamental en la rutina del nostre laboratori: la sala blanca. Cristina i Raquel quines grans gurus. He gaudit molt compartint cafès i birres amb vosaltres.

M'ha encantat conèixer la vostra experiència al laboratori. Cristina m'agrada molt la teva força i energia. Raquel, ha estat un plaer compartir seminaris amb tu, totes les teves aportacions han estat molt enriquidores i sempre m'has generat una gran confiança per poder compartir amb tu inquietuds. Gràcies a les dos per tot. Gemma tot i que hem coincidit poc al laboratori, m'has fet riure molt i m'has donat molta confiança.

I finalment, els "regletoneros". Que dir-vos que no sabeu. Estic tant i tant contenta i orgullosa i feliç del nostre grup. Ja fa molt que no solament sou companys sinó que sou amics i com hem parlat alguns cops, per les hores que hem passat junts casi família. Hem compartit riures, plors, birres, nits de festa, estrès, filosofades, xerrades per arreglar el món, xerrades per criticar el món i una infinitat de coses més. Crec que hem generat entre tots un vincle molt especial que sempre compartirem.

Per aquí vull començar també pels nostres postdocs. Us vaig veure fer la transició i va ser tant emocionant, ja éreu un referent i de cop vaig veure com us convertíeu en doctors. Mar, gràcies, gràcies i gràcies per la teva alegria, bon rotllo, energia, optimisme i capacitat científica. He après molt i molt de tu. Gerard, també ha estat un plaer conèixer-te. Espero veure-us als dos aviat. Carla, el meu dia a dia al laboratori sense tu no hagués estat igual, quina gran sort poder començar els dies amb un cafè i un cigarret amb tu. Gràcies per tots els teus consells i tot el que m'has ensenyat. M'encanta la teva manera tan pura d'entendre la ciència. Cherubini mi amor, i pensar que al principi em feies por. Tot i que poc a poc vaig anar analitzant els teus moviments i vaig veure que series una amistat de cocció lenta, d'aquestes que és van generant poc a poc però que un cop generades són infinites. Admiro molt la manera d'enfocar el teu treball científic, ets molt metòdica, meticulosa i extremadament rigorosa. Xavi, tot i que vas ser un dels últims postdocs en arribar, has exercit molt bé el teu paper aconsellant-me i ajudant-me sempre. Gràcies per les xerrades compartides. I per últim, el postdoc més veterà del grup, això et costa alguna que altra broma i discriminació però ja saps que t'adorem. Andrés, he estat molt afortunada de veure com treballaves, he après molt de tu i penso que representes la definició de científic.

Aina, tinc tantes ganes de veure't, em generes un estat de bon humor constant. Vas ser la meva estudiant, però vaig aprendre tant de tu. Tens molta autonomia, iniciativa i curiositat per tot. Crec que aquestes tres característiques són indispensables per a poder ser científic. Sé que t'anirà molt bé. Laura López, em va alegrar molt que et quedessis al laboratori. Crec que tens la capacitat de ser assertiva i això ho pot dir poca gent. A part sempre tens un somriure i transmetes molta alegria.

I ara us toca a vosaltres, a la meva generació de predocs. Rafa, contigo empezó todo! Recordo perfectament el dia que ens van presentar i que vaig pensar: "si he de treballar amb ell em quedo aquí segur". M'has ensenyat a ser millor científica i millor persona. Les teves ganes d'aprendre coses noves i posar-les en pràctica són admirables. Sempre tens una resposta per a tot i el que és més sorprenent, sempre tens un moment per ajudar. Durant el màster em vaig convertir en la teva ombra i va ser una experiència genial. A part, per acabar d'arrodonir-ho tot sempre tens bon humor i ens fas riure a tots. Gràcies.

Anemie, mi compañera de drama, he empatizado tanto contigo. Nos hemos sincronizado tanto, nos hemos escuchado tanto. Tienes una gran capacidad de trabajo y análisis. Me encanta tu proyecto de Marfan. Y en estos momentos que escribo esto, no hace ni una semana que eres doctora, estoy muy orgullosa de ti.

Gerardo, tú y yo nos unimos gracias a los cultivos primarios, al principio simplemente hacíamos inmunos juntos y de repente ya estabas comiendo paella con mi familia en la Ràpita. Ya eres uno más del terreno. Por cierto, me debes una visita al delta. Ya sabes que has sido una parte muy importante para el desarrollo de esta tesis y sin tus análisis esto no hubiera sido posible. Podría decirte gracias por mil cosas y que te admiro por mil más pero sobretodo quiero agradecer tu generosidad.

Marta, tu també has anat entrant molt a poc a poc a la meva vida, tant a poc a poc que sense adornar-me'n t'has fet indispensable. Crec que vaig confirmar que aquella noia havia de formar part de la meva vida en el moment en que et vaig comentar que no havia provat mai aquella "massa rosa que venen a les fires" i uns dies després vas arribar al laboratori amb un gran pot d'allò. M'encanta la teva forma de treballar, com una formigueta, sense parar mai. Gràcies per escoltar-me i ajudar-me sempre. M'encanta picar-me amb tu.

Jordi, juntament amb el Rafa vas ser dels primers que va passar a ser amic meu directament. De fet, no feia ni un any que ens coneixíem i ja vam anar els tres de vacances a Menorca. Avui per escriure això he estat remenant i he trobat un diari que vaig fer del viatge. D'aquí uns anys us l'ensenyaré. Ja saps que la nostra relació es basa en empipar-nos mútuament i en veure qui posa més nerviós a l'altre. Però per un cop em toca dir-te coses bones (encara que de quant en quant també ho faig). Ja saps que admiro la teva capacitat de treball i anàlisi científic però crec que el que més m'agrada és la teva passió i la teva implicació científica. Quan expliques alguna cosa que de veritat t'apassiona se't nota i fas còmplice a l'altre, a mi m'aconsegueixes

emocionar. Intenta no perdre aquesta il·lusió, crec que la gent així es molt necessària. M'has ajudat molt i ho saps. Gràcies per tot.

I ara es el torn de les *lab girls*: Núria, Elena i Sara. Núria i Elena, tot i que vam entrar al mateix moment ens va costar conèixer-nos. Vosaltres éreu un duet perfecte i de seguida va marxar al Cellex. Però al final ens vam unir i va ser genial. Recordo al principi fer alguna reunió per llegir articles i anar aprenent a agafar capacitat crítica científica. Hem anat creixent científicament les tres juntes, i això ha estat un plaer. Núria, em transmetes pau i calma i adoro la teva manera de ser, de dir les coses, d'actuar. Penso que ets una persona molt reflexiva i coherent. M'has ajudat en tot el que t'he demanat i més. Mil gràcies.

Elena, vam fer el màster juntes i no ens vam fer ni cas, i al final t'has convertit en una peça fonamental de la meva vida. Hem xerrat i xerrat sense parar. Sense els teus consells i el teu suport no hagués arribat fins aquí. Estic molt orgullosa de la científica en la que t'has convertit, m'encanta el teu criteri. Ets perseverant i forta. Sé que arribaràs on vulguis.

I Sara, mi "Sarabella". Vas arribar al laboratori per fer el màster amb nosaltres al poc temps de que comencés el meu projecte doctoral. En principi havies de ser la meva estudiant però de seguida ens vam convertir en còmplices i tot ho vam aprendre juntes. Ens vam convertir en el tàndem perfecte. I això sempre serà així. Sé que et puc trucar quan sigui per al que sigui i m'escoltaràs, m'entendràs i m'ajudaràs. Hem rigut, xerrat, plorat i compartit molt. Gràcies i gràcies. Ets forta i valenta. Tens un projecte complicat i innovador i estàs posant totes les energies que tens i més per a que tiri endavant. Confio plenament en tu i sé que aconseguiràs allò que et proposis.

I per acabar, com no agrair a la meva família. No heu format part directa de l'elaboració de la tesi però sense vosaltres mai hagués arribat fins aquí ja que simplement no seria qui sóc. Mama i Papa, gràcies pel vostre amor i suport incondicional. M'ho heu donat sempre tot sense reserves ni límits. Mai us podré agrair suficient tots els valors i l'amor que m'heu donat. Gràcies per creure sempre amb mi. Iaia Fina, crec que ets la dona feminista amb més anys que conec, ets forta, valenta i no tens por a res. M'has transmès determinació i fermesa. Iaia Mariana, tu també m'ho has donat tot, tens una capacitat infinita d'estimar i em sento la persona més afortunada del món per poder rebre aquest amor. Padrina, Juancar, Emma i Mar sóc molt afortunada de poder-vos estimar, saber que formeu part de la meva vida em dona força. Manel, simplement gràcies ja que no et canses mai de fer-me saber que creus en mi. T'estimo. Padrí, sempre he sentit una gran admiració per la teva capacitat d'anàlisi, m'agraden les teves

filosofades. Carlos tu has viscut amb mi durant un període de l'elaboració d'aquesta tesi, així que ja et pots imaginar el contenta que estic d'estar escrivint aquestes paraules. Gràcies per la teva generositat. Padrí i Carlos gràcies per formar part de la meva vida.

Jon, gràcies per haver estat al meu costat durant tot aquest procés. Els teus consells sempre són tan útils, ets tan reflexiu i em transmets una serenor infinita. Sempre disposat a escoltar, sempre disposat a ajudar, sempre disposat a estimar. És un plaer compartir la vida i les il·lusions futures amb tu.

Cristina, amb tu sobren les paraules no? No sé si et puc dir molt més del que ja saps, del que ja notes. Ets el meu passat, el meu present i el meu futur. M'has acompanyat en tot. Ho hem compartit tot. T'admiro en tot. Diuen que l'amor és infinit, doncs això. I m'has donat també a Nil. Gràcies Nil simplement per existir.

I per acabar voldria recordar als meus iaies. Ja no esteu, però estareu sempre.

Abreviacions

Aa	Aminoàcid
AC	Adenilat ciclase
ADN	Àcid desoxiribonucleic
ADNc	Àcid desoxiribonucleic complementari
AMPA	Àcid α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoazolepropionic
AMPc	Monofosfat d'adenosina cíclic
Arc	Proteïna regulada per activitat associada al citoesquelet (<i>Activity-regulated cytoskeleton-associated protein</i>)
ARN	Àcid ribonucleic
ARNm	Àcid ribonucleic missatger
BDNF	Factor neurotròfic derivat del cervell (<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>)
CA	Banya d'Ammon (<i>Cornu Ammonis</i>)
Ca ²⁺	Calci
CaMK	Cinasa dependent de calci/calmodulina (<i>Calcium/calmodulin-dependent protein kinase</i>)
CBP	CREB-binding protein
COX	Ciclooxigenasa
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
DAG	Diaciglicerol
EP	Receptors de la prostaglandina E2
ERK	Cinasa regulada per senyals extracel·lulars (<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>)
GD	Gir Dentat
GFAP	Proteïna àcida fibril·lar glial (<i>Glial fibrillary acidic protein</i>)
GFP	Proteïna de fluorescència verda (<i>Green fluorescent protein</i>)
GP	Globus pà·lid
GPe	Globus pà·lid extern
GPi	Globus pà·lid intern
HAP1	Proteïna associada a la htt 1 (<i>Huntingtin-associated protein 1</i>)
HAT	Histona aciltransferasa
HDAC	Histona desacetilasa
HDCRG	<i>Huntington disease Collaborative Research Group</i>
HEAT	<i>Htt, elongation factor 3, the regulatory A subunit of protein phosphatase i TOR1</i>
Homer1a	Proteïna homòloga de Homer 1a (<i>Homer protein homolog 1a</i>)
Htt	Proteïna huntingtina
HTT	Gen de la huntingtina
Httm	Proteïna htt mutada
HTTNT o N17	Primers 17 aas de la regió N-terminal de la htt
i.p.	Intraperitoneal
IBA1	Proteïna adaptadora d'unió al calci ionitzat 1 (<i>Ionized calcium-binding adapter 1</i>)
iHDAC4b	Inhibidor d'HDACs 4b

IIN	Inclusions intranuclears
IL6	Interleucina 6
IP	Immunoprecipitació de proteïnes
IP3	Inositol trifosfat
IT15	<i>Interesting Transcript 15</i>
JNK	Cinasa N-terminal de c-Jun (<i>c-Jun N-terminal kinase</i>)
KD	Ratolins genominvats (<i>Knock-down</i>)
kDa	Kilodalton
KI	Ratolins genomodificats (<i>Knock-in</i>)
KO	Ratolins genoanul·lats (<i>Knock-out</i>)
LTD	Depressió a llarg termini (<i>Long-term depression</i>)
LTP	Potenciació a llarg termini (<i>Long-term potentiation</i>)
MAGUK	Proteïna guanilat cinasa de membrana (<i>Membrane-associated guanylate kinase</i>)
MAPK	Proteïna cinasa activada per mitògens (<i>Mitogen-activated protein kinase</i>)
MEF2	Myocyte enhancer factor 2
MH	Malaltia de Huntington
MIS	Misoprostol
MSN	Medium spiny neuron
NAD+	Nicotinamida adenina dinucleòtid
NF-κB	<i>Nuclear factor κ light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NGF	Factor de creixement nerviós (<i>Nerve growth factor</i>)
NMDA	N-metil-D-aspartat
NOLT	Test de localització d'objectes nous (<i>Novel object location test</i>)
NORT	Test de reconeixement d'objectes nous (<i>Novel object recognition test</i>)
NST	Nucli subtalàmic
NT3/4/5	Neurotrofina 3/4/5
P/CAF	p300/CBP-associated factor
PEST	Prolina, àcid glutàmic, serina i treonina
PG	Prostaglandina
PKA	Proteïna cinasa A (<i>Protein kinase A</i>)
PLC	Fosfolipasa C
poliP	Tram de poliprolines
poliQ	Tram de poliglutamines
PSD	Densitat postsinàptica (<i>Postsynaptic density</i>)
PSD95	Proteïna de la densitat postsinàptica (<i>Postsynaptic density protein 95</i>)
qPCR	Amplificació per PCR en temps real
RE1/NRE1	Element de resposta 1 (<i>Responsive element called element 1/neuron-restrictive silencer 1</i>)
REST1/NRSE	Repressor transcripcional de l'Element de resposta 1 (<i>Repressor element 1 transcription/neuron restrictive silencer factor</i>)
RSK	Proteïna ribosomal de 90 kDa S6 cinasa (<i>90 kDa ribosomal S6 kinase</i>)
SARE	Element genòmic de resposta a activitat sinàptica (<i>Synaptic activity-responsive element</i>)

SCA1	Atàxia Espinocerebel·losa tipus 1 (<i>Spinocerebellar atàxia type 1</i>)
SN	Substància negra
SNC	Sistema nerviós central
SNc	Substància negra <i>pars compacta</i>
SNr	Substància negra <i>pars reticulata</i>
Sp1	<i>Specificity protein-1</i>
SRF	Factor de resposta al sèrum (<i>Serum response factor</i>)
STEP	Fosfatasa tirosina enriquida en l'estriat (<i>Striatal-enriched protein tyrosine phosphatase</i>)
STHdh	Línia condicional cel·lular immortalitzada de progenitors neuronals estriatals
TBP	<i>TATA-binding protein</i>
TNF- α	Factor de necrosi tumoral- α (<i>Tumor necrosis Factor- α</i>)
TPR	Translocated promoter region
Trk	Receptor cinasa de la Tropolomiosina (<i>Tropomyosin-receptor kinase</i>)
T-SAT	La prova d'alternació espontània del laberint en T (<i>T-maze spontaneous alternation task</i>)
UHDRS	United Huntington's Disease Rating Scale
VGLuT1	Transportadors vesiculars de glutamat tipus 1 (<i>Vesicular Glutamate Transporter 1</i>)
VHC	Vehicle
WT	<i>Wild type</i>
YAC	Cromosoma artificial de llevat (<i>Yeast artificial chromosome</i>)

Índex de figures

Figura 1. Genètica de la MH	17
Figura 2. Correlació entre el nombre de repeticions CAG i l'inici de la MH	18
Figura 3. Períodes i estadis de la MH.....	20
Figura 4. Generació proteolítica dels fragments N-terminal i d'agregats de la httm	22
Figura 5. Representació esquemàtica de l'estructura i de les modificacions posttraduccionals de la htt .	24
Figura 6. Rols cel·lulars principals de la htt	26
Figura 7. Neuropatologia de la MH	28
Figura 8. Components i localització dels ganglis basals.....	30
Figura 9. Connectivitat de la via directa i indirecta dels ganglis basals	31
Figura 10. Canvis en la connectivitat dels ganglis basals en les etapes inicials i finals de la MH	32
Figura 11. Components de les estructures que formen l'eix central del sistema límbic i connectivitat hipocampal	35
Figura 12. Mecanismes moleculars alterats en la MH.....	42
Figura 13. Mecanismes causals de la desregulació transcripcional en la MH	44
Figura 14. Classificació i estructura de la família d'HDACs clàssiques	46
Figura 15. Cascades de les MAPK	54
Figura 16. Senyalització a través dels receptors EP	58
Figura 17. Estructura i dominis funcionals d'ERK5	63
Figura 18. Estructura i dominis funcionals de MEF2	66
Figura 19. Regulació de l'activitat de MEF2.....	67
Figura 20. El tractament amb Misoprostol augmenta els nivells de fosforilació de CREB i dels substrats de PKA en l'hipocamp dels ratolins WT	99

Figura 21. L'administració crònica amb l'agonista del receptor EP2, Misoprostol, redueix el claspig i els dèficits de memòria a llarg termini en els ratolins R6/1.....	101
Figura 22. El tractament crònic amb Misoprostol augmenta els nivells proteics del BDNF en l'hipocamp, però no en l'estriat i en l'escorça cerebral dels ratolins R6/1	102
Figura 23. El tractament crònic amb Misoprostol no altera l'expressió de marcadors proinflamatoris..	104
Figura 24. El tractament crònic amb Misoprostol incrementa el nombre de partícules positives PSD95 i VGluT1 en animals R6/1	105
Figura 25. El tractament crònic amb Misoprostol augmenta els nivells d'AMPC al GD.....	106
Figura 26. El tractament amb Misoprostol augmenta el nombre de neurites en cultius primaris hipocampals provinents d'animals WT i R6/1 a causa de l'augment en els nivells proteics del BDNF	108
Figura 27. El creixement del nombre de neurites induït pel tractament amb Misoprostol 10 µM és dependent de BDNF.....	109
Figura 28. El tractament crònic amb Misoprostol redueix la formació d'IIN en el GD de l'hipocamp	110
Figura 29. Els nivells proteics d'ERK5 i de pERK5 Thr218/Tyr220 es troben reduïts en l'estriat dels ratolins R6/1 i KI HdhQ7/Q111	112
Figura 30. Nivells proteics d'ERK5 i de pERK5 Thr218/Tyr220 en l'hipocamp i l'escorça dels ratolins R6/1 al llarg de la progressió de la malaltia	113
Figura 31. Els nivells proteics d'ERK5 estan disminuïts en el putamen de pacients de la MH	114
Figura 32. Els nivells d'ARNm d'ERK5 estan disminuïts en l'estriat dels ratolins R6/1 a les 12 i a les 30 setmanes.....	115
Figura 33. Els nivells proteics de MEK5 i de pMEK5 Ser311/Thr315 es troben alterats en l'estriat dels ratolins R6/1	116
Figura 34. Els nivells proteics de pMEF2c Ser387 es troben disminuïts en l'estriat dels ratolins R6/1.....	117
Figura 35. La fosforilació de la proteïna ERK5 està disminuïda en les cèl·lules estriatals STHdh ^{Q111/Q111}	118
Figura 36. La sobreexpressió d'ERK5 estimula l'expressió del BDNF en la línia cel·lular estriatal STHdh ^{Q111/Q111}	120

Figura 37. Els nivells proteics de MEF2 estan reduïts en l'hipocamp al llarg de la progressió de la malaltia en els ratolins R6/1 i KI	122
Figura 38. Els nivells d'ARNm de MEF2 no estan alterats en l'hipocamp dels ratolins R6/1.....	123
Figura 39. Marcatge amb immunofluorescència de MEF2 en seccions coronals hipocampals	124
Figura 40. MEF2 no interacciona ni amb la httm ni amb la htt	124
Figura 41. Els nivells de MEF2 estan disminuïts en els cultius primaris hipocampals R6/1.....	125
Figura 42. La disminució de MEF2 en els cultius primaris hipocampals és causada per un augment en l'activitat caspasa.....	126
Figura 43. L'activació de MEF2 mitjançant el tractament amb BML-210 augmenta el nombre de neurites i la seva llargària en cultius primaris hipocampals	128
Figura 44. El tractament agut amb BML-210 millora els dèficits de memòria a llarg termini dels ratolins R6/1	130
Figura 45. El tractament amb BML-210 redueix la interacció entre MEF2 i la HDAC4 de la classe IIa.....	131
Figura 46. El tractament amb BML-210 evita la disminució de les proteïnes Arc i Sinaptofisina en els ratolins R6/1	132
Figura 47. Caracterització de noves dianes terapèutiques en la MH	136
Figura 48. Activació del receptor EP2 en l'hipocamp de la MH.....	144
Figura 49. Alteració de la cinasa ERK5 en l'estriat de la MH	148
Figura 50. Activació del factor de transcripció MEF2 en l'hipocamp de la MH	153

Índex de taules

Taula 1. Models murins genèticament modificats de la MH.....	41
Taula 2. Mostres humanes <i>post mortem</i> del putamen de pacients de la MH	78
Taula 3. Anticossos primaris per a <i>Western Blot</i>	86
Taula 4. Anticossos secundaris per a <i>Western Blot</i>	87
Taula 5. Sondes d'expressió gènica	90
Taula 6. Anticossos primaris per a immunofluorescència	91
Taula 7. Anticossos secundaris per a immunofluorescència	91

Índex

Resum	1
Resumen	5
Abstract	9
I. Introducció	13
1. Bases clíniques de la malaltia de Huntington.....	15
2. La proteïna htt.....	21
3. Neuropatologia de la MH.....	28
4. Models animals de la MH.....	37
5. Mecanismes moleculars implicats en la patologia de la MH.....	42
6. Caracterització de noves dianes terapèutiques en la MH.....	57
II. Hipòtesi i Objectius	71
III. Materials i mètodes	75
1. Models Murins de la MH.....	77
2. Teixit cerebral <i>post mortem</i>	77
3. Cultius Cel·lulars: Línia estriatal STHdh.....	78
4. Cultius Primaris Hipocampals i estriatals.....	78
5. Plasmidis.....	79
6. Tractaments farmacològics.....	80
7. Anàlisi conductual.....	82
8. Extracció proteica.....	85
9. Immunoblot de proteïnes (<i>Western blot</i>).....	85
10. Immunoprecipitació de proteïnes (IP).....	88
11. Anàlisi d'expressió.....	89
12. Obtenció de seccions coronals de teixit cerebral murí.....	90
13. Immunofluorescència en seccions coronals de teixit cerebral murí.....	90
14. Immunocitoquímica IIN de httm.....	91
15. Immunofluorescència en cèl·lules.....	92
16. Captació i anàlisi d'imatges.....	93
17. Estadística.....	95
IV. Resultats	97
1. Estudi de l'estimulació del receptor EP2 com aproximació terapèutica per a reduir els dèficits hipocampals en la MH.....	99
2. Caracterització de la via de senyalització d'ERK5 i la seva implicació en els dèficits estriatals característics de la MH.....	111
3. Estudi del rol de la família de factors de transcripció MEF2 en els dèficits transcripcionals i cognitius dependents de la funció hipocampal en la MH.....	121

V. Discussió	133
1. L'estimulació del receptor EP2 redueix els dèficits cognitius de la MH estimulant la transcripció de proteïnes sinàptiques i del BDNF en l'hipocamp	137
2. La via de senyalització d'ERK5 es troba reduïda en l'estriat de models murins i de mostres humanes de la MH, afavorint la pèrdua dels nivells estriatals de BDNF	145
3. La família de factors de transcripció MEF2 està disminuïda en l'hipocamp de la MH, implicant dèficits transcripcionals i pèrdua de funció cognitiva	149
VI. Conclusions	155
VII. Referències	159

Resum

La malaltia de Huntington (MH) és un trastorn neurodegeneratiu caracteritzat per la presència de símptomes motors, cognitius i psiquiàtrics. El motiu causal de la MH és l'expansió del triplet CAG en l'exó 1 del gen IT15 que codifica per a la proteïna huntingtina (htt). Aquesta mutació va ser identificada l'any 1993 i es va observar que l'expansió del triple CAG causava un allargament en el tram de poliglutamines (poliQ) a l'extrem N-terminal de la proteïna htt. En individus no afectats per la MH el nombre de repeticions CAG varia entre 6 i 35, i quan la llargària de les repeticions CAG és major de 40 els pacients desenvoluparan la malaltia. S'ha descrit l'existència de correlació inversa entre el nombre de repeticions CAG i l'edat d'inici de la malaltia. Per tant, l'aparició dels símptomes en aquesta malaltia és variable, encara que l'edat mitjana de les primeres manifestacions simptomàtiques és als 40 anys. A causa de la inexistència de tractaments curatius o que retardin l'aparició de la malaltia, el seu curs és progressiu i letal i els pacients moren entre 15 i 20 anys després de les primeres manifestacions.

Un dels trets particulars i distintius de la MH és la degeneració selectiva de les neurones GABAèrgiques de projecció del nucli estriat (MSN), que és la regió que presenta més atrofia. No obstant, també s'ha descrit neurodegeneració en altres àrees cerebrals, com l'escorça cerebral i l'hipocamp. Més recentment, s'ha observat la presència de disfunció neuronal i sinàptica, que apareix abans que la mort neuronal, i que contribueix a l'aparició dels símptomes. En concret, els trastorns cognitius i emocionals estan associats a la funció cortico-estriatal i hipocampal i es manifesten en etapes inicials de la malaltia, fins i tot prèviament a l'aparició dels dèficits motors relacionats amb la funció cortico-estriatal.

La presència de la htt mutada (htt^m) causa l'activació de processos cel·lulars patològics causant primer la disfunció, i després la mort neuronal. Aquests processos inclouen l'agregació proteica, la desregulació transcripcional, la disfunció tròfica, l'alteració en l'homeòstasi del calci, l'alteració de l'activitat de les caspases, la desregulació de l'activitat dels receptors cel·lulars, l'alteració de la senyalització cel·lular i la disrupció del transport axonal entre altres. Tot i això, actualment encara no es coneixen completament tots els mecanismes alterats en aquesta malaltia. És necessari continuar estudiant per entendre millor les alteracions cel·lulars presents en la malaltia per a poder proposar noves dianes terapèutiques que permetin desenvolupar compostos o estratègies terapèutiques eficaces. En aquesta tesi hem estudiat la implicació de diferents proteïnes i vies cel·lulars en la fisiopatologia de la MH, sobretot relacionades amb els

mecanismes de la desregulació transcripcional i disfunció tròfica, per a definir nous candidats terapèutics que retardin o disminueixin la disfunció neuronal des de les etapes inicials de la MH.

Primerament hem estudiat la contribució de l'activació del receptor 2 de la prostaglandina E₂ (EP2) en la disfunció hipocampal en la MH. L'activació d'aquest receptor s'ha associat amb processos de plasticitat sinàptica i formació de memòria com també amb l'estimulació de la via AMPc/PKA/CREB. En aquest treball hem aportat per primer cop evidències del rol beneficiós de l'activació crònica del receptor EP2 amb Misoprostol, agonista d'aquest receptor, en el context de la MH. Els nostres resultats mostren que el tractament amb Misoprostol reverteix els dèficits cognitius millorant la memòria a llarg termini en els ratolins R6/1. Associat amb aquestes millores cognitives, el tractament amb Misoprostol produeix la recuperació dels nivells proteics del factor neurotròfic derivat del cervell (BDNF), de la proteïna de la densitat sinàptica 95 (PSD95) i del transportador vesicular de glutamat tipus 1 (VGluT1) en l'hipocamp dels ratolins R6/1. Aquest efecte també s'observa en cultius primaris hipocampals provinents d'embrions *wild type* (WT) i R6/1, on el Misoprostol augmenta el creixement neurític d'una manera dependent del BDNF. A més, l'administració de Misoprostol en els animals R6/1 redueix el nombre d'inclusions intranuclears (IIN) de httm, marca histopatològica de la MH, en el gir dentat (GD). Per tant, el nostre treball mostra que l'estimulació del receptor EP2 pot recuperar la funció cognitiva en els ratolins R6/1, promovent l'efecte tròfic mediat pel BDNF que estimula la síntesi de proteïnes sinàptiques en l'hipocamp i disminuint les IIN en el GD.

En segon lloc, hem analitzat la cinasa regulada per senyals extracel·lulars 5 (ERK5) i la seva via de senyalització com a possible mecanisme patològic en la MH. ERK5 és una de les últimes cinases identificades dins de la família de les MAPK. Recentment, diversos estudis han assenyalat la importància d'aquesta cinasa en la inducció de supervivència i protecció neuronal en resposta a estímuls neurotròfics i d'estrès cel·lular. En aquesta tesi hem mostrat l'alteració estriatal selectiva d'ERK5 en diferents models murins de la MH i també en mostres *post mortem* de putamen provinent de pacients afectats de la MH. L'alteració d'aquesta via és deguda a la desregulació transcripcional ja que en l'estriat dels ratolins R6/1 s'observa una disminució en l'expressió de l'ARN missatger (ARNm) d'ERK5. Per altra banda, l'activació d'aquesta via mostra un patró dual presentant una disminució dels nivells de fosforilació en etapes inicials de la malaltia i un augment en etapes finals. Aquest patró dual correlaciona amb els nivells de fosforilació de MEK5, que és la única cinasa que regula a ERK5. Per tant, els nostres resultats indicarien l'activació de mecanismes cel·lulars compensatoris per tal d'activar la via. No obstant, aquest augment no sembla suficient per activar la via. L'anàlisi dels nivells de pMEF2c, un dels

substrats més ben caracteritzats de la via, indica que els nivells de pME2c estan disminuïts des d'etapes inicials fins a estadis finals de la malaltia en l'estriat dels ratolins R6/1. A més, hem observat que la sobreexpressió d'ERK5 en un model cel·lular de la MH produeix un augment en els nivells proteics del BDNF, suggerint que l'activació d'aquesta via en el context de la MH permetria promoure un efecte tròfic en l'estriat.

Finalment, hem investigat la desregulació transcripcional hipocampal en la MH, examinant la família de factors de transcripció *myocyte enhancer factor 2* (MEF2). MEF2 controla un gran nombre de gens relacionats amb funcions de supervivència, de plasticitat sinàptica i de formació de memòria. A més, l'alteració en la transcripció dependent de MEF2 s'ha relacionat amb diferents malalties neurodegeneratives i neurològiques i en alteracions en processos cognitius hipocampals. En aquesta tesi hem mostrat per primera vegada la desregulació de MEF2 en la MH. Els nostres resultats mostren una disminució dels nivells proteics de MEF2 en l'hipocamp de dos models murins de la MH des de fases inicials, quan s'inicien els dèficits cognitius en aquests ratolins, fins etapes finals de la MH. Hem demostrat que l'alteració en els nivells de MEF2 no és deguda a mecanismes transcripcionals ni a la interacció de MEF2 amb les IIN de *htt*m. En canvi, els nostres experiments suggereixen que la reducció en els nivells proteics hipocampals de MEF2 pot ser deguda a un augment del clivatge d'aquest per caspases. També hem observat que l'activació de MEF2 amb el compost BML-210 produeix millores en la memòria a llarg termini en els ratolins R6/1 associades amb la recuperació de les proteïnes Arc i Sinaptofisina. Aquests resultats confirmen la contribució de la desregulació de MEF2 en la neuropatologia i la disfunció hipocampal en la MH.

En conjunt, en aquesta tesi hem descrit alteracions en tres mecanismes moleculars que poden incidir en la patologia de la MH en diferents nivells cel·lulars com són els receptors, la senyalització i la transcripció gènica. En el cas d'ERK5 hem demostrat que l'alteració d'aquesta via de senyalització pot estar afavorint la vulnerabilitat estriatal causant dèficits cognitius i motors. Per altra banda, hem distingit que tant l'estimulació de l'activació d'EP2 com de MEF2 produeixen millores en la funció hipocampal i reverteixen els dèficits cognitius característics de la MH. Per aquests motius, proposem aquests tres mecanismes com a noves dianes terapèutiques per incidir-hi farmacològicament i poder retardar o impedir l'avenç de la MH.

Resumen

La enfermedad de Huntington (EH) es un trastorno neurodegenerativo causado por la presencia de síntomas motores, cognitivos i psiquiátricos. El motivo causal de la EH es la expansión del triplete CAG en el exón 1 del gen IT15 que codifica para la proteína huntingtina (htt). Esta mutación fue identificada el año 1993 y se observó que la expansión del triplete CAG causaba un alargamiento en el tramo de poliglutaminas (poliQ) en el extremo N-terminal de la proteína htt. En individuos no afectados por la EH el número de repeticiones CAG varía entre 6 y 35, y cuando el número de repeticiones CAG es superior a 40 los pacientes desarrollaran la enfermedad. Se ha descrito la existencia de correlación inversa entre el número de repeticiones CAG i el inicio de la enfermedad. Por lo tanto, la edad de aparición de los síntomas en esta enfermedad es variable. Debido a la inexistencia de tratamientos curativos o que retarden la aparición de los síntomas, su curso es progresivo y letal y los pacientes mueren entre 15 y 20 años después de la manifestación de los primeros síntomas.

Una de las características particulares y distintivas de la EH es la degeneración selectiva de las neuronas Gabaérgicas de protección del núcleo estriado (MSN), que es la región donde se observa más atrofia. Sin embargo, también se ha descrito neurodegeneración en otras áreas cerebrales, como la corteza cerebral y el hipocampo. Más recientemente, se ha observado la presencia de disfunción neuronal y sináptica, que aparece antes que la muerte neuronal, contribuyendo a la aparición de los síntomas. En concreto, los trastornos cognitivos y emocionales que están asociados a la función cortico-estriatal y hipocampal se manifiestan en etapas iniciales de la enfermedad, incluso previamente a la aparición de los déficits motores relacionados con la función cortico-estriatal.

La presencia de la htt mutada (hhtm) causa la activación de procesos celulares patológicos causando primero la disfunción, y después la muerte neuronal. Estos procesos incluyen la agregación proteica, la desregulación transcripcional, la disfunción trófica, la alteración en la homeostasis del calcio, la excitotoxicidad, la alteración de la actividad caspasa, la desregulación de la actividad de los receptores, la alteración de la señalización celular, la disrupción del transporte axonal y la disfunción mitocondrial entre otras. Actualmente aún no se conocen completamente todos los mecanismos alterados en esta enfermedad. Es necesario continuar estudiando para entender mejor las alteraciones celulares presentes en la enfermedad para poder proponer nuevas dianas terapéuticas que permitan desarrollar compuestos o estrategias terapéuticas eficaces. En esta tesis hemos estudiado la implicación de diferentes proteínas y vías

celulares en la fisiopatología de la EH, sobretodo relacionadas con los mecanismos de desregulación transcripcional y disfunción trófica, para definir nuevos candidatos terapéuticos que retarden o disminuyan la disfunción neuronal desde etapas iniciales de la EH.

En primer lugar, hemos estudiado la contribución de la activación del receptor 2 de la prostaglandina E₂ (EP2) en la disfunción hipocampal en la EH. La activación de este receptor se ha asociado con procesos de plasticidad sináptica y formación de memoria como también con la estimulación de la vía AMPc/PKA/CREB. En este trabajo hemos aportado por primera vez evidencias del papel beneficioso de la activación crónica del receptor EP2 con Misoprostol, agonista de este receptor, en el contexto de la EH. Nuestros resultados muestran que el tratamiento con Misoprostol revierte los déficits cognitivos mejorando la memoria a largo plazo en los ratones R6/1. Asociado a estas mejoras cognitivas, el tratamiento con Misoprostol produce la recuperación de los niveles proteicos del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), de la proteína de la densidad sináptica 95 (PSD95) y del transportador vesicular de glutamato tipo 1 (VGlut1) en el hipocampo de ratones R6/1. Este efecto también se observa en cultivos hipocampales primarios de embriones *wild type* (WT) y R6/1, donde el Misoprostol aumenta el crecimiento neurítico de manera dependiente del BDNF. Además, la administración de Misoprostol en los animales R6/1 reduce el número de inclusiones intranucleares (IIN) de httm, marca histopatológica de la EH, en el giro dentado (GD). Por lo tanto, nuestro trabajo muestra que la estimulación del receptor EP2 puede recuperar la función cognitiva en los ratones R6/1, promoviendo el efecto trófico mediado por el BDNF que estimula la síntesis de proteínas sinápticas en el hipocampo y disminuyendo las IIN en el GD.

En segundo lugar, hemos analizado la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK5) y su vía de señalización como posible mecanismo patológico en la EH. ERK5 es una de las últimas quinasas identificadas dentro de la familia de las MAPK. Recientemente, diferentes estudios han señalado la importancia de esta quinasa en la inducción de supervivencia y protección neuronal en respuesta a estímulos neurotróficos y de estrés celular. En esta tesis hemos mostrado la alteración estriatal selectiva de ERK5 en diferentes modelos de ratón de la EH y también en muestras *post mortem* de putamen de pacientes de la EH. La alteración de esta vía es debida a la desregulación transcripcional ya que en el estriado de los ratones R6/1 se observa una disminución en la expresión del mensajero de ERK5. Por otro lado, la activación de esta vía muestra un patrón dual presentando una disminución de los niveles de fosforilación en etapas iniciales de la enfermedad y un aumento en etapas finales. Este patrón dual correlaciona con los niveles de fosforilación de MEK5, que es la única quinasa que regula ERK5. Por lo tanto, nuestros

resultados indicarían la activación de mecanismos celulares compensatorios para activar la vía. No obstante, este aumento no parece ser suficiente para activarla. El análisis de los niveles de pMEF2c, uno de los sustratos más bien caracterizados de la vía, indica que los niveles de pMEF2c están disminuidos desde etapas iniciales hasta etapas finales de la enfermedad en el estriado de los ratones R6/1. Adicionalmente, hemos observado que la sobreexpresión de ERK5 en un modelo celular de la EH produce un aumento en los niveles proteicos del BDNF, sugiriendo que la activación de esta vía en el contexto de la EH permitiría promover un efecto trófico en el estriado.

Finalmente, hemos investigado la desregulación transcripcional hipocampal en la EH, examinando la familia de factores de transcripción *myocyte enhancer factor 2* (MEF2). MEF2 controla un gran número de genes relacionados con funciones de supervivencia, de plasticidad sináptica y de formación de memoria. Además, alteraciones en la transcripción dependientes de MEF2 se han relacionado con diferentes enfermedades neurodegenerativas y neurológicas y con alteraciones en procesos cognitivos hipocampales. En esta tesis, hemos observado por primera vez la desregulación de MEF2 en la EH. Nuestros resultados muestran una disminución de los niveles proteicos de MEF2 en el hipocampo de dos modelos de ratón de la EH desde fases iniciales, cuando se inician los déficits cognitivos en estos ratones, hasta etapas finales de la EH. Hemos demostrado que la alteración en los niveles de MEF2 no es debida a mecanismos transcripcionales ni a la interacción de la MEF2 con las IIN de la httm. En cambio, nuestros experimentos sugieren que la reducción en los niveles proteicos hipocampales de MEF2 puede ser debida a un aumento del clivaje de este por caspasas. También hemos observado que la activación de MEF2 con el compuesto BML-210 produce mejoras en la memoria a largo plazo en los ratones R6/1 asociadas con la recuperación de las proteínas Arc y Sinaptodisina. Estos resultados confirman la contribución de la desregulación de MEF2 en la neuropatología y la disfunción hipocampal en la EH.

En conjunto, en esta tesis hemos descrito alteraciones en tres mecanismos moleculares que pueden incidir en la patología de la EH en diferentes niveles celulares como son los receptores, la señalización y la transcripción génica. En el caso de ERK5 hemos mostrado que alteraciones de esta vía de señalización pueden estar favoreciendo la vulnerabilidad estriatal causando déficits cognitivos y motores. Por otro lado, hemos observado que tanto la estimulación de la activación del receptor EP2 como de MEF2 producen mejoras en la función hipocampal y revierten los déficits cognitivos característicos de la MH. Por estos motivos,

proponemos estos tres mecanismos como nuevas dianas terapéuticas para incidir farmacológicamente y poder retardar o impedir la progresión de la EH.

Abstract

Huntington disease (HD), is a neurodegenerative disorder characterized by motor, cognitive and psychiatric dysfunction. The disease is caused by an expanded CAG trinucleotide repetitions at the exon 1 of the IT15 gen, which encodes for the huntingtin protein (htt). In 1993, this mutation was discovered and it was observed that the expansion of the CAG trinucleotide led to lengthening of the polyglutamin (polyQ) chain in the N-terminal sequence of the htt. In normal individuals, the number of GAG repetitions length ranges from 6 to 35, whereas HD patients showed 40 or more CAG repetitions. Several studies showed that the onset of the symptoms inversely correlated with the lengthening of the mutation. Therefore, the initial symptoms vary from person to person but on average the first symptoms appear after the age of 40. Because of the absence of available treatment for delaying or preventing the progression of the disease, the course of the disease is progressive and lethal and the patient usually dies within 15-20 years after the first disease manifestations.

One of the main and differential features of HD is the Medium spiny neurons (MSNs) selective degeneration in the striatum, which is the most atrophic region. However, many other regions including the hippocampus and cerebral cortex are also affected. Recently, several studies have shown that the symptomatology and the disease progression involve neuronal dysfunction, which precedes the neuronal loss. Specifically, cognitive and behavioral symptoms related with the hippocampal and cortico-striatal function are evident prior to the time at which motor symptoms related to cortico-striatal function appear.

It has been determined that the presence of mutant huntingtin (mhtt) activate distinct pathological cellular mechanisms that generate neuronal dysfunction and lead to neuronal death. These cellular mechanisms involve protein aggregation, transcriptional dysregulation, neurotrophic dysfunction, calcium signaling, caspase activity alteration, dysregulation of cellular receptor activity, cellular signaling alteration and axonal transport disruption, among others. Even though, currently all the molecular mechanisms altered by the presence of mhtt are not completely known. For these reason, understanding the mechanisms involved in neuronal dysfunction may be crucial to find new therapeutic targets in order to develop effective therapeutic strategies and compounds. In this thesis we studied the implication of different proteins and cellular pathways, mainly related with transcriptional and neurotrophic dysregulation, in the physiopathology of HD to define new therapeutic candidates to stop or delay the disease progression from the onset of HD.

Firstly, we studied the involvement of the prostaglandin E₂ receptor 2 (EP2) in the hippocampal dysfunction in HD. Different studies associated EP2 receptor activation with synaptic plasticity and memory formation processes and also with the AMPc/PKA/CREB pathway stimulation. In this thesis we have provided the first evidence of the beneficial role of EP2 receptor chronic activation with Misoprostol, an agonist of this receptor, in the context of HD. Our results show that Misoprostol treatment revert cognitive dysfunction, improving long-term memory, in R6/1. Together with this cognitive improvement, Misoprostol treatment lead to the recovery of brain derived neurotrophic factor (BDNF), postsynaptic density protein 95 (PSD95) and vesicular glutamate transporter 1 (VGluT1) in the hippocampus of R6/1 mice. This positive effect of BDNF regulation has been also observed in *wild* type (WT) and R6/1 hippocampal primary cultures, where Misoprostol increases neurite growth in a BDNF dependent manner. It's worth mentioning that Misoprostol administration decreases an important neuropathological feature of HD, the mhtt intranuclear inclusions (IIN) in the Dentate Gyrus (DG). Thus, our results show that EP2 receptor stimulation reduce R6/1 mice cognitive deficits by improving BDNF and synaptic proteins in the hippocampus and also decreasing the number of IIN in the DG.

Secondly, we have analyzed the extracellular regulated kinase 5 (ERK5) and its pathway as a possible pathological mechanism in HD. ERK5 is one of the latest identified members of the MAPK family. Recently, diverse studies have shown the important role of ERK5 in neuronal protection and survival in response of neurotrophic factors and cellular stress. In this thesis we have observed an ERK5 selective striatal alteration in different HD mice models and in *post mortem* putamen HD human samples. In R6/1 mice ERK5 mRNA levels were decreased, indicating that ERK5 was diminished by transcriptional dysregulation. On the other hand, ERK5 pathway activation show a dual pattern with a decrease of ERK5 phosphorylation levels in the beginning of the disease and an increase in the final stages. This dual pattern correlate with MEK5 phosphorylation levels, which is the only kinase that regulate ERK5. Therefore, our results indicate that compensatory mechanisms may be activated to regulate ERK5 pathway. Nevertheless, MEK5/ERK5 activity increase is not enough to activate the pathway. pMEF2 levels, a well-known ERK5 substrate, are decreased from early to late disease stages in the striatum of R6/1 mice. Moreover, we observe that ERK5 overexpression produce an increase in BDNF levels in a striatal cellular model. This result suggests that activation of ERK5 pathway in HD context promotes a neurotrophic effect in the striatum.

Finally, we have investigated hippocampal transcriptional dysregulation analyzing the transcription factor myocyte enhancer factor 2 (MEF2). MEF2 controls an important number of genes involved in survival functions, synaptic plasticity and memory formation. In addition, alterations in MEF2 dependent transcription have been reported with different neurodegenerative and cognitive diseases and with alterations in hippocampal cognitive processes. In this thesis, we have demonstrated for the first time that MEF2 is dysregulated in HD. Our results show a decrease on MEF2 hippocampal protein levels in two different mice HD models from the onset of cognitive dysfunction and is maintained during the progression of the disease. We have corroborated that MEF2 alteration is not due to transcriptional mechanisms. We also have demonstrated that MEF2 levels reduction is not caused by an interaction between MEF2 and mhtt IIN. Lastly, we have observed, that MEF2 activation with BML-210 lead to long-term memory improvements and Arc and Synaptophysin protein levels recovery. These results confirm the contribution of MEF2 dysregulation in the HD neuropathology and hippocampal dysfunction.

Altogether, in this thesis we have described alterations in three molecular mechanisms that are implicated in HD pathology at different cellular levels, such as cellular receptors and signaling and gene transcription. In the ERK5 study we have proved that the alteration of this pathway could contribute to striatal vulnerability, generating motor and cognitive deficits. On the other hand, we have observed that EP2 and MEF2 stimulation improve hippocampal function and revert the cognitive deficits of HD. For all these reasons, we propose these three mechanisms as a new therapeutic pharmacological targets to prevent and delay HD progression.

I. Introducció

Cada matí, en llevar-me, li deia "Bon dia! Què, com has passat la nit?".

Al vespre, li desitjava descans reparador i somnis bells. Al migdia li recomanava que fes el cor fort, perquè al capdavant la vida es curta i l'eternitat insondable.

Pere Calders

1. Bases clíniques de la malaltia de Huntington

La malaltia de Huntington (MH) és un trastorn neurodegeneratiu, autosòmic dominant que presenta una tríada de símptomes motors, cognitius i psiquiàtrics. Tot i això, el tret més característic d'aquesta malaltia són els moviments involuntaris. Aquests moviments són irregulars, breus, abruptes i no estereotipats, similars a una dansa. Per aquest motiu, aquesta malaltia era coneguda popularment com el ball de Sant Vito. Posteriorment, George Huntington va descriure mèdicament aquest trastorn i el va anomenar corea de Huntington. El terme corea deriva del terme grec *khoreia*, que significa dansa coral i que en medicina fa referència a un trastorn del moviment. Finalment aquesta malaltia es va anomenar MH per donar-li rellevància al caràcter polifacètic d'aquesta, que presenta una combinació de símptomes motors i no motors (1–3).

1.1. Epidemiologia de la MH

La MH és considerada una malaltia rara o minoritària ja que la seva prevalença és molt baixa. Durant molts anys s'ha considerat que la prevalença de la MH era d'entre 5-7 casos per cada 100.000 habitants en poblacions caucàsiques (4). En estudis més recents, però, s'ha descrit que la MH pot afectar 12,3 persones per 100.000 habitants en el Regne Unit (5,6). En un metaanàlisi publicat el desembre del 2015 (7) s'apunta que la prevalença mitjana actual de la MH en poblacions caucàsiques és de 9,71 casos per 100.000 habitants. En aquest estudi també s'indica que les taxes de prevalença de la MH han augmentat al voltant d'un 15-20% cada dècada a Austràlia, Estats Units, el Regne Unit i altres regions d'Europa Occidental (7).

Aquest augment en la prevalença de la MH pot ser degut a diferents causes (7,8), tot i que diferents autors coincideixen a atribuir aquest augment a una subestimació de la prevalença d'aquesta malaltia a dos motius principals. El primer és un millor coneixement de la MH per part dels professionals mèdics, juntament amb l'existència del test genètic que permet determinar la malaltia. Això ha permès una millora en el diagnòstic, sobretot en pacients d'edat avançada i en pacients sense una història familiar coneguda per a la MH (9). En segon lloc, una altra causa que ha portat a la subestimació de la prevalença de la MH és el fet que molts cops els pacients han amagat aquest trastorn per causes psiquiàtriques greus, preocupacions relacionades amb la descendència -que ha pogut heretar la malaltia- i l'alta estigmatització històrica d'aquesta (8). Durant l'emergència de les teories mèdiques eugenèsiques es va relacionar la MH amb famílies acusades de bruixeria i es va promocionar l'estereotip negatiu de la MH entre els professionals

I. Introducció

mèdics (10). L'any 1916, es va publicar un article mèdic on es reclamava vigilància, restriccions immigratòries i esterilització obligatòria per a les famílies afectades amb la MH (11). Probablement, en els últims anys ha disminuït aquesta "vergonya" associada a la MH i els metges són menys reticents a diagnosticar-la (5,7). Per altra banda, la disponibilitat de tractaments simptomàtics més efectius (per exemple l'ús d'antidepressius, antipsicòtics, i medicació anticoreïforme) ha fet augmentar la supervivència dels pacients de la MH augmentant la prevalença de la malaltia (7).

La MH és present en diferents països i grups ètnics a diferents regions del món. Tot i això, la seva prevalença mundial varia àmpliament entre els diferents indrets del món. En els països asiàtics la prevalença de la MH és molt baixa, 0,42 casos per 100.000 habitants. Una altre país amb una molt baixa prevalença de la MH és Finlàndia, amb una prevalença de 0,53 casos per 100.000 habitants. Per altra banda, hi ha comunitats petites amb una prevalença de la MH realment alta. Per exemple, una comunitat reconeguda per l'alta prevalença de la MH es troba a Veneçuela, en una regió localitzada prop del llac Maracaibo on la prevalença de la MH és de 700 per 100.000 persones (7). Per aquest motiu, en aquesta comunitat es va realitzar l'estudi de lligament genètic que va permetre el descobriment del gen causal de la MH l'any 1993 (12). Aquestes variacions geogràfiques en la prevalença d'aquest trastorn genètic poden ser explicades, al menys en part, per l'existència de diferents haplotips genètics en les diferents poblacions (8).

Actualment, s'estan fent estudis per a determinar amb exactitud la prevalença real de la MH i els motius concrets del seu augment. Com que els pacients de la MH presenten una discapacitat important, conèixer amb precisió la prevalença real d'aquesta malaltia és important per a la correcta planificació dels serveis de salut pública.

1.2. Genètica de la MH

L'any 1983 va ser descrit el locus responsable de la MH al cromosoma 4p16.3 (13). Més tard, l'any 1993 el *Huntington disease Collaborative Research Group* (HDCRG) va identificar la mutació causal de la MH (12).

Aquesta mutació va ser identificada al gen *Interesting Transcript 15* (IT15), que codifica per a la proteïna huntingtina (htt). Aquest gen consta de 67 exons i té una llargària de 200 kilobases. En la seqüència N-terminal del gen de la Huntingtina (HTT), més concretament a l'exó 1 d'aquest gen, hi ha una regió repetitiva d'àcid desoxiribonucleic (ADN). Aquesta regió de

repeticions consisteix en la repetició dels nucleòtids citosina (C) adenina (A) i guanina (G) i es coneix com a tram de repeticions CAG. La mutació causal de la MH és deguda a una expansió del nombre de repeticions CAG d'aquest gen (12). En individus no afectats per la MH, el nombre de repeticions CAG varia entre 6 i 35. Per sota de 35 repeticions, no hi ha manifestació de la MH (figura 1) (14,15).

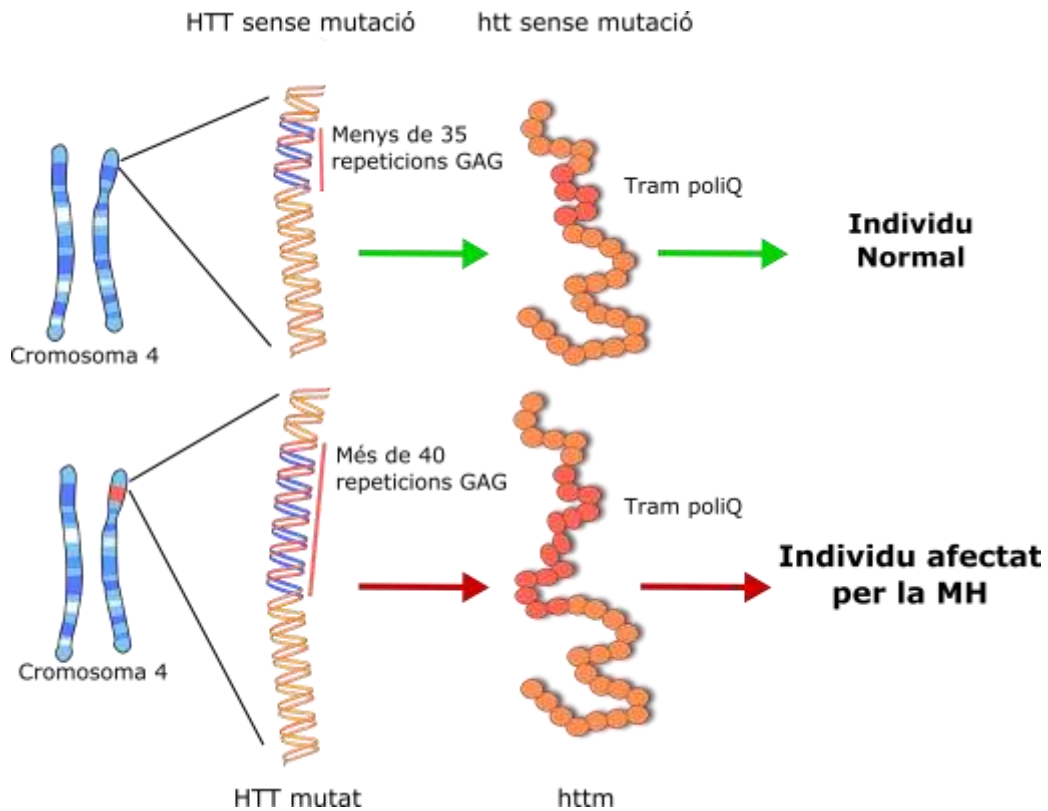


Figura 1. Genètica de la MH

El gen de la huntingtina (HTT) que codifica per a la htt està localitzat al cromosoma 4. Aquest gen conté repeticions del trinucleòtid CAG que codifiquen per al tram poliQ present en la htt. Els individus que presenten menys de 35 repeticions CAG no manifesten la MH. En canvi, individus amb més de 40 repeticions presenten una expansió excessiva del tram de poliglutamines (poliQ) que donarà lloc a la htt mutada (httm) i a la manifestació de la MH. Figura adaptada de EHDN, 2016. Disponible: www.ehdn.org (16).

La MH és una malaltia amb un patró d'herència autosòmica dominant, és a dir, que la descendència d'un pacient amb la MH té una probabilitat d'un 50% de desenvolupar-la també. Tot i això, la MH mostra un patró de penetrància associat al nombre de repeticions CAG. Individus que presenten una llargària de repeticions CAG entre 27-35 són considerats com asimptomàtics, tot i que presenten anomalies (17). Els pacients que tenen un rang de repeticions d'entre 36 i 39 repeticions CAG presenten una penetrància incompleta de la malaltia, i per tant poden o no manifestar-la (14,18). Quan la llargària de les repeticions CAG és major de 40, hi ha penetrància completa i els pacients desenvoluparan la MH.

I. Introducció

Per altra banda, diferents models estadístics han mostrat que hi ha una alta correlació inversa entre el nombre de repeticions CAG i l'edat d'inici de la malaltia (19,20). L'inici de la malaltia es defineix per la manifestació clara de símptomes motors i neurològics. L'edat mitjana d'inici és als 40 anys, tot i que en casos estranys la MH ha estat diagnosticada en nens de 2 anys i en adults de fins a 87 anys (18).

L'edat d'inici de la malaltia també està determinada per factors gènics i ambientals (21,22). S'ha descrit que la llargària de les repeticions CAG explicaria entre un 50 i un 70% de la variabilitat observada en l'edat d'inici de la malaltia (19). Per tant, no és possible predir amb total exactitud l'edat d'inici individual de la malaltia. No obstant, la forta correlació entre l'edat d'inici de la simptomatologia i la llargària de les repeticions CAG permeten fer certes generalitzacions (figura 2). Individus amb un rang de repeticions CAG d'entre 40-49 presenten un inici de la malaltia adult entre els 30-50 anys. Les manifestacions clíniques abans dels 20 anys estan associades amb més de 50 repeticions CAG, i aquests casos es coneixen com a MH juvenil (23).

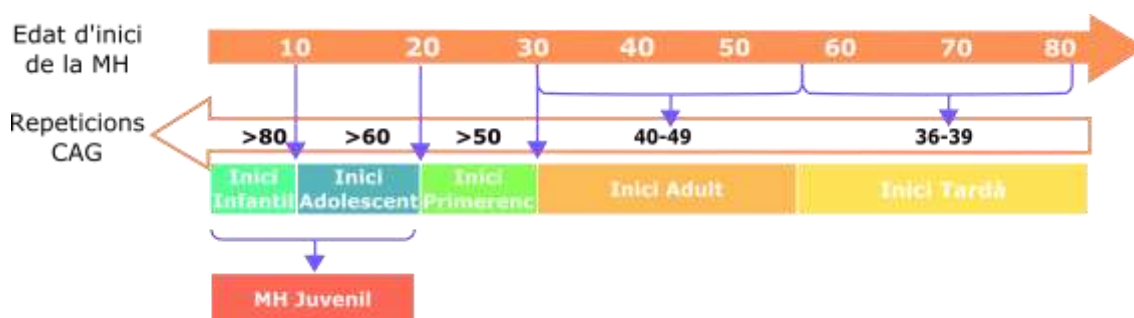


Figura 2. Correlació entre el nombre de repeticions CAG i l'inici de la MH

En la MH la llargària de les repeticions CAG correlaciona inversament amb l'edat d'inici de la simptomatologia. En la figura es mostra una aproximació de l'edat d'inici de la MH en relació amb el nombre de repeticions CAG. Figura adaptada de Nopoulos et al., 2016 (14).

Un altre factor a tenir en compte en la genètica de la MH és que la mutació causant de la malaltia és una mutació dinàmica. Això significa que la llargària de l'expansió CAG d'un al·lel es pot expandir o contreure durant la transmissió gènica i pot variar entre cèl·lules en un mateix individu (24). Quan les repeticions CAG es troben en el rang normal, entre 6 i 27 repeticions, aquestes s'hereden de manera estable. Contràriament, si el nombre de repeticions CAG excedeix les 27, les repeticions són inestables i això pot comportar un allargament d'aquestes durant la meiosi (24).

La combinació dels factors genètics existents en la MH com són la naturalesa dinàmica de la mutació i la correlació entre la llargària del tram CAG i l'edat d'inici de la malaltia creen el

fenomen genètic conegut com a anticipació genètica. L'anticipació genètica es defineix com un fenomen genètic que provoca que una malaltia hereditària es manifesti abans o amb més severitat en generacions successives en una família afectada per la malaltia. Aquest fenomen té lloc en un 20% dels casos de la MH (25).

L'anticipació genètica en la MH té, per tant, dues conseqüències directes. La primera és l'aparició de casos esporàdics de la malaltia. Els individus amb un número d'entre 27-35 repeticions sense cap símptoma aparent, poden passar a la descendència al·lels de més de 35 repeticions CAG que poden desenvolupar la MH. En aquests casos la MH apareix de manera esporàdica en una família sense una història de la MH aparent. Diferents estudis mostren que l'aparició de mutacions esporàdiques representa entre un 6 i un 8% de tots els casos diagnosticats de la MH (26). La segona conseqüència és que l'allargament del nombre de repeticions CAG correlaciona amb un inici anticipat de la malaltia i pot generar casos de la MH juvenil (14).

1.3. Síntomes clínics de la MH

La progressió de la MH es pot dividir en dos períodes clarament diferenciats que presenten diferents estadis (figura 3). Primerament, té lloc el període que és conegut com a període premanifest, que s'inicia amb l'estadi presimptomàtic. Durant aquest estadi els pacients de la MH no presenten símptomes clínics clarament distingibles de la població general. Aquest estadi és seguit per l'estadi prodròmic, que està caracteritzat per ser la fase precursora de la manifestació completa de la malaltia i és quan s'inicia l'aparició de símptomes motors, cognitius i psiquiàtrics, encara que de manera gairebé imperceptible (18).

Després del període premanifest els pacients entren en el període manifest de la malaltia. Existeixen diferents escales per avaluar la progressió de la malaltia. Les dues escales més conegudes en la MH són l'escala de capacitats Shoulson-Fahn, que divideix el període manifest en cinc estadis, i l'escala de qualificació unida de la MH UHDRS (*United Huntington's Disease Rating Scale*) (27,28). Actualment, la UHDRS és l'escala més usada. Aquesta escala avalua usant diferents testos i puntuacions els símptomes motors, cognitius i psiquiàtrics com també la capacitat funcional dels pacients (18,28). Des d'un punt de vista general, el període manifest pot ser dividit en tres estadis: inicial, moderat i tardà. En l'estadi inicial de la MH els símptomes esdevenen aparents però els pacients encara són actius en la majoria de les àrees, i majoritàriament encara poden treballar. En l'estadi moderat de la MH els pacients perden la capacitat de realitzar funcions complexes com són conduir o treballar. Finalment en l'estadi

I. Introducció

tardà de la malaltia els pacients mostren una pèrdua total de la independència en tots els aspectes de la vida (14,18,27,28).

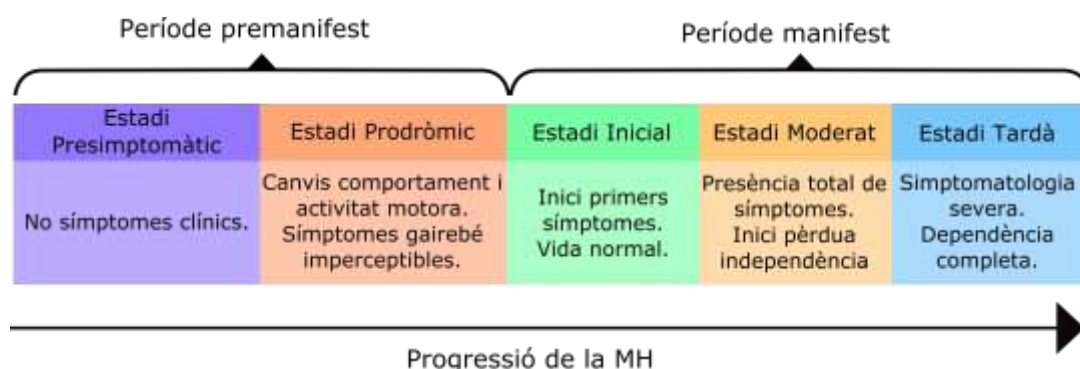


Figura 3. Períodes i estadis de la MH

La MH es divideix en diferents períodes i estadis associats a la progressió de la simptomatologia. La MH s'inicia amb el període premanifest que es divideix en l'estadi presimptomàtic i l'estadi prodròmic. Després del període premanifest s'inicia el període manifest que consisteix en els estadis inicial, moderat i tardà.

El desordre motor de la MH presenta un patró bifàsic. Inicialment, els símptomes motors es caracteritzen per ser moviments coreics, els quals són hipercinètics (moviments involuntaris, excessius, curts i que poden semblar ser semivoluntaris). Amb la progressió de la malaltia, els moviments coreics empitjoren i poden causar problemes amb l'escriptura i l'alimentació i contribueixen a caigudes. A mesura que la malaltia progressa, els moviments hipercinètics disminueixen i els símptomes motors estan caracteritzats per una pèrdua de la capacitat per iniciar moviments voluntaris i per la presència de moviments hipocinètics, que són moviments rígids i lents (18).

Els símptomes cognitius apareixen anys abans que els símptomes motors i el declivi cognitiu és gradual (29,30). Inicialment, els principals símptomes cognitius impliquen la funció executiva, cosa que genera problemes en l'organització, la planificació i la iniciació d'accions, així com també una disminució en la capacitat d'atenció (18,29,31). A més, el dèficit cognitiu en la MH també inclou deteriorament visuoespacial i de memòria que estan associats amb problemes en l'aprenentatge i en la recuperació de nova informació (32). El llenguatge i el coneixement semàntic estan relativament preservats. Tot i això, els pacients de la MH presenten problemes comunicatius deguts a problemes en la coordinació dels músculs orofacials i de la llengua, com també incapacitat d'estructurar el discurs (32). En alguns casos, el deteriorament cognitiu pot arribar al nivell de demència (14,18,31).

Els trastorns psiquiàtrics són freqüents i afecten entre el 33 i el 76% dels pacients de la MH. Els símptomes psiquiàtrics de la MH són molt variables (32,33). En els estadis inicials s'observa un augment en la impulsivitat, en la irritabilitat i en la dificultat de la regulació de l'estat d'ànim. Aquests símptomes estan relacionats amb la desinhibició del lòbul frontal cerebral (20). També a causa de la desinhibició del lòbul frontal, els pacients mostren comportaments i pensaments obsessivocompulsius (33). Encara que hi ha una gran variabilitat en els trastorns psiquiàtrics en la MH, la condició psiquiàtrica més comú entre els pacients de la MH és la depressió, seguida de l'ansietat i l'apatia (18,34). Els símptomes depressius s'observen en el 50% dels pacients (32,34). Les tendències suïcides en els pacients de la MH són freqüents, les taxes de suïcidi observades en els malalts són 12 vegades més grans que en la població general. La depressió i la impulsivitat són les principals causes de risc del suïcidi en la MH (32). El deteriorament cognitiu i psiquiàtric pot causar més angoixa i dificultats per als pacients i les famílies que els símptomes motors (18,35).

Com que els principals símptomes de la MH són motors, cognitius i psiquiàtrics, clàssicament aquesta malaltia ha estat entesa com un trastorn exclusiu del sistema nerviós central (SNC). Tot i això, cada cop hi ha més evidències que demostren que els símptomes clínics perifèrics que presenten els pacients són una part important de la MH. Una d'aquestes manifestacions patològiques perifèriques que ha estat molt documentada és la gran pèrdua de pes que presenten els pacients. Borrell-Pages descriu aquesta pèrdua de pes com el quart component de la malaltia (36). Altres manifestacions perifèriques que s'han descrit en la MH són: defectes en l'hematopoesi, disfuncions endocrines i metabòliques, atrofia testicular i dels músculs esquelètics, migració i activació aberrant de les cèl·lules del sistema immune i disfunció cardíaca (37).

Quan els primers símptomes són diagnosticats el curs de la malaltia és progressiu i letal i els pacients normalment moren entre els següents 15-20 anys. La causa més comú de mort és la pneumònia seguida per les insuficiències cardíques. Altres causes de mort de la MH són el suïcidi, danys relacionats amb caigudes o complicacions a l'hora d'engolir (38). Actualment no hi ha tractaments que retardin o previnguin el curs de la malaltia. Els tractaments actuals es basen en millorar els símptomes i optimitzar l'estat funcional dels pacients.

2. La proteïna htt

La htt és una proteïna multiconformacional que consta de 3142 aminoàcids (aas) i té un pes aproximat de 384 kilodaltons (kDa) (12). La htt està codificada pel HTT, que consta del tram

I. Introducció

de repeticions CAG a l'exó 1. Aquest tram codifica per a una cadena de glutamines, conegut també com a tram poliQ. En individus no afectats per la MH aquest tram poliQ conté entre 6 i 35 glutamines (12) mentre que els pacients de la MH presenten una expansió del tram poliQ que està format per 36 o més glutamines, generant la httm. La proteïna httm és clivada proteolíticament i els fragments resultants agregen i formen fibril·les i oligòmers (figura 4) (39).

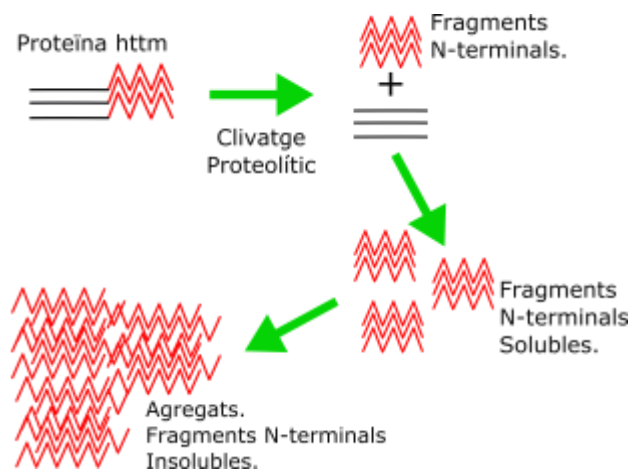


Figura 4. Generació proteolítica dels fragments N-terminals i d'agregats de la httm

El processament proteolític de la proteïna httm produeix la formació de fragments N-terminals que presenten el tram de PoliQ. Aquests fragments N-terminals formen monòmers insolubles que presenten tendència a agregar i a formar oligòmers insolubles. La toxicitat produïda per la httm pot ser deguda a la proteïna total sense clivar o a la formació dels fragments N-terminals.

Hi ha nou malalties neurodegeneratives, entre les que cal destacar la MH i algunes atàxies espinocerebel·loses, relacionades amb proteïnes que presenten una expansió anormal en el tram poliQ. Totes aquestes malalties mostren característiques comuns com per exemple la gran correlació que existeix entre la llargària de les repeticions CAG i l'edat d'inici de la malaltia, i que totes presenten agregats de la proteïna mutant en les cèl·lules que degeneren. Tot i això, la naturalesa de les proteïnes, les poblacions neuronals que degeneren i les manifestacions clíniques associades a cadascuna d'elles difereixen substancialment. Això suggereix que l'expansió del tram poliQ té un paper molt important en la patologia d'aquestes malalties, però també la proteïna on té lloc aquesta expansió determina l'especificitat de la malaltia (40). Per aquesta raó, per entendre la patologia de la MH és clau conèixer l'expressió, l'estructura i la funció de la htt.

2.1. Expressió i localització cel·lular de la htt

Tant la htt com els seus transcrits tenen una expressió ubíqua en tots els teixits, encara que amb diferents nivells, depenent del teixit i del tipus cel·lulars. Els teixits on els nivells

d'expressió de la htt són més alts són el cervell i els testicles (37). En el SNC l'expressió de la htt no està restringida a les cèl·lules que degeneren en la MH, sinó que s'expressa en totes les neurones del SNC i en les cèl·lules de la glia (41). Les regions cerebrals amb uns nivells d'expressió de la htt particularment alts són l'estriat, el neocòrtex, l'hipocamp i l'escorça cerebel·losa (18,37,42). La localització subcel·lular de la htt és dinàmica i complexa i la conformació de la proteïna pot canviar depenent del compartiment subcel·lular on es trobi (43). La htt es pot trobar tant al citoplasma com al nucli i pot ser transportada entre els dos compartiments. En el citoplasma s'ha observat que la htt pot estar localitzada en diferents orgànuls cel·lulars com ara el reticle endoplasmàtic i l'aparell de Golgi, i en endosomes, com també en les neurites i les sinapsis associada a microtúbuls, vesícules, membrana plasmàtica i sinaptosomes (44–46).

Un altre factor a tenir en compte pel que fa a la regulació de l'expressió gènica de la htt és el factor temporal, ja que la htt s'expressa tant en teixits adults com durant el desenvolupament embrionari (47). Tot i que la htt ha estat una proteïna exhaustivament estudiada, encara no és coneixen totalment els mecanismes reguladors de la seva expressió.

2.2. Estructura de la proteïna htt

La regió més ben estudiada de la htt és la regió N-terminal codificada per l'exó 1 del HTT ja que és on es troba la mutació causal de la MH. Aquesta regió està formada aproximadament per 100 aas i és pot dividir en tres dominis altament caracteritzats (figura 5). Els primers 17 aas de la regió N-terminal, formen el domini conegut com HTT^{NT} o N17 (48). El domini N17 s'associa de manera reversible a les membranes lipídiques del reticle endoplasmàtic, endosomes i vesícules autofàgiques ja que presenta una estructura secundària d' α -hèlix amfipàtica (49). A més a més, aquest domini interacciona amb la proteïna TPR (translocated promoter region), component del porus nuclear i amb activitat de translocació nuclear, i per tant funciona com un senyal d'exportació nuclear (49). El domini N17 té un paper clau en la regulació, l'activitat i la localització de la htt. S'ha observat que la mutació puntual o deleció d'aquesta seqüència produeix l'acumulació nuclear de la htt i toxicitat cel·lular (46,49).

Adjacent a aquest domini N17 és troba el tram polimòrfic poliQ. El tram poliQ forma una estructura proteica secundària de cremallera polar, que serveix com a zona d'interacció amb altres proteïnes. El tram poliQ, també present en factors de transcripció, possibilita la interacció d'aquests amb reguladors transcripcionals (46,50). Seguidament al tram poliQ es troba un altre tram polimòrfic format per prolines (poliP). La htt té una solubilitat molt baixa, a casa del seu alt

I. Introducció

pes molecular i a la llargària de la regió poliQ. S'ha descrit que el tram poliP ajuda a estabilitzar la htt i a mantenir la solubilitat d'aquesta (51). Per altra banda també s'ha descrit aquesta regió com una regió clau que permet la interacció amb diferents tipus de proteïnes (46,50,52).

Seguidament de la part codificant de l'exó 1, la htt està conformada per repeticions de la seqüència d'aas HEAT. S'anomenen seqüències HEAT per les quatre proteïnes en les quals van ser inicialment observades: htt (H), *elongation factor 3* (E), *the regulatory A subunit of protein phosphatase A* (A) i TOR1 (T) (figura 5). Les seqüències HEAT són seqüències d'aproximadament 40 aas que formen estructures secundàries α -hèlix antiparal·leles separades per estructures no-helicoidals i que és repeteixen múltiples vegades en una mateixa proteïna (53).

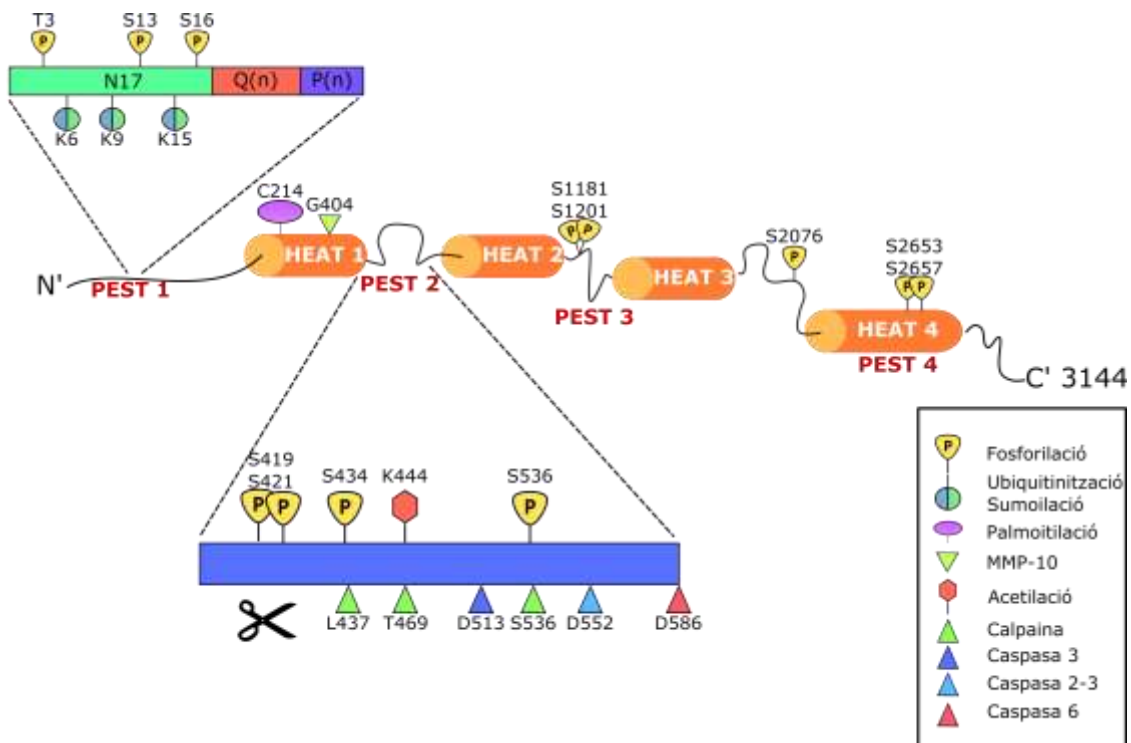


Figura 5. Representació esquemàtica de l'estructura i de les modificacions posttraduccional de la htt
El diagrama representa la seqüència d'aas de la htt amb les regions HEAT i PEST. Els dominis PEST1 i PEST2 han estat magnificats ja que aquests dos dominis presenten un gran nombre de modificacions posttraduccional. A més, el domini PEST 1 conté la regió N17, el tram poliQ (Q(n)) amb un nombre d'entre 6 i 35 glutamines i el tram poli (P(n)). Figura adaptada de Saudou i Humber, 2016 (46).

Diferents estudis bioinformàtics han determinat que la htt presenta entre 16 i 36 seqüències HEAT que s'ordenen formant grups d'entre 3 i 5 grans dominis, coneguts com a regions HEAT, que estan separats per regions desordenades. Així aquests dominis formats per seqüències HEAT formen estructures superhelicoidals que actuen com a suport estructural per a altres proteïnes facilitant les interaccions proteïna-proteïna (54). Així mateix també faciliten les interaccions internes entre diferents regions de la htt. Això suggereix que la htt és una

proteïna àmpliament flexible que pot adoptar múltiples conformacions 3D que influeixen la seva activitat i localització (46,54).

També ha estat descrit que la htt conté 4 dominis PEST. Aquests dominis són regions enriquides amb asparagina (P), àcid glutàmic (E), serina (S) i treonina (T) i són motius proteolítics. Tres d'aquests dominis es troben en les estructures desordenades que separen els dominis HEAT i un al domini N17. Curiosament, la majoria de modificacions posttraduccionals a les quals està sotmesa la htt es troben en aquestes regions (figura 5) (46,48,49). La htt està sotmesa a diferents tipus de modificacions posttraduccionals com són fosforilacions, ubiquitinacions, sumoilacions, acetilacions, palmitilacions i clivatge proteic (55–58). Aquestes modificacions tenen un paper clau en l'estabilitat, funció, localització i homeòstasi de la proteïna. L'extensió del tram poliQ fa que es produeixi una alteració en aquestes modificacions posttraduccionals augmentant la toxicitat de la httm a través de diferents mecanismes patològics que juguen un paper clau en la MH (46,48,55–58).

Finalment, a la part C-terminal de la proteïna s'ha descrit que hi ha una senyal d'exportació nuclear, molt rellevant per a la localització i la regulació funcional de la proteïna (59). També s'ha descrit que en aquesta regió C-terminal hi ha un senyal poc actiu de localització nuclear (60).

2.3. Funció proteica de la htt

Des de l'any 1993, quan es va descobrir que el gen codificant de la htt és el causant de la MH, s'han invertit molts esforços per entendre el rol cel·lular d'aquesta. Tot i això, no ha estat fàcil determinar-lo ja que la htt té un pes molecular molt alt i per tant és difícil d'aïllar i d'analitzar. A més, és una proteïna d'expressió ubíqua que s'expressa tant al nucli com al citoplasma i que interacciona amb un gran nombre de proteïnes.

L'estudi de l'estructura proteica de la htt, de la seva localització subcel·lular, de les interaccions proteïna-proteïna que estableix, així com l'ús de ratolins genoanul·lats (*Knock-out*, *KO*) i models cel·lulars han ajudat a dilucidar diferents rols cel·lulars d'aquesta. S'ha observat que la htt està implicada en un gran nombre de processos cel·lulars bàsics que tenen lloc en diferents localitzacions subcel·lulars (figura 6). Diferents autors defineixen la htt com una proteïna multifuncional que actua com a estructura d'unió d'un gran nombre de proteïnes, formant complexos que regulen i coordinen diferents processos cel·lulars. Per tant, conèixer amb exactitud quines proteïnes interactuen amb la htt i quan i on es formen aquests complexos

I. Introducció

proteics és essencial per poder definir tots els rols cel·lulars de la htt i la seva rellevància en els processos patològics de la MH (46,50).

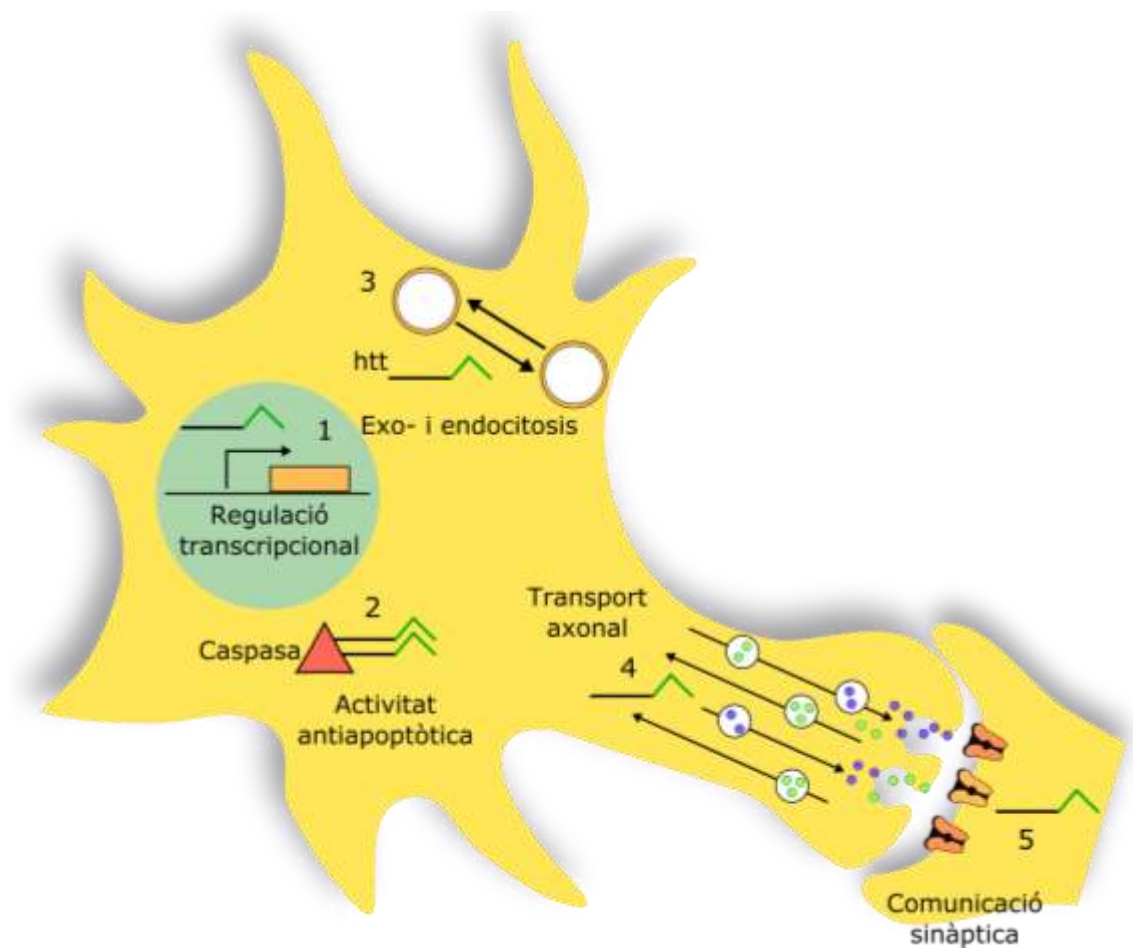


Figura 6. Rols cel·lulars principals de la htt

La il·lustració esquematitza les funcions centrals de la htt: 1) regulació transcripcional, 2) activitat antiapoptòtica, 3) exo-i endocitosis, 4) transport axonal i 5) comunicació sinàptica.

La htt està implicada en la regulació de l'expressió gènica. S'ha descrit que la htt interactua amb un gran nombre de factors de transcripció, receptors nuclears, proteïnes encarregades del remodelatge de la cromatina, coactivadors i repressors transcripcionals (50,61-63). Els mecanismes exactes de com la htt regula cadascuna de les vies transcripcionals encara no es coneixen totalment, encara que s'han descrit alguns d'aquests mecanismes. S'ha observat que la htt és pot unir amb repressors o coactivadors transcripcionals en el citoplasma i retenir-los o bé transportar-los al nucli. Un exemple molt ben estudiat del mecanisme de regulació transcripcional de la htt és el cas del factor neurotròfic derivat del cervell (*Brain-derived neurotrophic factor*, BDNF). En el promotor del BDNF hi ha una seqüència reguladora anomenada Element de resposta 1 (*Responsive element called element 1/neuron-restrictive silencer 1*, RE1/NRE1) que és reprimida quan se li uneix el repressor transcripcional de l'Element

de resposta 1 (*Repressor element 1 transcription/neuron restrictive silencer factor*, REST1/NRSE). La htt s'uneix i reté al repressor REST1/NRSE en el citoplasma promovent la transcripció del BDNF. El grup de Zuccato ha mostrat que la sobreexpressió de la htt augmenta els nivells del BDNF tant *in vivo* com *in vitro*, mentre que la depleció de la htt redueix els seus nivells (63,64).

La htt també juga un paper fonamental en la regulació del transport cel·lular. La htt interactua amb la maquinària motora cel·lular de manera directa unint-se amb la proteïna dineïna o de manera indirecta a través de la proteïna associada a la htt 1 (*Huntingtin-associated protein 1*, HAP1) (65,66). Aquests complexos proteics transporten en sentit retrògrad i anterògrad al llarg dels axons, vesícules cel·lulars, autofagosomes, lisosomes i endosomes (65–67). Paral·lelament a la regulació transcripcional de la htt sobre l'expressió del BDNF, la htt també promou el transport vesicular d'aquest, aquest transport és essencial ja que la majoria del BDNF estriatal es produeix al còrtex cerebral i és transportat fins a l'estriat (66).

A part de regular el transport cel·lular, que és un punt essencial en el procés de transmissió i de comunicació sinàptica, la htt està implicada en molts altres mecanismes importants d'aquest procés. En el terminal presinàptic la htt està implicada en els processos d'exo-i endocitosi vesicular (46,50,68). A nivell postsinàptic la htt interacciona amb la proteïna de la densitat postsinàptica (*Postsynaptic density 95*, PSD95) que és una proteïna fonamental en l'organització de la densitat postsinàptica i la morfologia de les dendrites (69,70). La proteïna PSD95 s'uneix amb els receptors glutamatèrgics N-metil-D-aspartat (NMDA) i kainat regulant la seva activitat i la seva localització. La sobreexpressió de la htt protegeix contra la neurotoxicitat generada per aquests receptors (50,69).

Adicionalment, la htt també té una funció en la supervivència cel·lular degut a les seves propietats antiapoptòtiques. Diferents estudis mostren que la sobreexpressió de la htt protegeix les cèl·lules de diferents estímuls tòxics tant *in vitro* com *in vivo* (71,72), mentre que la depleció d'aquesta augmenta la vulnerabilitat cel·lular davant d'estímuls tòxics (72,73). Aquest rol antiapoptòtic de la htt està lligat al fet de que la htt bloqueja l'activació de les caspases 3, 8 i 9 (71,72,74). A més, com ja ha estat explicat, també promou la producció i transport de la neurotrofina BDNF, que és un factor clau per a la supervivència neuronal.

Per altra banda es va observar que els ratolins KO del gen de la htt presentaven uns alts nivells de mort cel·lular. L'ús d'aquests models de ratolins també va permetre observar la importància del paper de la htt durant el desenvolupament. Aquests embrions KO presentaven defectes en la gastrulació i morien al dia embrionari 7.5 (75). Posteriorment, usant ratolins que

expressen el 50% de la htt o ratolins que tenien deleció en la htt en un nombre limitat de cèl·lules, es va observar que la htt és una proteïna necessària per la correcta diferenciació del neuroblast en l'estriat, el còrtex i el tàlem (46,75).

3. Neuropatologia de la MH

Neuropatològicament, la MH està caracteritzada per la pèrdua neuronal en diferents àrees funcionals del cervell. Les alteracions cerebrals són progressives i es desenvolupen abans de l'aparició de les manifestacions clíniques (2,76). Els pacients de la MH poden arribar a mostrar una disminució del pes cerebral de fins al 25% en els casos avançats de la malaltia. Aquesta gran pèrdua de pes cerebral és deguda principalment a la gran atròfia estriatal i cortical present en la MH (figura 7) (2,76). Tot i això, altres àrees cerebrals freqüentment també mostren pèrdua neuronal i atrofia. Aquestes àrees inclouen l'hipocamp, el tàlem, l'hipotàlem, el globus pàl·lid (GP), el nucli subtalàmic i el cerebel (2,77). Actualment, està ben establert que la degeneració cerebral en la MH és un fenomen variable i generalitzat a totes les àrees cerebrals (20,77). Curiosament, aquesta variabilitat en el patró degeneratiu reflecteix la gran heterogeneïtat clínica observada en els pacients de la MH (78,79).

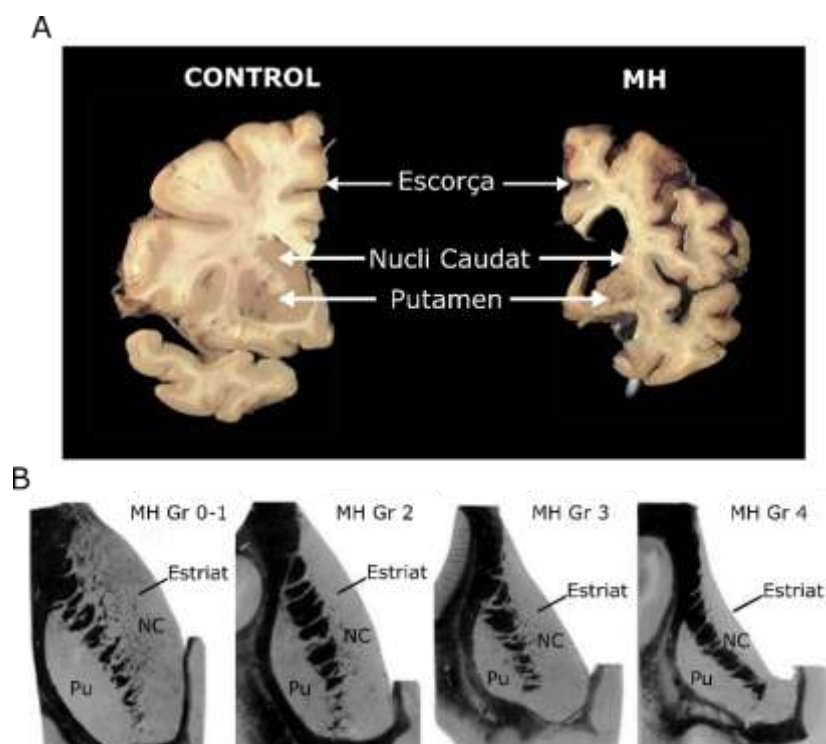


Figura 7. Neuropatologia de la MH

(A) Seccions coronals del cervell humà d'un individu control i d'un pacient avançat de la MH. Tal com s'observa a la imatge, la MH causa la degeneració del nucli caudat (NC) i del putamen (Pu), donant lloc a

un engrandiment dels ventricles, i l'atròfia de l'escorça cerebral. (B) Il·lustracions esquemàtiques dels diferents graus (Gr) de la neuropatologia estriatal segons el sistema de classificació gradual de Vonsattel. En els Gr 0-1 l'estriat no mostra canvis macroscòpics apreciables. La degeneració estriatal presenta una atròfia progressiva des dels Gr 2 fins al 4, on l'atrofia estriatal és molt severa. Figura adaptada de Vonsattel et al., 1985 i Reiner et al., 2011 (76,80).

Un altre tret neuropatològic característic de la MH és la presència d'agregats proteics de la httm. En totes les regions cerebrals s'observen inclusions intranuclears (IIN) i citoplasmàtiques. Les inclusions s'han utilitzat àmpliament com un indicador del procés patològic ja que són presents en tot el cervell i es formen abans de l'aparició dels símptomes clínics (81,82). Tot i això el seu rol en la disfunció i mort neuronal és molt controvertit, ja que hi ha evidències que mostren tant un paper deleteri com protector de les inclusions en la patologia de la malaltia (39,81,83).

L'estriat és la zona on s'observa una atròfia més clara en la MH, i a més presenta diferents patrons de degeneració. Per aquest motiu, el neuropatòleg Jean Paul Vonsattel va desenvolupar un sistema per classificar la severitat neuropatològica de la MH, basant-se en criteris macroscòpics i microscòpics relacionats amb la morfologia estriatal dels cervells *post mortem* dels pacients. Aquest és un sistema gradual que consta de 5 graus (0-4) de severitat estriatal progressiva (figura 7) (76). El 52% dels cervells de la MH estan classificats en el grau 3. El 21% formen part dels graus 0, 1 i 2 mentre que el grau 4 està format pel 28% dels cervells de la MH. L'atròfia cerebral és determinada per un anàlisi macroscòpic generalitzat. En el grau 0 no s'observa atròfia cerebral, els cervells dels pacients classificats en aquest grup no mostren diferències amb els cervells d'individus normals. En el grau 1 els cervells presenten una atròfia molt lleu. A partir del grau 2 ja s'observa una atròfia cerebral moderada i es comença a fer evident l'engrandiment dels ventricles laterals degut a l'atròfia estriatal. Els cervells classificats en el grau 3 mostren una atròfia severa. Les anàlisis histològiques microscòpiques mostren característiques patològiques ja en els cervells assignats al grau 0. Aquestes característiques estan presents i progressen en els diferents graus. En el grau 0 ja són evidents la presència d'IIN, una pèrdua neuronal del 30-40% i un augment del nombre d'oligodendròcits. L'astrogliosi estriatal es detecta a partir del grau 1. Els cervells classificats en el grau 4 mostren una atròfia estriatal molt severa amb una pèrdua neuronal del 90-95% (2,76,79).

3.1. Neuropatologia cortico-estriatal de la MH

Com ja s'ha citat abans, l'estriat és la zona on s'observa una major afectació patològica i atrofia en la MH. L'estriat és un component clau dels ganglis basals. Els ganglis basals son un grup de nuclis subcorticals altament interconnectats, així que alteracions en un d'aquest nuclis

I. Introducció

genera greus conseqüències en els altres. Estan implicats en el control d'una gran varietat de funcions com poden ser funcions motores, associatives, cognitives i emocionals (84). Els ganglis basals estan formats per l'estriat, el GP i l'amígdala. L'estriat està compost pel nucli caudat i el putamen. El GP inclou el GP extern (GPe) i el GP intern (GPI) (79,84). Encara que anatòmicament el nucli subtalàmic (NST) i la substància negra (SN) no formen part dels ganglis basals, a causa de la seva connectivitat són inclosos com a components d'aquests. La SN està dividida en dues zones principals *SN pars reticulata* (SNr) i *SN pars compacta* (SNc) (figura 8) (79,84).

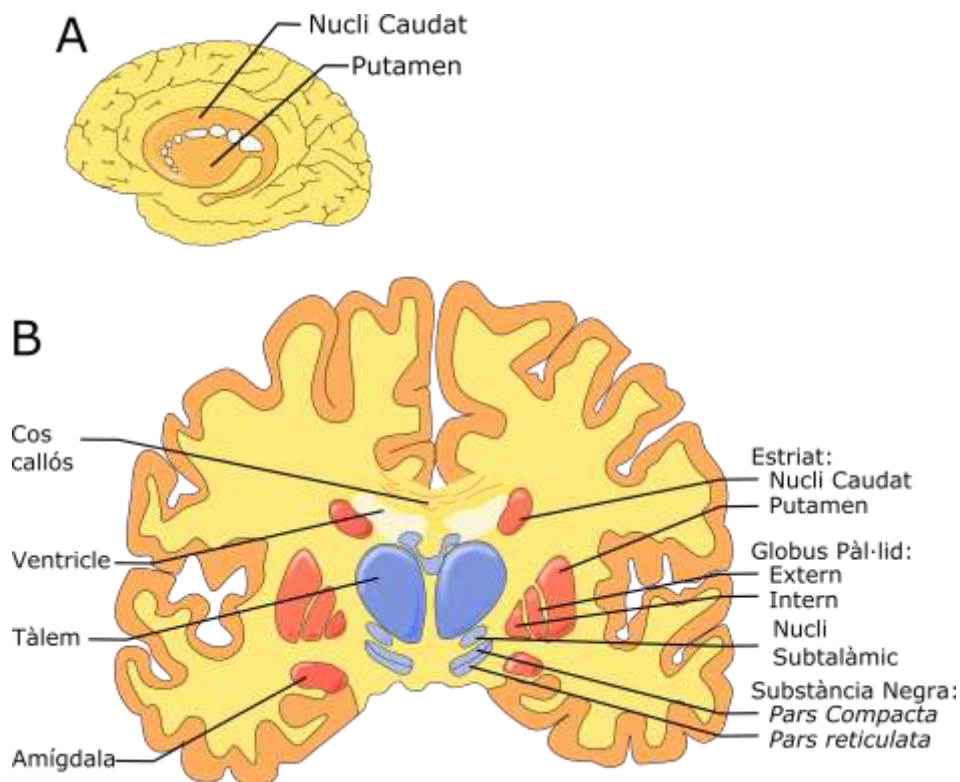


Figura 8. Components i localització dels ganglis basals

A) Il·lustració on es mostra la localització del nucli caudat i putamen en un tall sagital del cervell humà. B) Localització dels ganglis basals, així com d'estructures associades com el nucli subtalàmic, la substància negra, el cos callós, el tàlem i els ventricles en una il·lustració d'un tall coronal del cervell humà. Els nuclis principals dels ganglis basals, estriat, globus pàl·lid i amígdala estan representats en vermell. Mentre que el tàlem, el nucli subtalàmic i la substància negra estan representats en blau. Figura adaptada de Waldvogel et al., 2014 (79).

L'estriat rep innervacions glutamatèrgiques i dopaminèrgiques de forma massiva (figura 9). És el nucli principal d'entrada d'informació dels ganglis basals. Les innervacions excitadores glutamatèrgiques que arriben a l'estriat procedeixen de totes les regions de l'escorça cerebral així com de diferents nuclis talàmics. Les innervacions dopaminèrgiques que rep l'estriat arriben de la SNc, i està ampliament acceptat que la senyalització dopaminèrgica pot modificar les respostes al glutamat. Aquestes projeccions aferents convergeixen en les neurones estriatals

conegudes com a *medium spiny neurons* (MSN). Per tant, les MSN són les encarregades de rebre, processar i integrar la informació que els arriba de l'escorça, dels nuclis talàmics i de la SNc i seguidament transmetre la informació integrada a altres nuclis dels ganglis basals (figura 9) (85). Les MSN són neurones inhibidores gabaèrgiques de projecció eferent. L'estriat està constituït per un 90-95% de MSN i un 5-10% d'interneurones. Les interneurones s'encarreguen de modular l'excitabilitat de les MSN (86). En la neuropatologia de la MH, les MSN són la població neuronal més afectada i pateixen una degeneració progressiva (87). Les interneurones no presenten mort cel·lular i el seu nombre està preservat al llarg de la progressió de la malaltia. Tot i això, poden tornar-se disfuncionals i estar implicades en la patologia de la malaltia (86).

Les MSN es poden dividir en dues subpoblacions segons la seva composició neuroquímica i la seva connectivitat. La població de MSN que forma la "via directa" projecta principalment al GPi i a la SNr. Aquestes neurones expressen principalment receptors de Dopamina tipus 1 (D1) i els neuropèptids substància P i dinorfina. La segona població de MSN expressen encefalina i receptors de Dopamina tipus 2 (D2). Aquesta segona població de MSN forma la "via indirecta" que projecta al GPe (figura 9) (79,88).

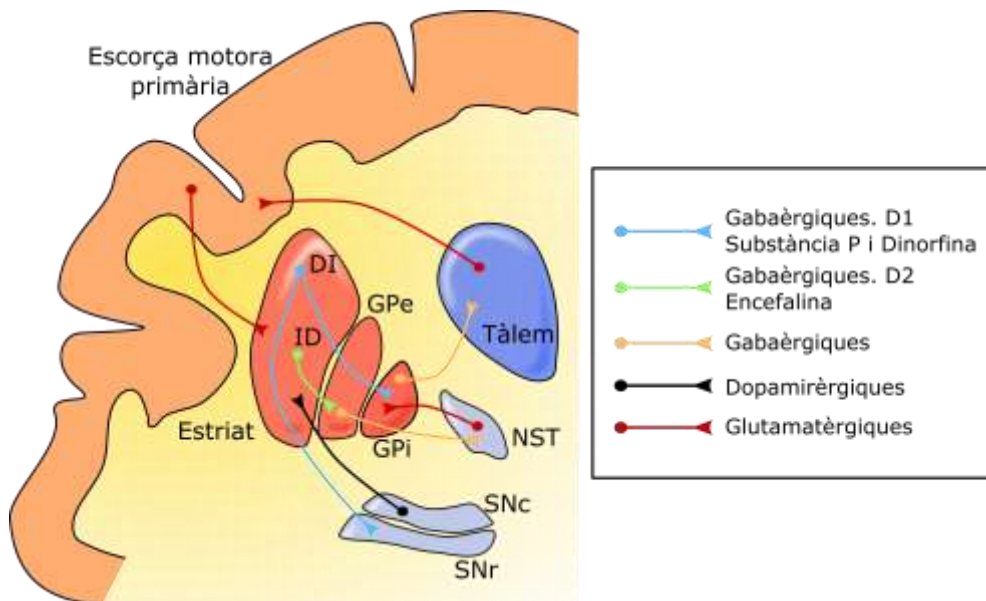


Figura 9. Connectivitat de la via directa i indirecta dels ganglis basals

Diagrama esquemàtic de les connexions principals que formen part de la via directa (DI) i indirecta (ID) dels ganglis basals. L'estriat és el nucli d'entrada de les innervacions excitadores glutamatèrgiques i dopaminèrgiques enviades des de l'escorça cerebral i de la SNc, respectivament. L'estriat envia innervacions gabaèrgiques inhibidores a través de la DI i de la ID. La via DI connecta i inhibeix el GPi i la SNr. La ID connecta i inhibeix el GPe que al seu torn envia innervacions gabaèrgiques inhibidores al NST. El NST també regula el GPi enviant innervacions glutamatèrgiques excitadores. Seguidament, el GPi envia innervacions gabaèrgiques inhibidores al tàlem. Finalment, el tàlem connecta i excita l'escorça motora primària. En resum, podríem considerar que la DI afavoreix l'activitat del tàlem mentre que la ID causa una reducció de l'activació talàmica. Figura adaptada de Gosh et al., 2015 i Wadvogel et al., 2015 (18,79).

I. Introducció

Per tant, la informació processada en l'estriat és transmesa per aquestes dos vies, que són fonamentals en la patofisiologia de la MH (figura 9). Aquestes dues vies formen circuits paral·lels i amb funcions oposades que estan altament interconnectats per tal de controlar finalment la funció motora. Les dues vies convergeixen en el GPi, que envia projeccions inhibidores al tàlem. Però mentre que la via directa s'encarrega d'inhibir directament el GPi, la via indirecta s'encarrega d'excitar-lo indirectament. Les projeccions inhibidores de la via indirecta inhibeixen el GPe que al seu torn està inhibint el NST. Per tant, la via indirecta allibera la inhibició que el GPe genera sobre el NST, activant-lo. El NST envia projeccions excitadores al GPi. Així doncs, la via directa s'encarrega d'estimular l'activitat talàmica a través de la inhibició directa del GPi mentre que la via indirecta inhibeix l'activitat talàmica a través de l'estimulació indirecta del GPi. Finalment el tàlem envia projeccions excitadores al còrtex motor primari. De manera resumida es pot considerar que la via directa s'encarrega de reforçar l'activitat del còrtex motor primari estimulants els moviments voluntaris, mentre que la via indirecta s'encarrega d'inhibir-lo mitjançant la inhibició dels moviments voluntaris (figura 9 i 10) (79,88).

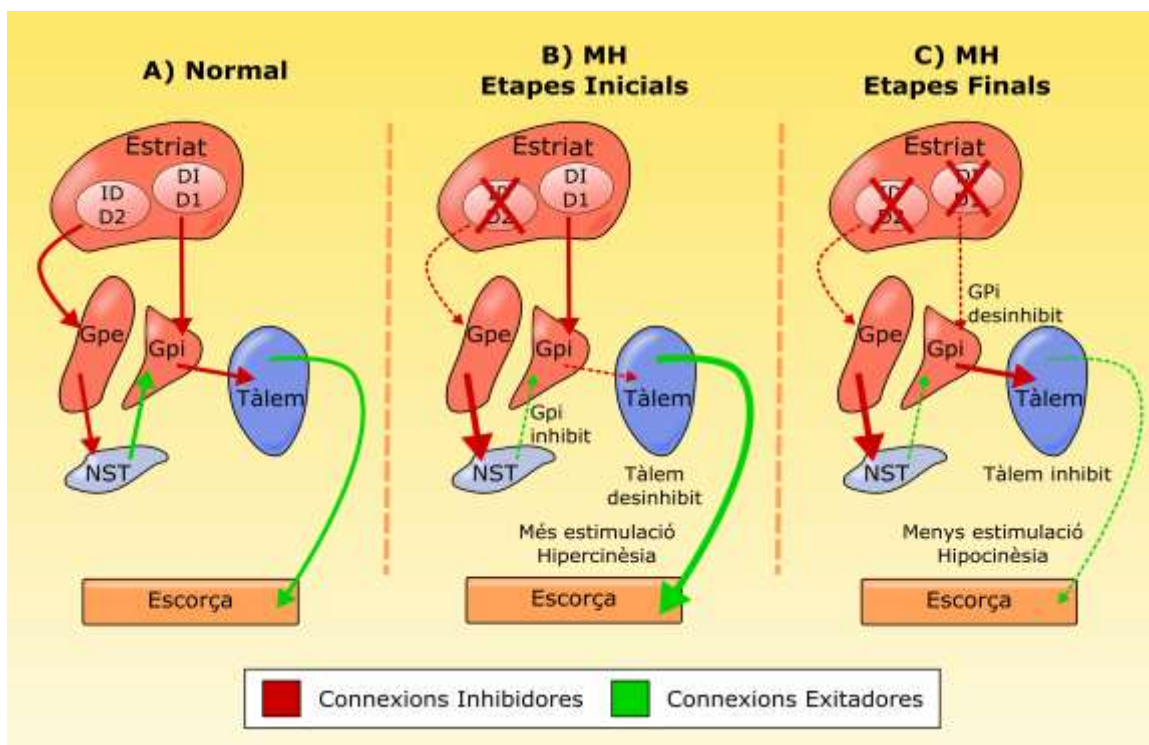


Figura 10. Canvis en la connectivitat dels ganglis basals en les etapes inicials i finals de la MH

Diagrama esquemàtic on es mostren les connexions dels ganglis basals i la seva desregulació en la MH. Les fletxes vermelles indiquen inhibició i les verdes excitació. Les fletxes més gruixudes indiquen un augment de la inhibició o de l'estimulació, mentre que les fletxes discontinues indiquen una disminució. (A) En una situació normal la via directa (DI), composta per neurones estriatals que expressen receptors dopaminèrgics tipus 1 (D1), i la via indirecta (ID), composta per neurones estriatals que expressen receptors D2, estan preservades. La DI s'encarrega de facilitar el moviment, mentre que la via ID s'encarrega d'inhibir el moviment. El correcte equilibri d'aquestes dues vies és essencial per a la correcta

generació i coordinació del moviment. (B) En etapes inicials de la MH les neurones inhibidores D2 de la via ID degeneren. La degeneració d'aquesta via causa que el GPe al estar menys inhibït reforci la inhibició que exerceix sobre el NST, que al seu torn excitarà menys el GPi. Com a resultat el GPi desinhibirà el tàlem. Finalment el tàlem es trobarà en una situació més desinhibida augmentant l'estimulació sobre l'escorça cerebral i es generaran moviments coreics hiperkinètics i descoordinació motora. (C) En etapes finals de la MH també es produeix degeneració de les neurones estriatals D1 de la DI, disminuint la inhibició que genera sobre el GPi. Per tant el GPi estarà desinhibït i disminuirà la inhibició que generarà sobre el Tàlem. Així doncs, en etapes finals de la MH el Tàlem estarà més inhibït i reduirà l'estimulació que exerceix sobre l'escorça cerebral, que finalment causarà moviments hipocinètics i augmentarà la descoordinació motora. Figura adaptada de Raymon et al., 2016 (89).

En la MH estan afectades les dues rutes de control del moviment però en estadis inicials de la malaltia la via més afectada és la via indirecta. La degeneració d'aquesta via causa que l'escorça motora rep massa estimulació i es troba hiperactivada generant els moviments coreics hiperkinètics característics de la MH (figura 10). En etapes més avançades de la malaltia, totes les cèl·lules estriatals estan implicades en el procés neurodegeneratiu, i per tant les projeccions de la via directa també són disfuncionals. En aquesta etapa de la malaltia l'escorça motora no rebrà prou estimulació i es trobarà hipoactivada generant els moviments motors hipocinètics i rígids característics dels símptomes motors de les etapes avançades de la malaltia (figura 10) (90).

Recentment, s'ha descrit una tercera via involucrada en el control del moviment anomenada via hiperdirecta. Aquesta via és una via excitadora que connecta de manera directa l'escorça amb el NST. Actualment, s'està estudiant la implicació d'aquesta via en la MH per tal d'entendre si la desregulació d'aquesta està implicada en la simptomatologia motora de la MH (79).

Un ampli camp d'estudi i debat en el camp de la MH ha estat i és l'estudi dels mecanismes de vulnerabilitat que causa la mort específica de les MSN. Actualment, hi ha dos mecanismes ben establerts que expliquen aquesta vulnerabilitat. Per una banda, en la MH hi ha un dèficit en la producció del BDNF i en el seu transport cortico-estriatal. Per aquest motiu les MSN disposen de menys BDNF, que és un factor de creixement essencial per a la seva supervivència (66,91). Per altra banda, també hi ha molts estudis que demostren el paper clau de l'excitotoxicitat glutamatèrgica en la vulnerabilitat de les MSN (92–94). Aquesta excitotoxicitat és causada per un augment de l'activació dels receptors NMDA en les MSN (95). L'excessiva alliberació de glutamat cortical (93) i la desregulació intrínseca de la senyalització glutamatèrgica en les MSN (94) són els mecanismes causals de la hiperactivació dels receptors NMDA en les MSN. A més, estudis recents demostren que les MSN de la via indirecta reben més projeccions corticals. El que suggereix que aquesta subpoblació de MSN pot ser més vulnerable i degenerar abans pel fet que estan més exposades a l'excitotoxicitat glutamatèrgica (94,96).

I. Introducció

Clàssicament els símptomes de la MH s'atribuïen només a la degeneració estriatal. Posteriorment, es va observar la pèrdua de volum i disminució neuronal en l'escorça dels pacients de la MH (97). Aquesta degeneració neuronal és particularment important en les neurones de projecció corticals de les capes III, V i VI, que són les capes que projecten principalment a l'estriat (98,99). A més, l'estudi de Rosas et al. assenyala que la degeneració de diferents àrees corticals correlaciona amb la variabilitat simptomatològica de la MH (100). Actualment, el punt que genera un gran debat és si aquesta degeneració cortical és una conseqüència secundària de la degeneració estriatal o és un fenomen previ.

El que sí que està àmpliament acceptat és que la disfunció neuronal de la via cortico-estriatal precedeix a la degeneració cel·lular i està altament relacionada amb els símptomes cognitius, motors i psiquiàtrics característics de la MH (96,101).

3.2. Neuropatologia Hipocampal de la MH.

L'hipocamp, per la seva anatomia, connectivitat i funcionalitat, és una de les estructures més ben estudiades de l'encèfal. L'any 1572 va ser estudiada per primera vegada la seva anatomia i va rebre el nom d'hipocamp ja que la seva forma recorda a un cavallet de mar (102). L'any 1973 en el laboratori de Per Andersen es van caracteritzar per primera vegada en l'hipocamp els fenòmens de la potenciació a llarg termini (*long-term potentiation*, LTP) i la depressió a llarg termini (*long-term depression*, LTD) (103). Aquests fenòmens són els mecanismes principals de la plasticitat sinàptica neuronal i són necessaris per a la correcta formació i retenció de la memòria.

La formació hipocampal, juntament amb l'amígdala i el nucli accumbens, forma l'eix central del sistema límbic (figura 11). Aquest sistema cerebral està implicat en la formació de la memòria episòdica, eventual i declarativa, l'aprenentatge espacial i de coneixement, la navegació, el reconeixement d'objectes i la memòria visual, com també en funcions executives.

L'hipocamp està format per la banya d'Ammon (*Cornu Ammonis*, CA) que anatòmicament es subdivideix en tres regions: la CA1, la CA2 i la CA3 (figura 11) (102). Per altra banda, el gir dentat (GD) és una estructura en forma de C separada de la CA pel solc hipocampal i formada per tres capes cel·lulars. La capa principal del GD consisteix en una capa amb una alta densitat cel·lular formada per cèl·lules granulars. La CA té essencialment una capa cel·lular, formada per cèl·lules piramidals (104).

La formació hipocampal forma un circuit tancat que té com a porta d'entrada el GD (figura 11). L'escorça entorínica envia projeccions des de les capes cel·lulars II i III a través de la via perforant. Les projeccions de la capa II de la via perforant connecten amb les cèl·lules granulars del GD i amb les cèl·lules piramidals de la CA3. En canvi, les projeccions de la capa III de la via perforant connecten amb les cèl·lules piramidals de la CA1 i amb les cèl·lules del subicle. Les cèl·lules granulars del GD envien les seves projeccions a través de fibres molsoses a la CA3. Els axons de les cèl·lules piramidals de la CA3 projecten a les cèl·lules piramidals de la CA1 a través de la via formada per les fibres col·laterals de Schaffer. A la vegada, les cèl·lules piramidals de la CA1 projecten al subicle. Finalment, el subicle integra la informació que rep de la CA1 i de l'escorça entorínica i la torna a enviar a l'escorça entorínica tancant el circuit de connexions hipocampals (105).

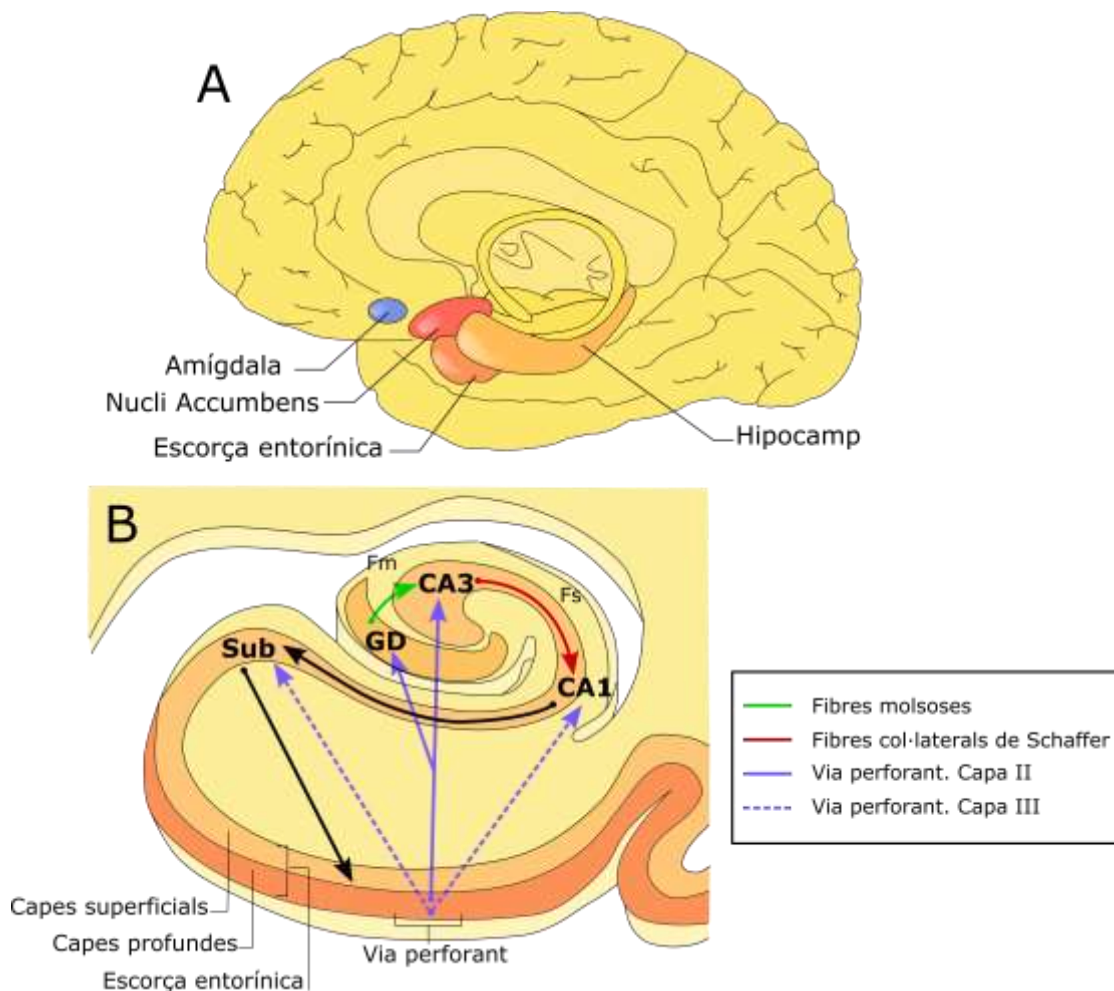


Figura 11. Components de les estructures que formen l'eix central del sistema límbic i connectivitat hipocampal

(A) Localització de l'amígdala, nucli accumbens, escorça entorínica i hipocamp en una il·lustració d'un tall sagital del cervell humà. (B) Diagrama esquemàtic on es mostren les connexions hipocampals. Les neurones de la capa II de l'escorça entorínica envien innervacions a través de la via perforant al GD i a la CA3. El GD connecta amb la CA3 a través de les fibres molsoses (Fm), i al seu torn la CA3 connecta amb la CA1 a través de les fibres col·laterals de Schaffer (Fs). La via perforant de la capa III connecta amb la CA1 i el subicle (Sub).

I. Introducció

CA1 a través de les fibres col·laterals de Schaffer (Fs). Les neurones de l'escorça entorínica de la capa III innerven la CA1 i el subicle (Sub) a través de la via perforant. Seguidament, la CA1 innerva el Sub que integra la informació de l'hipocamp i les aferències de l'escorça entorínica. Finalment, el Sub connecta amb l'escorça entorínica tancant el circuit. Figura adaptada de Small et al., 2011 (106).

En la MH s'han observat diferents alteracions morfològiques en l'hipocamp. S'ha demostrat que l'hipocamp dels pacients de la MH presenta una forta disminució de l'àrea i el volum i també pèrdua neuronal, astrogliosi i presència d'IIN en etapes inicials de la malaltia (2,77,107,108).

Molts estudis han descrit dèficits cognitius relacionats amb la desregulació hipocampal, abans de l'aparició dels símptomes motors en diferents models murins de la MH (109,110). Addicionalment, en els models murins també s'han descrit alteracions en els processos de formació de la LTP i la LTD en les vies hipocampals (111).

Tot i aquestes evidències de la implicació hipocampal en la patologia de la MH, la majoria d'estudis en humans s'han centrat en l'estudi de la via cortico-estriatal. Aquests estudis en humans han atribuït els dèficits cognitius observats en etapes inicial de la malaltia a la disfunció d'aquesta via, encara que està àmpliament acceptat que tots els dèficits cognitius inicials no tenen únicament unes bases cortico-estriatals. És important remarcar que aquests estudis han analitzat diferents característiques cognitives, com per exemple la memòria de reconeixement, la memòria espacial i l'aprenentatge associatiu que també impliquen la funció hipocampal (112,113).

L'ús de tècniques de neuroimatge també ha permès corroborar l'existència d'atròfia hipocampal en etapes inicials de la malaltia en pacients de la MH. S'ha observat correlació entre els nivells d'atròfia hipocampal i la puntuació en la escala d'UHDRS (77). Finalment, cal ressaltar un estudi recent de Begeti i col·laboradors, en el qual utilitzen tests funcionals anàlegs als usats en els models murins per avaluar exclusivament la funció hipocampal en humans (114). Els pacients de la MH mostren dèficits en la realització d'aquests tests abans de l'aparició dels símptomes motors. Els autors afirmen que els dèficits dependents de la funció hipocampal contribueixen a les característiques cognitives de la MH i que l'atròfia hipocampal defineix l'inici de la MH (114).

4. Models animals de la MH

El fet de que la MH sigui una malaltia neurodegenerativa hereditària causada per una mutació en un únic gen ha permès la generació de models genètics de la malaltia. Aquests models han servit com a sistemes experimentals acurats i accessibles i han estat una eina indispensable per a la recerca i l'estudi de la malaltia. Han permès avenços molt importants per entendre els mecanismes patològics de la malaltia i la seva progressió ja que reproduïen molts dels esdeveniments clínics, neuropatològics i moleculars que mostren els pacients de la MH.

A finals dels anys 70, quan és desconeixia la causa genètica concreta que causava la MH, els models animals usats en l'estudi de la MH es basaven en models tòxics aguts que mimetitzaven la degeneració estriatal característica de la malaltia (115). Es van desenvolupar diferents models tòxics que induïen la mort selectiva de les MSN mentre que les interneurons no es veïen afectades (116,117). Aquesta mort selectiva s'aconseguia a través de lesions excitotòxiques, administrant de manera intraestriatal àcid kainat (116) o àcid quinolínic (117), dos agonistes dels receptors glutamatèrgics, o bé interrompent l'activitat de la maquinària mitocondrial amb àcid 3-nitropropionic (118). Aquests models són una bona aproximació per a l'estudi de la MH ja que reproduïen moltes de les característiques neuropatològiques de la malaltia i han ajudat a resoldre moltes qüestions relacionades amb la vulnerabilitat estriatal. Tot i això, l'ús d'aquests models presenta moltes limitacions ja que es basen només en una degeneració aguda estriatal. Per tant, molts aspectes com per exemple esdeveniments importants en la progressió de la malaltia o els mecanismes moleculars alterats a causa de la presència de la httm entre d'altres no poden ésser estudiats en aquests models.

Des del descobriment de la mutació en el HTT causal de la MH, l'any 1993, s'han generat models animals de la MH en diferents espècies. Els organismes usats per a generar models animals de la MH inclouen des d'invertebrats com cucs (*Caenorhabditis elegans*) i mosques (*Drosophila melanogaster*), mamífers com ara rosegadors, ovelles i porcs fins a primats no humans, encara que els models animals més usats per a l'estudi de la MH són amb diferència els models murins (119,120). Aquests mostren moltes similituds a nivell conductual, neuropatològic i d'expressió gènica amb la MH humana tot i que cada model presenta unes característiques fenotípiques particulars. Aquestes particularitats fenotípiques són degudes al nombre de repeticions CAG que tingui la mutació, als nivells d'expressió de la proteïna mutant, a la localització genòmica on s'insereixi la mutació, etc. . Això fa que cada model expressi amb diferent intensitat i temporalitat diferents trets fenotípics. Per tant, conèixer les característiques

I. Introducció

particulars de cada model és de vital importància per a un correcte disseny experimental. Sobretot, cal tenir present que cap d'aquests models reproduceix amb total fidelitat tots els aspectes fenotípics de la patologia humana (119,120).

Els models murins genètics de la MH generalment es classifiquen depenent de si expressen el fragment N-terminal (models fragment N-terminal) del HTT mutat o bé si expressen tot el HTT mutat (models *full-length*) (taula 1).

4.1. Models Murins Fragment N-terminal: Línies R6 i N171-82Q

El grup de Bates va generar el primer model murí transgènic de la MH l'any 1996, el model R6. Aquests ratolins tenen inserit l'exó 1 humà del HTT mutat en una posició aleatòria en el genoma dels ratolins. Per tant, aquests ratolins presenten l'exó 1 humà i els dos al·lels murins del HTT. L'expressió del transgèn és regulada pel promotor humà del HTT (121). Tot i que el context genètic d'aquests ratolins no és tan acurat com en els models *full-length*, els ratolins R6 estan caracteritzats per presentar una progressió molt ràpida de la malaltia i tenir un fenotip molt robust, amb unes característiques neuropatològiques i conductuals molt clares. Per aquest motiu aquests ratolins han estat àmpliament usats en recerca.

Les diferències principals entre els ratolins R6/1 i R6/2 són degudes al número de repeticions CAG que presenten i als nivells d'expressió del transgèn (taula 1). Els ratolins R6/1 tenen 116 repeticions CAG i integren només una còpia del fragment transgènic que dona lloc a una expressió del 31% de la *htt*m en relació a l'expressió normal de la *htt*. En canvi, els ratolins R6/2 tenen 145 repeticions CAG i tenen integrat en el seu genoma tres còpies del transgèn amb una expressió del 75% de la *htt*m (121). Consistent amb el que s'observa en la patologia humana els ratolins R6/2 presenten un fenotip més agressiu i una progressió més ràpida de la malaltia que els ratolins R6/1.

En els ratolins R6/2 s'observa una pèrdua de pes corporal a les 7 setmanes i tenen una esperança de vida mitja de 14 setmanes, mentre que els ratolins R6/1 mostren una pèrdua de pes corporal a les 22 setmanes i l'esperança de vida mitja és de 32-40 setmanes (81,121). Les dues línies mostren un fenotip progressiu que empitjora amb l'edat tant pel que fa a les característiques conductuals com neuropatològiques. A nivell conductual els dèficits cognitius apareixen abans que els dèficits motors en les dues línies. Els ratolins R6/2 presenten l'aparició de dèficits motors a les 6-8 setmanes (122) i de dèficits cognitius a les 4 setmanes (123), mentre que els ratolins R6/1 presenten dèficits motors a les 14 setmanes i dèficits cognitius a les 12

setmanes (124,125). En aquests ratolins les alteracions neuropatològiques apareixen abans que l'inici de la simptomatologia. Els trets neuropatològics més rellevants d'aquestes línies són la presència generalitzada d'IIN a totes les àrees cerebrals (81), la pèrdua de pes i volum cerebral, l'atrofia estriatal (121) i la gliosi (109,126). Curiosament, tot i que aquestes dues línies murines de la MH presenten disminució del pes cerebral i atrofia estriatal i en alguns casos cortical, amb engrandiment ventricular, la mort neuronal és mínima en aquests ratolins. Malgrat que la presència de cèl·lules necròtiques i apoptòtiques no és freqüent en l'estriat d'aquestes línies sí que s'ha observat la presència de cèl·lules electrodenses que mostren condensació citoplasmàtica i atròfia (101,127).

4.2. Models murins full-length: Línies YAC i Knock-in (KI)

Els models murins *full-length* engloben totes les línies murines que expressen tota la httm, encara que cadascuna d'aquestes línies tenen unes bases genètiques diferents. Per una banda, hi ha els models transgènics YAC que incorporen el HTT *full-length* mutat utilitzant com a vectors el cromosoma artificial de llevat (*yeast artificial chromosome*, YAC) en una posició genòmica aleatòria. Aquests models expressen el HTT mutant humà amb tots els introns i exons com també seqüències reguladores (128). S'han generat diferents línies de ratolins YAC, amb diferent nombre de repeticions CAG (YAC18, YAC46, YAC72 i YAC128), tot i que les úniques línies que presenten anormalitats fenotípiques són els YAC72 i YAC128 amb 72 i 128 repeticions CAG, respectivament (taula 1). La patologia dels ratolins YAC72 i YAC128 és més lenta i més progressiva que l'observada en els ratolins fragment N-terminal i tenen una esperança de vida normal, encara que com passava en els ratolins fragment N-terminal, els ratolins YAC128 al presentar un major nombre de repeticions mostren un fenotip més sever i una progressió més ràpida de la malaltia que els ratolins YAC72 (128). Els ratolins YAC72 no presenten dèficits motors fins als 16 mesos (129). En canvi els YAC128 presenten alteracions motores avaluades amb el test del cilindre rotatori (*rotarod test*) als quatre mesos que empitjoren amb l'edat. Els YAC128 comencen a presentar dèficits cognitius lleus a partir dels dos mesos d'edat, fent-se més severs i evidents a partir dels 8-12 mesos (130). Un tret rellevant dels ratolins YAC és que presenten unes característiques neuropatològiques que reproduïxen molt bé les observades en els pacients de la MH ja que paral·lelament a l'atròfia cortical i estriatal mostren mort neuronal selectiva de les MSN (128,129,131). Per això aquests ratolins són una eina àmpliament usada en l'estudi de mecanismes patològics relacionats amb la mort estriatal. Tot i això, cal tenir en compte que aquests ratolins presenten altres trets que no representen la condició humana, com és el fet que els ratolins YAC72 no presenten IIN i en els ratolins YAC128 les IIN no són

I. Introducció

evidents fins als 18 mesos i aquestes només s'observen en l'estriat i el còrtex (132). Un altre tret diferencial és que els ratolins YAC128, contràriament al que s'observa en la condició humana i en els ratolins fragment N-terminal, no mostren una pèrdua de pes corporal sinó que mostren un augment de pes corporal (132).

Per últim, els ratolins genomodificats (*knock-in, KI*) representen el model genètic més precís de la MH, ja que presenten la mutació del HTT en el context genòmic apropiat. Aquests ratolins es generen per recombinació homòloga, substituint-se l'exó 1 del HTT murí amb l'exó 1 humà, amb diferents expansions de la repetició del trinucleòtid CAG (taula 1). Per tant, la mutació és genòmicament correcta i es troba sota el control del promotor endogen del HTT. Aquestes línies presenten un fenotip molt suau, una progressió molt llarga de la malaltia i una esperança de vida normal. Els primers ratolins quimèrics KI van ser els Hdh^{Q111} i Hdh^{Q92} amb 111 i 92 repeticions CAG, respectivament (133,134). Cap d'aquestes línies mostra una degeneració estriatal evident, tot i que sí que presenten alteracions neuropatològiques. Les dues línies de ratolins quimèrics KI presenten translocació nuclear de la *htt*m als 4,5 mesos i les IIN de la *htt*m són evidents als 14,5 mesos en els ratolins Hdh^{Q92} i als 10 mesos en els ratolins Hdh^{Q111} (133). Tot i la patologia cerebral que presenten els ratolins Hdh^{Q111}, poca informació existeix sobre el seu fenotip. És rellevant mencionar que dos treballs del nostre grup han observat que els ratolins heterozigots Hdh^{Q7/Q111} presenten dèficits cognitius progressius associats a la desregulació cortico-estriatal a partir dels dos mesos i associats a la desregulació de l'activitat hipocampal des dels sis mesos i dèficits motors a partir dels vuit mesos (110,135). Posteriorment, dues línies més de ratolins KI que presentaven 140 (Hdh^{Q140}) i 150 (Hdh^{Q150}) repeticions CAG van ser generades (taula 1). Aquests dos models de ratolins, a diferència dels ratolins Hdh^{Q111} i Hdh^{Q92}, mostren degeneració estriatal, mort neuronal i presència d'IIN de la *htt*m (136–138).

Taula 1. Models murins genèticament modificats de la MH

Model Murí	Característiques genètiques	Promotor	Repeticions CAG	Caract. conductuals		Caract. neuropatològiques			Pes Corporal	Supervivència	Ref.
				M	C	Agregats	Atròfia estriatal	Pèrdua neuronal			
Transgènic Fragment N-terminal											
R6/2	Inserció Exó 1 humà (67 aas)	HTT Humà	144-150	6-8S	4S	3-4,5S	12S	Absència	7S	12-18S	(81,109,121-126)
R6/1	Inserció Exó 1 humà (67 aas)	HTT Humà	116	14S	12S	9S	16S	Absència	22S	32-40S	
Transgènic full-length											
YAC 72	Expressió tot el HTT mutat humà amb el vector YAC	HTT Humà	72	16 M	No estudiat	Absència	10 M	12M	Augment 12 M	Normal	(128-130,132)
YAC 128	Expressió tot el HTT mutat humà amb el vector YAC	HTT Humà	120	4M	2M	18M	9M	12M	Augment 2-3M	Normal	
Knock-in											
Hdh ^{Q92}	Substitució exó 1 murí amb l'exó 1 mutat humà. HTT quimèric humà-murí	HTT murí	92	4M	4M	14,5 M	Absència	Absència	17M	Normal	(110,133-135)
Hdh ^{Q111}	Substitució exó 1 murí amb l'exó 1 mutat humà. HTT quimèric humà-murí	HTT murí	111	2M Hdh ^{Q7/Q111}	8M Hdh ^{Q7/Q111}	10M	Absència	Absència	7M	Normal	
Hdh ^{Q140}	Substitució exó 1 murí amb l'exó 1 mutat humà. HTT quimèric humà-murí	HTT murí	140	4-12M	No estudiat	2M	20M	20M	12M	Normal	(136-138)
Hdh ^{Q150}	Inserció repeticions CAG al HTT murí	HTT murí	150	10M	4M	10-14M	25M	25M	17,5M	Normal	

Setmanes (S); Mesos (M); Síntomes motors (M); Síntomes cognitius (C).

5. Mecanismes moleculars implicats en la patologia de la MH

La presència de la httm produeix canvis patofisiològics com són l'agregació proteica, la desregulació transcripcional, la disfunció tròfica, l'alteració en l'homeòstasi del calci (Ca^{2+}), l'alteració de l'activitat de les caspases, la desregulació de l'activitat dels receptors cel·lulars, l'alteració de la senyalització cel·lular i la disrupció del transport axonal entre altres (figura 12) (36,46,50,139). Tots aquests mecanismes generen la disfunció neuronal i sinàptica que acabarà conduint a la neurodegeneració observada en la MH. S'ha postulat que aquests canvis patofisiològics són deguts a un guany de la funció tòxica de la httm, així com també a una pèrdua de funció de la htt normal (46,140,141). Tot i això tots els mecanismes cel·lulars i moleculars que porten a la generació dels símptomes i a la progressió de la malaltia no són completament coneguts. Per això, actualment es segueixen invertint molts esforços per entendre els mecanismes patològics implicats en la MH per tal de trobar noves dianes terapèutiques. En les següents seccions, descriurem els mecanismes que han estat estudiats en aquesta tesi.

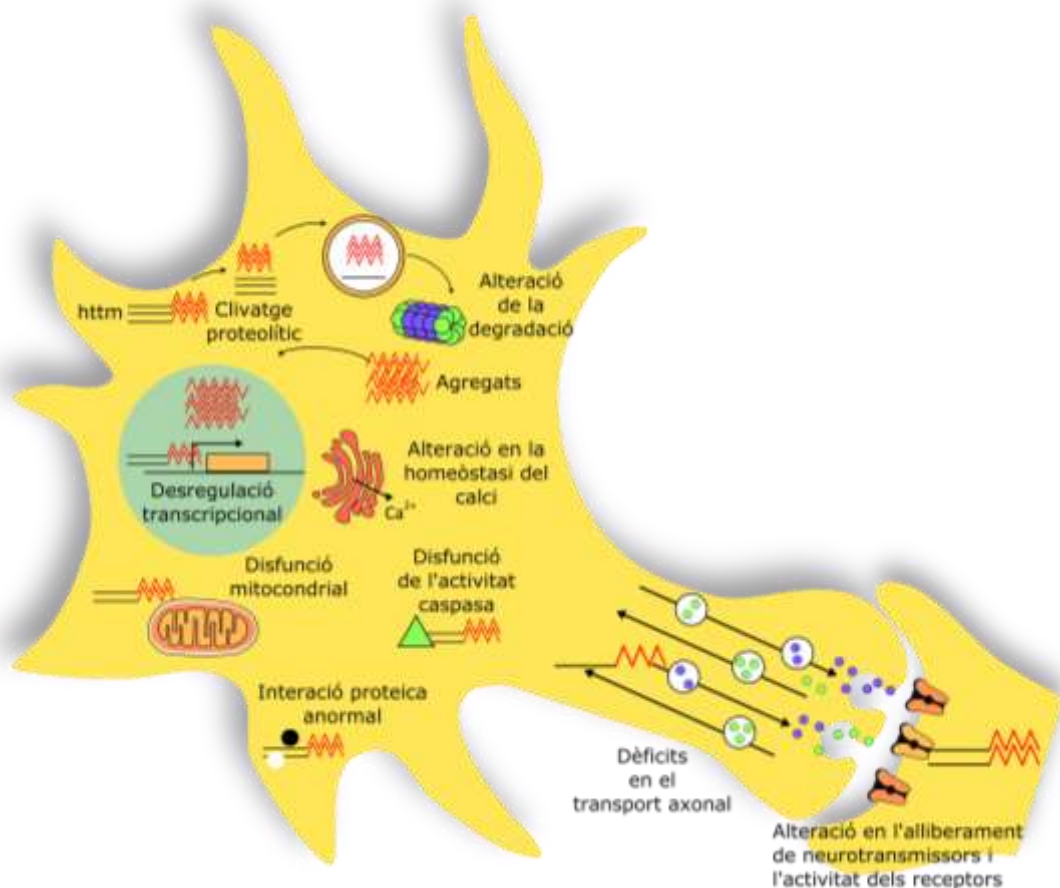


Figura 12. Mecanismes moleculars alterats en la MH

Il·lustració resum dels principals mecanismes alterats per la presència de la httm. Aquests mecanismes inclouen la formació d'agregats de httm, l'alteració en la homeòstasi del Ca^{2+} , la desregulació transcripcional, la disfunció mitocondrial i la disfunció en l'activitat caspasa, la interacció proteica anormal, els dèficits en el transport axonal i l'alteració en l'alliberament de neurotransmissors i l'activitat dels receptors. Figura adaptada de Zuccato et al., 2010 (142).

5.1. Alteració transcripcional en la MH

5.1.1. Alteració de diferents mecanismes transcripcionals degut a la presència de la httm

La desregulació transcripcional és un mecanisme clau en la patologia de la MH que té lloc en estadis inicials i precedeix la mort neuronal i la simptomatologia de la malaltia. Inicialment, el grup de Cha va observar una disminució en els nivells proteics i d'ARNm de receptors glutamatèrgics i dopaminèrgics en la línia de ratolins R6/2. Aquesta desregulació transcripcional va ser observada molt abans de l'inici dels símptomes patològics en els ratolins R6/2 (143). D'acord amb aquest estudi, es va descriure una disminució en els receptors dopaminèrgics D1 i D2 en pacients asimptomàtics de la MH (144,145). Addicionalment, l'anàlisi global dels nivells d'ARNm en models murins, a través de l'anàlisi de bioxips (*microarrays*) d'ARNm, ha mostrat una disminució generalitzada dels nivells de l'expressió gènica de gens implicats en la senyalització de la neurotransmissió, en el metabolisme del Ca^{2+} i en processos transcripcionals (146,147). A més, estudis genòmics globals en pacients han corroborat les evidències observades en els models murins i han mostrat desregulació transcripcional en un gran nombre de gens (148).

Un dels primers mecanismes que es va postular per explicar aquesta desregulació transcripcional va ser que la httm interacciona i recluta en les IIN diferents factors de transcripció, inhibint la seva activitat transcripcional (figura 13). Es va observar que la httm interactua amb factors de transcripció com són CBP (*CREB-binding protein*), TBP (*TATA-binding protein*), Sp1 (*specificity protein-1*), p53 i NF- κ B (*nuclear factor κ light-chain-enhancer of activated B cells*) (149–151). Aquests resultats van portar a la hipòtesi inicial que les IIN de httm poden causar desregulació transcripcional segregant factors de transcripció. Per altra banda, també s'ha descrit que la presència de la httm augmenta la repressió transcripcional ja que la httm s'encarrega de retenir repressors transcripcionals al citoplasma (figura 13). S'ha descrit una pèrdua d'interacció entre el repressor transcripcional REST1/NRSE i la httm, fet que comporta la translocació al nucli d'aquest factor i la conseqüent repressió dels gens que regula, entre ells el BDNF (152). Per últim, un dels mecanismes més recents proposats per explicar els dèficits transcripcionals en la MH és l'alteració de diferents mecanismes epigenètics (figura 13). Diferents grups han mostrat que diferents marques epigenètiques, com són la metilació d'ADN

I. Introducció

o les modificacions posttraduccional de les histones, es troben significament alterades tant en models murins com en pacients de la MH (153–155).

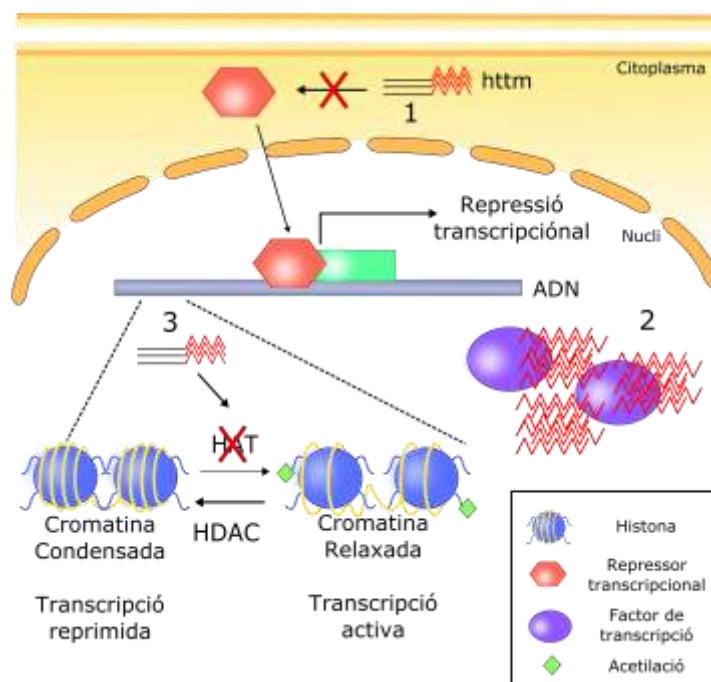


Figura 13. Mecanismes causals de la disregulació transcripcional en la MH

El diagrama resumeix els principals mecanismes moleculars alterats per la presència de la httm que interfereixen en la maquinària transcripcional a diferents nivells: 1) la httm perd la capacitat d'unir-se a repressors transcripcionals, permetent que aquests transloquin al nucli i reprimeixin la transcripció, 2) la httm interactua amb factors de transcripció i els recluta en les IIN, impedint que puguin regular la transcripció, 3) la httm interactua i inhibeix els enzims histona aciltransferasa (HAT) reduint l'acetilació d'histones i reprimint la transcripció.

5.1.2. Alteració de l'activitat dels enzims histona aciltransferasa i histona desacetilasa en la MH

L'acetilació d'histones en els residus lisina de les cues N-terminals d'aquestes és una de les marques epigenètiques més estudiades. L'estat d'acetilació de les histones està definit per l'activitat dels enzims HAT (histona aciltransferasa) i HDAC (histona desacetilasa), que modulen els nivells d'acetilació i desacetilació, respectivament. Aquests enzims tenen rols oposats en la regulació del procés transcripcional a través de la modificació de l'estructura de la cromatina. Resumidament, l'acetilació d'histones a les regions promotores correlaciona amb un augment de l'expressió gènica generant una conformació més laxa i oberta de la cromatina. En canvi, la desacetilació de les histones està associada a una disminució de l'expressió gènica generant un estat més condensat i tancat de la cromatina (figura 13) (156). Diferents estudis han descrit un estat d'hipoacetilació en diferents models cel·lulars i murins de la MH (157–159). Tot i això, un punt que genera controvèrsia i debat és l'extensió d'aquesta hipoacetilació. Alguns estudis

mostren que l'hipoacetilació en la MH és present només en alguns gens específics (159,160) mentre que altres estudis observen una reducció global dels nivells d'acetilació de les histones (157,158,161).

En la MH aquesta hipoacetilació es pensa que es deguda a una disminució de l'activitat HAT i a la desregulació de l'activitat HDAC. El grup de Steffan va demostrar que la httm interaccionava i inhibia l'activitat HAT d'almenys tres proteïnes: p300, CBP i P/CAF (*p300/CBP-associated factor*) (162). D'aquestes tres proteïnes la més estudiada en el context de la MH ha estat la proteïna CBP. La proteïna CBP té un paper clau en el SNC i mutacions o delecions en aquesta causen el síndrome Rubinstein-Taybi (163). Diferents models murins amb deficiències en l'activitat CBP presenten una disminució de l'acetilació de les histones, alteracions en la plasticitat sinàptica i dèficits cognitius i motors (163,164). En la MH s'ha descrit una disminució dels nivells de la proteïna CBP deguts a que aquesta queda retinguda en els agregats de la httm (165,166) i a un augment de la seva degradació proteosòmica (167). A més, com ja ha estat mencionat, també s'ha observat que la httm interacciona amb la proteïna CBP inhibint la seva activitat HAT (162). La pèrdua de funció de la proteïna CBP ha estat relacionada amb la disminució d'acetilació d'histones, amb la neurodegeneració de les cèl·lules estriatals i amb els dèficits cognitius dependents de la funció hipocampal en models de la MH (166–169). Finalment, també s'ha descrit que tant la sobreexpressió de la proteïna CBP com l'ús d'inhibidors d'HDAC (iHDAC) disminueix la hipoacetilació d'histones i la mort neuronal en models cel·lulars de la MH i reverteix els dèficits cognitius en els ratolins KI (165,166,168).

Molts d'estudis centrats en revertir el gran dèficit transcripcional present en la MH han utilitzat aproximacions farmacològics usant iHDAC ja que són fàrmacs químicament molt estudiats i usats en la recerca d'altres patologies (154,160,166,170). La superfamília d'enzims HDAC es classifica en dos famílies segons les característiques del seu domini HDAC i els cofactors que requereixen. La família d'HDAC "clàssiques" necessiten la presència de zinc com a cofactor per a la seva activitat enzimàtica i presenten diferents graus d'homologia amb el domini HDAC del llevat *Saccharomyces cerevisiae*. Aquesta família d'HDAC està formada per la classe I (HDAC 1-3 i 8), classe II (HDAC 4-5-6-7-9 i 10) i la classe IV (HDAC11). A més, la classe II es pot dividir en dos subclasses: la classe IIa (HDAC 4,5,7 i 9) i la classe IIb (HDAC 6 i 10) (figura 14). Per altra banda, la família d'HDAC "atípica" consta només de la classe III, també coneguda com a família de les Sirtuïnes. Aquesta família d'HDAC requereix la presència de NAD⁺ (Nicotinamida adenina dinucleòtid) com a cofactor per a la seva activació i el seu domini HDAC no presenta homologia amb el domini HDAC de cap de les altres classes (figura 14) (171). Inicialment, es van usar iHDAC

I. Introducció

d'ampli espectre, que inhibien de manera general totes les classes d'HDAC com són l'àcid valproic, el butirat sòdic, el TSA (*Trichostatin A*) o el vorinostat (*Suberoylanilide hydroxamic acid*, SAHA). L'ús d'aquests iHDAC en diferents models animals de la MH va mostrar millores neuropatològiques i conductuals (154,166,170,172). Tot i això, aquests inhibidors d'ampli espectre tenen molts d'efectes secundaris i actualment s'estan estudiant iHDAC més selectius i específics. Un d'aquests inhibidors és l'inhibidor d'HDACs 4b (iHDAC4b), que inhibeix solament les HDAC1 i HDAC3. Aquest iHDAC4b millora els símptomes motors i cognitius i reverteix els dèficits transcripcionals en els ratolins R6/2 i N171-82Q. A més, el tractament amb l'iHDAC4b indueix metilacions en l'ADN i millores fenotípiques en la primera generació de la descendència dels ratolins tractats (160,173). Un altre inhibidor estudiat en la MH, és el compost RGFP966 que és un inhibidor selectiu de la HDAC3. S'ha descrit una millora conductual i efectes protectors estriatals en els ratolins N171-82Q i KI degut al tractament crònic amb aquest compost (174,175).

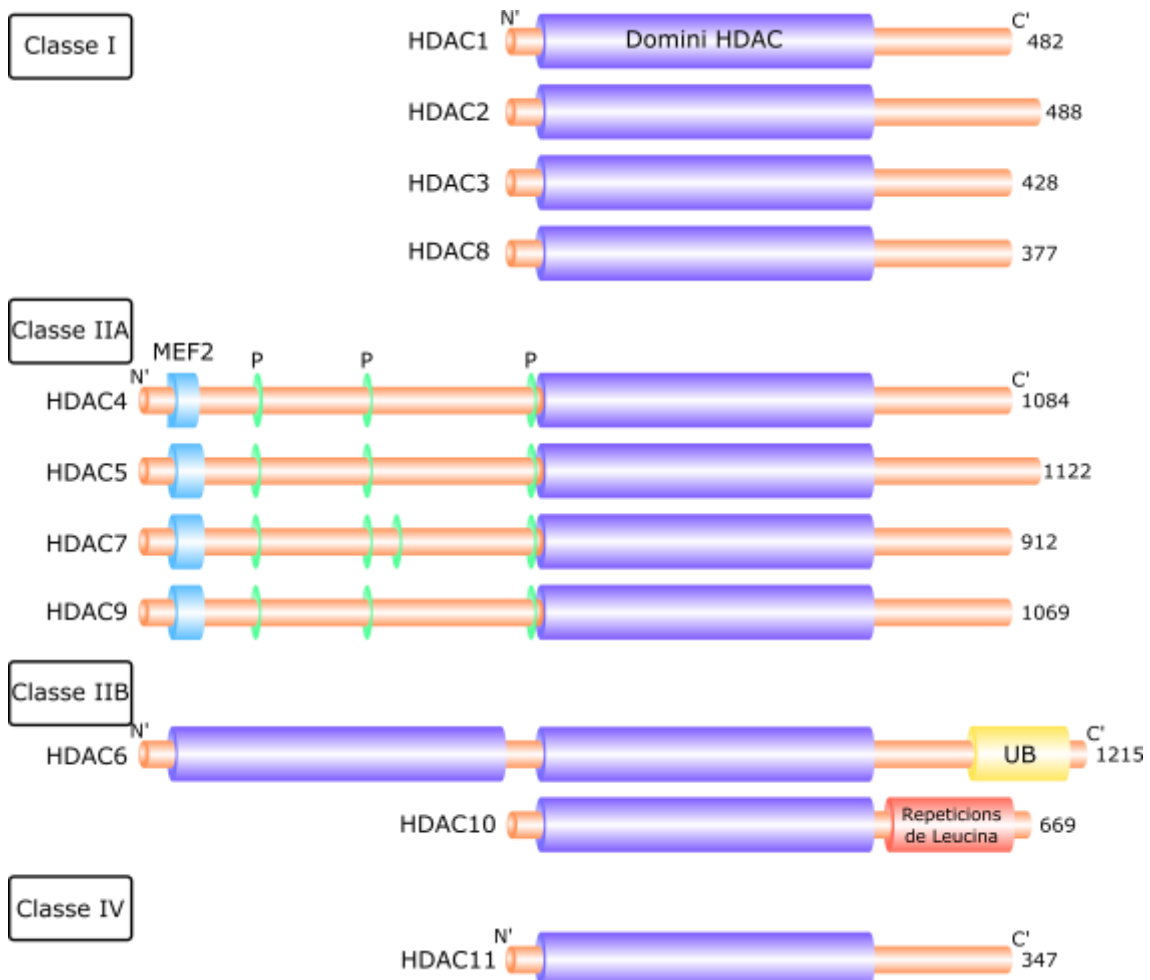


Figura 14. Classificació i estructura de la família d'HDACs clàssiques

Les HDAC de la classe I estan formades quasi únicament pel domini HDAC (representat amb cilindres blaus). Les HDAC de la classe IIA tenen un extrem N-terminal més llarg, on es localitza el domini d'unió al

MEF2 (representat amb cilindres blau cel) i diferents regions de fosforilacions múltiples (representades per cilindres verds) que són llocs d'unió per a la proteïna xaperona 14-3-3. La HDAC6 pertany a la classe IIb i té una estructura única ja que conté dos dominis HDAC i un domini d'unió a ubiquitina (representat per un cilindre groc, UB). La classe IIb també consta de la HDAC10 que té un extrem N-terminal molt més curt que la HDAC6 i presenta una regió rica en leucines (representat per un cilindre vermell). La classe IV consta únicament de la HDAC11. Figura adaptada de Seto et al. 2014 (171).

Finalment, el rol de les HDAC en la MH també ha estat estudiat en models de la MH amb aproximacions genètiques. Aquestes aproximacions s'han dut a terme generant ratolins genòmicament inactivats (*knock-down*, KD) de la MH per a diferents HDAC. Els grups de Bates i Mielcarek ha generat diferents línies dels ratolins R6/2 KD per a diferents HDAC i en cap d'aquestes línies s'ha observat millores fenotípiques ni restauració dels nivells transcripcionals (176–179). Aquest grup també ha generat una línia R6/2 KD per a la HDAC4 de la classe IIa. Sorprenentment, aquests ratolins mostren una millora conductual, un augment de l'esperança de vida i una disminució en la formació dels agregats citoplasmàtics (180). Aquestes evidències senyalen la inhibició selectiva de la HDAC4 com una estratègia terapèutica important per a restaurar les anormalitats transcripcionals de la MH.

Totes aquestes evidències senyalen la modulació de la maquinària transcripcional com un mecanisme clau per a noves aproximacions terapèutiques. Tot i això, es necessiten més estudis per conèixer amb exactitud els mecanismes causals de la desregulació transcripcional en la MH. Per això, en aquesta tesi estudiarem la possible alteració de mecanismes transcripcionals en la MH.

5.2. Rol de la pèrdua del suport neurotròfic en la MH

Els factors neurotròfics són biomolècules amb un paper essencial en el creixement, la supervivència i la plasticitat de poblacions neuronals específiques en el SNC (181). Una família important de factors neurotròfics són les neurotrofines. Aquesta família està composta pel BDNF, el factor de creixement nerviós (*Nerve growth factor*, NGF), la neurotrofina 3, la neurotrofina 4 i la neurotrofina 5 (NT3, NT4 i NT5). Les neurotrofines són sintetitzades com a precursors o proformes, que seran processades per proteases intra- o extracel·lularment generant la forma madura de les neurotrofines (181). Quan les neurotrofines són alliberades al medi extracel·lular es poden unir als seus respectius receptors cinasa de la Tropomiosina (*Tropomyosin-receptor kinase*, Trk) d'alta afinitat. Hi ha tres tipus de receptors Trk: els receptors TrkA, TrkB i TrkC. Cadascun d'aquests receptors mostra una distribució cel·lular específica i s'activa majoritàriament a un tipus específic de neurotrofines. Així el BDNF s'uneix majoritàriament al receptor TrkB, que és el receptor Trk més abundant a l'estriat i s'expressa

I. Introducció

principalment a les MSNs. El receptor TrkC, que és activat per la NT3, també és localitzat a les MSN, encara que en menor proporció que el receptor TrkB. En canvi el receptor TrkA no s'expressa a les MSN sinó que s'expressa a les interneurons colinèrgiques i és activat preferentment pel NGF (182). Per altra banda, totes les proneurotrofines com les seves formes madures s'uneixen amb la mateixa afinitat al receptor de neurotrofines p75 (p75^{NTR}) (183).

La disfunció crònica dels factors neurotròfics té un paper fonamental en la progressió de les malalties neurodegeneratives i en la degeneració específica neuronal (184). D'entre totes les neurotrofines el BDNF és un regulador clau en la supervivència neuronal i la plasticitat sinàptica (185). El BDNF té un rol crucial en processos com la potenciació sinàptica, la formació i la dinàmica dendrítica i també en la formació i el manteniment de noves memòries i processos d'aprenentatge (186,187). Per tots aquests motius ha estat considerat com una diana molecular excel·lent per al desenvolupament de noves teràpies en els desordres neurològics (184,185).

Diversos estudis han demostrat que les neurones estriatals necessiten el BDNF per a la seva supervivència i funció. La disminució de la senyalització activada pel BDNF causa anomalies dendrítiques i pèrdua neuronal en l'estriat i l'escorça cerebral (188,189). A més, també s'ha demostrat que el BDNF mostra efectes protectors en les MSN contra estímuls excitotòxics després de l'administració d'àcid quinolínic i també en models transgènics de la MH (190,191).

En la MH ha estat extensament descrita la disminució dels nivells del BDNF en diferents regions cerebrals en els pacients i en els models murins de la MH (192). Això suggereix que els dèficits neurotròfics causats per la reducció del BDNF tenen un rol clau en la neuropatologia del HD.

Aquesta disminució dels nivells del BDNF en la MH s'ha associat a disfuncions transcripcionals i del transport vesicular del BDNF, ja que la htt té un paper fonamental en aquests dos processos (192). Com ja he citat amb anterioritat, la sobreexpressió de la htt promou la transcripció del BDNF (64,193). En canvi la httm disminueix l'expressió del BDNF ja que facilita l'entrada al nucli de l'inhibidor transcripcional REST1/NRSE (152). La httm també altera l'activitat del factor de transcripció CREB (*cAMP response element-binding protein*), disminuint la seva fosforilació (194) i els nivells de la proteïna CBP que recluta la maquinària transcripcional que permet l'activació transcripcional dels gens regulats per CREB, entre ells el BDNF (195). Tot i això, no tots els mecanismes moleculars que generen una reducció de l'expressió del BDNF en la MH han estat descrits i per tant es necessiten més estudis per elucidar

aquesta important qüestió. En aquesta tesi s'investiguen diferents mecanismes moleculars que poden estar regulant l'expressió del BDNF.

Per altra banda, la httm també altera el transport vesicular del BDNF. La httm forma part del complex motor que condueix el transport vesicular del BDNF a través dels microtúbuls. La httm altera la formació d'aquest complex motor i indueix una disminució del transport vesicular del BDNF (66). El BDNF és sintetitzat al citosol i les seves vesícules son transportades fins als terminals axonals on el BDNF és alliberat. El BDNF cortical és alliberat a través de les projeccions corticals a l'estriat. Per tant, una interrupció del transport vesicular del BDNF fins als terminals axonals disminuirà l'aportació del BDNF a l'estriat (91). A més s'ha observat que la httm també bloqueja el transport post-Golgi de les vesícules del BDNF. En concret afecta el transport post-Golgi d'una de les formes polimòrfiques del BDNF que presenta una valina a la posició 66 de la seqüència proteica (196). El polimorfisme del BDNF a la posició 66 és un polimorfisme molt estudiat i s'associa a diferents malalties neurodegeneratives i psiquiàtriques (197,198). Aquest polimorfisme consisteix en el canvi d'una valina a una metionina a la posició 66 de la proteïna BDNF (199). El grup d'Alberch també ha descrit que els pacients que presenten la forma polimòrfica del BDNF que presenta una metionina a la posició 66 presenten un inici tardà de l'inici de la malaltia (21). Així, les alteracions del transport del BDNF com a conseqüència del polimorfisme genètic del BDNF a la posició 66 impacten en l'inici i la progressió de la malaltia.

Un altre punt important pel que fa la desregulació neurotròfica en la MH són els receptors del BDNF. Quan el BDNF s'uneix als receptors TrkB promou la supervivència neuronal i la seva unió al receptor p75^{NTR} pot potenciar la senyalització de TrkB (200). Tot i això, s'ha descrit que la senyalització del receptor p75^{NTR} també pot activar cascades de mort cel·lular i pot actuar com a modulador negatiu de la plasticitat sinàptica (201). Diferents estudis han descrit una important reducció dels nivells i l'activitat del receptor TrkB en models de ratolins de la MH (202,203). També s'ha demostrat un augment dels nivells del receptor p75^{NTR} en l'hipocamp i l'estriat de ratolins de la MH i de pacients (110,202). Això suggereix que, paral·lelament a la contribució del BDNF a la neuropatologia de la MH, el desequilibri dels receptors TrkB/ p75^{NTR} també té un rol important en aquesta. Recentment, Miguez i col·laboradors han observat que el tractament amb el fàrmac Fingolimod en els ratolins R6/1 produeix millores en la plasticitat sinàptica i en la memòria i redueix l'astrogliosi. Aquestes millores són degudes a que aquest tractament promou la síntesi del BDNF i restableix el desequilibri TrkB/p75 ja que aquest fàrmac activa el receptor TrkB i normalitza els nivells del receptor p75^{NTR} (109).

I. Introducció

També s'ha observat que ratolins modificats genèticament que no produeixen BDNF en neurones corticals mostren altes similituds amb ratolins models de la MH. Aquests ratolins presenten una disminució del volum estriatal i una desregulació transcripcional així com un fenotip conductual semblant a l'observat en els models murins de la MH (188,204). A més, s'ha determinat que els nivells del BDNF regulen l'inici i la severitat dels símptomes motors i cognitius, com també els dèficits en la plasticitat sinàptica en diferents models murins de la MH (124,126,205,206).

En conjunt, aquests estudis indiquen que els tractaments basats en la recuperació dels nivells del BDNF poden ser adequats per a prevenir la mort i les disfuncions neuronals i millorar tant els dèficits motors com les alteracions sinàptiques i cognitives en la MH. Tot i això, l'administració clínica del BDNF presenta tres grans limitacions: no travessa la barrera hematoencefàlica, té una vida mitja curta i posseeix una gran capacitat de difusió (184,207,208). Per consegüent, és molt important estudiar nous mecanismes per promoure un increment dels nivells endògens del BDNF i l'alliberació endògena i regulada del BDNF.

5.3. Disfunció sinàptica deguda a l'expressió de la httm

Actualment, les línies d'investigació suggereixen que la disfunció sinàptica és crucial en la patogènesis de la MH. Així mateix, els dèficits cognitius, que apareixen abans que els símptomes motors, manifesten alteracions en la funció sinàptica neuronal, quan encara no s'observa mort neuronal. Això indica que, els símptomes cognitius de la MH poden ser causats per la disfunció sinàptica més que per la mort neuronal (209,210).

El 85% de les sinapsis que rep l'estriat són sinapsis excitadores, i una neurona piramidal típica de l'hipocamp rep unes 25.000 sinapsis excitadores. La disfunció en aquestes sinapsis s'han descrit en estadis inicials en models animals de la MH i ha estat proposat que aquesta disfunció pot ser la iniciadora dels processos fisiopatològics de la MH (96,211). Per tant, la disfunció sinàptica i en particular en les alteracions en les sinapsis excitadores s'ha postulat com una bona diana per a estratègies terapèutiques.

La httm altera la transmissió sinàptica alterant directament la maquinària cel·lular tant a nivell presinàptic com postsinàptic. Presinàpticament la httm altera la funció sinàptica ja que desregula moltes proteïnes involucrades en el tràfic vesicular i en els processos excitotòtics i endocitòtics. A més, també altera receptors presinàptics com són els receptors de Cannabinoïdes tipus 1 (212), i els receptors glutamatèrgics metabotròpics tipus 2 (143), com

també els transportadors vesiculars de glutamat tipus 1 (*Vesicular Glutamate Transporter 1*, VGLuT1) (126). Els receptors glutamatèrgics presinàptics contribueixen al dany excitotòxic observat en la MH i a la disfunció sinàptica, ja que augmenten l'alliberació presinàptica del glutamat.

A nivell postsinàptic s'ha descrit que la httm altera la funció dels receptors glutamatèrgics AMPA (àcid α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoazolepropionic) (124), kainat (143) i NMDA (94) produint disfuncions en la funció i la plasticitat sinàptica i excitotoxicitat. Entre tots aquests receptors glutamatèrgics, els que han estat més estudiats en el context de la MH han estat els receptors NMDA, ja que la seva funció està severament alterada en la MH. Tot i que no s'han observat canvis en estadis inicials en els nivells proteics de cap de les subunitats que conformen els receptors NMDA (94,124), sí que s'ha observat una sobreactivació d'aquests en models murins de la MH (94,213,214). També s'ha descrit que la senyalització regulada per aquests i la seva localització extrasinàptica estan afectades en la MH (94,214).

La senyalització dels receptors postsinàptics té com a diana inicial les proteïnes localitzades en la densitat postsinàptica (*postsynaptic density*, PSD). L'organització estructural i funcional de la PSD depèn de varies famílies de proteïnes d'ancoratge. La proteïna PSD95 forma part de la superfamília de les proteïnes guanilat cinases de membrana (*membrane-associated guanylate kinases*, MAGUK) i és el membre més estudiat d'aquesta família. S'ha demostrat que la proteïna PSD95 està implicada en diversos processos com són l'estabilització i la modulació dels receptors AMPA i NMDA (215,216), la modulació de processos sinàptics com la LTP (217) o la regulació de diferents vies de senyalització dependents dels receptors NMDA (218). S'ha observat una disminució dels nivells proteics de la proteïna PSD95 en el nucli caudat de pacients de la MH i també una disminució d'aquesta en l'estriat, l'escorça i l'hipocamp dels ratolins R6/1. És important ressaltar el treball de Sun i companys on es descriu que la htt s'associa als receptors NMDA i kainat a través de la unió amb la proteïna PSD95. En aquest treball també es mostra que la regió poliQ de la httm disminueix la interacció entre aquestes dues proteïnes causant una sobreactivació dels receptors NMDA. De manera que els autors suggereixen que la proteïna PSD95 és mediadora de la toxicitat neuronal i la disfunció sinàptica induïda pels receptors NMDA en la MH (219).

Per tant, canvis en els components pre- i postsinàptics alteren la funció sinàptica i la dinàmica de l'estructura dendrítica. Per altra banda, canvis en la morfologia i la densitat dendrítica i en concret de les espines dendrítiques modulen la formació i el manteniment de les sinapsis permetent la naturalesa plàstica dels circuits neurals. De manera general, es pot

I. Introducció

considerar que com a estructures dinàmiques, la densitat i la mida de les espines dendrítiques augmenten després de canvis dependents d'activitat com la LTP, i disminueixen després de la LTD (220). Diferents estudis han mostrat que els pacients de la MH mostren un menor nombre de dendrites i d'espines dendrítiques (39,87,109,110). És més, diversos estudis han demostrat diferents evidències que corroboren la presència d'alteracions en la morfologia dendrítica en models murins de la MH. En els ratolins R6/1 s'ha descrit una disminució en el nombre i la llargària d'espines dendrítiques de l'escorça cingular i de l'estriat dorsal. També s'ha observat una disminució en el diàmetre, la ramificació i la complexitat dendrítica així com de l'àrea del soma neuronal en aquests ratolins (109,110,221). La disminució en la densitat i el diàmetre de les espines dendrítiques de les MSNs i de neurones corticals també s'ha observat en ratolins R6/2 (127), YAC128 (222) i en un model d'ADNc *full-length* de la *htt* (223).

Finalment, en un treball recent de Prity-Murmu, on s'utilitza la tècnica microscòpica d'excitació de dos fotons *in vivo* en ratolins R6/2, també es mostra una disminució de la densitat de les espines dendrítiques. Però el que és més rellevant d'aquest treball és que s'observa un augment en la formació de noves espines en aquests ratolins al llarg de la malaltia, tot i que aquestes espines noves i immadures no s'estabilitzen ni es transformen en espines persistents i madures. En aquest treball els autors mostren que la disminució en el nombre d'espines dendrítiques en la MH no és solament deguda a una pèrdua d'aquestes sinó que també és causada per una manca d'estabilització de les espines immadures de nova formació. Els autors d'aquest estudi suggereixen que la inestabilitat de les espines dendrítiques que presenten els ratolins R6/2 genera dèficits en la formació de connexions sinàptiques duradores (224).

Una de les tècniques més caracteritzades i usades per analitzar l'estat i la funcionalitat sinàptica es a través de mètodes electrofisiològics. Diversos grups usant aquesta metodologia han mostrat alteracions en la plasticitat sinàptica cortico-estriatal i hipocampal en models murins de la MH (96,108,111,135,210,211). Aquests estudis també indiquen que les sinapsis excitadores són les que semblen presentar alteracions més importants en la MH (96,111,211). En la via cortico-estriatal s'han descrit dèficits en les respostes sinàptiques evocades i en els corrents sinàptics espontànies i aquests dèficits empitjoren a mesura que avança el fenotip neurològic en models murins de la MH (96). En els ratolins YAC s'ha observat una tendència cap a la depressió sinàptica cortico-estriatal (210). Els ratolins *exó 1* mostren dèficits plàstics en l'escorça primària somato-sensorial, desregulació de la LTP cortico-estriatal i pèrdua progressiva de la capacítancia cel·lular de les MSN (94,126,134). Aquests dèficits correlacionen amb la pèrdua de marcadors sinàptics cortico-estriatals, la disminució d'espines dendrítiques i la

reducció en la transmissió sinàptica (126,127,223). A més, estudis en talls corticals de ratolins transgènics de la MH mostren un declivi progressiu en la capacitat de mantenir la LTD (225). En l'hipocamp, s'ha observat que la neurotransmissió basal és normal però s'ha descrit una disminució en l'expressió de la LTP en ratolins exó 1, YAC i KI (108,124,128,226). Addicionalment, la desregulació en l'expressió hipocampal de la LTP s'ha observat que va acompanyada de dèficits en la LTD (108,111,128). Aquests estudis indiquen que hi ha una disfunció sinàptica hipocampal en diferents models murins de la MH.

Per a concloure, les alteracions en la LTP i la LTD que presenten els ratolins models de la MH mostren de manera clara l'alteració sinàptica present en la MH. Totes aquestes evidències suggereixen que el dèficit sinàptic, que inclou alteracions en la transmissió sinàptica, desregulació de la plasticitat sinàptica i de la densitat i la morfologia dendrítica, pot ser la causa fisiopatològica inicial que condueix als dèficits cognitius observats en la MH.

5.4. Alteracions en vies de senyalització intracel·lulars en la MH

Molts mecanismes cel·lulars estan regulats per l'adhesió o l'eliminació de grups fosfats a través de l'activitat de proteïnes cinases i fosfatases, respectivament. De fet, el balanç adequat entre l'activitat cinasa i fosfatasa és crucial per a la regulació de la supervivència i la plasticitat neuronal. En la MH s'han descrit canvis en l'expressió i l'activitat de diverses cinases i fosfatases en pacients i en models animals de la MH. Moltes de les cinases alterades en la MH estan relacionades amb la regulació transcripcional, els processos de plasticitat sinàptica i la supervivència cel·lular com per exemple la proteïna cinasa A (*Protein kinase A*, PKA) dependent del monofosfat d'adenosina cíclic (AMPC) (125), la proteïna cinasa serina/treonina B també coneguda com AKT (227) i les proteïnes cinases activades per mitògens (*Mitogen-activated protein kinases*, MAPKs) (228). També s'han observat alteracions en diverses proteïnes fosfatases en models murins de la MH (229). Algunes d'aquestes fosfatases són la proteïna fosfatasa calcineurina (230), les fosfatases riques en repeticions leucina i dominis PH (227), i la fosfatasa tirosina enriquida en l'estriat (*Striatal-enriched protein tyrosine phosphatase*, STEP) (231).

En conclusió, existeixen molts estudis que mostren la funció aberrant de les proteïnes cinases i fosfatases i la seva implicació en la patogènesis de la MH, de manera que s'han identificat aquestes proteïnes com a bons candidats per a dissenyar estratègies terapèutiques per a restaurar la supervivència i la funció neuronal en la MH.

5.4.1. Rol de la cinasa regulada per senyals extracel·lulars 1/2 en la MH

Les cascades de senyalització regulades per les MAPK constitueixen una xarxa de vies de senyalització molt complexa que té un rol essencial en la transducció de senyals extracel·lulars a través d'efectors citoplasmàtics i nuclears. La senyalització regulada per les MAPK regula molts processos cel·lulars com són la proliferació i la supervivència cel·lular, l'apoptosi i la plasticitat sinàptica. Dins de la família de les MAPK clàssiques es coneixen 4 subgrups principals: cinasa regulada per senyals extracel·lulars (*Extracellular signal-regulated kinase, ERK1/2*), les cinases N-terminal de c-Jun (*c-Jun N-terminal kinase, JNK*), el grup de cinases p38 i ERK5 (figura 15)(232).

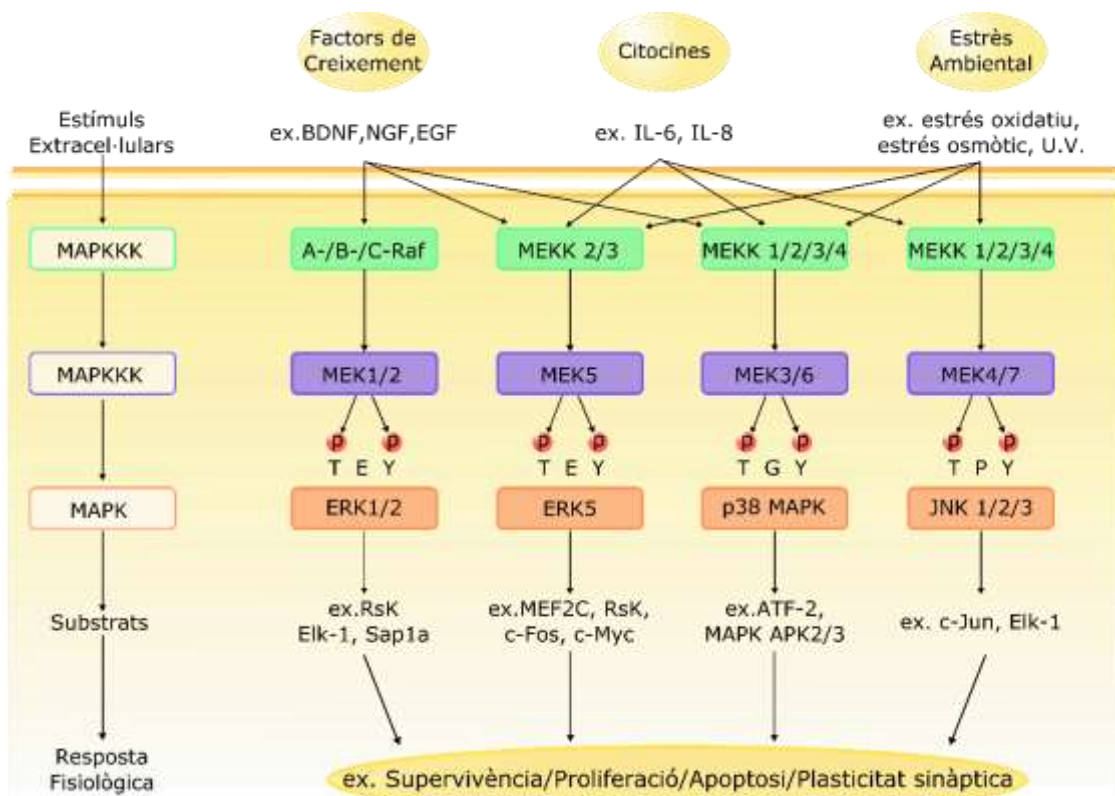


Figura 15. Cascades de les MAPK

Esquema representatiu de les quatre cascades principals de les MAPK: ERK1/2, ERK5, p38 MAPK i JNK 1/2/3. Diferents senyals extracel·lulars, com són factors de creixement, citocines o estrès ambiental, activen receptors específics promovent la senyalització de les MAPK. La resposta a aquests senyals extracel·lulars s'inicia amb la fosforilació d'una cinasa apical MAPKKK. La seva activació genera l'activació de la següent cinasa MAPKK. Al seu torn les MAPKK realitzen una fosforilació dual (representada amb cercles taronja) dels residus treonina (T) i tirosina (Y) que es troben al motiu conservat T-X-Y present en totes les MAPK. La X en el cas d'ERK1/2 i ERK5 representa l'aa àcid glutàmic (E), en el cas de p38 MAPK és l'aa glicina(G), mentre que en el cas de JNK 1/2/3 és l'aa prolina (P). Finalment, les diferents MAPK fosforilen una gran varietat de substrats citosòlics o nuclears, que inclouen altres proteïnes cinasa com per exemple RSK, factors de transcripció com són MEF2C i Elk-1, entre d'altres. Aquests substrats produeixen canvis transcripcionals o no-transcripcionals que causaran una gran varietat de respostes cel·lulars entre les que és troben la supervivència, la proliferació, l'apoptosi cel·lular i la plasticitat sinàptica. Figura adaptada de Pearson al., 2001 (232).

Cadascuna d'aquestes vies s'estructura per l'activació seqüencial de tres nivells cinases: una cinasa MAPKK (MAPKKK o MEKK) que activa a una cinasa MAPK (MAPKK o MEK) que al seu torn activa a una cinasa MAP (MAPK), la qual activarà als efectors cel·lulars de cadascuna de les vies (figura 15) (233).

De totes les vies de senyalització implicades en la MH, les que activen la cascada de senyalització d'ERK1/2 són de particular interès. ERK1/2 és un mediador antiapoptòtic i prosupervivència molt important (234). S'ha observat en experiments en cultius cel·lulars que la proteïna ERK1/2 és activada en resposta a la httm augmentant la supervivència cel·lular (235). Així mateix, en l'estriat dels ratolins R6/1 i R6/2 s'ha observat una activació significativa d'aquesta cinasa (231). La regulació temporal de l'activació d'ERK1/2 en aquests ratolins dona suport a la hipòtesi que la via d'ERK1/2 no està involucrada en els processos patològics primaris de la malaltia sinó que és un mecanisme compensatori activat en resposta a la httm que podria activar mecanismes prosupervivència. D'acord amb aquesta hipòtesi, s'ha observat en cèl·lules que expressen la httm que l'activació d'ERK1/2 protegeix les neurones, mentre que la inhibició d'ERK1/2 augmenta la mort cel·lular (228,235).

Altrament, s'ha descrit que la cinasa ERK1/2 regula els nivells del BDNF (236). Concretament en la MH s'ha suggerit que els baixos nivells d'ERK1/2 corticals augmenten la mort cel·lular i disminueixen l'expressió cortical del BDNF. En conseqüència, les cèl·lules estriatals rebran menys aportació cortical de BDNF, i activaran, en resposta, mecanismes compensatoris per tal d'augmentar l'expressió d'ERK1/2 (235).

Per tots aquests motius, estratègies farmacològiques que tinguin com a diana la via d'ERK1/2, poden servir com a base per a desenvolupar intervencions terapèutiques en la MH. S'ha descrit que ratolins R6/2 tractats amb Pizotifen, un fàrmac que activa transitòriament la cinasa ERK1/2, mostren una disminució en la neurodegeneració i una millora en el comportament motor (237). Addicionalment, el polifenol Fisetin, que prèviament s'havia mostrat que activava la senyalització d'ERK1/2, va ser testat en diferents models de la MH i es va observar que reduïa l'impacte tòxic de la httm en tots els models usats (238). De la mateixa manera, el Resveratrol, un altre polifenol, també activa la via d'ERK1/2 i també es protector en models de la MH (238). Finalment, també s'ha descrit que l'activació del receptor Cannabinoide tipus 1 protegeix de la mort induïda per la httm en cèl·lules PC12 i STHdh^{Q111/Q111} (línia cel·lular estriatal que expressa la httm amb 111 repeticions CAG) d'una manera dependent d'ERK1/2 (239). En general, aquestes evidències indiquen que ERK1/2 té un rol prosupervivència en

I. Introducció

presència de la httm, que és degut a l'activació/inactivació de diferents proteïnes que promouen la supervivència i la regulació de gens protectors.

5.4.2. Implicació de la via AMPc/PKA/CREB/BDNF en la MH

L'activació de la senyalització de l'AMPc té un paper clau en la regulació de la supervivència i la plasticitat neuronal i en la neurobiologia de l'aprenentatge i la memòria. La senyalització intracel·lular de l'AMPc implica l'activació de la PKA i la consegüent fosforilació i activació del factor de transcripció CREB (240,241). Finalment, CREB regula l'expressió de gens crítics per a la plasticitat, el creixement i la supervivència de les neurones, entre els quals es troba el BDNF (142,195,241–243).

En la MH s'ha descrit una disminució en els nivells d'AMPc en pacients i en models murins i cel·lulars de la MH (194). També s'ha descrit una disminució de la senyalització de la via AMPc/PKA/CREB en les cels STHdh^{Q111/Q111} (194) i en ratolins R6/2 (244). No solament això sinó que s'ha observat que la httm disminueix l'expressió de molts gens regulats per CREB, entre aquests el BDNF (142,144,146). Totes aquestes evidències indiquen que la disminució de la transcripció del BDNF de manera dependent de CREB és una característica important de la patologia de la MH (142).

S'han usat inhibidors específics de fosfodiesterases per a estimular la senyalització i la transcripció de CREB, com són el Rolipram i el TP10. Es va mostrar que el tractament amb aquests inhibidors disminuïa la pèrdua cel·lular estriatal en un model excitotòxic de la MH (245), reduïa l'atrofia cerebral i millorava la supervivència de les cèl·lules estriatals en ratolins models de la MH. També es va descriure que aquests fàrmacs augmentaven l'expressió cortical i estriatal del BDNF, disminuïen les IIN i milloraven els dèficits motors en diferents models murins de la MH (245,246). Per altra banda, es va observar que la inhibició de la fosfodiesterasa 10 i el tractament amb Fingolimod augmentaven la senyalització hipocampal de CREB i prevenien dels dèficits sinàptics i de memòria en els ratolins R6/1 (109,247). A més, la sobreexpressió de CREB és suficient per a rescatar de la letalitat dependent de la httm en *Drosophila* (248). Tots aquests resultats suggereixen que la httm altera la transcripció de gens regulats per CREB i que un augment de l'expressió gènica dependent de CREB pot ser una bona aproximació terapèutica.

6. Caracterització de noves dianes terapèutiques en la MH

A causa de la intensiva investigació duta a terme en la MH, actualment es coneixen molts dels mecanismes fisiopatològics que causen la disfunció neuronal i la neurodegeneració en aquesta malaltia. Alguns d'aquests mecanismes han estat extensament explicats en l'apartat anterior d'aquesta tesi. Tot i això, avui en dia no hi ha cap tractament establert que pugui pal·liar o aturar la MH. Per aquest motiu, és de vital importància caracteritzar dianes específiques que puguin alterar els mecanismes neuronals afectats en la MH per a poder desenvolupar i establir nous candidats terapèutics. En els següents apartats s'exposaran les noves dianes moleculars que han estat font d'investigació en la present tesi.

6.1. Receptors cel·lulars: Rol dels receptors de la prostaglandina E₂ en el SNC

Les prostaglandines (PG) són un conjunt de compostos lipídics fisiològicament actius derivats del metabolisme de l'àcid araquidònic i sintetitzats per les ciclooxigenases (COX)-1 i COX-2 (249). Quan els teixits estan exposats a diferents estímuls fisiològics i patològics, l'àcid araquidònic s'allibera de la membrana fosfolipídica i es genera un intermediari inestable, la PGH₂. Posteriorment, la PGH₂ serveix com a substrat per a generar les diferents PG (PGE₂, PGF_{2α}, PGD₂ i PGI₂) i el tromboxà A₂. Cada prostanoide és sintetitzat en compartiments cel·lulars específics a través de l'acció de sintases específiques (249). Les PG s'uneixen a receptors acoblats a proteïnes-G, caracteritzats per presentar set segments hidrofòbics transmembrana (250).

La PGE₂ és la PG més produïda en el cos i és sintetitzada per la PGE sintasa. La PGE₂ s'uneix a quatre subtipus diferents de receptors acoblats a proteïnes-G, anomenats receptors de la PGE₂ (EP): EP1, EP2, EP3 i EP4. La PGE₂ pot tenir diferents funcions i efectes, alguns dels quals poden ser oposats, depenent al receptor al que s'uneixi (251). El receptor EP1 està acoblat a la proteïna G_q i per tant indueix l'activació de la fosfolipasa C (PLC) que comporta l'augment citosòlic de l'inositol trifosfat (IP₃), el diaciglicerol (DAG) i el Ca²⁺ (251), mentre que els receptors EP2 i EP4 estan acoblats a la proteïna G_s que estimula l'activitat de l'adenilat ciclase (AC) que al seu torn activa la PKA (252). Per últim, el receptor EP3 és un cas més particular, ja que aquest està sotmès a tres processos d'empalmament (*splicing*) alternatiu diferents. Cadascun d'aquests tres processos genera diferents receptors EP3 acoblats a diferents proteïnes G. Per tant, l'activació del receptor EP3 pot produir canvis en els nivells de l'AMPc i també augmentar els nivells de Ca²⁺ (figura 16) (250). Els receptors EP s'expressen diferencialment en quasi tots els òrgans, incloent el SNC. Encara que es localitzen en regions i en àrees cel·lulars específiques en el cervell i són

I. Introducció

expressats en les cèl·lules endotelials, la micròglia, els astròcits i les neurones (253,254). L'expressió del receptor EP4 es troba restringida en neurones del nucli hipotalàmic (255), mentre que els receptors EP1, EP2, i EP3 s'expressen en múltiples regions cerebrals, entre les quals es troben l'hipocamp, l'estriat i l'escorça (256,257).

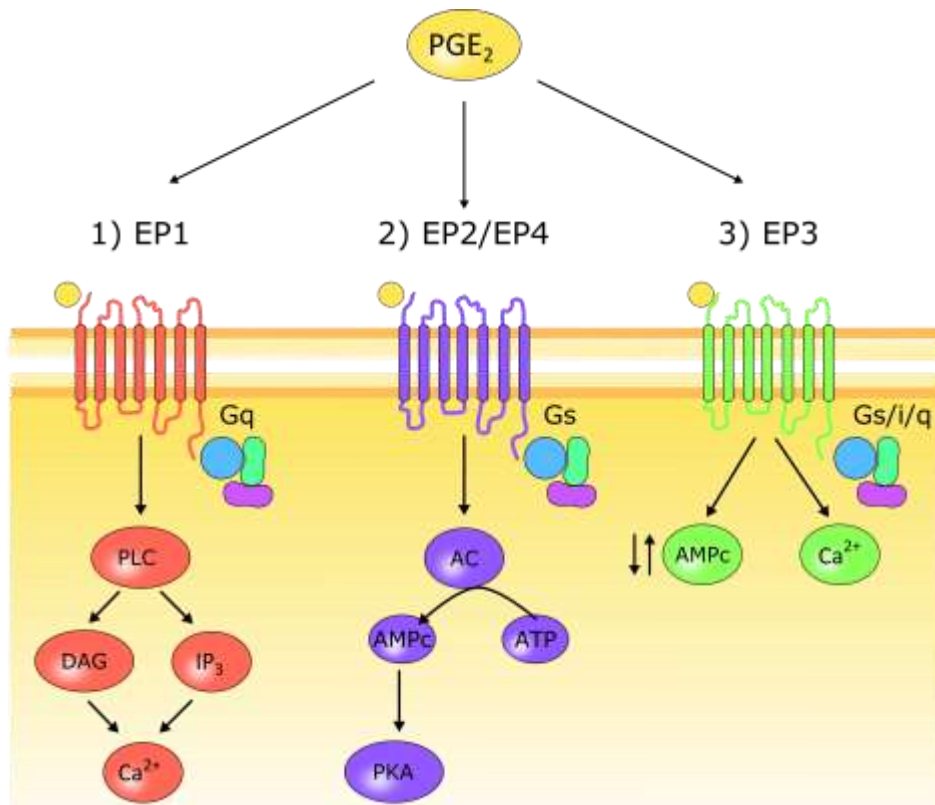


Figura 16. Senyalització a través dels receptors EP

La il·lustració resumeix les vies de senyalització activades pels 4 subtipus de receptors EP. (1) El receptor EP1 produeix un augment transitori de Ca²⁺ intracel·lular. L'activació d'aquest receptor estimula la senyalització cel·lular activant a la proteïna Gq. La proteïna Gq al seu torn activa a la PLC que augmenta els nivells de tres intermediaris cel·lulars com són el DAG, IP₃ i el Ca²⁺. (2) Els receptors EP2 i EP4 estan units a la senyalització de la proteïna Gs que activa a la proteïna AC que dirigeix la síntesi de l'AMPc. Finalment, l'AMPc estimula l'activitat de la cinasa PKA. (3) Per últim, el receptor EP3 pot estar lligat a les proteïnes Gs, Gq o Gi i pot actuar inhibint o activant la producció d'AMPc i també augmentar el Ca²⁺ intracel·lular.

6.1.1. Paper del Receptor EP1 en el SNC

La senyalització a partir del receptor EP1 s'ha relacionat com la principal via de neurotoxicitat dependent de COX-2 en el SNC, tant en processos aguts de dany neuronal (258) com en malalties neurodegeneratives (259,260).

S'han dut a terme molts estudis per tal d'elucidar el rol del receptor EP1 en l'excitotoxicitat neuronal i s'ha descrit que la inhibició o la deleció d'aquest receptor té efectes protectors en models aguts de dany neuronal (258,261–263). Diversos estudis on es disminueix

la senyalització del receptor EP1, ja sigui per inhibició farmacològica o per inhibició gènica d'aquest receptor, recolzen la seva implicació en processos neurotòxics. Aquests estudis mostren que la disminució de la seva senyalització millora el dany cerebral i recupera efectes conductuals en models *in vivo* d'isquèmia cerebral o d'excitotoxicitat (258,261,262). També s'ha observat que la inhibició de la senyalització del receptor EP1 disminueix significativament el dany cerebral produït per una lesió hipòxica isquèmica i augmenta la supervivència en neurones corticals en un ambient hipòxic (262,263).

Per altra banda també s'ha descrit un paper neurotòxic del receptor EP1 en models de malalties neurodegeneratives. En models *in vivo* i *in vitro* de la malaltia de Parkinson s'ha mostrat que el bloqueig de el receptor EP1 protegeix les neurones dopaminèrgiques de la mort induïda per la 6-Hidroxidopamina (259,264). En el context de la malaltia d'Alzheimer, ha estat demostrat que la neurotoxicitat causada pel pèptid β -amiloide és parcialment causada pel receptor EP1 (265). S'ha observat que ratolins deficients en el receptor EP1 mostren menys acumulació del pèptid β -amiloide (260). A més, la deleció genètica del receptor EP1 atenua els danys neuronals hipocampals causats pel pèptid β -amiloide i disminueix la pèrdua de memòria en un model murí de la malaltia d'Alzheimer (260).

Finalment, un treball recent del nostre grup mostra que la senyalització del receptor EP1 té un paper rellevant en la fisiopatologia de la MH (266). En aquest estudi es mostra com la inhibició del receptor EP1 amb el compost SC-51089, un antagonista selectiu d'aquest receptor, protegeix les MSN en un model excitotòxic de la MH. A més a més el tractament agut amb SC-51089 causa millores motores i cognitives en els ratolins R6/1. Aquestes millores conductuals van acompanyades en una disminució de les IIN de la httm en l'hipocamp i l'estriat. Per últim, també s'observa que el bloqueig del receptor EP1 produeix millores sinàptiques, com són la recuperació estriatal i hipocampal de diferents marcadors sinàptics i la millora de la LTP hipocampal. Totes aquestes evidències demostren que el bloqueig del receptor EP1 té un efecte terapèutic important en els ratolins R6/1 i el senyalen com un bon candidat terapèutic per a tractar els dèficits motors i cognitius de la MH.

6.1.2. Receptor EP2: Activació de la via AMPc/PKA/CREB/BDNF i rol de protecció neuronal

Contràriament al que s'ha descrit en el cas del receptor EP1, investigacions prèvies han mostrat que l'activació del receptor EP2 té un paper de protecció neuronal i també un paper associat a la plasticitat sinàptica hipocampal (256).

I. Introducció

Com ja he citat amb anterioritat, el receptor EP2 està acoblat a la proteïna G tipus Gs i la seva senyalització activa la proteïna AC que sintetitza AMPc. La senyalització intracel·lular de l'AMPc activa la PKA que al seu torn fosforila i activa el factor de transcripció CREB (252). L'activació de CREB estimula l'expressió de gens importants per a la plasticitat i la supervivència neuronal, entre els quals es troba el BDNF (142,241,242,267). S'ha descrit en cultius glials humans que l'activació del receptor EP2 indueix l'alliberament del BDNF a causa de l'activació de la via d'AMPc/PKA/CREB (268). A més, altres estudis mostren que les PG estimulen l'alliberació de neurotrofines (269) i mostren una correlació entre els nivells del BDNF i la PGE₂ (270).

En ratolins, s'ha observat que l'estriat, l'hipocamp i l'escorça, tres regions altament implicades en la fisiopatologia de la MH, mostren alts nivells d'expressió del receptor EP2 (271,272). Per tant, és important estudiar si el receptor EP2 té algun rol en els dèficits de BDNF observats en la MH.

Com ja s'ha explicat, la PGE₂ pot exercir efectes funcionals molt diversos i en alguns casos oposats. En el cas del receptor EP2, s'ha estudiat àmpliament els efectes protectors neuronals de la seva activació en models de dany cerebral. Diferents treballs mostren que en paradigmes de toxicitat dependent de NMDA i de privació d'oxigen i glucosa, l'activació del receptor EP2 té efectes neuronals beneficiosos (273–275). Ha estat suggerit que aquests efectes protectors són dependents de la senyalització d'AMPc, ja que quan s'inhibeix la PKA es produeix un bloqueig d'aquests efectes (274,275). En un model murí isquèmic, la deleció genètica del receptor EP2 incrementa significativament l'infart cerebral en l'escorça cerebral i en estructures subcorticals (273,274). A més, també s'ha observat que l'estimulació del receptor EP2 és beneficiosa en models murins d'excitotoxicitat estriatal (271). En conclusió, aquests estudis mostren que l'activació del receptor EP2 pot protegir contra el dany excitotòxic i anòxic a través de l'activació de la senyalització de l'AMPc.

A part dels efectes protectors de l'estimulació del receptor EP2 en models de dany cerebral també s'ha observat que la seva estimulació confereix protecció neuronal en diferents models *in vitro* de malalties neurodegeneratives, com són models cel·lulars de la malaltia de Parkinson (276), de l'esclerosi lateral amiotròfica (277) i de la malaltia d'Alzheimer (278). En tots aquests estudis, els efectes protectors deguts a l'estimulació del receptor EP2 són dependents de l'activació de la via AMPc/PKA (276–278). Tot i això, és important mencionar que també s'ha descrit la implicació del receptor EP2 en processos neurotòxics en models d'inflamació crònica i

neurodegeneratiu (279,280). Així és que l'efecte de la senyalització del receptor EP2 en la viabilitat neuronal dependrà del context dels estímuls i del grau de la resposta inflammatòria *versus* la resposta protectora contra el dany excitotòxic específics de cada desordre neurodegeneratiu. Per això és interessant l'estudi de l'activació del receptor EP2 en la MH.

L'ús de ratolins KO per al gen del receptor EP2 o bé el seu silenciament amb ARNs d'interferència ha posat de manifest que la senyalització de la PGE₂ té funcions cerebrals inesperades, com per exemple el rol del receptor EP2 en l'aprenentatge, la formació de memòria i la plasticitat sinàptica dependent de l'hipocamp (281–283).

El receptor EP2 es troba localitzat en estructures presinàptiques de neurones primàries hipocampals (281). S'ha proposat que la PGE₂ és alliberada des del terminal postsinàptic i actua activant els receptors presinàptics EP2. Per tant, la PGE₂ actuaria com un missatge retrògrad ja que facilitaria la senyalització des del terminal postsinàptic cap al terminal adjacent presinàptic en l'hipocamp (281).

Funcionalment s'ha observat que l'activació del receptor EP2 per la PGE₂ augmenta la densitat de les espines dendrítiques a través d'un mecanisme dependent dels receptors AMPA (284,285). Endemés, ratolins deficientes en l'expressió del receptor EP2 mostren perturbacions en la memòria, com problemes en la memòria espacial (282,283). Aquests ratolins també presenten dèficits cognitius significatius en la realització de tests estandarditzats per a avaluar les respostes a la por i a la memòria social (282).

Finalment, també s'ha demostrat que la PGE₂ està implicada en la transmissió sinàptica excitadora i la plasticitat a llarg termini gràcies a diferents estudis electrofisiològics (270,281–283,286). S'ha descrit que la inhibició de la COX-2 bloqueja la inducció de la LTP de la via perforant del GD hipocampal i que aquest bloqueig és revertit quan s'administra exògenament PGE₂ (270,286). Aquests resultats concorden amb els resultats dels ratolins deficientes en el receptor EP2 ja que aquests també mostren danys en la LTP (283). Així doncs, la senyalització de la via PGE₂/EP2 sembla tenir un paper crucial en la LTP en la via perforant de l'hipocamp a través de la senyalització presinàptica del receptor EP2 i la conseqüent activació de la PKA (281). Per últim, s'ha descrit que la deficiència en el receptor EP2 també provoca dèficits en la LTD en les sinàpsis de les fibres col·laterals de Schaffer amb les cèl·lules de la CA1 (282), corroborant encara més el paper del receptor en la plasticitat hipocampal.

6.2. Senyalització cel·lular: Importància de la via d'ERK5

6.2.1. Estructura i via de senyalització d'ERK5

ERK5 és un dels últims membres identificats de la família de les MAPK i per aquesta raó és una de les vies MAPK menys estudiada (287). ERK5 es localitza tant al nucli com al citoplasma (288,289) i té una expressió ubíqua en molts teixits, mostrant alts nivells d'expressió en el SNC (290,291). La seva senyalització s'ha relacionat amb supervivència, proliferació i diferenciació cel·lular i és activada per factors de creixement i estrès cel·lular (292,293).

Per a que ERK5 s'activi és necessària la seva fosforilació en els residus Thr218 i Tyr220 per part de la cinasa MEK5, que al seu torn és activada per les cinases MEKK2, MEKK3. MEK5 és la única cinasa MAPK que activa ERK5 i ERK5 és l'únic substrat d'aquesta, per aquest motiu tota la senyalització i els efectes atribuïts a aquesta estan relacionats amb ERK5 (294).

La proteïna ERK5 conté un domini cinasa (localitzat a la seva regió N-terminal) i la seva regió C-terminal compta amb una estructura i funció úniques que la diferencien de la resta de MAPK (figura 17). El domini cinasa d'ERK5 presenta una regió d'unió a MEK5 i el motiu d'activació TEY (Treonina-Glutamina-Tirosina), que és molt similar al que presenta la proteïna ERK1/2. En la regió N-terminal ERK5, com moltes altres MAPK, també conté un domini d'ancoratge que permet l'associació amb diferents substrats. En canvi, l'extrem C-terminal d'ERK5 és una regió gran, fent que ERK5 tingui un pes dos vegades superior al de la majoria de MAPK. En aquest extrem C-terminal ERK5 conté: (i) un motiu de localització nuclear(295), (ii) un domini d'interacció amb la proteïna MEF2 (*myocyte enhancer factor 2*)(296), (iii) dues regions d'interacció amb proteïnes amb dominis d'homologia Src 3 i (iv) un domini d'activació transcripcional. A més, aquest extrem regula l'activació, l'autofosforilació i la localització subcel·lular d'ERK5 (287–289).

Diferents estudis han demostrat que els dominis N i C terminals interaccionen fent que la cinasa ERK5 estigui en un conformació tancada. Quan la cinasa MEK5 fosforila ERK5 aquesta interacció és interrompuda i ERK5 passa a estar en una conformació oberta. La conformació oberta d'ERK5 promou la seva activació i permet la seva translocació al nucli (287–289,297). Un cop ERK5 es troba dins del nucli s'associa i fosforila molts factors de transcripció i cinases com la proteïna ribosomal de 90 kDa S6 cinasa (*90 kDa ribosomal S6 kinase, RSK*), c-Fos, c-Myc, MEF2 entre altres (287–289,298).

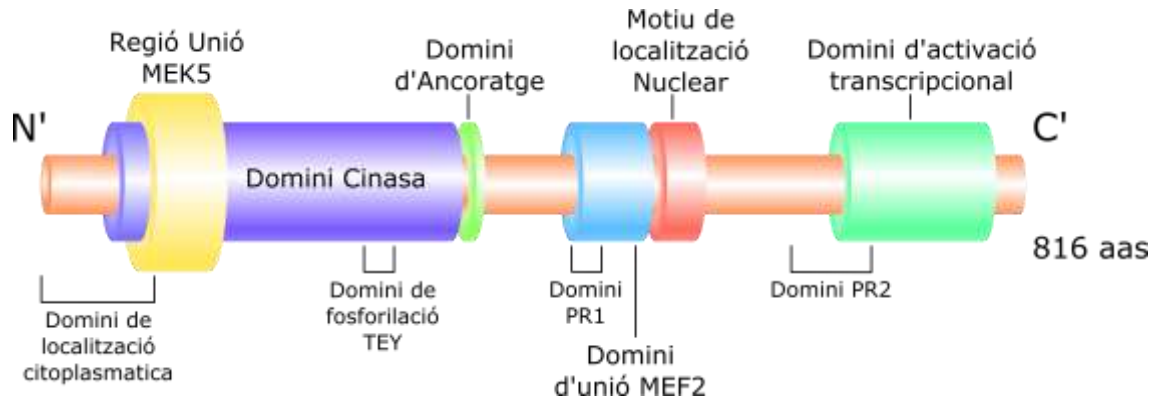


Figura 17. Estructura i dominis funcionals d'ERK5

La proteïna ERK5 està formada per 816 aas, amb un domini N-terminal cinasa i una cua C-terminal gran, amb aproximadament 400 aas. L'extrem N-terminal conté un motiu de localització citoplasmàtica, el domini cinasa i el domini d'ancoratge. El domini cinasa d'ERK5 conté la regió d'unió a MEK5 i el motiu de fosforilació TEY. La cua C-terminal està composta per dos dominis rics en prolines (PR), PR1 i PR2, que són dominis d'interacció amb proteïnes d'homologia Src 3. En l'extrem C-terminal també es troba el domini d'unió al MEF2, el motiu de localització nuclear i el domini d'activació transcripcional. Figura adaptada de Drew et al. 2012 i de Nithianandarajah et al. 2012 (288,289).

També s'ha descrit que ERK5 té la capacitat d'autofosforilar-se activant i regulant directament la transcripció gènica a través del seu domini d'activació transcripcional. Aquesta capacitat directa d'activació transcripcional és una habilitat única que no s'ha observat en cap de les altres MAPK convencionals (297,299).

6.2.2. Implicació d'ERK5 en les funcions neuronals

Com ja hem explicat anteriorment, l'activació de la via d'ERK1/2 per factors de creixement ha estat relacionada amb processos de supervivència, diferenciació i plasticitat neuronal (234,300). Tot i això, molts d'aquests estudis es basen en l'ús dels inhibidors farmacològics de la via d'ERK1/2, PD98059 i U0126, per estudiar el seu rol neuronal. Encara que prèviament aquests inhibidors s'havien considerat específics de la via d'ERK1/2, s'ha observat que també inhibeixen MEK5 inhibint també la via d'ERK5 (301–303). Això suggereix que ERK5 també pot estar implicada en moltes de les funcions atribuïdes a la senyalització d'ERK1/2. Per aquest motiu és necessari estudiar meticulosament el seu rol neuronal.

Nombrosos estudis mostren que ERK5 és un facilitador de la supervivència neuronal en resposta a factors neurotròfics (291,292,304–307). S'ha descrit que la via de senyalització d'ERK5 promou la supervivència cel·lular activant l'expressió de gens prosupervivència gràcies a l'activació de la família de factors de transcripció MEF2 (291,304,305) i disminuint l'expressió de gens proapoptòtics a través de l'estimulació de la via Akt i del factor de transcripció CREB (292,307).

I. Introducció

Un dels rols neuronals més estudiats de la via d'ERK5 és la seva implicació en la senyalització retrògrada de les neurotrofines. La senyalització retrògrada s'inicia quan els factors neurotròfics s'uneixen als seus respectius receptors en els terminals nerviosos. Posteriorment els receptors activats són endocitats i transportats axonalment fins al cos cel·lular. Watson i companys van descriure que les vies de senyalització activades per les neurotrofines en el terminal axonal són diferents de les que es generen després d'una activació en el cos cel·lular (292). Van mostrar que durant la senyalització retrògrada, els receptors de neurotrofines Trk són endocitats i transportats fins al cos cel·lular on activen la proteïna ERK5. Seguidament, ERK5 activa els gens de resposta retrògrada, promovent l'activació de les proteïnes CREB, MEF2 i l'expressió de la proteïna antiapoptòtica bcl-w. D'aquesta manera ERK5 estimula la supervivència neuronal (292,308). Contràriament, ERK1/2 que està implicat en la generació de respostes després d'una activació neurotròfica directa al cos cel·lular, no està involucrat en la transmissió de les senyals retrogrades (292,309). Per tant, la via d'ERK5 té una funció única i essencial en la senyalització retrògrada de les neurotrofines.

Adicionalment, s'ha observat que ERK5 estimula la supervivència i protecció neuronal no solament quan és activat per factors neurotròfics sinó que també és activat en situacions neurotòxiques (310), d'estrès oxidatiu (306) i isquèmiques (311). També s'ha relacionat l'activació d'ERK5 amb processos de diferenciació de neurones corticals (291), neurones dopaminèrgiques (312) i neurones gabaèrgiques (313). Recentment, el grup de Xia ha demostrat usant diferents aproximacions genètiques que ERK5 activa la neuronogènesi en l'hipocamp i el bulb olfatori en ratolins adults millorant la memòria i la funció olfactiva (314,315). A més, també és important mencionar que s'ha mostrat que l'activitat d'ERK5 és requerida pel creixement neurític (316,317).

En conclusió, tots aquests resultats indiquen que la via de senyalització d'ERK5 està relacionada amb processos de proliferació, diferenciació, supervivència i protecció neuronal. Tot i això, la seva implicació en desordres del SNC no ha estat àmpliament descrita. Un estudi publicat l'any 2007 va mostrar l'alteració de l'activitat d'ERK5 en l'hipocamp de subjectes suïcides (318). A més, recentment alguns estudis han relacionat l'alteració d'ERK5 amb diferents mecanismes alterats amb la malaltia d'Alzheimer. Aquests estudis han suggerit que la regulació d'ERK5 pot ser un mecanisme terapèutic potencial en el context de les malalties neurodegeneratives (310,319,320).

Per aquest motiu, és important la seva caracterització i l'estudi de la seva implicació en la MH. A més, dos estudis rellevants on es descriu el rol de protecció neuronal d'ERK1/2 associat a la toxicitat induïda per la httm en la MH es basen amb resultats obtinguts amb l'ús dels inhibidors PD098059 i U0126 (228,235). Com ja ha estat citat, aquests inhibidors inhibeixen la via d'ERK1/2 però també l'activitat de la MEK5 i per tant no és pot descartar el fet de que la via d'ERK5 no estigui implicada en funcions de protecció neuronal en la MH.

6.3. Regulació transcripcional: Paper de MEF2 en el SNC

6.3.1. Biologia de MEF2: estructura, expressió i regulació

La família de factors de transcripció MEF2 és una família àmpliament conservada al llarg de l'evolució que s'expressa des de llevats fins a mamífers. Els vertebrats posseeixen quatre gens (MEF2A-D) que codifiquen quatre isoformes proteiques de MEF2 (321). Aquesta família de factors de transcripció va ser primerament identificada per Olson i companys l'any 1989 en el teixit muscular. Es va observar que els factors de transcripció MEF2 estaven enriquits en aquest teixit. Addicionalment, també es va mostrar que tenien un paper clau ja que regulaven la miogènesi i la morfogènesi de les cèl·lules musculars (321,322).

Tot i això, ràpidament es va observar que els factors de transcripció MEF2 eren altament expressats en cèl·lules musculars però també s'expressaven en alts nivells en neurones i en baixos nivells en diferents tipus cel·lulars (321). Tant en el cervell en desenvolupament com en el cervell adult, les quatre proteïnes MEF2 mostren patrons d'expressió diferencials però que es solapen entre ells. Els factors de transcripció MEF2 són expressats en tot el cervell adult, incloent regions que estan implicades en la formació de diferents tipus de memòria com són l'escorça, l'hipocamp, l'amígdala i l'estriat (323–325).

Tots els membres de la família MEF2 presenten una estructura similar amb tres dominis funcionals (figura 18). A l'extrem N-terminal de les proteïnes MEF2 es troba el domini MADS (*MCM1-Agamous-Deficiens-Serum response*) i el domini MEF2. Aquests dos dominis estan altament conservats en tots els membres de la família. El domini MADS és el principal responsable de la unió d'aquestes proteïnes amb els dominis d'ADN rics en seqüències A/T dels gens diana de MEF2, mentre que el domini MEF2 regula l'afinitat d'unió amb l'ADN i les interaccions amb els cofactors. Les proteïnes MEF2 s'associen amb una alta varietat de cofactors per a controlar específicament grups de gens diana. Finalment, a l'extrem C-terminal es troba el domini d'activació transcripcional (326,327).

I. Introducció

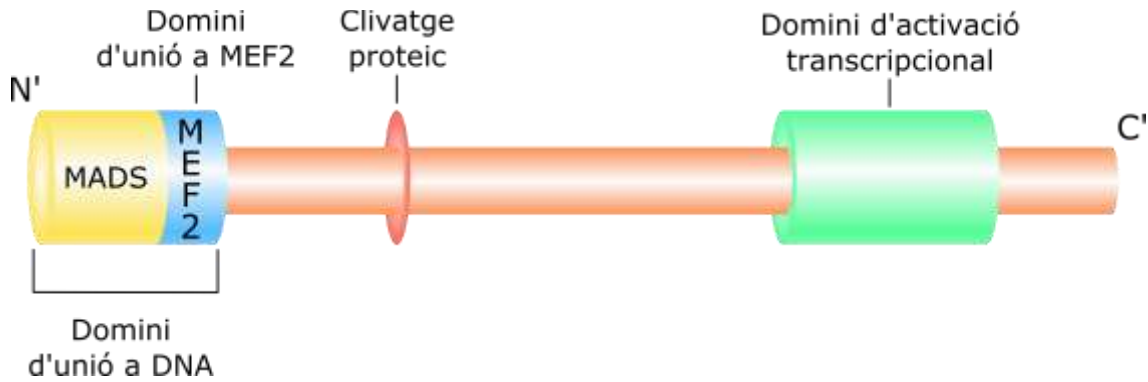


Figura 18. Estructura i dominis funcionals de MEF2

Tots els membres de la família MEF2 posseeixen una estructura similar. A l'extrem N-terminal presenten els dominis encarregats de la unió de la proteïna amb l'ADN i de regular l'afinitat d'aquesta unió i la dimerització, els dominis MADS i MEF2, respectivament. La proteïna també presenta una regió de clivatge proteic per caspases. Finalment a la cua C-terminal es troba el domini d'activació transcripcional. Figura adaptada de McKinsey et al. 2002 i Rashid et al. 2014 (326,328).

L'activitat transcripcional de MEF2 està estretament regulada per diferents estímuls extracel·lulars. En neurones, MEF2 pot ser activat per neurotrofines (305) i per vies de senyalització cel·lulars dependents de Ca^{2+} (329). Per aquest motiu, MEF2 està sotmès a un complex programa de modificacions posttranscripcionals, que inclou fosforilacions, acetilacions i sumoïlacions. Aquestes modificacions regulen molts processos relacionats amb la funció de MEF2 com són: l'afinitat d'unió amb l'ADN, l'associació amb els cofactors transcripcionals, el tràfic nuclear i citoplasmàtic i la seva degradació per caspases. MEF2 està regulat per diferents cinases i fosfatases, entre les quals es troba, com ja ha estat detallat, la cinasa ERK5(291,326,328).

Un altre mecanisme de regulació important de l'activitat de MEF2 està relacionat amb la interacció amb les HDAC de la classe IIa. Totes les HDAC de la classe IIa tenen un motiu conservat de 17 aas en l'extrem N-terminal que serveix de motiu d'unió amb MEF2 (figura 19) (330–332). De fet, l'associació entre MEF2 i les HDAC de la classe IIa es coneix com l'eix MEF2/HDAC classe IIa (333,334). Això és així perquè la majoria de funcions associades a les HDAC de la classe IIa estan relacionades i executades per MEF2.

Consistent amb el seu rol com a reguladors de MEF2 les HDAC de la classe IIa s'expressen predominantment al teixit muscular i al cervell, reproduint el patró d'expressió de MEF2 (335). En una cèl·lula no estimulada les HDAC de la classe IIa s'associen a MEF2 i inhibeixen l'expressió dels seus gens diana. En canvi, en resposta a l'activació cel·lular pel Ca^{2+} , l'associació entre MEF2 i les HDAC de la classe IIa es trenca. Aquest trencament és causat per la fosforilació de les HDAC de la classe IIa, que provoca que aquestes siguin exportades al citoplasma. Permeten així la unió

de MEF2 amb cofactors transcripcionals que activen l'expressió dels seus gens diana (figura 19) (330,332,336).

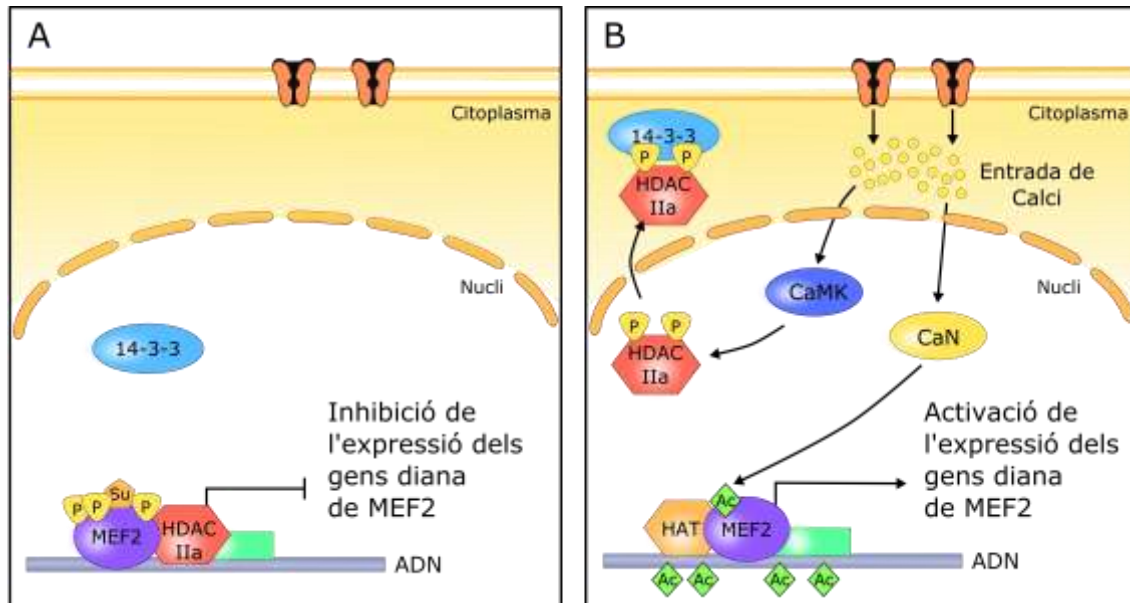


Figura 19. Regulació de l'activitat de MEF2

(A) En una cèl·lula no estimulada, les HDACs de la classe IIa, que reprimeixen l'expressió gènica eliminant grups acetils d'histones i de factors de transcripció, s'associen amb MEF2. Sota aquestes condicions, MEF2 es troba fosforilat (P) i sumoïlat (Su). La fosforilació i la sumoïlació que presenta MEF2 com també l'associació amb les HDAC de la classe IIa promouen la repressió transcripcional dels gens diana de MEF2.

(B) En resposta a l'activitat sinàptica, dues vies independents convergeixen sobre MEF2 i produeixen un augment en la seva activitat transcripcional. Per una banda, l'activació de la cinasa dependent de calci/calmodulina (Calcium/calmodulin-dependent protein Kinasa, CaMK) causa la fosforilació de les HDAC de la classe IIa. La fosforilació d'aquestes inicia la unió amb les proteïnes xaperones 14-3-3 i la seva subseqüent exportació nuclear. Com a resultat, MEF2 pot interactuar amb enzims HAT, que acetilaran el factor de transcripció i també els seus gens diana. A més, l'activació de la calcineurina (CaN), una fosfatasa dependent de calci, desfosforila MEF2 promovent la seva dessumoïlació, contribuint a la seva acetilació i activació transcripcional. Figura adaptada de Cohen et al., 2008 (336)

6.3.2. Paper de MEF2 en la supervivència i la plasticitat sinàptica neuronal

Un gran nombre d'estudis han descrit que MEF2 és un factor fonamental per a la supervivència neuronal i té un paper antiapoptòtic clau en neurones postmitòtiques (291,329,337,338). Diferents autors han postulat que el rol de MEF2 en la supervivència neuronal és essencial per preservar la integritat del SNC (328,339). Més recentment, MEF2 ha estat identificat com una proteïna crítica en processos de plasticitat sinàptica estructural i funcional. La seva activitat ha estat relacionada en el control de la densitat de les espines dendrítiques, la sinaptogènesi i també en el creixement dendrític *per se* (340–342). A més, diferents treballs també relacionen l'activació de MEF2 com un component essencial en els processos de plasticitat funcionals, implicant-lo en el control homeostàtic de la plasticitat sinàptica i dels circuits neuronals (323,342–344). Tots aquests processos són crítics en el

I. Introducció

desenvolupament cerebral però també en el control i el refinament dels circuits neuronals en el cervell adult. En els últims anys diferents estudis usant diferents aproximacions genètiques han demostrat que la desregulació de l'activació de MEF2 en l'hipocamp i l'escorça altera els processos d'aprenentatge i memòria (345–347). Aquests estudis assenyalen la implicació de MEF2 en aquests processos i l'afegeixen a la relativament curta llista de factors de transcripció que regulen la formació de la memòria.

L'experiència sensorial genera activitat sinàptica que és crítica per al correcte desenvolupament dels circuits neurals. L'activitat sinàptica causa despolarització de les membranes i entrada de Ca^{2+} en les neurones, que al seu torn genera una gran varietat de canvis cel·lulars que alteraran la connectivitat sinàptica. Una de les maneres en què l'entrada de Ca^{2+} altera la remodelació de les sinapsis és a través de l'activació genètica. L'activitat neuronal regula un programa complex d'expressió genètica implicat en la connectivitat sinàptica que és la base dels processos d'aprenentatge i memòria (336,348,349). Tot i això, la diversitat i la complexitat d'aquest programa genètic regulat per activitat sinàptica no es coneix amb exactitud. Exceptuant potser CREB, que la seva regulació genètica neuronal ha estat extensament estudiada i s'ha demostrat que controla un gran nombre de gens implicats en la funció neuronal (350).

Per això, cal assenyalar la importància del treball realitzat al laboratori de Flavell i publicat l'any 2008. En aquest treball es fa un anàlisi exhaustiu del programa genètic controlat per MEF2 i es descriuen 182 gens dependents d'activitat sinàptica i regulats per MEF2. Entre aquests 182 gens s'inclouen la proteïna regulada per activitat associada al citoesquelet (*Activity-regulated cytoskeleton-associated protein*, Arc), la proteïna homòloga de Homer 1a (*Homer protein homolog 1a*, HOMER1a) i el BDNF. Aquests 182 gens són expressats principalment en el SNC i estan implicats en un gran nombre de funcions que regulen múltiples aspectes del desenvolupament i la funció del circuit neuronal. Els autors descriuen que MEF2 activa gens que debiliten les sinapsis excitadores, però curiosament també gens que reforcen aquestes sinapsis. També observen que regula gens relacionats en la remodelació de les sinapsis inhibidores i l'alliberació de vesícules presinàptiques. Per tant, tots aquests resultats suggereixen que en resposta a l'activitat neuronal MEF2 indueix l'expressió d'un programa genètic que probablement té un paper central en el desenvolupament, el refinament, la plasticitat i l'homeòstasi sinàptica (351).

Adicionalment, dos grups independents han descrit l'element genòmic de resposta a activitat sinàptica (*Synaptic activity-responsive element, SARE*). Aquest element controla l'expressió de gens regulats per activitat neuronal i que conté llocs d'unió per als factors de transcripció CREB, MEF2 i el factor de resposta al sèrum (*Serum response factor, SRF*). Moltes de les regions genètiques que contenen l'element SARE estan relacionades amb funcions neuronals implicades amb processos sinàptics. Gens com ARC, HOMER1a i BDNF, entre d'altres, estan sota la regulació d'aquest element regulador. Els autors d'aquests treballs suggereixen que les seqüències SARE són responsables de la resposta coordinada dels factors de transcripció CREB, MEF2 i SRF per a transmetre la informació des del compartiment postsinàptic al nucli (352–354).

La importància de MEF2 en la regulació i el desenvolupament dels circuits neuronals en humans s'observa pel fet que mutacions en els gens de MEF2 com en els seus gens diana han estat implicats en malalties com l'autisme, l'epilèpsia i en la discapacitat intel·lectual (349,355,356). També s'ha mostrat una disminució dels nivells i de l'activitat de MEF2 en humans i en models animals i cel·lulars en la malaltia neurodegenerativa de Parkinson i s'ha indicat que pot ser una diana terapèutica potencial en aquesta malaltia (357,358). Endemés, s'ha descrit que la proteïna ataxina-1, causant del desordre neurodegeneratiu Atàxia Espinocerebel·losa tipus 1 (*Spinocerebellar atàxia type 1, SCA1*), s'associa i segresta el factor de transcripció MEF2 a les IIN. Això comporta la repressió transcripcional dels gens regulats per MEF2, fet que contribueix a la neurotoxicitat i la neurodegeneració induïda per l'ataxina-1 (331).

En conclusió, és molt important seguir investigant per comprendre totalment el rol funcional de MEF2 en el manteniment i formació dels circuits neuronals en l'adult com també el seu paper i la seva implicació en els desordres dels SNC.

II. Hipòtesi i Objectius

-Vós seríeu capaç de donar la vida per una idea?

-No. M'estimaria més de trobar una idea que em salvés la vida.

Pere Calders

Un dels punts centrals en la recerca de la MH és l'estudi d'alteracions moleculars per a poder trobar nous candidats terapèutics que puguin aturar o atenuar la inexorable progressió de la malaltia. L'expressió de la httm promou l'activació complexa de diferents mecanismes cel·lulars, involucrant receptors, proteïnes cinases i factors de transcripció entre d'altres, que causen disfunció i mort neuronal i que generen els símptomes motors, cognitius i psiquiàtrics. Per tal d'oferir possibles dianes terapèutiques que permetin el desenvolupament de fàrmacs, en aquesta tesi hem volgut estudiar la implicació en la MH de tres proteïnes que pertanyen als tres nivells cel·lulars abans esmentats. També hem analitzat la possible relació d'aquestes proteïnes amb els dèficits motors i cognitius associats a la vulnerabilitat estriatal i a la disfunció hipocampal respectivament.

Hipòtesi:

La hipòtesi del present treball és que alteracions en el receptor EP2, la cinasa ERK5 i el factor de transcripció MEF2 en l'estriat o en l'hipocamp de la MH tenen un paper rellevant en els processos patofisiològics de la MH i representen noves dianes terapèutiques per a tractar els dèficits cognitius o motors característics de la MH.

Objectius:

Per tal de comprovar la validesa de la hipòtesi, es plantegen els següents objectius en aquesta tesi:

1. Analitzar el paper del receptor EP2 en els dèficits tròfics, sinàptics i cognitius en la funció hipocampal en els ratolins R6/1 models de la MH.
2. Estudiar la via de senyalització de la cinasa ERK5 i la seva contribució en la regulació tròfica en la MH.
3. Caracteritzar el possible rol del factor de transcripció MEF2 en els dèficits transcripcionals, cel·lulars i cognitius dependents de l'hipocamp en la MH.

III. Materials i mètodes

Un irlandès es troba en una habitació fosca. A les palpentes, busca el quinqué. El troba, l'encén amb un misto i veu que a la paret del davant hi ha una altra porta. S'afanya a traspasar-la i tancar-la rere seu, oblidant el quinqué, per comprovar que torna a ser en una altra habitació sense llum. La història pot repetir-se fins a l'infinit, amb el tossut irlandès buscant quinqués i encenent-los, traspasant portes i tancant-les, oblidant el quinqué, sempre endavant, sempre cap a una nova foscor. Finalment l'irlandès tossut es troba en una habitació sense portes, ensarronat com una rata. Sap què diu? "Gràcies a déu, era el meu últim misto."

Albert Sánchez Piñol. La pell freda

1. Models Murins de la MH

Per al desenvolupament dels objectius d'aquesta tesi van ser usats dos models diferents de ratolins mascles de la MH, els ratolins transgènics R6/1 i els ratolins KI Hdh^{Q111/Q111}.

Els ratolins R6/1 van ser proveïts inicialment pel laboratori Jackson (Bar Harbor, ME, USA) i mantinguts després de successius creuaments amb el fons genètic B6CBA. La colònia de R6/1 usada en els processos experimentals expressa l'exó 1 N-terminal de la httm humana amb 145 repeticions (125). Com a animals controls d'aquesta colònia s'han usat animals *Wild Type* (WT) de la mateixa soca.

Els ratolins Hdh^{Q111/Q111} presenten una inserció de 109 repeticions CAG en homozigosis en el gen de la htt que estén el tram poliQ d'aquesta a 111 residus. Aquest ratolins KI Hdh^{Q111/Q111} van ser creuats amb ratolins KI Hdh^{Q7/Q7}, que presenten 7 repeticions CAG en el gen de la htt. Així es van obtenir els ratolins heterozigots Hdh^{Q7/Q111} que són els que es van usar en la realització aquesta tesi. Com a animals controls van ser usats els ratolins KI Hdh^{Q7/Q7} ja que no presenten fenotip de la MH. Tots aquest ratolins han estat mantinguts amb un fons genètic C57BL/6.

Els ratolins han estat establats a la Unitat d'Experimentació Animal de *la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona*. Els ratolins s'han mantingut sota cicles de llum/fosc de 12 h amb accés a aigua i menjar *ad libitum*. La temperatura de les habitacions és manté controlada entre 20 i 24°C i amb una humitat entre el 30 i el 70%.

La comprovació del genotip de tots els animals usats es va fer per PCR. Cada ratolí ha estat marcat amb microxips numèrics que permeten la identificació genòmica de cada animal.

Tots els procediments han estat aprovats pel comitè local de benestar animal de la Universitat de Barcelona, seguint les directrius de la legislació catalana (Decret 214/1997), espanyola (RD 53/2013) i europea (Directiva 2010/63/EU) vigent.

2. Teixit cerebral *post mortem*

Les mostres humanes de putamen (6 controls i 4 pacients de la MH) van ser proveïdes del Banc de Teixits Neurològics pel Biobanc-Hospital Clínic-IDIBAPS, Barcelona (NTB-Biobanc-HC-IDIBAPS) seguint les pautes generals dels comitès ètics locals (taula 2). Totes les directives

III. Materials i mètodes

contingudes en l'última Declaració de Helsinki van ser tingudes en consideració, i tots els subjectes estudiats van firmar un informe de consentiment.

Taula 2. Mostres humanes *post mortem* del putamen de pacients de la MH

Cas N°	Diagnosi Patològica	Repeticions CAG	Gènere	Edat
1	Normal		Femení	81
2	Normal		Masculí	31
3	Normal		Femení	68
4	Normal		Masculí	56
5	Normal		Masculí	64
6	MH, Grau de Vonsattel 4	62	Femení	28
7	MH, Grau de Vonsattel 4	44	Masculí	59
8	MH, Grau de Vonsattel 4	43	Masculí	60
9	MH, Grau de Vonsattel 3-4	-	Masculí	55
10	MH, Grau de Vonsattel 3	45	Masculí	53
11	MH, Grau de Vonsattel 1	40	Masculí	73

3. Cultius Cel·lulars: Línia estriatal STHdh

En la realització experimental d'aquesta tesi va ser usada una línia condicional cel·lular immortalitzada de progenitors neuronals estriatals (STHdh). Es van usar les cèl·lules control WT STHdh^{Q7/Q7} i les cèl·lules mutants STHdh^{Q111/Q111} que expressen la htt amb 7 glutamines i la httm amb 111 glutamines, respectivament. També ens hi referim com a cèl·lules estriatals WT i KI, respectivament.

Aquesta línia cel·lular va ser generada aïllant els precursors estriatals de ratolins Hdh^{Q7/Q7} i Hdh^{Q111/Q111}. Seguidament, els precursors estriatals van ser immortalitzats amb l'antigen SV40 *LargeT antigen* que conté les mutacions sensibles a la temperatura tsA58/U19 i el gen de resistència a la Neomicina. Les cèl·lules es van mantenir a 33°C en el medi de cultiu *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM; Sigma-Aldrich, Sant Louise, MO, USA).

4. Cultius Primaris Hipocampals i estriatals

Els cultius primaris hipocampals i estriatals van ser preparats a partir de la dissecció d'estriats i d'hipocamps d'embrions a dia embrionari 18 que provenien de creuaments entre

animals WT i R6/1. El genotipatge es va realitzar mitjançant anàlisi per PCR de la cua de cada embrió.

Les plaques de cultiu van ser pretractades 24 hores abans de sembrar les neurones amb 0,1 mg/ml de poli-D-Lisina (Sigma-Aldrich, Sant Louise, MO, USA). Les cèl·lules embrionàries hipocampals i estriatals es van sembrar a una densitat de 400.000 neurones en plaques de cultius de 60 mm (per a anàlisis bioquímics) i a una densitat de 50.000 neurones/pou en plaques de 24 pous amb cobreobjectes (per a anàlisis d'immunofluorescència). El medi utilitzat per cultivar les neurones va ser el medi Neurobasal (Gibco-BRL, Renfrewshire, Scotland, UK) suplementat amb B-27 (Gibco-BRL, Renfrewshire, Scotland, UK) i Glutamax (Gibco-BRL, Renfrewshire, Scotland, UK). Al finalitzar el cultiu, les plaques de cultiu es van transferir a un incubador a 37 °C en una atmosfera humidificada i amb un contingut del 5% de CO₂ fins a dia *in vitro* (DIV) 10.

5. Plasmidis

El constructes per a sobeexpressar ERK5 van ser amablement cedits pel Dr. Lizcano de la Universitat Autònoma de Barcelona. Aquest plasmidi expressa el gen bacterià de resistència a la Kanamicina i la proteïna ERK5 fusionada amb la proteïna de fluorescència verda (*green fluorescent protein*, GFP).

5.1. Transformació i amplificació de l'ADN plasmídic

Per a expandir els plasmidis, es van usar cèl·lules competents bacterianes d'*E. Coli* (Subcloning Efficiency™ DH5α™ Competent Cells, Invitrogen, Varlsbad, CA, USA). Aquestes cèl·lules van ser transformades per xoc tèrmic. Es van afegir 250 ng dels plasmidis a 50 µl de les cèl·lules competents i es van incubar durant 15 minuts amb gel. Per tal que es generés la transformació, la mescla va ser incubada durant 1,5 minuts a 42 °C i ràpidament es van tornar a incubar en gel durant 2 minuts.

Després de realitzar el xoc tèrmic, es va procedir al creixement de les cèl·lules competents d'*E. Coli*. Amb aquest objectiu, es va afegir medi LB (*Lysogeny broth media*; 800 µl) a les cèl·lules competents amb el ADN plasmídic i es va deixar incubar durant 1 hora a 37 °C a 250 rpm. Finalment, 200 µl de les cèl·lules transformades en creixement es van sembrar en una placa d'agar amb 30 µg/ml de Kanamicina o bé 50 µg/ml d'Ampicil·lina. Les colònies es van deixar créixer durant tota la nit a 37 °C. El dia següent es va agafar una colònia bacteriana aïllada de la

III. Materials i mètodes

placa d'agar i es va deixar créixer en 200 ml LB en una dilució 1:1000 de l'antibiòtic adequat a 37 °C en agitació durant tota la nit.

A continuació es va procedir a aïllar l'ADN plasmídic. L'aïllament es va realitzar amb 5 ml del cultiu bacterià usant el kit de purificació d'ADN de *Minipreps* i *Maxipreps* de Promega (Wizard Plus SV, Madison, WI, USA), amb el protocol indicat pel fabricant.

5.2. Transfecció dels plasmidis

El procediment de transfecció es va realitzar usant Lipofectamina 3000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) seguint les instruccions del fabricant. Les cèl·lules STHdh^{Q7/Q7} i STHdh^{Q111/Q111} amb una confluència del 50% van ser transfectades 24 hores després de ser sembrades.

Les cèl·lules transfectades amb els plasmidis ERK5 van ser lisades 48 hores després de la transfecció.

6. Tractaments farmacològics

El model animal R6/1, així com els diferents tipus cel·lulars usats en la tesi, van ser tractats amb diferents compostos farmacològics i amb diferents paradigmes temporals depenent del disseny experimental.

6.1. Tractaments amb Misoprostol

Per a l'estudi del rol del receptor EP2 en la MH va ser usat el compost farmacològic Misoprostol, que és un agonista específic d'aquest receptor.

Per tal de concretar si la concentració administrada de misoprostol produeix un efecte a nivell cerebral, es va realitzar una sola injecció per via intraperitoneal (i.p.) amb vehicle (*Phosphate Buffer Saline*, PBS) o Misoprostol (50 o 500 µg/kg) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) a animals WT de 10 setmanes d'edat. Es van usar quatre animals per a cada grup, que van ser sacrificats per dislocació cervical una hora després de ser tractats i posteriorment es va extreure ràpidament i en fred diferents regions del cervell.

Per a realitzar els anàlisis conductuals es va realitzar un tractament crònic implantant i.p. en animals WT i R6/1 de 14 setmanes d'edat una bomba osmòtica (model 1004; Alzet, Palo Alto, CA, USA) per tal d'alliberar misoprostol de manera regular. Els animals van ser profundament anestesiats amb pentobarbital (60mg/ kg) per a poder realitzar la cirurgia i.p. d'implantació de

la bomba. Es van implantar bombes que contenien vehicle (PBS) o el Misoprostol per ser infosos a una velocitat de 0,11 µl/hora durant 28 dies. Aquest índex d'infusió equival a una dosi de 50 µg/kg/dia. Es van utilitzar entre 10 i 15 animals per a cada condició.

Per als anàlisis morfològics de les neurites, els cultius primaris hipocampals WT i R6/1 es van tractar a DIV 3 amb 1, 10 i 50 µM de Misoprostol, i es va utilitzar el PBS com a vehicle. Un tractament de 10 ng/ml del BDNF (Peprotech EC Ltd., London, UK) va ser utilitzat com a control positiu. Els cultius van ser fixats per a iniciar el protocol d'immunofluorescència 7 dies després del tractament, a DIV 10.

Per a estudiar els nivells del BDNF, els cultius primaris de neurones hipocampals provinents d'embrions WT i R6/1 van ser tractats amb PBS o Misoprostol (10 µM). En aquest cas els cultius també es van tractar a DIV 3 però, van ser lisats 24 hores o 7 dies després del tractament.

6.2. Tractaments amb BML-210

Per a estudiar la implicació de MEF2 en la MH, es va inhibir la interacció entre MEF2 i les HDAC de la classe IIa com a aproximació farmacològica. El compost BML-210 va ser usat amb aquest objectiu, ja que es un inhibidor d'aquesta interacció (359).

Per a dur a terme els anàlisis conductuals, es va realitzar un tractament amb animals WT i R6/1 de 15 setmanes d'edat que van ser injectats per via i.p. una vegada al dia amb 150 mg/kg/dia de BML-210 (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA) durant tres dies. Com a vehicle es va injectar per via i.p. sulfòxid de dimetil (DMSO) una vegada el dia durant tres dies. Els ratolins es van sacrificar per dislocació cervical immediatament després de la realització del test conductual corresponent, l'últim dia de tractament. Després del sacrifici l'estriat, l'escorça i l'hipocamp van ser extrets ràpidament. Es van utilitzar entre 10 i 15 animals per a cada condició.

Per als anàlisis morfològics de les neurites, els cultius primaris hipocampals WT i R6/1 es van tractar a DIV 7. Els cultius van ser tractats amb 10 µM de BML-210 o amb 10 ng/ml de BDNF. L'adició de DMSO en el medi de cultiu va ser utilitzat com a vehicle. Posteriorment, els cultius van ser fixats a DIV 10 per a iniciar el protocol d'immunofluorescència.

6.3. Tractaments amb zVAD

Per a l'estudi del clivatge de MEF2 per caspases els cultius primaris hipocampals WT i R6/1 de DIV 9 es van tractar amb 50 µM de zVAD-FMK (Z-Val-Ala-Asp-Fluoromethylketone) (Enzo Life

Sciences, Farmingdale, NY, USA), un paninhibidor de les caspases. L'adició de DMSO en el medi de cultiu va ser utilitzat com a vehicle. Els cultius es van tractar durant un període de 17 hores i després van ser lisats a DIV 10 per a realitzar l'extracció proteica.

7. Anàlisi conductual

Per a l'anàlisi conductual dels ratolins es van realitzar diferents paradigmes conductuals per analitzar diferents trets en els diferents estudis.

7.1. Fentotip neuronal i estat general dels ratolins: *claspings* i pes

El *claspings* és una característica típica dels models animals de la MH, que es caracteritza per la retracció de les extremitats quan l'animal està suspès en l'aire. Avalua el fenotip neurològic de l'animal (360,361). Per valorar el *claspings* els ratolins van ser aixecats per la cua i mantinguts suspesos a l'aire durant 1 minut. Durant aquest temps s'observa si els ratolins recreen les extremitats cap al cos. Els ratolins van ser puntuats seguint aquest criteri: 0= no retracció de cap pota, 1= retracció de dues potes, 2= retracció totes les potes. El *claspings* va ser mesurat setmanalment en animals R6/1 tractats amb Misoprostol des de les 12 a les 18 setmanes d'edat.

També es va realitzar un control setmanal del pes dels animals WT i R6/1, tractats o no amb el Misoprostol, per tal d'obtenir un valor de l'estat general dels ratolins.

7.1.1. Proves conductuals motores: test del cilindre rotatori

Es van realitzar proves conductuals motores en ratolins WT i R6/1 tractats amb vehicle i Misoprostol.

El test del cilindre rotatori amb acceleració (*Accelerating rotarod test*) es va realitzar per avaluar l'aprenentatge i la coordinació motora. Els ratolins van ser col·locats en un cilindre motoritzat de 30 mm de diàmetre. La velocitat de rotació es va anar augmentant gradualment durant 5 minuts des de 4 rpm fins a 40 rpm i es va registrar el temps de latència. El temps de latència està definit per ser el temps que els ratolins aguanten damunt del cilindre rotatori fins que no poden mantenir-se degut a l'augment de velocitat i cauen. L'entrenament i el test de l'*accelerating rotarod* es va realitzar quatre vegades per dia durant quatre dies consecutius a les 17 setmanes d'edat.

7.2. Proves conductuals de memòria i aprenentatge

Les proves conductuals de memòria i aprenentatge es van realitzar a les 15-16 setmanes d'edat en els animals tractats amb vehicle i BML-210 i a 17 setmanes d'edat als ratolins tractats amb vehicle i Misoprostol.

7.2.1. Test de reconeixement d'objectes nous

El test de reconeixement d'objectes nous (*Novel object recognition test*, NORT) es va dur a terme per avaluar la memòria de reconeixement.

Per a realitzar el test es va usar un camp obert que consisteix en un espai tancat quadrat de 40 cm d'ample i 35 cm d'alt. Aquest test es divideix en tres fases: habituació, entrenament i test pròpiament dit. La fase d'habitució va durar dos dies, els ratolins van ser habituats al camp obert en absència d'objectes durant 10 minuts/dia. El tercer dia es va iniciar la fase d'entrenament. Durant aquesta fase els ratolins van ser col·locats al camp obert amb dos objectes idèntics (condició A i A') durant 10 minuts. 24 hores després de la fase d'entrenament es va realitzar el test, i els animals es van tornar a col·locar al camp obert amb un objecte familiar (A) i un objecte nou (B) durant 5 minuts. Durant la realització de l'experiment les condicions lumíniques van ser controlades mantenint una il·luminació constant de 20 lux al centre.

Per a avaluar l'assoliment de la memòria a llarg termini es va mesurar el temps de preferència de cada objecte que es calcula amb la fórmula següent: $\text{temps d'exploració de cada objecte} \times 100 / \text{temps d'exploració total}$.

7.2.2. Test de localització d'objectes nous

El test de localització d'objectes nous (*Novel object location test*, NOLT) es va dur a terme per avaluar la memòria espacial a llarg termini dels ratolins.

Per a realitzar el test es va usar com a camp obert el mateix espai que s'havia usat en el NORT. Igual que en el NORT, el NOLT també es divideix en tres fases: habituació, entrenament i test pròpiament dit. Durant la fase d'habitució, els ratolins van ser col·locats al camp obert en absència d'objectes durant 10 minuts. Aquest procés es va realitzar dues vegades el primer dia, una pel matí i l'altra per la tarda. El segon dia es va iniciar la fase d'entrenament: durant aquesta fase els ratolins van ser col·locats al camp obert amb dos objectes idèntics situats en dos localitzacions (localització a i a') durant 10 minuts. 24 hores després de la fase d'entrenament, es va realitzar el test, els animals es van tornar a col·locar al camp obert amb un objecte en una

III. Materials i mètodes

localització coneguda (a) i un objecte en una localització nova (b) durant 5 minuts. Durant la realització de l'experiment les condicions lumíniques van ser controlades mantenint una il·luminació constant de 20 lux al centre.

Per a avaluar l'assoliment de la memòria a llarg termini es va mesurar el temps de preferència de cada objecte, que es calcula amb la fórmula següent: $\text{temps d'exploració de cada objecte} \times 100 / \text{temps d'exploració total}$. També es va mesurar l'índex de reconeixement que es calcula amb la fórmula següent: $\text{temps d'exploració de la localització nova} \times 100 / \text{temps d'exploració total}$.

7.2.3. Prova d'alternació espontània del laberint en T

La prova d'alternació espontània del laberint en T (*T-maze spontaneous alternation task, T-SAT*) va ser usada per analitzar l'aprenentatge i la memòria espacial.

L'aparell usat per a dur a terme aquest test consisteix en una plataforma de tres braços, dos dels quals estan situats a 180° l'un de l'altre. El tercer braç, que és el braç central de la T, està situat a 90° dels altres dos. Els tres braços tenen una llargària de 45 cm i una amplitud de 8 cm i estan envoltats per unes parets de 20 cm d'alçada. En l'entrada dels dos braços situats a 180° hi ha dues portes idèntiques amb forma de guillotina. Durant la realització de la prova aquesta plataforma va estar ubicada a 60 cm del terra.

Durant la fase d'entrenament, un dels dos braços estava tancat (braç nou) i els ratolins van ser col·locats en el braç central de la T i van poder explorar aquest braç i el que estava obert (braç conegut) durant 10 minuts. Per a avaluar la memòria a llarg termini, després de 5 hores es va realitzar el test pròpiament dit. Amb aquest objectiu, es van col·locar els ratolins en el braç central de la T i se'ls va deixar explorar lliurement els tres braços durant 5 minuts. Durant la realització de l'experiment, les condicions lumíniques van ser controlades mantenint una il·luminació constant de 20 lux al centre.

Per a avaluar l'assoliment de la memòria a llarg termini es va mesurar el temps de preferència de cada braç, que es calcula amb la fórmula següent: $\text{temps d'exploració de cada braç} \times 100 / \text{temps d'exploració total}$.

8. Extracció proteica

Les mostres biològiques van ser processades per a obtenir la fracció proteica. Cada tipus de mostra va ser processada seguint un protocol concret que es detalla a continuació.

Per tal d'obtenir la fracció proteica, els ratolins es van sacrificar per dislocació cervical en edats diferents. El cervell va ser ràpidament extret en fred i es va realitzar la dissecció de l'estriat, l'escorça i l'hipocamp. Les mostres de teixit humà, com ja s'ha indicat, van ser cedides pel Biobanc-Hospital Clínic-IDIBAPS.

Tant les mostres de ratolins com les humanes van ser homogeneïtzades per sonicació en una solució amortidora (*Buffer*) de lisi preparat amb: 1% Tritó X-100, 10% Glicerol, 50 mM Tris-HCl pH7.5, 10 mM EDTA, 150 mM NaCl. Posteriorment aquest *buffer* de lisi va ser suplementat amb els inhibidors de proteases i fosfatases següents: 2mM PMSF, 10 µg/ml Aprotinina, 1 µg/ml Leupeptina, 2mM Na₃VO₄ i 100 mM NaF.

Les cèl·lules STHdh^{Q7/Q7} i les cèl·lules STHdh^{Q111/Q111} van ser rentades un cop amb PBS. Seguidament, es va utilitzar el mateix *buffer* de lisi descrit anteriorment i es va afegir a la placa cel·lular. Les cèl·lules van ser dissociades mecànicament amb un rascador de cèl·lules.

Per a l'obtenció de l'homogenat proteic dels cultius primaris el procediment seguit va ser el mateix que el que ha estat explicat per a les cèl·lules STHdh. L'única diferència va ser el *buffer* de lisi emprat. El *buffer* de lisi usat per a l'extracció proteica dels cultius primaris conté: 1% NP-40, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl. Posteriorment en aquest *buffer* de lisi es van afegir els inhibidors de proteases i fosfatases següents: 2mM PMSF, 10 µg/ml Aprotinina, 1 µg/ml Leupeptina, 2mM Na₃VO₄ i 100 mM NaF.

Tots els lisats van ser centrifugats a 16,100 x g durant 15 minuts a 4°C i el líquid sobrenedant recollit. La concentració proteica va ser determinada usant el kit d'assaig proteic Dc (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA).

9. Immunoblot de proteïnes (*Western blot*)

Les mostres utilitzades per a l'electroforesi es van preparar amb 15 µg d'extracte proteic i *buffer* de carrega compost per: 62,5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% (w/v) SDS, 10% Glicerol, 140 mM β-Mercaptoetanol i 0,1% (w/v) blau de Bromofenol. Per tal de desnaturalitzar completament les proteïnes les mostres van ser incubades a 100°C durant 5 minuts.

III. Materials i mètodes

Amb la finalitat de separar les proteïnes en funció del seu pes molecular, s'han utilitzat gels de SDS i poliacrilamida en condicions desnaturalitzants (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, SDS-PAGE) seguint el mètode de Laemmli (LAEMMLI 1970). Les mostres van ser carregades en gels de diferents concentracions de poliacrilamida en funció del pes de la proteïna que s'havia de detectar. Per a la migració de les proteïnes va ser fixat un amperatge constant de 35 mA durant aproximadament una hora.

Seguidament les proteïnes van ser transferides a membranes de nitrocel·lulosa (Whatman Schleicher&Schuell; Dassel, Germany). La transferència es va realitzar fixant un voltatge constant de 90V durant 1,5 hores a 4°C per a evitar un escalfament excessiu.

Un cop les membranes van ser transferides a la membrana de nitrocel·lulosa, les membranes es van bloquejar amb un *buffer* de bloqueig durant una hora. Aquest *buffer* va ser preparat amb un 5% de Sèrum d'albumina bovina (BSA) (Sigma-Aldrich (Sant Louise, MO, USA)) i un 5% de Llet desnatada en una solució de TBS-T (*Tris Buffer Saline-Tween*; 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl pH 7.4, 0,05% Tween 20). Després del bloqueig les membranes van ser rentades tres cops amb TBS-T i incubades tota la nit amb l'anticòs primari corresponent diluït en TBS-T, 0,1% BSA, 0,02% Azida sòdica. En la taula següent (taula 3) es resumeixen els anticossos usats en aquesta tesi.

Taula 3. Anticossos primaris per a Western Blot

Antigen	Pes Molecular (kDa)	Espècie hoste	Dilució	Casa comercial
Arc	55	Mouse	1:1000	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)
BDNF	14	Rabbit	1:1000	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)
Caspasa 3	17, 19, 35	Rabbit	1:1000	Cell Signaling (Beverly, MA, USA)
Caspasa 3 Clevada	17, 19	Rabbit	1:1000	Cell Signaling (Beverly, MA, USA)
CBP	265	Rabbit	1:1000	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)
ERK1/2	42-44	Mouse	1:1000	BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)
ERK5	115	Rabbit	1:1000	Cell Signaling (Beverly, MA, USA)
GFAP	50	Rabbit	1:2000	DAKO (Santa Clara, CA, USA)
HDAC4	140	Rabbit	1:1000	Abcam (Cambridge, UK)
htt (181-810 aa)	350	Mouse	1:1000	Merk Millipore (Billerica, MA, USA)
htm (clone mEM48)	350	Mouse	1:1000	Merk Millipore (Billerica, MA, USA)
IBA1	17	Rabbit	1:1000	Wako Chemicals USA (Richmond, VA, USA)
IL6	25	Mouse	1.1000	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)
MEF2	40-65	Rabbit	1:200	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)

Antigen	Pes Molecular (kDa)	Espècie hoste	Dilució	Casa comercial
MEF2C	50-60	Rabbit	1:1000	Cell Signaling (Beverly, MA, USA)
MEK5	42	Rabbit	1:1000	Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY, USA)
pCREB (Ser 133)	43	Rabbit	1.1000	Merk Millipore (Billerica, MA, USA)
pERK1/2 (Thr202/Tyr204)	42-44	Rabbit	1:1000	Cell Signaling (Beverly, MA, USA)
pERK5 (Thr218/Tyr220)	115	Rabbit	1:1000	Cell Signaling (Beverly, MA, USA)
pMEF2C (Ser387)	45	Rabbit	1:1000	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)
pMEK5 (Ser311/Thr315)	42	Rabbit	1:1000	Abcam (Cambridge, UK)
PSD95	95	Rabbit	1:2000	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Substrats de pKA		Rabbit	1.1000	Cell Signaling (Beverly, MA, USA)
Synaptophysin	45	Rabbit	1:1000	Abcam (Cambridge, UK)
TNF α	17 i 26	Mouse	1.1000	Abcam (Cambridge, UK)
α -Actina	45	Mouse	1:2000	MP Biomedicals (Aurora, OH, USA) Lamin
α -Tubulin	55	Mouse	1:2000	Sigma-Aldrich (Sant Louise, MO, USA)

Després de la incubació amb l'anticòs primari, les membranes van ser rentades tres cops amb TBS-T i incubades durant una hora a temperatura ambient amb l'anticòs secundari adequat conjugat amb peroxidasa (HRP, *Horseradish peroxidase*) diluït en TBS-T, 1% BSA (taula 4).

Taula 4. Anticòsos secundaris per a Western Blot

Anticòs secundari	Dilució	Casa comercial
Anti-Mouse IgG	1:2000	Promega (Madison, WI, USA)
Anti-Rabbit IgG	1:2000	Promega (Madison, WI, USA)

Finalment les membranes van ser rentades tres cops més amb TBS-T i incubades amb el reactiu Luminol (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). La reacció final va ser visualitzada i fixada exposant la membrana sobre films fotogràfics (Fujifilm Holdings Corp., Tokyo, Japan). Aquests films es van escanejar i les densitometries van ser quantificades usant la versió 3.0 del programa GelPro.

Per poder realitzar el control de carrega proteica, les membranes van ser incubades durant 15 minuts contra les proteïnes α -tubulina i α -actina (taula 3).

10. Immunoprecipitació de proteïnes (IP)

El teixit va ser homogeneïtzat mecànicament, primer amb una punta de pipeta d'1ml i després amb una xeringa d'insulina (Becton and Dickinson Medical, Franklin Lakes, NJ, USA). La homogeneïtzació es va realitzar amb *buffer* d'IP preparat amb 40 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 10 nM Na₄P₂O₇, 10 mM C₃H₇Na₂O₆P, 1mM EDTA i 0,3% CHAPS. Aquest *buffer* d'IP va ser suplementat amb els següents inhibidors de proteases i fosfatases: 1mM Na₃VO₄, 2,5 mM NaF, 2 mM PMSF i 1:10:000 còctel d'inhibidors de proteases (*Life Science Merck*, Darmstadt, Germany). Un cop finalitzada l'homogeneïtzació, es va centrifugar a 16,100 x g a 4°C durant 15 minuts. El sobrenedant es va recollir i la concentració proteica va ser determinada.

Una quantitat de 200 µg de proteïna va ser diluïda en 300 µl de *buffer* d'IP suplementat amb els inhibidors de proteases i fosfatases. A aquesta mescla se l'hi van afegir els anticossos anti-htt corresponents en una dilució 1:40 (MAB2166 o EM48, Massachusetts, CA, USA). Per a tenir controls negatius, no es va posar anticòs primari en aquest pas i en canvi es va posar 1µl d'immunoglobulina G (IgG) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., PA, USA). Seguidament, ho vam deixar incubant tota la nit a 4°C en agitació rotatòria.

A continuació, la mescla incubada tota la nit amb els anticossos primaris va ser suplementada amb 30 µl de Proteïna A Sefarosa (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) i es va tornar a deixar incubat tota la nit a 4°C en agitació rotatòria.

El dia següent es va procedir a la IP precipitació *per se*. Els immunocomplexos formats van ser recollits per centrifugació. La mescla es va centrifugar a 3400 x g i el pellet va ser rentat tres cops consecutius amb *buffer* d'IP. Després d'aquests tres rentats, es va realitzar un últim rentat amb *buffer* de Rentat preparat amb: 50 mM HEPES pH 7,5, 40 mM NaCl i 2mM EDTA.

Per acabar, els immunocomplexos van ser desnaturalitzats bullint les mostres a 100°C durant 7 minuts amb el mateix *buffer* de càrrega usat en el Western Blot: 62,5mM Tris-HCl pH 6.8, 2% (w/v) SDS, 10% Glicerol, 140mM β-Mercaptoetanol i 0,1% (w/v) Blau de bromofenol. Finalment, els immunocomplexos van ser analitzats usant el protocol de Western Blot, descrit en l'apartat anterior.

11. Anàlisi d'expressió

11.1. Extracció d'ARN

L'ARN va ser extret i aïllat de les cèl·lules estriatals *STHdh^{Q7/Q7}* i *STHdh^{Q111/111}* i de l'estriat i l'hipocamp d'animals WT i R6/1 de diferents edats. Aquesta extracció es va realitzar amb el Kit d'aïllament d'ARN *Nucleospin RNA II* (Macherey-Nagel, Düren, Germany) seguint les indicacions del fabricant. Breument, després de la lisi cel·lular, les mostres biològiques es van fer passar per columnes d'aïllament i l'ARN es va unir al filtre de les columnes. L'ADN contaminant va ser eliminat mitjançant una digestió de 15 minuts a temperatura ambient. Els filtres es van netejar diverses vegades i l'ARN resultant es va eluir amb H₂O lliure de Ribonucleases. La concentració d'ARN aïllat es va quantificar amb l'espectofotòmetre Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

11.2. Transcripció inversa

Una quantitat de 500 ng d'ARN purificat va ser transcrit inversament usant el Kit *PrimeScript RT* (Perfect Real Time, Takara Biotechnology Inc., Kusatsu, Shiga, Japan). La síntesi de l'ADNc es va realitzar en un volum de 20 µl d'acord amb les indicacions del fabricant. El programa utilitzat consistia en un cicle a 37°C durant 15 minuts i un cicle final a 85 °C durant 5 segons. Per a tenir controls negatius i excloure la contaminació d'ADN genòmic, l'enzim transcriptasa inversa va ser omès en els controls negatius.

11.3. Amplificació per PCR en temps real (qPCR)

La qPCR és una variant de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) utilitzada per amplificar i simultàniament quantificar de forma absoluta el producte resultant de l'amplificació de l'ADNc.

El producte de la síntesi de l'ADNc va ser analitzat per qPCR usant les sondes d'ADN proveïdes amb l'assaig *PrimeTime qPCR (Integrated ADN Technologies, Coralville, IA, USA)* (taula 5). La qPCR va ser realitzada en un volum final de 12 µl en plaques de 96 pous usant el Kit *Premix Ex Taq* (Takara Biotechnology Inc., Kusatsu, Shiga, Japan). El programa de cicles tèrmics usat va ser el següent: un cicle de 30 segons a 95 °C, 40 cicles de 5 segons a 95°C i un cicle final de 20 segons a 60°C. Tots els anàlisis de qPCR es van realitzar per duplicat. Els resultats de la qPCR van ser quantificats usant la versió 3.0 del programa d'anàlisi quantitatiu comparatiu *MxProTM*

III. Materials i mètodes

(Stratgen). Com a gens constitutius (*housekeeping genes*) es van usar els gens 18S, β -actina i GAPDH.

Taula 5. Sondes d'expressió gènica

Gen	Referència de l'Assaig	Casa comercial
18S	Hs.PT.39a.22214856.g	Integrated ADN Technologies (Coralville, IA, USA)
β -Actina	Mm.PT.39a.22214843.g	Integrated ADN Technologies (Coralville, IA, USA)
GAPDH	Mm.PT.39a.1	Integrated ADN Technologies (Coralville, IA, USA)
BDNF	Mm.PT.58.8157970	Integrated ADN Technologies (Coralville, IA, USA)
ERK5	Mm.PT.58.5356153.gs	Integrated ADN Technologies (Coralville, IA, USA)
MEF2c	Mm.PT.58.30837612	Integrated ADN Technologies (Coralville, IA, USA)

12. Obtenció de seccions coronals de teixit cerebral murí

Per tal d'aconseguir les mostres per a realitzar l'anàlisi d'immunofluorescència en el teixit cerebral murí els ratolins van haver de ser perfosos. Primerament, els ratolins van ser profundament anestesiats amb pentobarbital (60mg/kg) i perfosos de manera intracardíaca amb 4% de paraformaldehid en 0,1 mM de *buffer* fosfat (*Phosphate Buffer*, PB). Els cervells van ser ràpidament extrets i postfixats durant dues hores en la mateixa solució de perfusió. Seguidament van ser crioprotegits passant-los a través d'un gradient de sacarosa durant tres dies consecutius. El primer dia els cervells s'immergeixen en una solució del 30% de sacarosa, el segon dia s'immergeixen en una solució del 20% de sacarosa i finalment l'últim dia s'immergeixen en una solució del 10%. Un cop els cervells han passat per aquest gradient de sacarosa ja estan crioprotegits i poden ser congelats amb metilbutà a una temperatura d'entre -33 i -45°C. Per últim es va utilitzar el criòstat per a tallar els cervells congelats en seccions coronals amb un gruix de 30 μ m. Els talls es van recollir i es van guardar en flotació amb PBS.

13. Immunofluorescència en seccions coronals de teixit cerebral murí

Un cop vam aconseguir les seccions coronals de teixit cerebral murí es va procedir a realitzar el protocol d'immunofluorescència que detallarem a continuació. Les seccions coronals van ser rentades dos cops amb PBS i incubades amb NH_4Cl 50 mM durant 30 minuts per a bloquejar els aldehyds lliures que poden quedar després de la fixació i evitar així l'autofluorescència de la mostra. A continuació, els talls van ser permeabilitzats amb PBS en 0,5% Tritó X-100 i bloquejats durant una hora amb *buffer* de bloqueig. El *buffer* de bloqueig va ser preparat amb PBS en 0,2% BSA, 0,2% Lisina, 0,2% Glicina, 0,2% Azida sòdica, 0,5% Tritó X-100 i 5% de Sèrum de cavall (*normal horse serum*, NHS, Pierce Biotechnology, Rockfors, IL). Tot

seguit els talls van ser incubats durant tota la nit a 4°C amb l'anticòs primari corresponent (taula 6). L'anticòs primari va ser diluït en un *buffer* amb PBS en 0,3% Tritó X-100, 0,2% BSA i 0,2% Azida sòdica.

Taula 6. Anticossos primaris per a immunofluorescència

Antigen	Espècie hoste	Dilució	Casa comercial
MAP2 (2a+2b)	Mouse	1:500	Sigma-Aldrich (Sant Louise, MO, USA)
VGlut1	Rabbit	1:300	Synaptic Systems (Göttingen, Germany)
PSD95	Rabbit	1:500	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
cAMP	Mouse	1:100	Abcam (Cambridge, UK)
MEF2	Rabbit	1:500	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)

Després de la incubació amb l'anticòs primari, les seccions es van rentar dos cops amb PBS i van ser incubades durant dues hores a temperatura ambient amb l'anticòs secundari adequat conjugat amb fluorocroms (taula 7). Després de dos rentats més amb PBS, els talls van ser incubats durant 10 minuts a temperatura ambient amb Hoechst 33258 (1:4000, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Finalment, els talls es van muntar amb el medi de muntatge Mowiol (Merck, Darmstadt, Germany) en portaobjectes.

Taula 7. Anticossos secundaris per a immunofluorescència

Anticòs secundari	Dilució	Casa comercial
Cy TM 3 AffiniPure Donkey anti-Mouse IgG (H+L)	1:300	Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, USA)
Cy TM 3 AffiniPure Donkey anti-Rabbit IgG (H+L)	1:300	Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, USA)
Alexa Fluor 488 AffiniPure Donkey anti-Mouse IgG (H+L)	1:300	Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, USA)
Alexa Fluor 488 AffiniPure Donkey anti-Rabbit IgG (H+L)	1:300	Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, USA)

14. Immunocitoquímica IIN de httm

Per a la visualització de les IIN de httm en les seccions coronals de teixit hipocampal es va utilitzar el procediment experimental immunohistoquímic amb *Diaminobenzidine* (DAB). Primerament, es va realitzar un bloqueig de les peroxidases endògenes. Aquest bloqueig es va realitzar en les seccions coronals hipocampals durant 45 min en agitació a temperatura ambient en una dilució 1:200 de H₂O₂ amb PBS. A continuació es va realitzar un bloqueig d'una hora a temperatura ambient per a evitar les interaccions proteiques no específiques. El *buffer* de

III. Materials i mètodes

bloqueig es va preparar amb PBS, 4% NHS i 0,1% Tritó X-100. Després, es va procedir a realitzar la incubació amb l'anticòs primari durant tota la nit a 4°C en agitació. Aquesta incubació es va realitzar en una dilució 1:150 d'anticòs primari EM48 amb PBS, 0,1% Tritó X-100, 2% de NHS i 0,02% d'Azida sòdica.

El dia següent es van fer tres rentats amb PBS i es van incubar les seccions hipocampals amb l'anticòs secundari durant dues hores en agitació a temperatura ambient. L'anticòs secundari emprat en aquest procediment és un anticòs Biotinilat. Aquest anticòs es proveït amb un kit de detecció de complexos Avidina-Biotina (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). L'anticòs secundari es va usar en una dilució 1:200 amb PBS, 0,1% Tritó X-100, 2% NHS i 0,02% Azida sòdica. Després d'aquesta incubació es van fer tres rentats amb PBS i tot seguit es va fer una incubació durant 1 hora i 30 minuts amb dos reactius proveïts pel fabricant. Tant bon punt es va acabar aquesta última incubació es van fer tres rentats amb PBS i dos rentats amb PB. Per acabar, es va realitzar el rebel·lat amb DAB usant una solució amb 1x DAB, PB i H₂O₂ (1:200). Les seccions hipocampals van ser rebel·lades durant 3 min a temperatura ambient en agitació suau. Tot seguit es van realitzar quatre rentats amb PB i els talls van ser muntats en portaobjectes tractats prèviament amb Xilane i Acetona.

15. Immunofluorèscencia en cèl·lules

En primer lloc les cèl·lules van ser fixades amb 4% de paraformaldehid (Electron Microscopy Science EMS, Hatfield, PA, USA) diluït amb PBS durant 10 minuts. Les cèl·lules van ser incubades en 0,2 M Glicina durant 20 minuts per tal de bloquejar els aldehids lliures. A continuació les cèl·lules es van permeabilitzar amb 0,1% de saponina en PBS durant 10 minuts. Seguidament el bloqueig es va realitzar amb PBS en 1% de BSA durant una hora. Un cop les cèl·lules van estar bloquejades es van incubar a 4°C durant tota la nit amb l'anticòs primari diluït amb el *buffer* de bloqueig (taula 6). Després de tres rentats amb PBS, es va fer la incubació amb l'anticòs secundari durant una hora (taula 7).

Les cèl·lules van ser rentades tres cops més, per eliminar l'excés d'anticòs secundari. Les cèl·lules es van incubar durant 5 minuts amb Hoechst 33258 (1:10.000, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) i es van tornar a rentar tres cops amb PBS. Finalment, els cobreobjectes van ser muntats en portaobjectes amb el medi de muntatge Mowiol (Merck, Darmstadt, Germany).

16. Captació i anàlisi d'imatges

Les imatges dels cultius cel·lulars i de les seccions coronals dels teixits es van examinar i captar usant un microscopi d'epifluorescència o un microscopi confocal. El microscopi d'epifluorescència que va ser usat és l'Olympus BX60 (Olympus, Tokyo, Japan). Aquest microscopi està equipat amb una càmera Orca-ER CCD (*Hamamatsu Photonics*, Hamamatsu, Japan). El microscopi confocal que es va utilitzar va ser el microscopi Leica TS SP5 (*Leica Microsystems Heidelberg GmbH*, Mannheim, Germany). Aquest és un microscopi de rastreig de làser confocal espectral amb làsers d'Argó i HeNe i està unit a un microscopi invertit Leica DMI6000. Les imatges confocals van ser captades amb un objectiu d'oli ultraviolat blau lambda 63.0 x 1.40 amb una càmera estenopeica estàndard (amb un disc d'Airy). Per a cada secció coronal, es van captar imatges al microscopi confocal en diferents plans en Z amb els diferents canals de manera seqüencial. Les imatges van ser captades amb una obertura òptica de 0,5 µm i amb una separació de 4 µm entre cadascuna.

16.1. Anàlisi neurític

Per a realitzar el traçat neuronal i l'anàlisi morfològic de les neurites en els cultius primaris hipocampals i estriatals WT i R6/1 va ser usat el mètode de Sholl. Aquest, és un mètode usat per els neuroanatomistes per a definir l'arborització neural. Actualment molts programes es basen en aquest mètode per analitzar amb ordinador la morfologia neuronal.

Per a realitzar aquest anàlisi en l'estudi del receptor EP2 es va utilitzar el connector (*plugin*) NeuronJ de la versió 1.33 del programa ImageJ (NIH, USA). La descripció clara de com es realitzen aquests anàlisis està detallat en la bibliografia següent: (362,363).

En el cas de l'estudi de MEF2 la morfologia neuronal es va determinar també amb el mètode de Sholl, però en aquest cas usant la versió 2.8 del programa CellProfiler (364–366). Amb aquest programa es va fer una segmentació basada en la detecció de nuclis (*Identify_primary_objects*) i després es va identificar el citoplasma corresponent a cada nucli (*Identify_secondary_objects*). Seguidament es va fer el traçat neuronal i es va obtenir el diagrama neuronal (*Skeletonize*) que va ser mesurat amb la funció "*MeasureNeurons*". Les mesures obtingudes es van exportar a un full de càlcul i van ser analitzades.

III. Materials i mètodes

En els dos casos es van analitzar com a mínim 30 neurones piramidals seleccionades de manera aleatòria de cada embrió i cada condició. Van ser usats entre 6 i 8 embrions per a cada condició. Les imatges van ser captades amb el microscopi Olympus BX60 a 40 augments.

16.2. Anàlisi apoptòtic

Per la quantificació de l'apoptosi en cultius neuronals primaris, es va fer servir la versió 2.8 del programa CellProfiler. Igual que en l'apartat anterior es va fer una segmentació basada en la detecció de nuclis (*Identify_primary_objects*). Després, es va mesurar la mida i intensitat de fluorescència de cada nucli amb les funcions "MeasureObjectSizeShape", "MeasureObjectIntensity". Les mesures obtingudes es van exportar a un full de càlcul i van ser analitzades.

Es van analitzar com a mínim 30 nuclis seleccionats de manera aleatòria de cada embrió i cada condició. Van ser usats entre 6 i 8 embrions per a cada condició. Les imatges van ser captades amb el microscopi Olympus BX60 a 40 augments.

16.3. Detecció VGlut1 i PSD95

La detecció de les partícules VGlut1 i PSD95 en les estructures sinàptiques es va realitzar utilitzant almenys quatre seccions coronals de 30 µm de teixit hipocampal. Es van captar tres imatges representatives de cadascuna de les regions hipocampals amb el microscopi confocal Leica TS SP5. Per a cada condició van ser usats sis animals. Per a l'anàlisi de les imatges i el comptatge de les partícules es va usar la versió 1.33 del programa ImageJ (NIH, USA).

16.4. Detecció d'AMPC

La detecció de la tinció de l'AMPC hipocampal va ser observada amb el microscopi d'epifluorescència Olympus BX60. Amb aquest microscopi es van captar tres imatges representatives de la tinció d'AMPC de cadascuna de les regions hipocampals. Per a cada condició van ser usats cinc animals. Per a la quantificació de la immunoreactivitat de l'AMPC es va usar l'anàlisi de la densitat òptica integrada (Integrated Optic Density, IOD) amb la versió 1.33 del programa ImageJ (NIH, USA).

16.5. Estereologia

El nombre d'IIN de htm es va determinar usant un anàlisi estereològic. Les imatges van ser captades amb el microscopi Olympus BX51 a 40 augments. En les diferents àrees de

l'hipocamp es va realitzar un comptatge imparcial per a cada condició amb el programa *Computer-Assisted Stereology Toolbox (CAST)* (Olympus Danmark A/S). Es va usar el procediment de comptatge espacial de seccions separades per 240 µm. Per a cada condició van ser usats sis animals.

17. Estadística

Els resultats van ser analitzats amb el programa estadístic *Graphpad Prism 6*. En la majoria de casos els resultats són mostrats com a mitjana \pm l'error estàndard del valor mitjà (SEM). Els anàlisis estadístics van ser realitzats usant la prova *t* de Student o la prova ANOVA seguida del post hoc test de Newman's Keuls depenent del cas experimental. Va ser usat un interval de confiança del 95% i els valors de $p < 0,05$ es van considerar estadísticament significants. Al peu de cada figura s'indica la informació estadística pertinent.

IV. Resultats

Va manar-me que destriés les males herbes de les plantes beneficioses. Com que jo no en coneixia cap, estava obligat a consultar-lo abans d'arrencar-les. Aquesta no és una mala herba, deia d'unes, es poden bullir les fulles i fer infusions. Aquesta tampoc, deia d'altres, són espàrrecs silvestres i per tant comestibles, encara més, exquisits. Aquesta tampoc, com s'entén que pugui ser una mala herba si al maig treu unes flors bellíssimes? Per fi, només quedava una planta. No tenia cap utilitat, no amagava cap secret. Unes fulles fosques, punxegudes i tòxiques, un tronc dur i lleig. Ell va sospirar: d'acord, planta pèssima, però si l'arranquem, quin sentit tindrien les altres? Cap, vaig dir jo. I a quina conclusió arriba, doncs? Que les males herbes no existeixen.

Albert Sánchez Piñol. La pell freda

1. Estudi de l'estimulació del receptor EP2 com aproximació terapèutica per a reduir els dèficits hipocampals en la MH

1.1. L'administració i.p. de Misoprostol promou l'activació de la via dependent del receptor de PGE₂ EP2 en l'hipocamp

Inicialment, vam voler analitzar si el fàrmac Misoprostol, agonista del receptor EP2, activava aquest receptor en el SNC i definir la dosi de fàrmac adequada. Per aquesta raó, vam estudiar la via AMPc/PKA/CREB, ja que és la via de senyalització dependent de l'activació del receptor EP2 (252). Els ratolins WT van ser injectats i.p. amb vehicle i dos concentracions diferents de Misoprostol, 50 µg/kg i 500 µg/kg. Una hora postinjecció, els nivells de fosforilació de CREB (pCREB) van ser analitzats en l'hipocamp (figura 20A). Vam observar un augment significatiu en els nivells de pCREB en els animals WT amb les dues concentracions usades. Tot i això, l'augment de pCREB era superior en els animals tractats amb Misoprostol 50 µg/kg. Per a confirmar que l'administració i.p. activava la via cAMP/PKA/CREB a l'hipocamp, també vam analitzar els nivells proteics dels substrats de fosfo-PKA (pPKA), en els animals WT tractats amb Misoprostol 50 µg/kg. Els resultats van mostrar que una hora després del tractament els nivells dels substrats de pPKA estaven augmentats significativament en els ratolins tractats amb Misoprostol 50 µg/kg comparats amb els ratolins WT tractats amb vehicle (figura 20B).

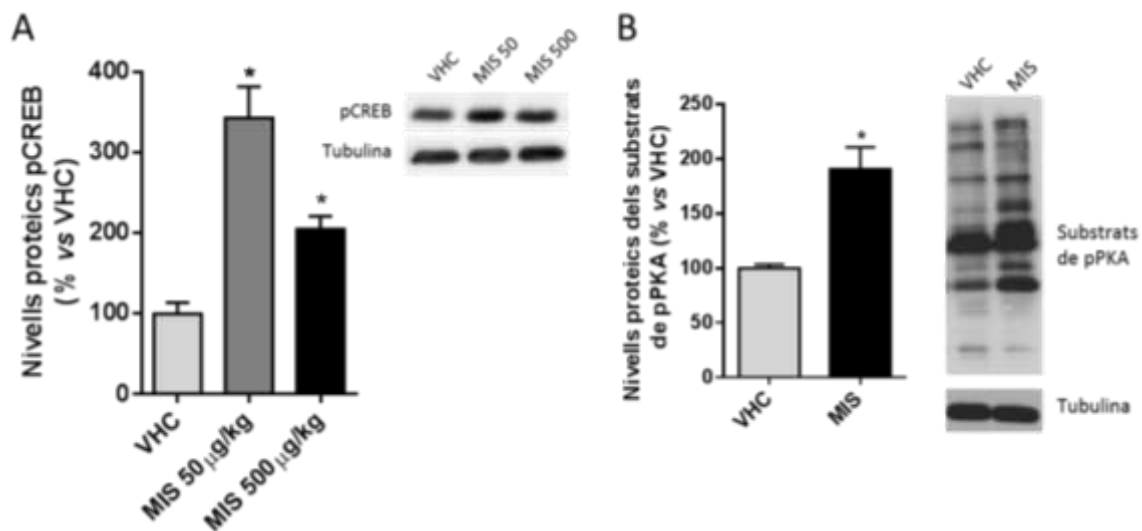


Figura 20. El tractament amb Misoprostol augmenta els nivells de fosforilació de CREB i dels substrats de PKA en l'hipocamp dels ratolins WT

Els ratolins WT de 10 setmanes van ser injectats i.p. amb vehicle (VHC) o Misoprostol (MIS, 50 µg/kg/dia o 500 µg/kg/dia). Una hora després de l'administració els extractes proteics hipocampals d'aquests ratolins van ser analitzats per *Western Blot* per a determinar (A) els nivells de pCREB i (B) els substrats de pPKA. Els gràfics representen la mitjana ± SEM de la relació dels nivells proteics de pCREB i dels substrats

IV. Resultats

de pPKA *versus* els nivells proteics d' α -tubulina. Aquesta mitjana està expressada com a percentatge del valor dels cultius hipocampals primaris WT VHC (n=3-4 per grup). Els resultats van ser analitzats amb el test estadístic *t* de Student. * $p < 0,05$ comparat amb els ratolins WT VHC. Els immunoblots mostren imatges representatives dels nivells de pCREB, dels substrats de pPKA i d' α -tubulina en les diferents condicions.

1.2. L'administració crònica de Misoprostol redueix el *clasp*ing i els dèficits de memòria a llarg termini en els ratolins R6/1

Diversos articles han descrit que diferents models murins presenten una disminució dels gens regulats per CREB que contribueix a la patologia de la MH (149,167,169,367). A més, els dèficits cognitius observats en els models murins de la MH s'han relacionat amb dèficits en la plasticitat sinàptica hipocampal (110,111,166,368). Per a analitzar si l'activació del receptor EP2 podia millorar la funció cognitiva observada en la MH, es van implantar de manera i.p. bombes osmòtiques en ratolins WT i R6/1 de 14 setmanes d'edat. Aquestes bombes alliberaven de manera constant Misoprostol (50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$) durant un tractament crònic de 28 dies. En primer lloc, es va avaluar el reflex de *clasp*ing, usat com a fenotip neurològic dels ratolins models de la MH, i el pes corporal des de les 12 setmanes fins a les 18 setmanes. Com es mostra a la figura 21A, l'administració de Misoprostol produeix un retard significatiu en la progressió del fenotip del *clasp*ing. No obstant, el tractament amb misoprostol no és capaç de frenar la pèrdua de pes que es produeix a partir de les 13 setmanes d'edat en els animals R6/1 (figura 21B).

A continuació vam estudiar la memòria a llarg termini avaluant els ratolins amb el T-SAT i el NORT. Els ratolins WT i R6/1 tractats crònicament amb vehicle o Misoprostol van ser avaluats amb aquests testos a les 17 setmanes. Els resultats del T-STAT van mostrar que els ratolins WT passaven menys temps explorant el braç vell que el braç nou. Contràriament, els ratolins R6/1 tractats amb vehicle no mostraven cap preferència pel braç nou (figura 21C). En canvi, els ratolins R6/1 tractats amb Misoprostol exploraven el braç nou sense diferències significatives a com ho feien els ratolins WT (figura 21C). De manera similar, en el NORT vam observar que els ratolins WT exploraven més l'objecte nou, i que els ratolins R6/1 tractats amb vehicle exploraven per igual l'objecte nou i l'objecte vell. També en aquest cas, els ratolins R6/1 tractats amb Misoprostol exploraven l'objecte nou sense diferències significatives a com ho feien els animals WT, i significativament més que els ratolins R6/1 tractats amb vehicle (figura 21D).

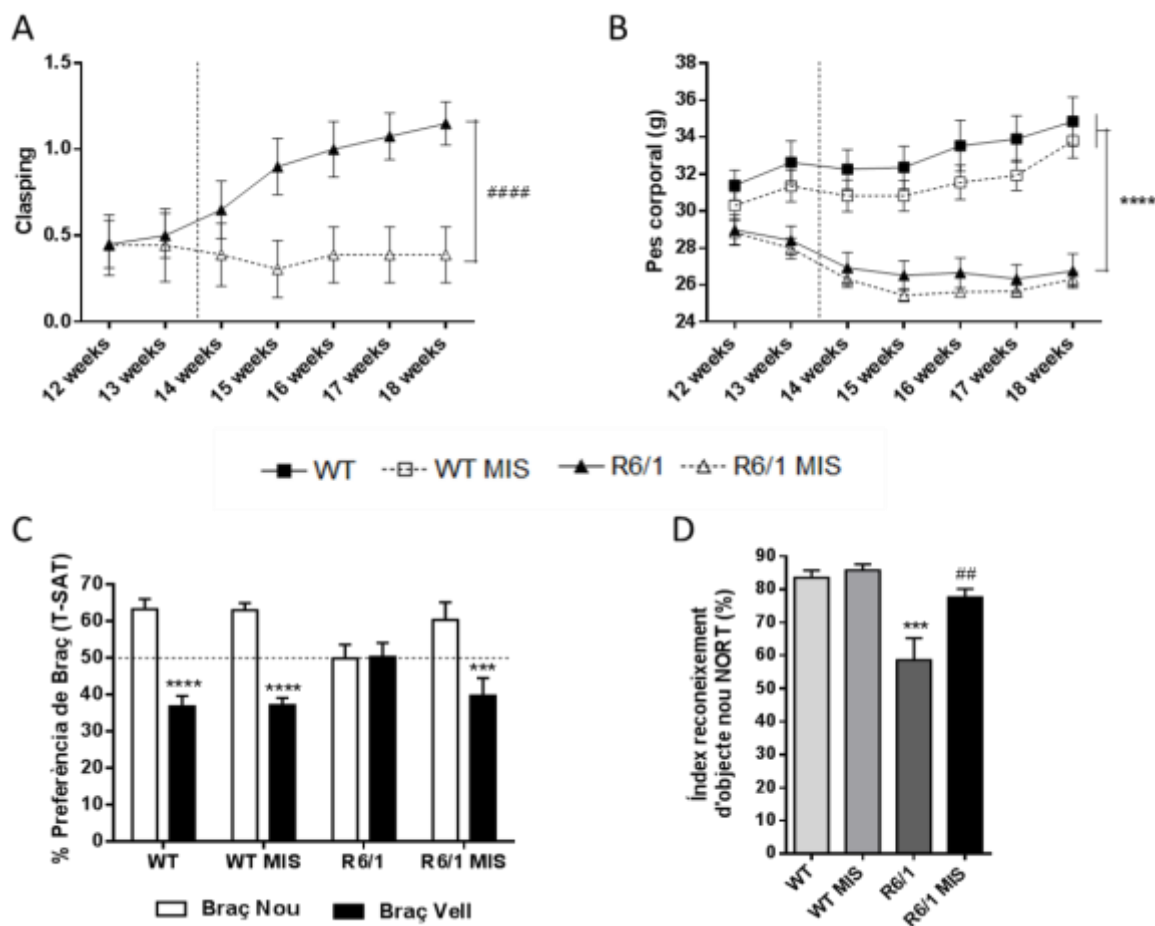


Figura 21. L'administració crònica amb l'agonista del receptor EP2, Misoprostol, redueix el claspings i els dèficits de memòria a llarg termini en els ratolins R6/1

Els ratolins WT i R6/1 van ser tractats amb vehicle (VHC) o Misoprostol (MIS, 50 µg/kg/dia) usant bombes osmòtiques implantades i.p. a les 14 setmanes d'edat. (A) El reflex de *claspings* i (B) el pes corporal dels ratolins WT i R6/1 van ser avaluats setmanalment de les 12 a les 18 setmanes. La línia vertical representa el moment de la cirurgia d'implantació de la bomba. Els valors representen la mitjana ± SEM (n=10-15 per grup). Els resultats van ser analitzats amb el test estadístic Two-way ANOVA seguit del post hoc de Newman-Keuls. ****p<0,0001 comparat amb els ratolins WT VHC; #####p<0,0001 comparat amb els ratolins R6/1 VHC. (C,D) Els ratolins WT VHC, WT MIS, R6/1 VHC i R6/1 MIS van ser avaluats amb (C) el T-SAT i (D) el NORT a les 17 setmanes. La línia discontinua indica la probabilitat d'exploració dels objectes. (C) El gràfic mostra el % de preferència d'exploració dels braços representat com la mitjana ± SEM (n=10-15/grup). Els resultats s'han analitzat amb el test estadístic Two-way ANOVA amb el post hoc de Newman-Keuls. ***p<0,001, ****p<0,0001 comparat amb el % de preferència del braç nou. (D) El gràfic mostra el % de preferència d'exploració de l'objecte nou expressat com a índex de reconeixement de l'objecte nou i representat com la mitjana ± SEM (n=10-15/grup). Els resultats s'han analitzat amb el test estadístic t de Student. ***p<0,001 versus WT VHC; ##p<0,01 versus R6/1 VHC.

Aquest efecte beneficiós del tractament amb Misoprostol sembla ser específic de la funció hipocampal ja que no vam observar canvis entre els ratolins tractats amb vehicle i els tractats amb Misoprostol quan vam avaluar les tasques motores dependents de la funció estriatal. Els resultats del test de l'*accelerating rotarod* van mostrar que els ratolins R6/1 presentaven un menor temps de latència fins que queien (genotip; $F_{1,44} = 4,967$, $p < 0,05$). Tot i això, no es van

IV. Resultats

observar diferències en el temps de latència entre es ratolins tractats amb vehicle o amb Misoprostol en cap dels genotips (tractament; $F_{1,44} = 0,4097$, $p = 0,5259$).

1.3. El tractament crònic amb Misoprostol recupera l'expressió dels nivells proteics hipocampals del BDNF, però no en l'escorça cerebral ni en l'estriat en els ratolins R6/1

En les cèl·lules gials, l'activació del receptor EP2 ha estat associada amb un augment en la producció i secreció de neurotrofines, entre elles el BDNF (268,269). Per aquest motiu, el nostre següent objectiu va ser estudiar si les millores conductuals observades en els ratolins R6/1 tractats crònicament amb Misoprostol correlacionaven en canvis en l'expressió hipocampal del BDNF. A la figura 22A es mostra que a les 18 setmanes els nivells proteics del BDNF (en concret la banda de 14 kDa que correspon al BDNF madur) en l'hipocamp dels ratolins R6/1 tractats amb vehicle estaven reduïts significativament comparat amb els ratolins WT tractats amb vehicle. És important mencionar que els nivells proteics hipocampals del BDNF estaven augmentats significativament en els ratolins R6/1 després del tractament crònic amb Misoprostol i eren similars als que mostraven els animals WT tractats amb vehicle (figura 22A). La capacitat del Misoprostol d'augmentar els nivells del BDNF també va ser observada en els ratolins WT (figura 22A).

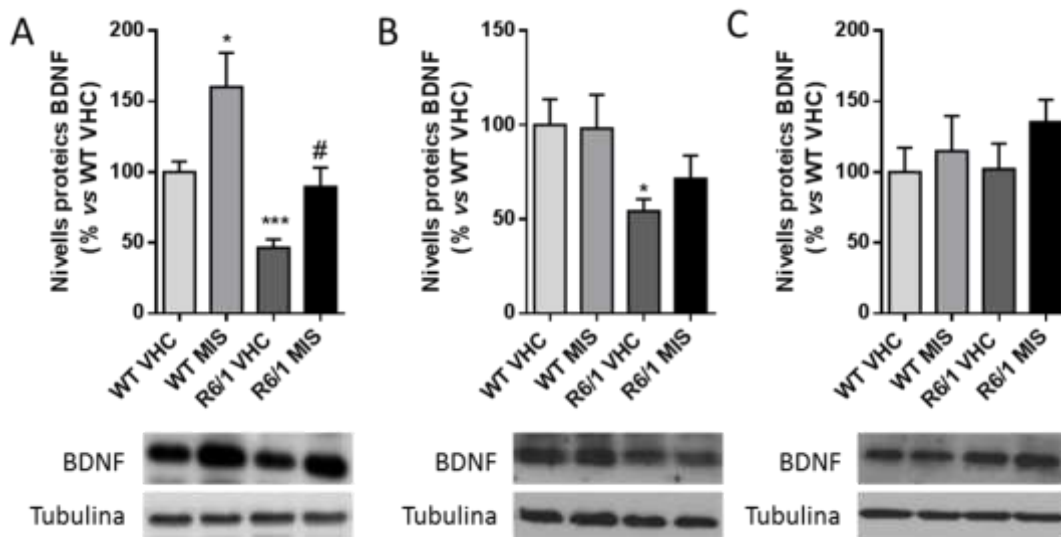


Figura 22. El tractament crònic amb Misoprostol augmenta els nivells proteics del BDNF en l'hipocamp, però no en l'estriat i en l'escorça cerebral dels ratolins R6/1

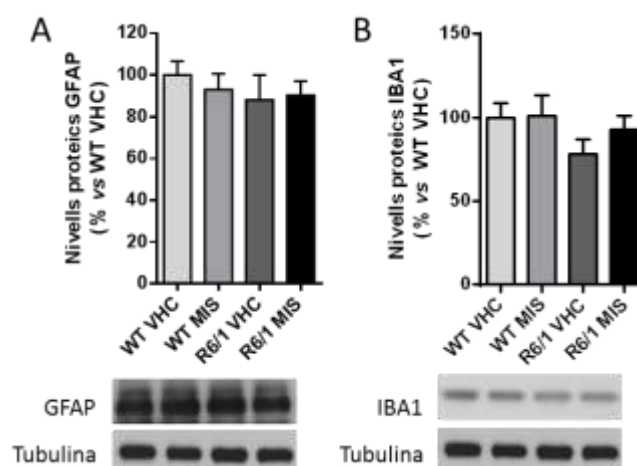
Els extractes proteics hipocampals dels ratolins WT i R6/1 de 18 setmanes tractats amb vehicle (VHC) i Misoprostol (MIS) van ser analitzats per *Western Blot* per a determinar els nivells proteics del BDNF madur (14 kDa) a (A) l'hipocamp, (B) l'escorça i (C) l'estriat. Els gràfics representen la mitjana \pm SEM de la relació dels nivells proteics del BDNF i els nivells proteics d' α -tubulina. Aquesta mitjana està expressada com a percentatge del valor dels animals WT VHC ($n = 6-7$ per grup). Els resultats van ser analitzats amb el test

estadístic *t* de Student. * $p < 0,05$ i *** $p < 0,001$ comparat amb els ratolins WT VHC; # $p < 0,05$ comparat amb els ratolins R6/1 VHC. Els immunoblots mostren imatges representatives dels nivells del BDNF i d' α -tubulina en les diferents condicions.

Els nivells proteics del BDNF madur també van ser analitzats a l'escorça cerebral i a l'estriat (figura 22B i 22C) dels ratolins WT i R6/1 tractats crònicament amb vehicle o Misoprostol. Els nivells proteics del BDNF cortical estaven reduïts significativament en els ratolins R6/1 comparat amb els ratolins WT. Els ratolins R6/1 tractats amb Misoprostol no mostren canvis significatius en els nivells de BDNF cortical (figura 22B). En l'estriat no vam observar cap diferència significativa en els nivells de BDNF en cap dels grups estudiats (figura 22C).

1.4. El tractament crònic amb Misoprostol no induïx efectes proinflamatoris en l'hipocamp dels ratolins R6/1

Diversos estudis han indicat que l'activació del receptor EP2 pot tenir un efecte proinflamatori i neurotòxic en models de neurodegeneració inflamatòria (279,369). Per tant, vam analitzar si l'administració de Misoprostol induïa un efecte inflamatori mesurant diferents marcadors d'inflamació. En primer lloc vam estudiar en tots els grups l'expressió de la proteïna àcida fibril·lar glial (*Glial fibrillary acidic protein, GFAP*), que és un marcador astrocítari i de la proteïna adaptadora d'unió al calci ionitzat 1 (*Ionized calcium-binding adapter 1, IBA1*), que és un marcador específic de cèl·lules microglials. No vam observar canvis significatius ni en els nivells de la proteïna GFAP (figura 23A) ni en els nivells de la proteïna IBA1 (figura 23B) en cap dels grups analitzats. A continuació, vam examinar els nivells de dues proteïnes proinflamatòries, la interleucina 6 (IL6) i el factor de necrosi tumoral- α (*Tumor necrosis Factor- α* , TNF- α). En aquest cas tampoc vam observar canvis significatius en cap de les dues proteïnes en cap dels grups estudiats (figura 23C i 23D).



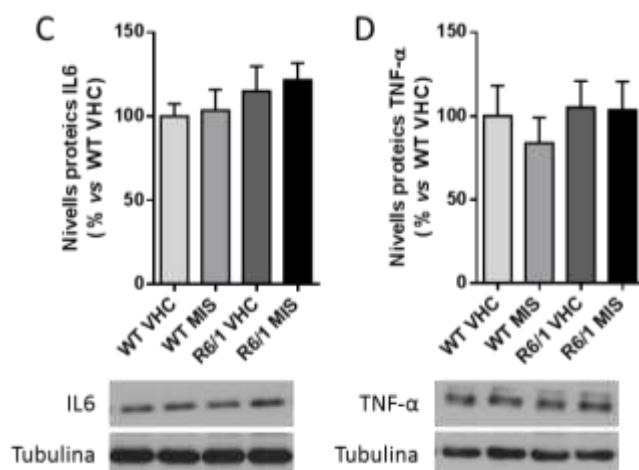


Figura 23. El tractament crònic amb Misoprostol no altera l'expressió de marcadors proinflamatoris

Els extractes proteics hipocampals dels ratolins WT i R6/1 de 18 setmanes tractats amb vehicle (VHC) i Misoprostol (MIS) van ser analitzats per *Western Blot* per a determinar els nivells proteics de (A) GFAP, (B) IBA1, (C) IL6 i (D) TNF- α . Els gràfics representen la mitjana \pm SEM de la relació dels nivells proteics de cada proteïna i els nivells proteics d' α -tubulina. Aquesta mitjana està expressada com a percentatge del valor dels cultius hipocampals primaris WT VHC (n=6-7 per grup). Els resultats van ser analitzats amb el test estadístic *t* de Student. Els immunoblots mostren imatges representatives dels nivells de cada proteïna i d' α -tubulina en les diferents condicions.

1.5. El tractament crònic amb Misoprostol augmenta significativament els nivells proteics hipocampals de PSD95 en els ratolins R6/1

Per a correlacionar les millores observades en la memòria espacial i de reconeixement que mostraven els ratolins R6/1 tractats amb Misoprostol amb canvis en la plasticitat sinàptica hipocampal, es van explorar els nivells del marcador postsinàptic PSD95. Aquest marcador és conegut per estar disminuït en l'hipocamp dels ratolins R6/1 (266,368). Per tal de determinar el nombre de partícules positives de PSD95, es van examinar imatges captades amb el microscopi confocal de seccions hipocampals coronals de ratolins WT i R6/1 tractats amb vehicle o amb Misoprostol (figura 24A-24D). Aquestes imatges mostren que només els ratolins R6/1 VHC tenen una disminució significativa del nombre de partícules positives de PSD95 en les tres regions hipocampals analitzades, CA1, CA3 i GD, comparat amb els ratolins WT VHC. En canvi, els ratolins R6/1 tractats amb Misoprostol presenten un augment significatiu del nombre de partícules positives de PSD95 en les tres regions analitzades comparat amb els R6/1 VHC (figura 24A-24D).

Adicionalment, també vam analitzar el nombre de partícules positives de VGluT1, usat com a marcador presinàptic (figura 24E-24H). Els gràfics mostren que el nombre de partícules positives de VGluT1 només està disminuït en regió hipocampal CA3 en els ratolins R6/1. L'administració de Misoprostol bloqueja aquesta reducció en els animals R6/1, augmentant el

nombre de partícules positives per VGlut1 fins a nivells en els quals no s'observa canvis significatius amb els ratolins WT VHC en aquesta regió (figura 24G).

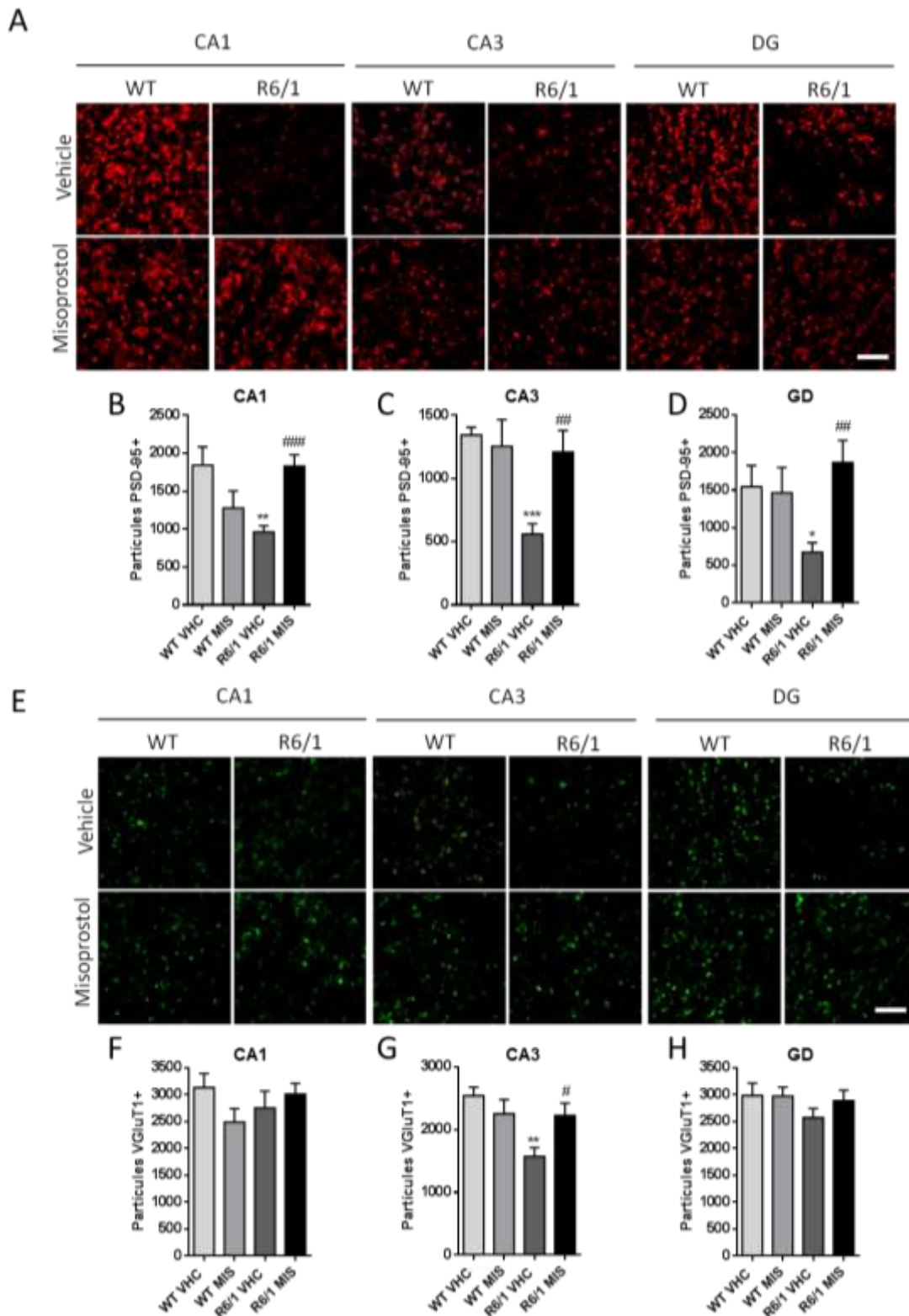


Figura 24. El tractament crònic amb Misoprostol incrementa el nombre de partícules positives PSD95 i VGlut1 en animals R6/1

La tinció immunofluorescent contra els marcadors sinàptics PSD95 i VGlut1 va ser realitzada en talls coronals hipocàmpals de ratolins WT i R6/1 de 18 setmanes d'edat tractats amb vehicle (VHC) o

IV. Resultats

Misoprostol (MIS). Les imatges van ser captades amb el microscopi confocal Leica TS SP5. La barra d'escala és 15 μm . (A i E) Imatges representatives del marcatge contra PSD95 i VGluT1. Les partícules positives per a (B-D) PSD95 i (F-H) VGluT1 van ser quantificades en (B i F) la CA1, (C i G) la CA3 i (D i H) el GD. La quantificació es va realitzar amb el programa ImageJ i representada en els gràfics com a nombre de partícules positives/camp. Els resultats estan expressats com la mitjana \pm SEM (n=6 per grup). Els resultats van ser analitzats amb el test estadístic *t* de Student. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ i *** $p < 0,001$ comparat amb els ratolins WT VHC; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ i ### $p < 0,001$ comparat amb els ratolins R6/1 VHC.

1.6. El tractament crònic amb Misoprostol incrementa els nivells d'AMPC en el GD

Per a investigar si l'administració crònica de Misoprostol induïx l'activació a llarg termini del receptor EP2 vam estudiar els nivells hipocampals d'AMPC. Els nivells d'aquest van ser analitzats amb immunofluorescència en la CA1, la CA3 i el GD després del tractament crònic amb Misoprostol en els ratolins WT i R6/1. Vam poder distingir que els nivells d'AMPC eren significativament més alts en el GD després de 28 dies de tractament tant en els ratolins R6/1 com en els ratolins WT (figura 25). En canvi, no vam observar canvis significatius ni en la regió CA1 ni en la regió CA3.

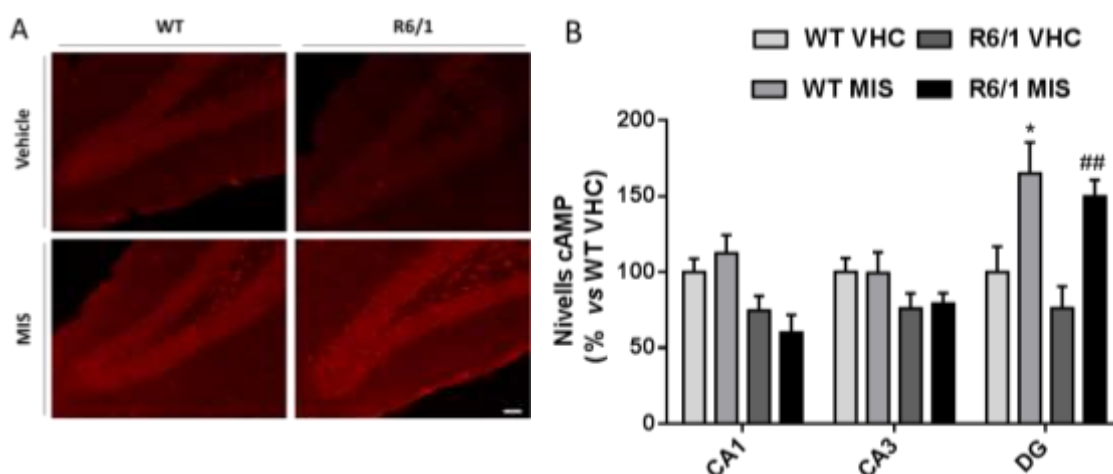
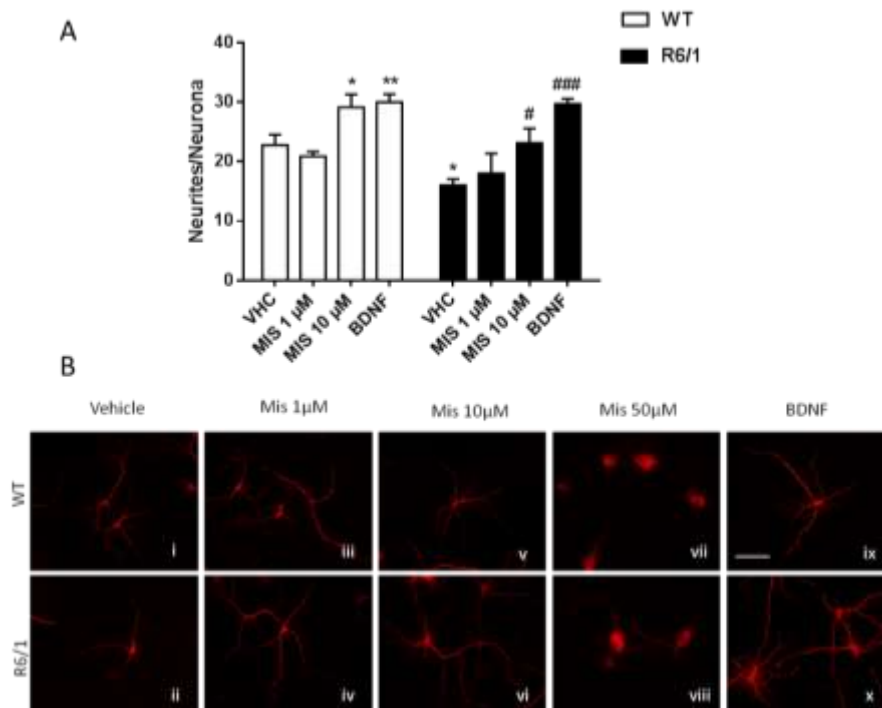


Figura 25. El tractament crònic amb Misoprostol augmenta els nivells d'AMPC al GD

La tinció immunofluorescent d'AMPC va ser realitzada en talls coronals hipocampals de ratolins WT i R6/1 de 18 setmanes d'edat tractats amb vehicle (VHC) o Misoprostol (MIS). (A) Imatges representatives de la immunoreactivitat de l'AMPC en el GD d'animals WT i R6/1 tractats amb VHC o amb MIS. Les imatges van ser captades amb el microscopi confocal Leica TS SP5. La barra d'escala és 50 μm . (B) El gràfic mostra la quantificació de la immunoreactivitat de l'AMPC en la CA1, la CA3 i el GD d'animals WT i R6/1 tractats amb VHC o amb MIS. Els valors es van obtenir amb l'anàlisi de la IOD. Els valors representen la mitjana \pm SEM de la immunoreactivitat de l'AMPC. Aquesta mitjana està expressada com a percentatge del valor dels ratolins WT VHC (n=5 per grup). Els resultats van ser analitzats amb el test estadístic *t* de Student. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ comparat amb els ratolins WT VHC; ## $p < 0,01$ comparat amb els ratolins R6/1 VHC.

1.7. L'activació del receptor EP2 augmenta el nombre de neurites en neurones hipocampals d'una manera dependent de BDNF

Per a continuar analitzant l'efecte neurotòxic i neuroprotector de l'activació del receptor de la PGE₂ EP2, es van tractar els cultius primaris hipocampals provinents d'embrions WT i R6/1 a DIV 3 amb diferents concentracions de Misoprostol (1,10 i 50 µM). Set dies després del tractament, es va quantificar el nombre de neurites per neurona mitjançant immunofluorescència de la proteïna MAP2 (figura 26A i 26B). Vam observar una disminució del nombre de neurites en les neurones hipocampals primàries R6/1 vehicle comparat amb les neurones WT vehicle (figura 26A i 26B, b.i i b.ii). Per altra banda, vam observar un augment en el nombre de neurites en els cultius WT i R6/1 tractats amb 10 µM de Misoprostol comparat amb els cultius vehicle (figura 26A i 26B, b.v i b.vi). Aquest augment és similar a l'observat en el tractament amb BDNF (figura 26A i 26B, b.ix i b.x), que és un conegut factor de creixement neurític en neurones hipocampals (370), i que va ser utilitzat com a control positiu. No vam observar cap efecte en el nombre de neurites amb el tractament amb 1 µM de Misoprostol en les neurones hipocampals (figura 26A i 26B, b.iii i b.iv). El tractament amb una concentració de 50 µM de Misoprostol produïa mort neuronal en els cultius primaris hipocampals (figura 26B, b.vii i b.viii).



IV. Resultats

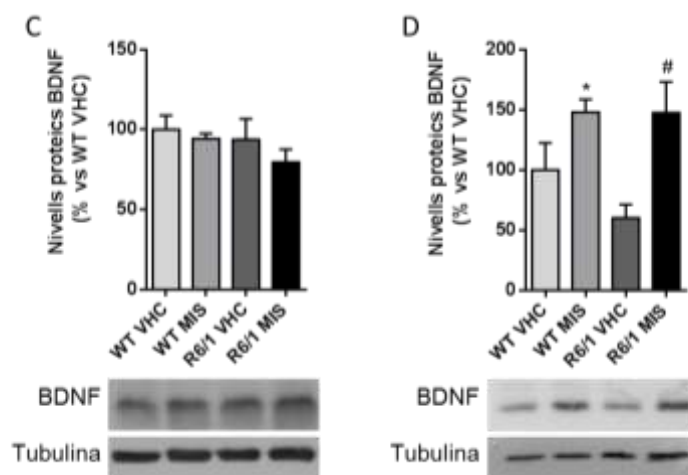


Figura 26. El tractament amb Misoprostol augmenta el nombre de neurites en cultius primaris hipocàmpals provinents d'animals WT i R6/1 a causa de l'augment en els nivells proteics del BDNF

(A) Per a les anàlisis dendrítiques, els cultius primaris hipocàmpals d'embrions WT i R6/1 van ser tractats a DIV 3 amb vehicle (VHC), Misoprostol, agonista del receptor EP2 (MIS, 1, 10 i 50 μ M) o BDNF (10 ng/ml). Set dies després del tractament els cultius van ser fixats i es va realitzar una immunofluorescència contra MAP2. El gràfic mostra la quantificació del nombre de neurites/neurona per a cada condició. Els resultats van ser analitzats amb el test estadístic t de Student. *p<0,05 i **p<0,01 comparat amb la condició WT VHC; #p<0,05 i ###p<0,001 comparat amb la condició R6/1 VHC. (B) Imatges representatives de les immunofluorescències contra MAP2 de neurones piramidals hipocàmpals tractades amb (i, ii) VHC, (iii, iv) MIS 1 μ M, (v, vi) 10 μ M, (vii, viii) 50 μ M i (ix, x) BDNF. Les imatges es van captar amb el microscopi d'epifluorescència l'Olympus BX60. La barra d'escala és 10 μ m. (C i D) Els cultius hipocàmpals primaris WT i R6/1 van ser tractats amb VHC o MIS 10 μ M a DIV 3. Els extractes proteics van ser analitzats per *Western Blot* per a determinar els nivells proteics del BDNF madur (14 kDa) (C) a DIV 10 o (D) a DIV 4. Els immunoblots mostren imatges representatives dels nivells del BDNF i d' α -tubulina en les diferents condicions. En el gràfic es representa la mitjana \pm SEM de la relació dels nivells proteics del BDNF *versus* els nivells proteics d' α -tubulina. Aquesta mitjana està expressada com a percentatge del valor dels cultius hipocàmpals primaris WT VHC. Els resultats van ser analitzats amb el test estadístic t de Student. *p<0,05 comparat amb la condició WT VHC; #p<0,05 comparat amb la condició R6/1 VHC.

Seguidament, vam estudiar si el tractament amb Misoprostol tenia la capacitat d'augmentar els nivells del BDNF madur en neurones hipocàmpals com havíem observat en el cas del tractament crònic en l'hipocamp dels ratolins R6/1. Amb aquest objectiu vam tractar els cultius amb Misoprostol (10 μ M) a DIV 3 i vam analitzar els nivells proteics del BDNF madur set dies (figura 26C) o 24 hores després del tractament (figura 26D). Els nivells proteics del BDNF set dies després del tractament amb Misoprostol no van mostrar cap canvi en cap de les condicions analitzades (figura 26C). En canvi, després de 24 hores del tractament amb Misoprostol els cultius hipocàmpals primaris mostraven un augment dels nivells del BDNF (figura 26D).

La següent pregunta que ens vam plantejar va ser si l'augment observat en el nombre de neurites dels cultius hipocàmpals després del tractament amb Misoprostol a 10 μ M era degut a l'augment dels nivells del BDNF madur trobats 24 hores després del tractament. Per a poder analitzar aquesta qüestió, vam cotractar els cultius primaris hipocàmpals WT amb vehicle o 10 μ M de Misoprostol amb un anticòs del BDNF, per a bloquejar l'efecte del BDNF alliberat i present

en el medi de cultiu (371). La presència de l'anticòs del BDNF en el medi mostrava una disminució del nombre de neurites en els diferents tractaments (figura 27A i 27B). Això indica que el tractament amb Misoprostol incrementa el nombre de neurites/neurona d'una manera dependent de BDNF (figura 27A i 27B).

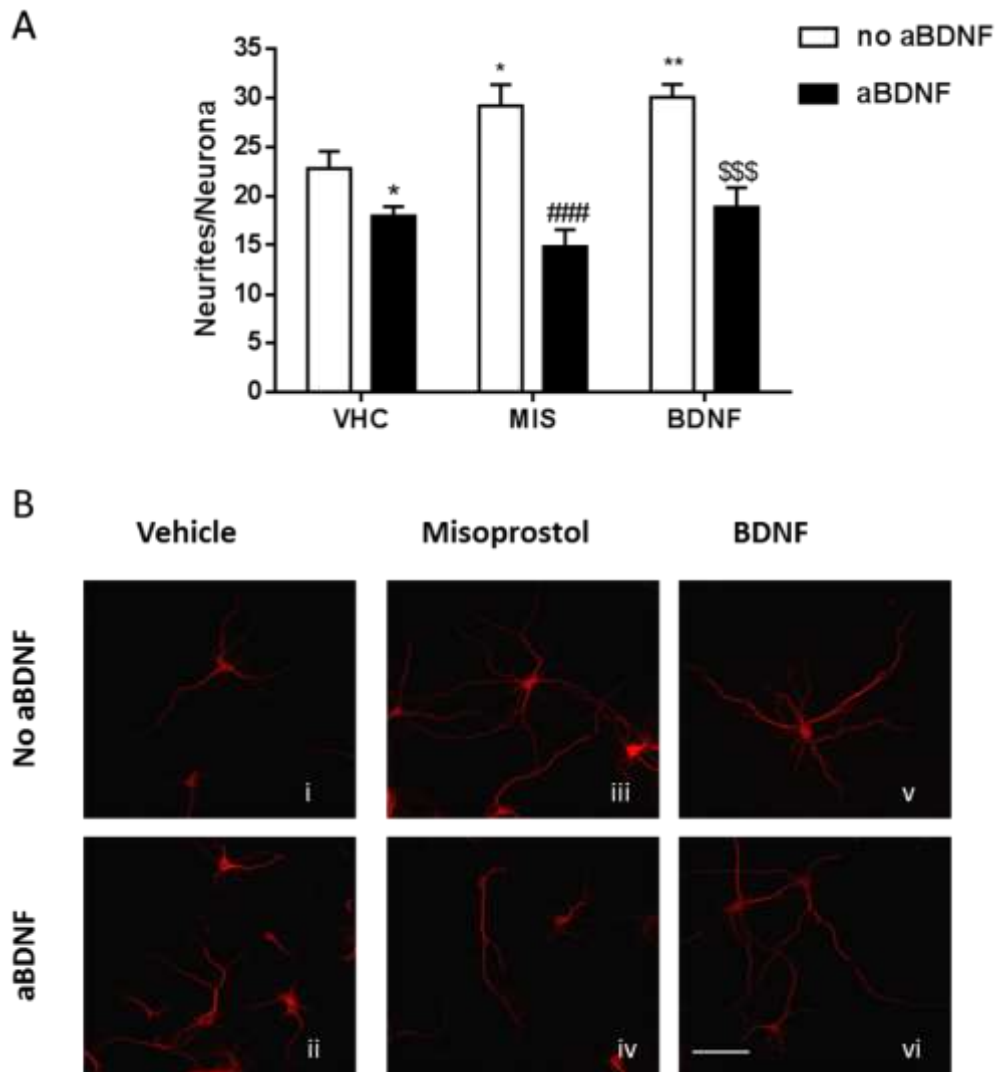


Figura 27. El creixement del nombre de neurites induït pel tractament amb Misoprostol 10 μ M és dependent de BDNF

Els cultius primaris hipocampals d'embrions WT a dia embrionari 18 van ser tractats a DIV 3 amb vehicle (VHC), Misoprostol 10 μ M o BDNF (10 ng/ml). Els cultius van ser cotractats en absència (no aBDNF) o presència de l'anticòs del BDNF (aBDNF, 10 ng/ml). Set dies després del cotractament els cultius van ser fixats i es va realitzar una immunofluorescència contra MAP2. (A) El gràfic mostra la quantificació del nombre de neurites/neurona per a cada condició. Els resultats van ser analitzats amb el test estadístic *t* de Student. * $p < 0,05$ i ** $p < 0,01$ comparat amb la condició VHC no aBDNF; ### $p < 0,001$ comparat amb la condició MIS no aBDNF; \$\$\$ $p < 0,001$ comparat amb la condició BDNF no aBDNF. (B) Imatges representatives de neurones piramidals hipocampals tractades amb (i, ii) VHC, (iii, iv) MIS 10 μ M i (v, vi) BDNF (i,iii,v) en absència o (ii,iv,vi) presència de l'aBDNF. Les imatges mostren les neurones hipocampals captades amb el microscopi d'epifluorescència l'Olympus BX60. La barra d'escala és 10 μ m.

1.8. La formació d'IIN es redueix significativament en el GD dels ratolins R6/1 després del tractament crònic amb Misoprostol

Finalment, vam analitzar si el tractament amb Misoprostol podia prevenir o reduir els agregats de httm en l'hipocamp. Les IIN es van observar en les diferents regions de l'hipocamp en els ratolins R6/1 a les 18 setmanes d'edat (figura 28A). És important observar que els ratolins R6/1 tractats amb Misoprostol mostren una reducció en el nombre d'IIN en el GD de l'hipocamp (figura 28A i 28B). Coincidint amb el patró observat amb la immunodetecció d'AMPC, la CA1 i la CA3 no presenten canvis significatius en el nombre d'IIN entre els ratolins R6/1 tractats amb VHC i els tractats amb Misoprostol. Malgrat la reducció en el nombre d'IIN en l'hipocamp, no vam presenciar canvis en l'estriat dels ratolins R6/1 després del tractament amb Misoprostol comparat amb els ratolins R6/1 VHC (figura 28C).

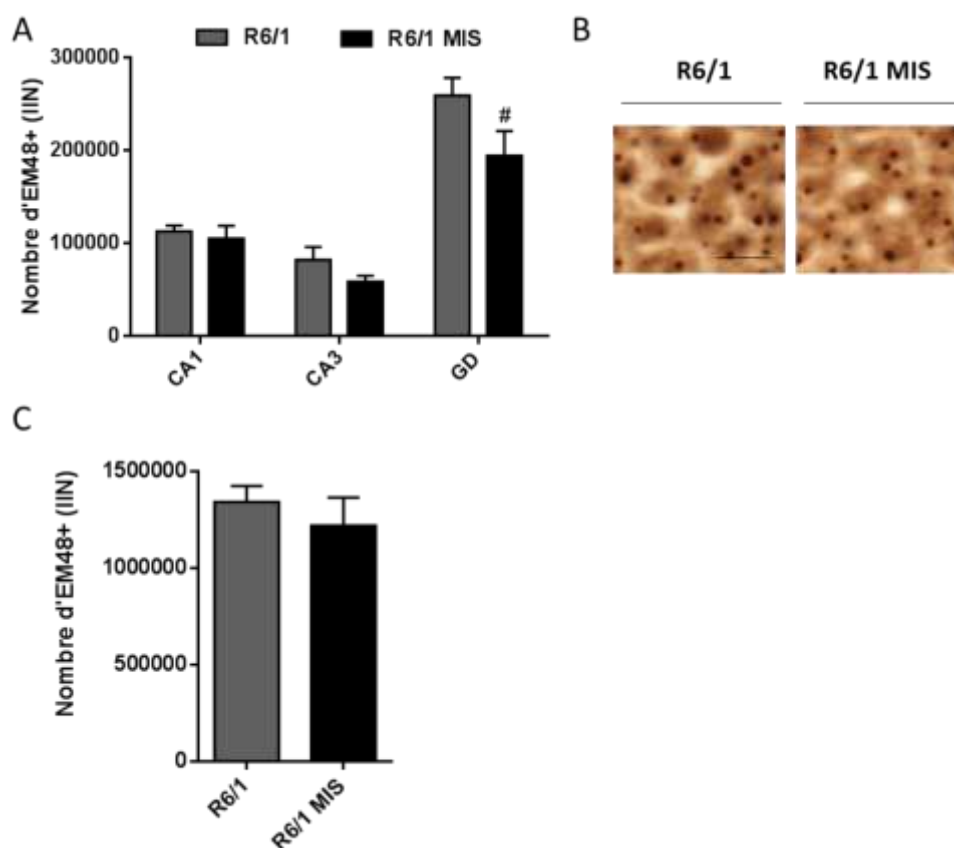


Figura 28. El tractament crònic amb Misoprostol redueix la formació d'IIN en el GD de l'hipocamp

La detecció de les IIN es va realitzar per immunohistoquímica amb DAB en talls coronals hipocampals i estriats de ratolins R6/1 de 18 setmanes d'edat. Els gràfics mostren la mitjana \pm SEM del nombre de partícules positives d'EM48, IIN ($n=6$ per grup). Les IIN van ser quantificades estereològicament en els ratolins R6/1 tractats amb vehicle (VHC) o Misoprostol (MIS) en (A) la CA1, la CA3, el GD i (C) l'estriat. Els resultats van ser analitzats amb el test estadístic t de Student. # $p<0,05$ comparat amb els ratolins R6/1 VHC. (B) Imatges representatives de l'immunoreactivitat d'EM48 que mostren les IIN en el GD de ratolins

R6/1 tractats amb VHC o amb MIS. Les imatges van ser captades amb el microscopi Olympus BX51. La barra d'escala és 10 μm .

2. Caracterització de la via de senyalització d'ERK5 i la seva implicació en els dèficits estriatals característics de la MH

2.1. Els nivells proteics i la fosforilació d'ERK5 és troba reduïda en l'estriat dels ratolins R6/1 i KI Hdh^{Q7/Q111}

Primerament, es van estudiar els nivells proteics estriatals en dos models murins de la MH, els ratolins R6/1 i els ratolins KI Hdh^{Q7/Q111}. En els ratolins R6/1, en etapes inicials de la MH, a les 8 setmanes, no es van observar canvis significatius en els nivells proteics d'ERK5. En canvi, durant la progressió de la malaltia es va presenciar una disminució dels nivells proteics d'ERK5 en els ratolins R6/1 comparat amb els ratolins WT (figura 29A). Tal i com es mostra a la figura 29A els nivells proteics d'ERK5 estan disminuïts a les 12, les 20 i les 30 setmanes en els ratolins R6/1.

En els ratolins KI Hdh^{Q7/Q111}, la disminució dels nivells d'ERK5 es pot distingir ja en etapes inicials de la MH. Aquesta disminució dels nivells d'ERK5 es manté al llarg de la progressió de la MH (figura 29C). Els ratolins KI Hdh^{Q7/Q111} mostren una reducció significativa comparat amb els ratolins WT Hdh^{Q7/Q7} dels nivells d'ERK5 als 3, als 6 i als 17 mesos (figura 29C).

Seguidament, vam analitzar si la disminució dels nivells d'ERK5 observada en els ratolins R6/1 i KI Hdh^{Q7/Q111} estava associada amb una alteració de l'activitat d'ERK5 en l'estriat. Amb aquest objectiu, vam analitzar els nivells estriatals de fosfo-ERK5 (pERK5). Es van examinar per *Western Blot* els nivells de fosforilació en els residus Thr218 i Tyr220 d'ERK5. Els nivells de pERK5 es van examinar en l'estriat dels ratolins R6/1 i KI Hdh^{Q7/Q111} amb les mateixes mostres amb què es van estudiar els nivells proteics d'ERK5.

Els nivells de fosforilació d'ERK5 mostren el mateix patró en els dos models murins. En etapes inicials (8 setmanes en els ratolins R6/1 i tres mesos en els ratolins KI Hdh^{Q7/Q111}) no s'aprecien canvis significatius de pERK5 entre els ratolins de la MH amb els seus respectius controls. Tot i això, els ratolins KI Hdh^{Q7/Q111} mostren una tendència a la baixa, encara que no és significativa, en els nivells de pERK5 comparat amb els ratolins WT Hdh^{Q7/Q7} (figures 29B i 29D). En etapes posteriors de la malaltia, els nivells de pERK5 es troben disminuïts en els ratolins R6/1 i KI Hdh^{Q7/Q111}, a les 12 i 20 setmanes i als 6 mesos, respectivament, comparat amb els ratolins WT Hdh^{Q7/Q7} (figures 29B i 29D). Curiosament en etapes finals de la malaltia, 30 setmanes en els

IV. Resultats

ratolins R6/1 i 17 mesos en els ratolins KI Hdh^{Q7/Q111}, els nivells de pERK5 estan augmentats comparats amb els nivells dels ratolins WT Hdh^{Q7/Q7} (figures 29B i 29D).

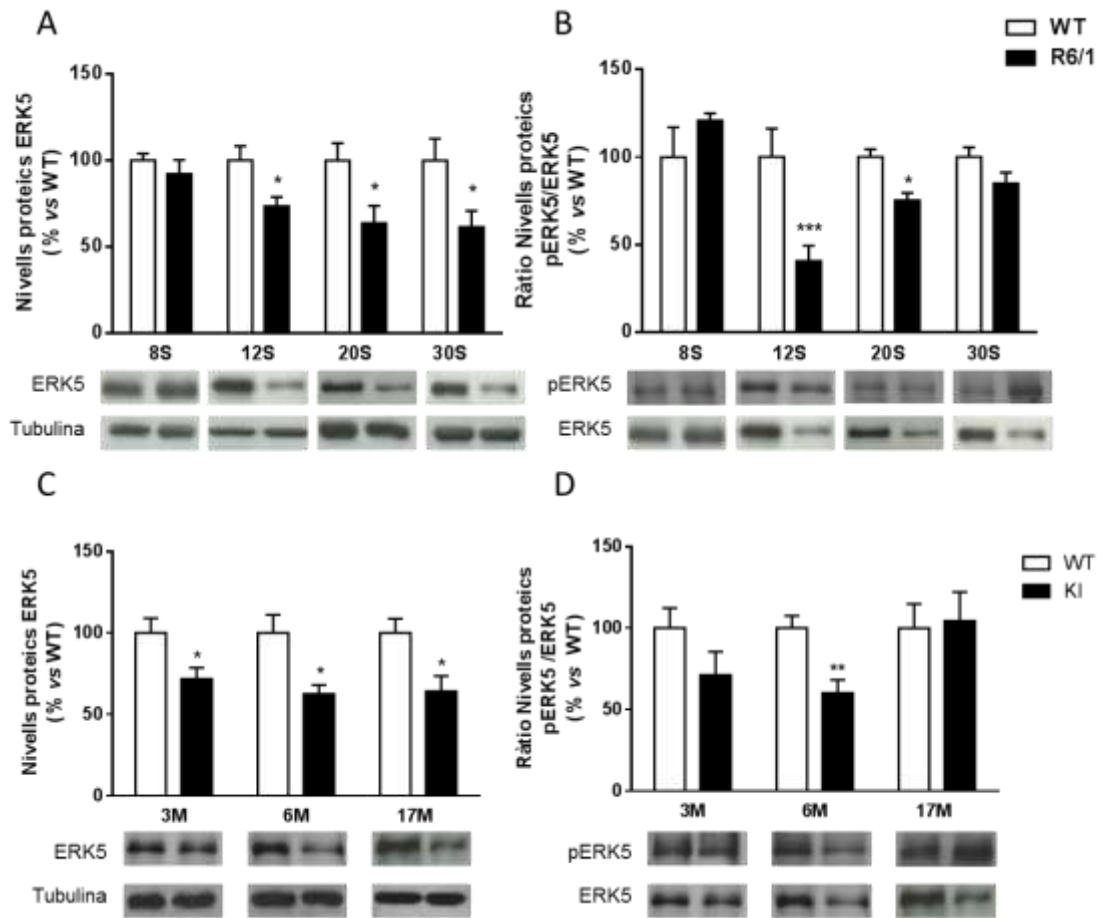


Figura 29. Els nivells proteics d'ERK5 i de pERK5 Thr218/Tyr220 es troben reduïts en l'estriat dels ratolins R6/1 i KI Hdh^{Q7/Q111}

(A i C) Els nivells proteics d'ERK5 van ser analitzats per *Western blot* d'extractes proteics estriats (A) de ratolins WT, R6/1 i (C) de ratolins WT Hdh^{Q7/Q7} (WT), KI Hdh^{Q7/Q111} (KI). Les anàlisis es van realitzar en diferents fases de la progressió de la malaltia (S, setmanes. M, mesos). En els gràfics es representa la mitjana \pm SEM de la relació dels nivells proteics d'ERK5 *versus* els nivells proteics d' α -tubulina. Aquesta mitjana està expressada com a percentatge del valor dels ratolins WT (n= 5-8 animals per genotip). Els resultats van ser analitzats amb el test estadístic Two-way ANOVA amb el post hoc anàlisi de Newman-Keuls. *p<0.05 comparat amb els ratolins WT. Els immunoblots mostren imatges representatives dels nivells proteics d'ERK5 i α -tubulina en les diferents condicions. (B i D) Els nivells de pERK5 Thr218/Tyr220 van ser analitzats per *Western blot* en les mateixes mostres en els ratolins (B) R6/1 i (D) KI. En els gràfics es representa la mitjana \pm SEM de la relació dels nivells de pERK5 *versus* els nivells proteics d'ERK5. Aquesta mitjana està expressada com a percentatge del valor dels ratolins WT (n= 5-8 animals per genotip). Els resultats van ser analitzats amb el test estadístic Two-way ANOVA amb el post hoc anàlisi de Newman-Keuls *p<0.05 i ***p<0,01 comparat amb els ratolins WT. Els immunoblots mostren imatges representatives dels nivells proteics de pERK5 i d'ERK5 en les diferents condicions.

Conjuntament, aquests resultats indiquen que els nivells proteics d'ERK5 en l'estriat estan disminuïts al llarg de la progressió de la malaltia. L'activitat d'ERK5 també està reduïda en les etapes simptomatològiques inicials de la malaltia. En canvi, en etapes finals de la

simptomatologia de la malaltia l'activitat d'ERK5 es recupera fins arribar als nivells dels animals WT.

Per tal d'analitzar si els canvis observats en l'estriat eren específics d'aquesta àrea cerebral o si es podien donar en altres regions de l'encèfal, vam estudiar els nivells proteics d'ERK5 i la seva activació en els ratolins R6/1 en dues regions també alterades en MH, l'hipocamp i l'escorça. No vam observar cap canvi significatiu ni en els nivells proteics ni en la fosforilació d'ERK5 en l'hipocamp dels ratolins R6/1 respecte els ratolins WT (figura 30A i 30B). A l'escorça vam observar una disminució significativa en els nivells proteics d'ERK5 en els ratolins R6/1 comparat amb els ratolins WT, però aquesta disminució no és produïda fins etapes avançades de la malaltia (figura 30C). En canvi, els nivells de fosforilació d'ERK5 en l'escorça es mantenen estables i no s'observen diferències significatives entre els ratolins WT i R6/1 en cap de les edats analitzades (figura 30D). Això suggereix que la desregulació observada en els nivells proteics i l'activitat d'ERK5 des d'etapes simptomàtiques inicials fins al final de la malaltia és molt específica de la regió estriatal en els ratolins R6/1.

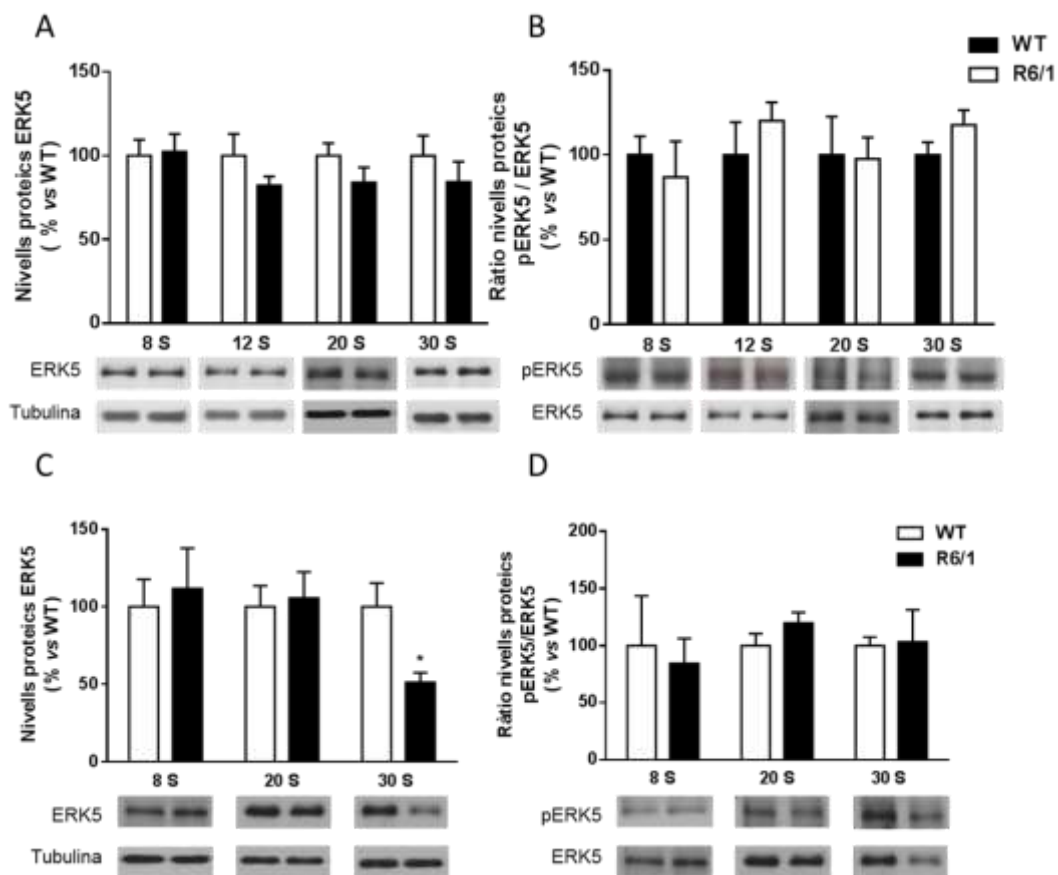


Figura 30. Nivells proteics d'ERK5 i de pERK5 Thr218/Tyr220 en l'hipocamp i l'escorça dels ratolins R6/1 al llarg de la progressió de la malaltia

(A i C) Els nivells proteics d'ERK5 van ser analitzats per *Western blot* d'extractes proteics de ratolins R6/1 (A) hipocampals i (C) corticals. Les anàlisis es van realitzar en diferents fases de la progressió de la malaltia

IV. Resultats

(S, setmanes). En els gràfics es representa la mitjana \pm SEM de la relació dels nivells proteics d'ERK5 *versus* els nivells proteics d' α -tubulina. Aquesta mitjana està expressada com a percentatge del valor dels ratolins WT ($n= 5-8$ animals per genotip). Els resultats van ser analitzats amb el test estadístic Two-way ANOVA amb el post hoc anàlisi de Newman-Keuls $p<0.05$ comparat amb els ratolins WT. Els immunoblots mostren imatges representatives dels nivells proteics d'ERK5 i α -tubulina en les diferents condicions. (B i D) Els nivells de pERK5 Thr218/Tyr220 van ser analitzats per Western blot en les mateixes mostres en els ratolins R6/1 (B) en l'hipocamp i (D) en l'escorça. En els gràfics es representa la mitjana \pm SEM de la relació dels nivells de pERK5 *versus* els nivells proteics d'ERK5. Aquesta mitjana està expressada com a percentatge del valor dels ratolins WT ($n= 5-8$ animals per genotip). Els resultats van ser analitzats amb el test estadístic Two-way ANOVA amb el post hoc anàlisi de Newman-Keuls. Els immunoblots mostren imatges representatives dels nivells proteics de pERK5 i d'ERK5 en les diferents condicions.

2.2. Els nivells proteics d'ERK5 també es troben reduïts en el putamen dels pacients de la MH

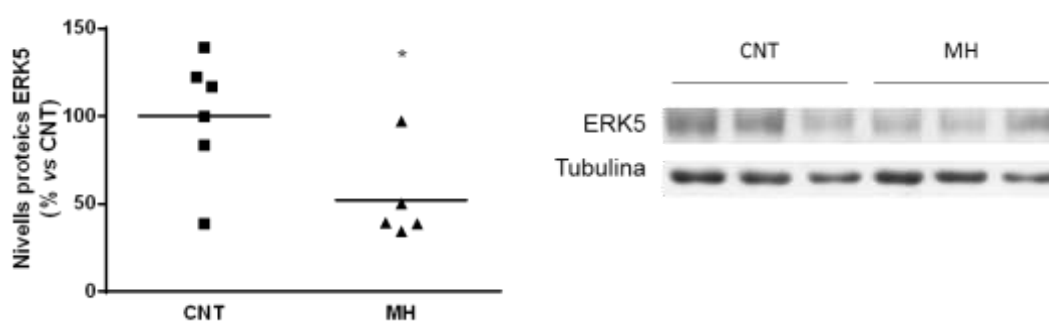


Figura 31. Els nivells proteics d'ERK5 estan disminuïts en el putamen de pacients de la MH

Els nivells proteics d'ERK5 van ser analitzats per *Western blot* d'extractes proteics de mostres *post mortem* del putamen d'individus control (CNT) i d'individus afectats per la MH (MH). En el gràfic es representa la mitjana \pm SEM de la relació dels nivells proteics d'ERK5 *versus* els nivells proteics d' α -tubulina. Aquesta mitjana està expressada com a percentatge del valor dels CNT ($n= 5-6$ per grup). Els resultats van ser analitzats amb la prova *t* de Student. * $p<0.05$ comparat amb els individus CNT. L'immunoblot mostra imatges representatives dels nivells proteics d'ERK5 i α -tubulina.

Finalment, els nivells d'ERK5 també van ser analitzats en mostres *post mortem* de putamen dels pacients de la MH. D'acord amb el que havíem observat en els models murins, els nivells de la proteïna ERK5 estan disminuïts en el putamen de pacients de la MH comparat amb els nivells en el putamen d'individus control, no afectats per cap malaltia neurològica (figura 31).

2.3. Els nivells d'expressió de l'ARNm d'ERK5 es troben alterats en l'estriat dels ratolins R6/1

Per a estudiar si la disminució dels nivells d'ERK5 era deguda a una alteració transcripcional, es van analitzar els nivells estriatals d'ARNm d'ERK5 en el estriat de ratolins R6/1. Aquests nivells van ser analitzats en les dues etapes on s'havia observat una disminució dels nivells proteics d'ERK5. En primer lloc, es van analitzar els nivells d'ARNm estriatals d'ERK5 en una etapa inicial de la simptomatologia de la malaltia, a les 12 setmanes en ratolins WT i

R6/1. En aquesta edat els ratolins R6/1 mostren una disminució significativa dels nivells d'ARNm d'ERK5 comparats amb els nivells dels ratolins WT (figura 32). En segon lloc, els nivells d'ARNm d'ERK5 també es van analitzar a les 30 setmanes, en una etapa final de la malaltia en els ratolins WT i R6/1. En la figura 32 s'aprecia que la reducció en els nivells d'ARNm d'ERK5 es manté també a les 30 setmanes en els ratolins R6/1 comparat amb els nivells dels ratolins WT. Per tant, la disminució en els nivells proteics estriatals d'ERK5 probablement és causada per una desregulació transcripcional, ja que els nivells d'ARNm d'ERK5 es troben disminuïts en els ratolins R6/1.

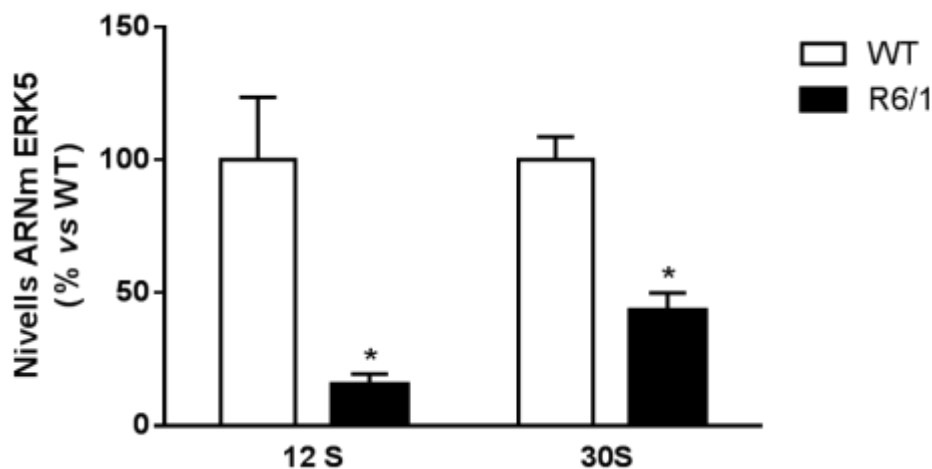


Figura 32. Els nivells d'ARNm d'ERK5 estan disminuïts en l'estriat dels ratolins R6/1 a les 12 i a les 30 setmanes

Els nivells d'ARNm estriatals van ser analitzats per qPCR en ratolins WT i R6/1 de 12 i 30 setmanes (S). L'histograma mostra els nivells d'ARNm d'ERK5 normalitzats amb els gens 18S i β -actina. En el gràfic es representa la mitjana \pm SEM dels nivells d'ARNm d'ERK5 relativitzats amb els valors dels ratolins WT (n=4-7 per genotip). Els resultats van ser analitzats amb el test estadístic Two-way ANOVA amb el post hoc anàlisi de Newman-Keuls. *p<0.05 comparat amb els ratolins R6/1.

2.4. Els ratolins R6/1 mostren alteracions en els nivells i en l'activitat de MEK5

L'única MAPKK que activa directament ERK5 és MEK5. MEK5 activa ERK5 fosforilant-la en els residus Thr218/Tyr220 del domini TEY d'ERK5 (372–374). Per consegüent, vam estudiar si l'alteració en l'activitat d'ERK5 era conseqüència de l'alteració en els nivells o l'activitat de MEK5. En els ratolins R6/1 no es mostren alteracions dels nivells de MEK5 en etapes inicials de la malaltia, a les 8 i 12 setmanes comparats amb els nivells dels ratolins R6/1 (figura 33A). Tot i això, a les 20 setmanes sí que es mostra una disminució significativa dels nivells de MEK5 que es manté també a les 30 setmanes en els ratolins R6/1 comparats amb els nivells dels ratolins WT.

IV. Resultats

L'activitat de MEK5 es va analitzar examinant els nivells de MEK5 fosforilada (pMEK5) en els residus Ser311/Thr315. No es van distingir diferències significatives en l'activitat de MEK5 fins a etapes finals de la malaltia entre els ratolins WT i R6/1. Els ratolins R6/1 de 8, 12 i 20 setmanes no mostren canvis en els nivells de pMEK5 respecte els ratolins WT, tot i que és important ressaltar que a les 20 setmanes s'observa un augment no significatiu en els nivells de pMEK5 en els ratolins R6/1 (figura 33B). Els ratolins R6/1 de 30 setmanes mostren un augment significatiu de l'activitat de MEK5 comparat amb els ratolins WT. Aquests resultats correlacionen amb els nivells de pERK5, ja que en els ratolins R6/1 a partir de les 20 setmanes s'observa un augment de la fosforilació d'ERK5 en els residus Thr218/Tyr220.

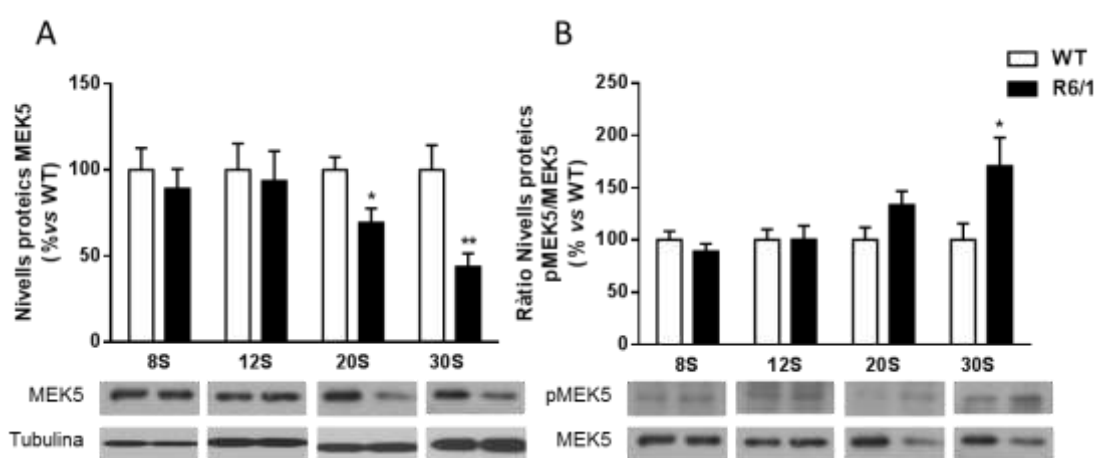


Figura 33. Els nivells proteics de MEK5 i de pMEK5 Ser311/Thr315 es troben alterats en l'estriat dels ratolins R6/1

A) Els nivells proteics de MEK5 van ser analitzats per *Western blot* d'extractes proteics estriats de ratolins WT i R6/1. Les anàlisis es van realitzar en diferents setmanes (S) de la progressió de la malaltia. En els gràfics es representa la mitjana \pm SEM de la relació dels nivells proteics de MEK5 *versus* els nivells proteics d' α -tubulina. Aquesta mitjana està expressada com a percentatge del valor dels ratolins WT (n= 5-8 animals per genotip). Els resultats van ser analitzats amb el test estadístic Two-way ANOVA amb el post hoc anàlisi de Newman-Keuls * $p < 0.05$ i ** $p < 0.01$ comparat amb els ratolins WT. Els immunoblots mostren imatges representatives dels nivells proteics de MEK5 i d' α -tubulina en diferents edats. (B) Els nivells de pMEK5 Ser311/Thr315 van ser analitzats per *Western blot* en les mateixes mostres en els ratolins R6/1. En els gràfics es representa la mitjana \pm SEM de la relació dels nivells de pMEK5 *versus* els nivells proteics de MEK5. Aquesta mitjana està expressada com a percentatge del valor dels ratolins WT (n= 5-8 animals per genotip). Els resultats van ser analitzats amb el test estadístic Two-way ANOVA amb el post hoc anàlisi de Newman-Keuls. * $p < 0.05$ comparat amb els ratolins WT. Els immunoblots mostren imatges representatives dels nivells proteics de pMEK5 i de MEK5 en diferents edats.

2.5. Els nivells de pMEF2c es troben reduïts en l'estriat dels ratolins R6/1

A continuació vam voler comprovar si la reducció en els nivells proteics i en la seva fosforilació d'ERK5 estava associada a una reducció de la via de senyalització controlada per ERK5. Un dels substrats més característics d'ERK5 és la família de factors de transcripció MEF2. ERK5 fosforila i activa MEF2c en el residu Ser387 (372,373). A més, s'ha descrit àmpliament que

l'activació de MEF2 per ERK5 té un paper molt important en la supervivència i la protecció neuronal (291,304,305,375). Així doncs, vam estudiar els nivells proteics i de fosforilació de MEF2c en l'estriat dels ratolins R6/1. No vam distingir canvis significatius en els nivells proteics en cap de les edats estudiades entre els ratolins WT i R6/1 (figura 34A).

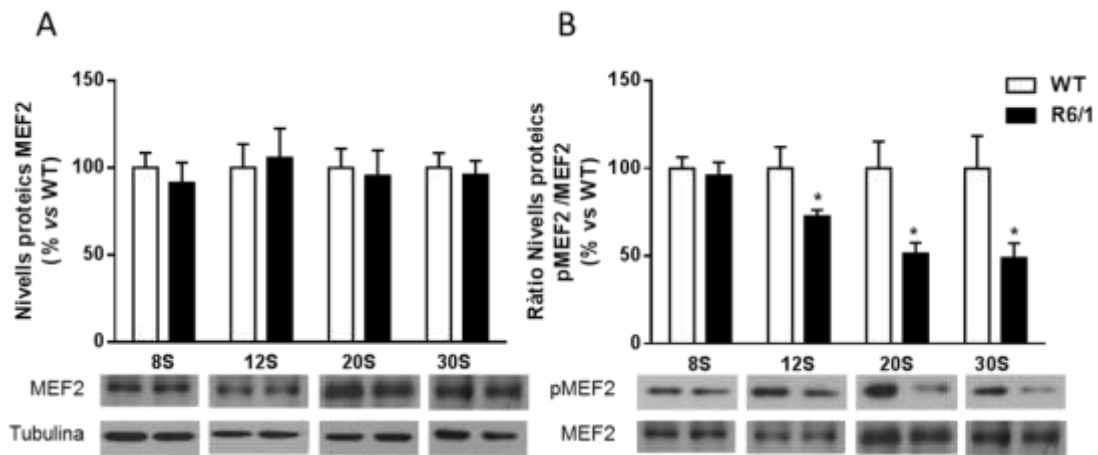


Figura 34. Els nivells proteics de pMEF2c Ser387 es troben disminuïts en l'estriat dels ratolins R6/1

(A) Els nivells proteics de MEF2c van ser analitzats per *Western blot* d'extractes proteics estriats de ratolins WT i R6/1. Les anàlisis es van realitzar en diferents setmanes (S) de la progressió de la malaltia. En els gràfic es representa la mitjana \pm SEM de la relació dels nivells proteics de MEF2c *versus* els nivells proteics d' α -tubulina. Aquesta mitjana està expressada com a percentatge del valor dels ratolins WT (n= 5-8 animals per genotip). Els resultats van ser analitzats amb el test estadístic Two-way ANOVA amb el post hoc anàlisi de Newman-Keuls. Els immunoblots mostren imatges representatives dels nivells proteics de MEF2 i d' α -tubulina en diferents edats. (B) Els nivells de pMEF2c Ser387 van ser analitzats per Western blot en les mateixes mostres en els ratolins R6/1. En els gràfics es representa la mitjana \pm SEM de la relació dels nivells de pMEF2c *versus* els nivells proteics de MEF2c. Aquesta mitjana està expressada com a percentatge del valor dels ratolins WT (n= 5-8 animals per genotip). Els resultats van ser analitzats amb el test estadístic Two-way ANOVA amb el post hoc anàlisi de Newman-Keuls *p<0.05 comparat amb els ratolins WT. Els immunoblots mostren imatges representatives dels nivells proteics de pMEF2c i de MEF2c de diferents edats.

Contràriament, quan vam examinar la fosforilació de MEF2c (pMEF2c) en el residu Ser387, sí que es van observar diferències significatives entre els ratolins WT i R6/1 (figura 34B). Els ratolins R6/1 mostraven una reducció en els nivells de pMEF2c a les 12 setmanes respecte als ratolins WT. Aquesta disminució era mantinguda al llarg de la progressió de la malaltia ja que també s'apreciava en els ratolins R6/1 a les 20 i a les 30 setmanes respecte els ratolins WT (figura 34B). Això indica que la disminució dels nivells i fosforilació d'ERK5 observades a les 12 i 20 setmanes correlaciona amb una reducció en la fosforilació de MEF2c dependent d'ERK5 en l'estriat dels ratolins R6/1, indicant una pèrdua d'activitat d'ERK5. En els ratolins R6/1 de 30 setmanes, en els quals havíem observat una recuperació de la fosforilació estriatal d'ERK5, presenten una disminució significativa dels nivells de pMEF2c. Per aquest motiu, nosaltres suggerim que la recuperació dels nivells de pERK5 no sembla ser suficient per restaurar l'activitat de la via d'ERK5 i recuperar els nivells de pMEF2c.

2.6. La fosforilació d'ERK5 també es troba reduïda en les cèl·lules STHdh^{Q111/Q111}

A continuació, vam voler saber si els canvis observats en els models murins de la MH també es mostraven en les cèl·lules STHdh^{Q111/Q111}. Així doncs, vam explorar els nivells d'ERK5 i de pERK5 en les cèl·lules estriatals STHdh^{Q7/Q7} (WT), que expressen la htt amb 7 glutamines, i en les cèl·lules STHdh^{Q111/Q111} (KI), que expressen la httm amb 111 glutamines.

A diferència del que hem observat en els models murins de la MH, les cèl·lules KI no mostren canvis en els nivells d'ERK5 comparat en les cèl·lules WT (figura 35A). No obstant això, d'acord amb els resultats obtinguts en els models murins de la MH, les cèl·lules KI sí que mostren una disminució en els nivells de pERK5 comparats amb els nivells de les cèl·lules WT (figura 35B). Aquests resultats indiquen que la disminució de l'activitat d'ERK5 és un factor estriatal comú en models *in vivo* i *in vitro* de la MH. A més, aquest resultat indica que l'alteració en l'activitat d'ERK5 té lloc en models de la MH que expressen diferents formes de la httm.

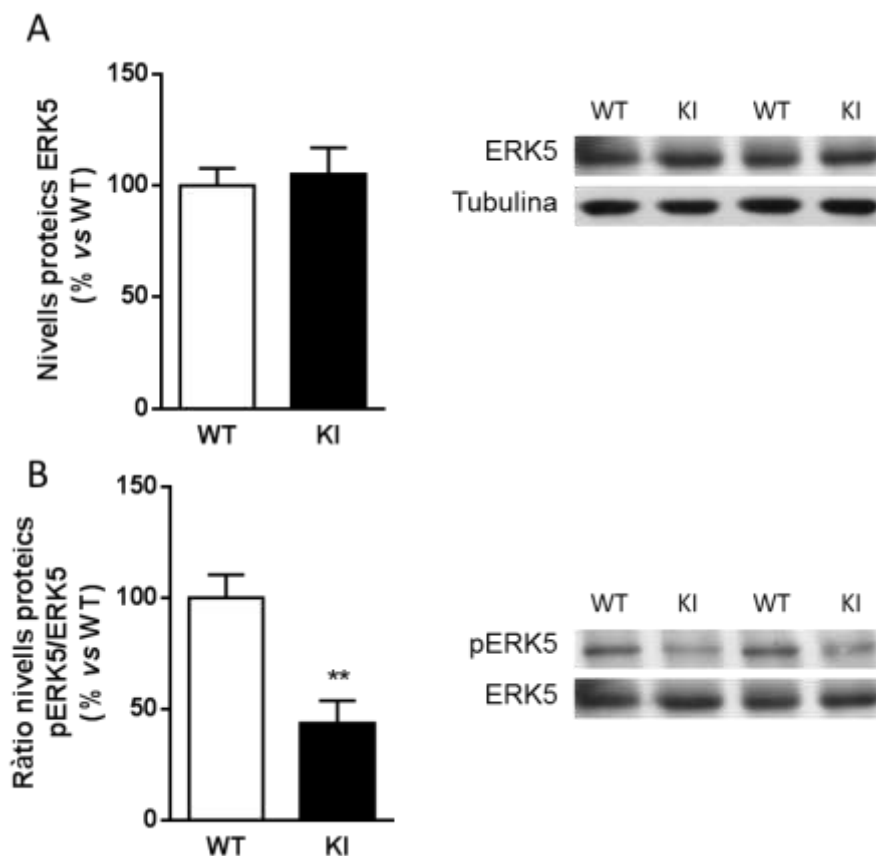


Figura 35. La fosforilació de la proteïna ERK5 està disminuïda en les cèl·lules estriatals STHdh^{Q111/Q111}
Els lisats de les cèl·lules estriatals STHdh^{Q7/7} (WT) i STHdh^{Q111/Q111} (KI) van ser analitzats per *Western Blot* per a estudiar els nivells (A) d'ERK5 (B) i de pERK5. (A) En el gràfic es representa la mitjana ± SEM de la

relació dels nivells proteics d'ERK5 *versus* els nivells proteics d' α -tubulina. Aquesta mitjana està expressada com a percentatge del valor de les cèl·lules WT (n=4-5 per condició). Els resultats van ser analitzats amb la prova *t* de Student. L'immunoblot mostra imatges representatives dels nivells proteics d'ERK5 i d' α -tubulina en les diferents condicions. (B) En el gràfic es representa la mitjana \pm SEM de la relació dels nivells proteics de pERK5 *versus* els nivells proteics d' ERK5. Aquesta mitjana està expressada com a percentatge del valor de les cèl·lules WT (n=4-5 per condició). Els resultats van ser analitzats amb la prova *t* de Student. ** $p < 0,01$. El immunoblot mostra imatges representatives dels nivells proteics de pERK5 i d'ERK5 en les diferents condicions.

2.7. L'augment dels nivells d'ERK5 indueix l'expressió del BDNF en la línia cel·lular estriatal STHdh^{Q111/Q111}

Ha estat descrit que l'activació de la via d'ERK5 augmenta l'expressió del BDNF (291). Per aquest motiu, vam voler examinar si la sobreexpressió d'ERK5 en la línia cel·lular estriatal STHdh estimulava l'expressió del BDNF. Per augmentar l'activitat de la proteïna ERK5 vam transfectar les cèl·lules amb plasmidis que contenen la proteïna. En primer lloc, vam estudiar les condicions temporals de transfecció del constructe de la proteïna ERK5 fusionada amb la proteïna GFP (ERK5-GFP). Vam transfectar les cèl·lules WT amb els constructes ERK5-GFP i GFP. Seguidament, passades 24, 48 i 72 hores des de la transfecció les cèl·lules van ser lisades. Tal i com es mostra a la figura 36A, hi ha un augment significatiu de l'expressió d'ERK5 a les 24 i a les 48 hores després de la transfecció del constructe ERK5-GFP comparat amb les cèl·lules transfectades amb el constructe que només expressa GFP. Tot i això, les cèl·lules lisades 48 hores després de la transfecció amb el constructe ERK5-GFP sembla que presenten més expressió d'ERK5 que les lisades a les 24 hores amb el mateix constructe. Per tant, en els posteriors experiments es va deixar un temps de 48 hores per a l'expressió del constructe ERK5-GFP.

Tot seguit, vam analitzar els nivells d'expressió d'ARNm del BDNF en les cèl·lules WT transfectades amb el constructe ERK5-GFP. Vam poder apreciar que les cèl·lules WT transfectades amb el constructe ERK5-GFP mostraven un augment significatiu en els nivells d'ARNm del BDNF respecte a les transfectades amb el constructe GFP (figura 36B). Finalment, vam estudiar els nivells proteics del BDNF en les cèl·lules WT i KI després de transfectar-les durant 48 hores amb els constructes ERK5-GFP i GFP. Tant les cèl·lules WT com les cèl·lules KI mostren un augment significatiu en els nivells proteics del BDNF comparats amb les cèl·lules transfectades amb el constructe que només expressa GFP (figura 36C). Aquests resultats indiquen que l'augment d'ERK5 estimula l'expressió del BDNF en la línia estriatal STHdh^{Q111/Q111}.

IV. Resultats

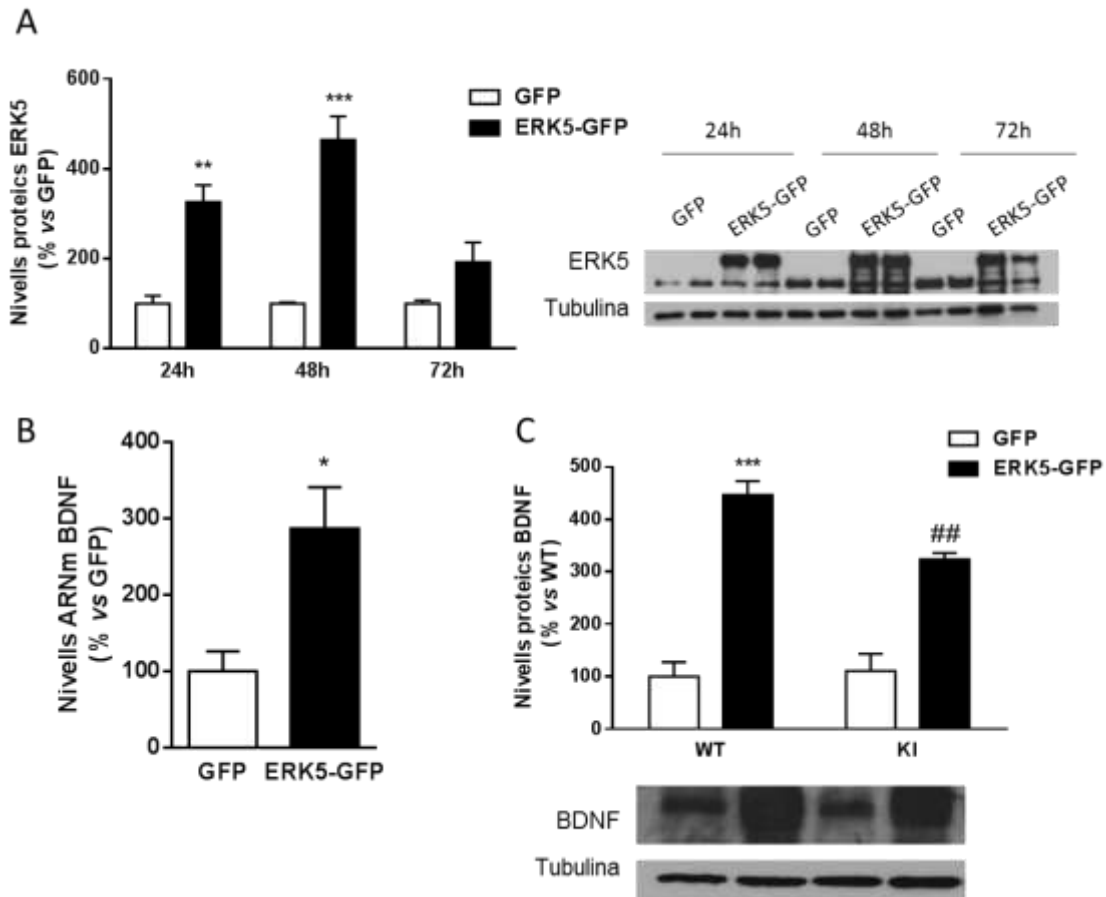


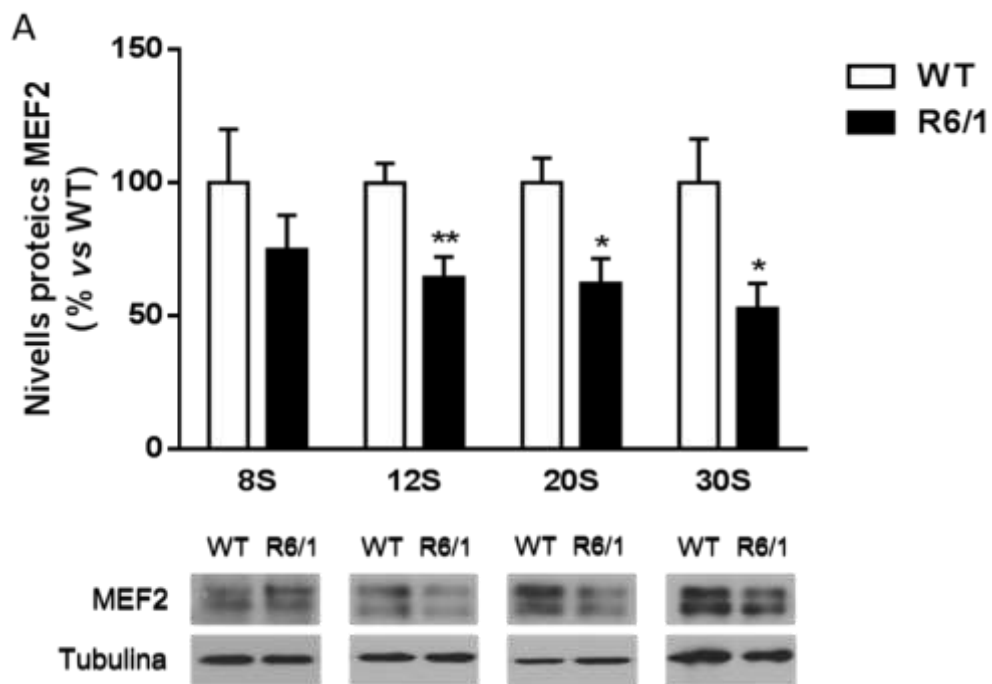
Figura 36. La sobreexpressió d'ERK5 estimula l'expressió del BDNF en la línia cel·lular estriatal STHdh^{Q111/Q111}

(A) Les cèl·lules estriatals STHdh^{Q7/7} (WT) van ser transfectades amb els constructes GFP i ERK5-GFP i van ser lisades a les 24, 48 i 72 hores (h). Els extractes proteics van ser analitzats per *Western Blot* per a estudiar els nivells d'ERK5. En el gràfic es representa la mitjana \pm SEM de la relació dels nivells proteics d'ERK5 *versus* els nivells proteics d' α -tubulina. Aquesta mitjana està expressada com a percentatge del valor de les cèl·lules WT (n=4 per condició). Els resultats van ser analitzats amb el test estadístic Two-way ANOVA amb el post hoc anàlisi de Newman-Keuls. **p<0,01 i ***p<0,001 comparat amb les cèl·lules WT. L'immunoblot mostra imatges representatives dels nivells proteics d'ERK5 i d' α -tubulina en les diferents condicions. (B) Els nivells d'ARNm de les cèl·lules WT van ser analitzats per qPCR després de 48 h de la transfecció dels constructes GFP i ERK5-GFP. L'histograma mostra els nivells d'ARNm del BDNF normalitzats amb els gens 18S i β -actina. En el gràfic es representa la mitjana \pm SEM dels nivells d'ARNm del BDNF relativitzats amb els valors de les cèl·lules WT (n=3-4). Els resultats van ser analitzats amb la prova *t* de Student. *p<0,05 comparat amb les cèl·lules WT-GFP. (C) Les cèl·lules WT i KI van ser transfectades amb els constructes GFP i ERK5-GFP, 48 hores després van ser lisades. Els extractes proteics van ser analitzats per *Western Blot* per a estudiar els nivells d'ERK5. En el gràfic es representa la mitjana \pm SEM de la relació dels nivells proteics d'ERK5 *versus* els nivells proteics d' α -tubulina. Aquesta mitjana està expressada com a percentatge del valor de les cèl·lules WT (n=3-4 per condició). Els resultats van ser analitzats amb el test estadístic Two-way ANOVA amb el post hoc anàlisi de Newman-Keuls. ***p<0,01 comparat amb les cèl·lules WT-GFP i ##p<0,01 comparat amb les cèl·lules KI-GFP. L'immunoblot mostra imatges representatives dels nivells proteics del BDNF i d' α -tubulina en les diferents condicions.

3. Estudi del rol de la família de factors de transcripció MEF2 en els dèficits transcripcionals i cognitius dependents de la funció hipocampal en la MH

3.1. Els nivells proteics hipocampals del factor de transcripció MEF2 es troben alterats en diferents models murins de la MH

Els nivells proteics de MEF2 van ser analitzats en l'hipocamp en dos models murins de la MH, els ratolins transgènics R6/1 i els ratolins heterozigots KI Hdh^{Q7/Q111}. Els nivells de MEF2 en els ratolins R6/1 van ser analitzats en quatre estadis diferents de la simptomatologia cognitiva: fase presimptomàtica (8 setmanes), fase d'inici de la simptomatologia (12 setmanes), fase simptomàtica (20 setmanes) i fase avançada (30 setmanes). Com es mostra a la figura 37A no s'observen diferències significatives en els nivells de MEF2 entre els animals WT i R6/1 a les 8 setmanes d'edat. En canvi, a partir de les 12 setmanes d'edat es pot observar una disminució significativa dels nivells proteics de MEF2 en l'hipocamp dels ratolins R6/1 respecte als animals WT, reducció que es manté a les 20 i 30 setmanes d'edat (figura 37A).



IV. Resultats

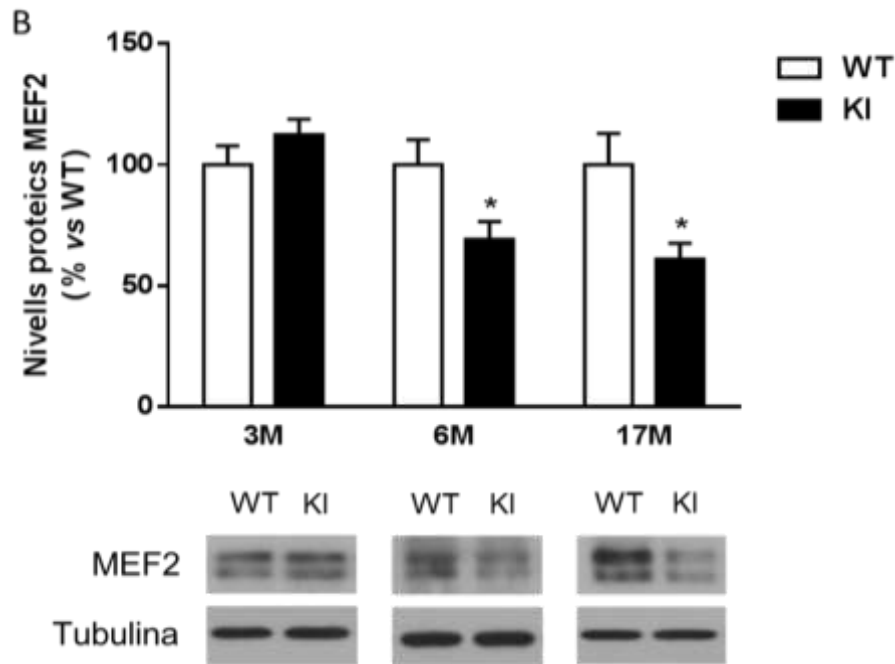


Figura 37. Els nivells proteics de MEF2 estan reduïts en l'hipocamp al llarg de la progressió de la malaltia en els ratolins R6/1 i KI

Els nivells proteics de MEF2 van ser analitzats per *Western blot* d'extractes proteics hipocampals (A) de ratolins WT, R6/1 i (B) de ratolins $Hdh^{Q7/Q7}$ (WT), $Hdh^{Q7/Q111}$ (KI). Les anàlisis es van realitzar en diferents fases de la progressió de la malaltia (S, setmanes. M, mesos). Els immunoblots mostren imatges representatives dels nivells proteics de MEF2 i d' α -tubulina en diferents edats. En els gràfics es representa la mitjana \pm SEM de la relació dels nivells proteics de MEF2 *versus* els nivells proteics d' α -tubulina. Aquesta mitjana està expressada com a percentatge del valor dels ratolins WT ($n= 5-8$ animals per genotip). Els resultats van ser analitzats amb el test estadístic Two-way ANOVA amb el post hoc anàlisi de Newman-Keuls. * $p<0.05$ i ** $p<0.01$ comparat amb els ratolins WT.

Com en els ratolins R6/1, també es va realitzar l'anàlisi de mostres hipocampals dels ratolins KI $Hdh^{Q7/Q111}$ per a estudiar els nivells proteics de MEF2. Els nivells de MEF2 en els ratolins KI $Hdh^{Q7/Q111}$ es va analitzar en les mateixes fases de la simptomatologia cognitiva, però en edats diferents degut a que la progressió de la malaltia dels ratolins KI $Hdh^{Q7/Q111}$ és més lenta que la que mostren els ratolins R6/1. En aquest cas corresponen: fase presimptomàtica (3 mesos), fase d'inici de la simptomatologia (6 mesos) i fase avançada (17 mesos). Els nivells proteics de MEF2 en els ratolins KI $Hdh^{Q7/Q111}$ segueixen el mateix patró de disminució que el que mostren els ratolins R6/1. En aquests ratolins tampoc s'observen diferències significatives entre els ratolins WT $Hdh^{Q7/Q7}$ i els ratolins KI $Hdh^{Q7/Q111}$ als 3 mesos d'edat. Per altra banda, en els ratolins KI $Hdh^{Q7/Q111}$ també s'observa una disminució significativa dels nivells proteics de MEF2 als 6 mesos, quan s'inicia la simptomatologia cognitiva, i aquesta disminució es mantinguda al llarg de la progressió de la malaltia (Figura 37B).

3.2. Mecanismes causals de la disminució hipocampal del Factor de transcripció MEF2 en la MH

3.2.1. La disminució hipocampal del Factor de transcripció MEF2 no és deguda a una desregulació transcripcional en els ratolins R6/1

Per a determinar si la disminució observada en els nivells proteics de MEF2 era causada per una desregulació transcripcional, es van analitzar els nivells de l'ARNm de MEF2. Els nivells de l'ARNm de MEF2 van ser determinats usant extractes d'ARNm hipocampals d'animals WT i R6/1 a les 8, 20 i 30 setmanes (figura 38). No s'observen diferències significatives en cap de les edats estudiades entre els ratolins WT i R6/1. Això suggereix que la presència de la httm no altera l'expressió gènica de MEF2. Per tant, la disminució dels nivells proteics hipocampals de MEF2 no és deguda a una desregulació transcripcional.

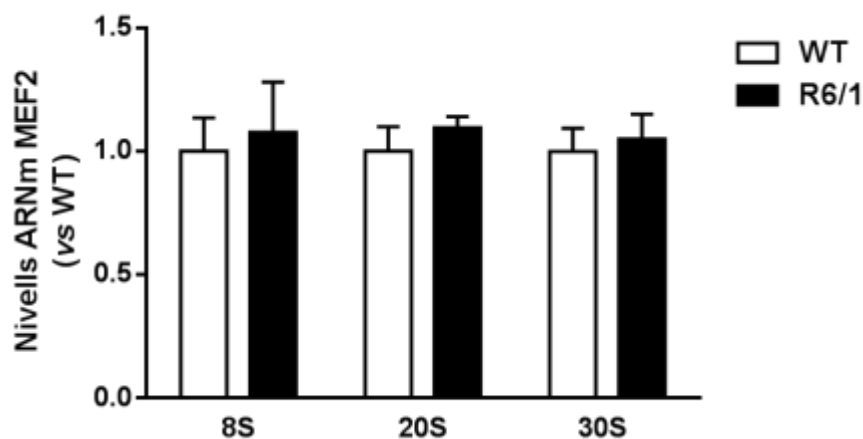


Figura 38. Els nivells d'ARNm de MEF2 no estan alterats en l'hipocamp dels ratolins R6/1

Els nivells d'ARNm hipocampals van ser analitzats per qPCR en ratolins WT i R6/1 de diferents edats (S, setmanes). L'histograma mostra els nivells d'ARNm de MEF2 normalitzats amb els gens 18S i GAPDH. En el gràfic es representa la mitjana \pm SEM dels nivells d'ARNm de MEF2 relativitzats amb els valors dels ratolins WT (n=4-7 per genotip). Els resultats van ser analitzats amb el test estadístic Two-way ANOVA amb el post hoc anàlisi de Newman-Keuls.

3.2.2. La disminució hipocampal del Factor de transcripció MEF2 no és causada per la interacció directa amb la httm en els agregats proteics

Per tal d'estudiar si MEF2 interaccionava amb la httm i caracteritzar l'expressió de MEF2 es van realitzar anàlisis d'immunofluorescència en seccions coronals hipocampals en animals WT i R6/1 de 20 setmanes d'edat. En les imatges de la figura 39 es pot observar que MEF2 té una localització nuclear tant en els animals WT com en els animals R6/1. Aquestes anàlisis mostren que no hi ha colocalització entre MEF2 i la httm. El que sí que és rellevant observar és

IV. Resultats

la gran disminució de MEF2 que s'observa en l'hipocamp dels ratolins R6/1, que confirma els resultats obtinguts per *Western blot*.

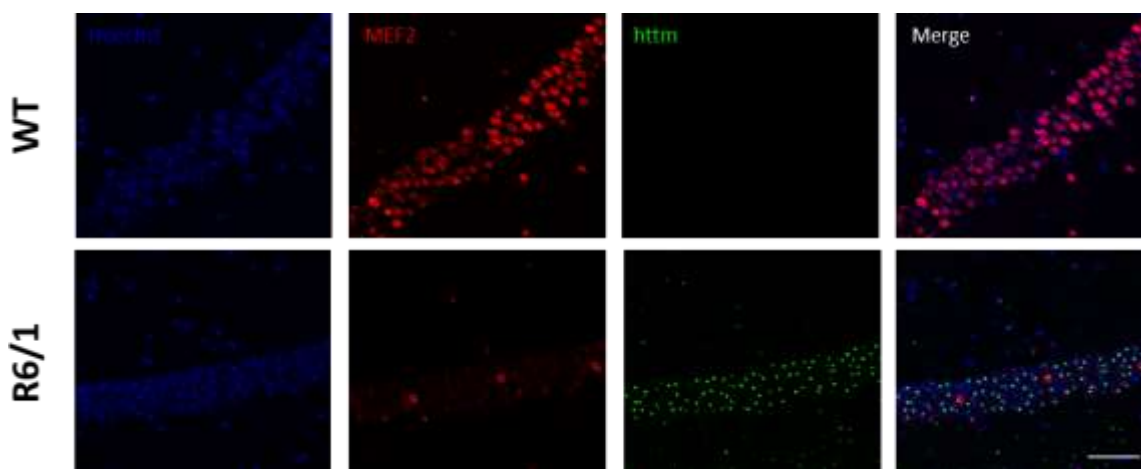


Figura 39. Marcatge amb immunofluorescència de MEF2 en seccions coronals hipocampals

MEF2 va ser analitzat amb immunofluorescència en el GD, la CA1 i la CA3. Les imatges són imatges representatives de la CA1 captades amb el microscopi confocal Leica TS SP5 a 63x. La barra d'escala és 50 µm. Els nuclis van ser marcats amb Hoechst 33258 i la httm amb l'anticòs EM48. El merge mostra el solapament de les imatges dels diferents canals.

Per a corroborar que MEF2 no interaccionava ni amb la httm ni amb la htt vam realitzar un assaig d'IP. Amb aquest assaig i tal i com s'observa a la figura 40 vam poder confirmar que no existeix interacció entre MEF2 i la httm ni tampoc amb la htt.

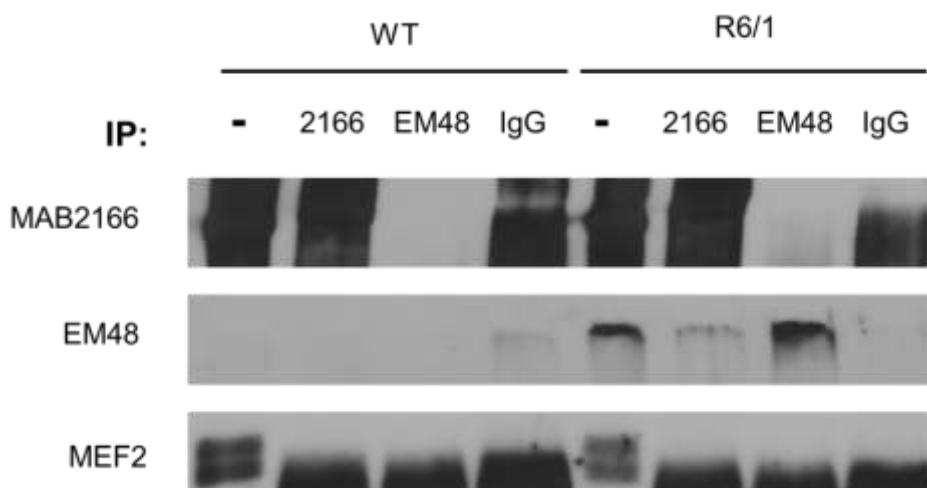


Figura 40. MEF2 no interacciona ni amb la httm ni amb la htt

La interacció entre MEF2 i la httm i la htt va ser analitzada en extractes proteics de l'hipocamp d'animals WT i R6/1 de 20 setmanes per IP. La htt va ser immunoprecipitada amb l'anticòs MAB2166, la httm amb l'anticòs EM48 i com a control negatiu es van usar IgG inespecífiques de ratolí. Les membranes després van ser incubades amb els mateixos dos anticossos de la htt i amb l'anticòs de MEF2 tal i com es mostra a les imatges representatives, on - indica extracte proteic sense immunoprecipitar.

3.2.3. La disminució hipocampal del factor de transcripció MEF2 és dependent de l'activitat de les caspases

Un altre possible mecanisme que podria explicar la reducció dels nivells de MEF2 en els models de la MH és un augment de la degradació de MEF2. Diferents estudis associen la disminució en els nivells de MEF2 amb un augment del seu clivatge per caspases (343,376–378). Per estudiar aquest possible mecanisme vam utilitzar cultius hipocampals primaris d'embrions WT i R6/1 a dia embrionari 18. Primerament, vam voler saber si les neurones hipocampals *in vitro* provinents dels animals R6/1 també presenten nivells reduïts de MEF2. D'acord amb el que havíem observat en els models murins, els resultats van mostrar que els cultius hipocampals primaris R6/1 mostraven una disminució significativa de la proteïna MEF2 comparats amb els cultius hipocampals primaris WT a DIV 10 (figura 41).

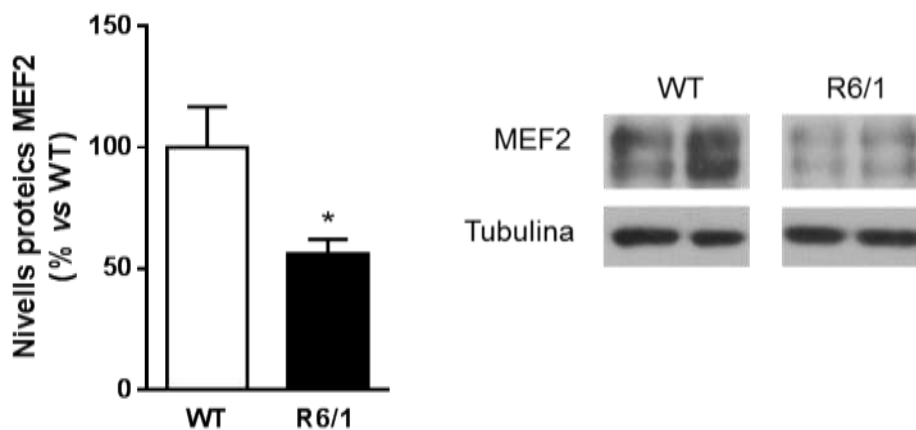


Figura 41. Els nivells de MEF2 estan disminuïts en els cultius primaris hipocampals R6/1

Els nivells proteics de MEF2 van ser analitzats en els cultius primaris hipocampals d'embrions WT i R6/1 a dia embrionari 18. Els cultius van ser lisats a DIV 10 i els extractes proteics analitzats per *Western blot*. En el gràfic es representa la mitjana \pm SEM de la relació dels nivells proteics de MEF2 *versus* els nivells proteics d' α -tubulina. Aquesta mitjana està expressada com a percentatge del valor dels ratolins WT (n= 6 embrions per genotip). Els resultats van ser analitzats amb la prova *t* de Student. * $p < 0.05$ comparat amb els ratolins WT. Els immunoblots mostren imatges representatives dels nivells proteics de MEF2 i d' α -tubulina dels cultius WT i R6/1.

Per a estudiar si aquesta disminució era deguda a un augment de la degradació per caspases es van tractar els cultius primaris hipocampals amb un paninhibidor de caspases, l'inhibidor zVAD. Després d'aquest tractament es va observar que els nivells de MEF2 augmentaven significativament en els cultius hipocampals primaris R6/1 tractats amb zVAD respecte als tractats amb vehicle (figura 42A).

IV. Resultats

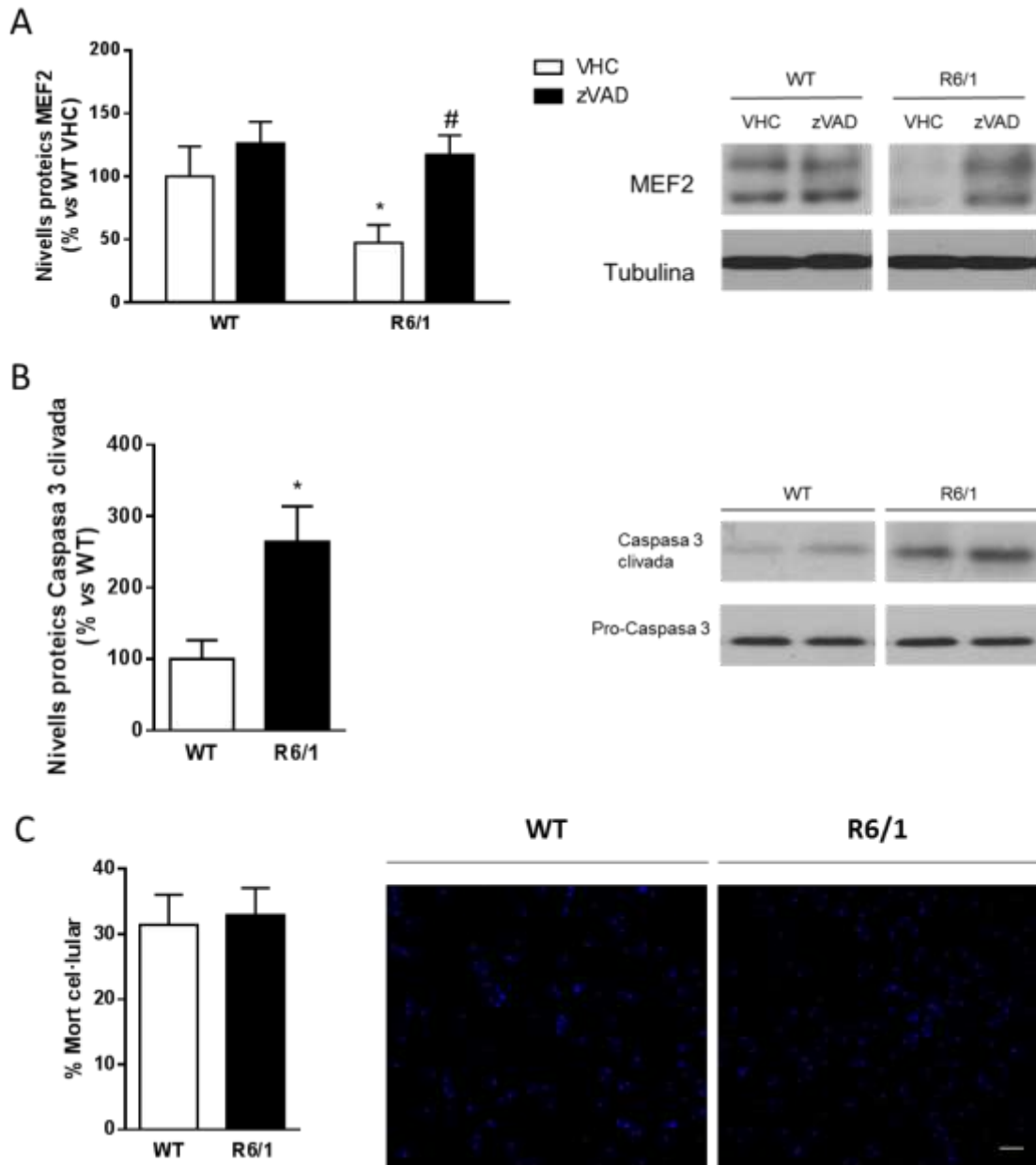


Figura 42. La disminució de MEF2 en els cultius primaris hipocampals és causada per un augment en l'activitat caspasa

(A) Els nivells proteics de MEF2 van ser determinats per *Western blot* dels extractes proteics dels cultius primaris hipocampals WT i R6/1 a DIV 10. Els cultius primaris hipocampals van ser tractats a DIV 9 amb 50 μ M del pan inhibidor de caspases (zVAD) o vehicle (VHC, DMSO) i 17 hores després a DIV 10 van ser lisats. En el gràfic es representa la mitjana \pm SEM de la relació dels nivells proteics de MEF2 *versus* els nivells proteics d' α -tubulina. Aquesta mitjana està expressada com a percentatge del valor dels cultius hipocampals primaris WT VHC (n= 6-7 per genotip). Els resultats van ser analitzats amb el test estadístic Two-way ANOVA amb el post hoc anàlisi de Newman-Keuls. *p<0,05 *versus* WT VHC; #p<0,05 *versus* R6/1 VHC. Els immunoblots mostren imatges representatives dels nivells de MEF2 i d' α -tubulina en les diferents condicions. (B) L'activitat caspasa 3 va ser determinada mesurant els nivells del fragment actiu de la caspasa 3 per *Western blot* dels extractes proteics dels cultius primaris hipocampals WT i R6/1 a DIV 10. En el gràfic es representa la mitjana \pm SEM de la relació dels nivells proteics de caspasa 3 clivada *versus* els nivells proteics de procaspasa 3. Aquesta mitjana està expressada com a percentatge del valor dels cultius hipocampal primaris WT. Els resultats van ser analitzats amb la prova *t* de Student.*p<0.05 comparat amb els ratolins WT (=5-6 per genotip). Els immunoblots mostren imatges representatives dels nivells de caspasa 3 clivada i procaspasa 3 dels cultius hipocampals primaris WT i R6/1. (C) Imatges

representatives neurones hipocampals primàries WT i R6/1 captades amb el microscopi d'epifluorescència l'Olympus BX60. La barra d'escala és 100 μm . Les imatges mostren el marcatge nuclear immunofluorescent amb Hoechst 33258. El gràfic mostra el % de mort cel·lular en els cultius primaris hipocampals WT i R6/1. Aquest % ha estat calculat amb el número de cèl·lules picnòtiques determinat amb el programa CellProfiler. Els resultats van ser analitzats amb la prova *t* de Student.

Per saber si l'augment de MEF2 en presència del zVAD era degut a un augment de la seva activitat en les neurones R6/1, vam analitzar els nivells del fragment actiu de la caspasa 3. Concretament, vam estudiar l'activitat de la caspasa 3, ja que juntament amb la 7, és la que ha estat implicada en el clivatge de MEF2 (343,376). Les caspases són sintetitzades com a proteïnes inactives (procaspases) i per a activar-se han de patir un trencament proteolític donant lloc a la proteïna activa (caspasa clivada). Vam observar un augment dels nivells del fragment actiu de la caspasa 3 a DIV 10 en els cultius hipocampals primaris R6/1 comparats amb els cultius WT, indicant un augment de la seva activitat (figura 42B). Finalment, vam voler estudiar si aquest augment de l'activitat caspasa anava acompanyat d'un augment en la mort cel·lular. Per tant, vam estudiar els nivells de mort cel·lular realitzant un assaig de mort cel·lular per tinció de la cromatina amb el programa CellProfiler. La mort cel·lular va ser determinada amb el % de cèl·lules que presentaven nuclis picnòtics (nuclis més petits i amb més intensitat de marcatge fluorescent). Tal i com es mostra a la figura 42C no vam observar diferències significatives en el % de mort cel·lular presents en els cultius hipocampals WT i R6/1.

3.3. El Tractament agut amb el BML-210 millora la complexitat neurítica en cultius hipocampals primaris d'embrions R6/1

Les dendrites són els llocs primaris de connexió sinàptica i el creixement dendrític és essencial per a la formació sinàptica. Alteracions que afecten la forma i la mida de l'arbre dendrític generen problemes cognitius, de percepció i de memòria (379,380). Per a estudiar si l'activació de MEF2 podia millorar la morfologia de les neurites en els cultius hipocampals primaris, aquests van ser tractats amb el compost BML-210. Aquest compost desinhibeix a MEF2 ja que impedeix la interacció entre MEF2 i les HDAC de la classe IIa. Quan MEF2 interacciona amb les HDAC de la classe IIa, la seva activitat transcripcional està reprimida, mentre que quan aquesta interacció es dissocia s'activa la transcripció de MEF2 (figura 43A) (359).

Els cultius primaris van ser tractats a DIV 7 amb BML-210 i BDNF. El BDNF es va usar com a control positiu, ja que està àmpliament definit que els seus efectes neurotròfics promouen el creixement de les neurites in vitro (370,381). Tres dies després del tractament, es va analitzar la complexitat neurítica, quantificant la llargària total de l'arbre neurític i el nombre de neurites/neurona (Figura 43B i 43C). Tal com es mostra en els gràfics de la figura 43B, vam

IV. Resultats

observar una disminució tant en la llargària total de l'arbre dendrític com en el nombre de neurites/neurona en els cultius hipocampals primaris R6/1 vehicle comparat amb els cultius hipocampals WT vehicle. Els cultius tractats amb BDNF mostren un augment dels dos paràmetres tant en els cultius WT com en els R6/1. En canvi els cultius WT tractats amb BML-210 no mostren millores en cap dels dos paràmetres, indicant un efecte específic sobre les neurones que expressen la huntingtina mutada. Destacar que el tractament amb BML-210 augmenta els dos paràmetres morfològics estudiats en els cultius R6/1 de manera comparable al tractament amb BDNF. Aquests resultats indiquen que el tractament amb BML-210 genera un efecte neurotròfic i neuroprotector en els cultius primaris hipocampals R6/1.

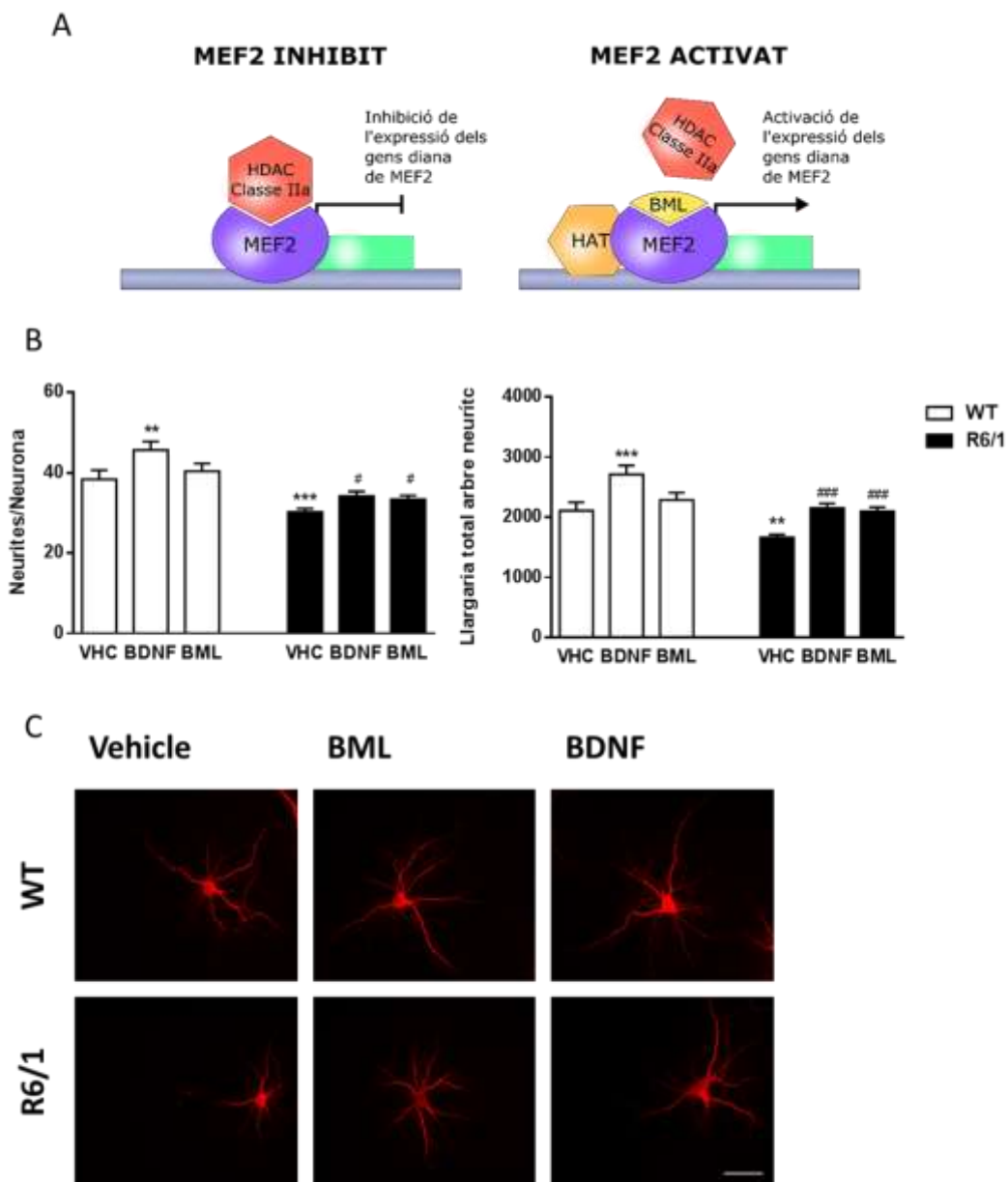


Figura 43. L'activació de MEF2 mitjançant el tractament amb BML-210 augmenta el nombre de neurites i la seva llargària en cultius primaris hipocampals

Els cultius hipocampals primaris d'embrions WT i R6/1 a dia embrionari 18 van ser tractats a DIV 7 amb vehicle (VHC), BML-210 (10 μ M) i BDNF (10ng/ml). Tres dies després els cultius van ser fixats. (A) Diagrama esquemàtic de l'acció molecular del compost BML-210. (B) Els gràfics mostren el nombre de neurites i la llargària de l'arbre neurític analitzats per a cada condició amb el programa CellProfiler. Els resultats van ser analitzats amb el test estadístic Two-way ANOVA amb el post hoc anàlisi de Newman-Keuls. ** $p < 0,01$ i *** $p < 0,001$ *versus* WT VHC; # $p < 0,05$ i ### $p < 0,001$ *versus* R6/1 VHC. (C) Imatges representatives que mostren el marcatge amb MAP2 dels diferents grups tractats de neurones hipocampals piramidals a DIV 10. La barra d'escala és 50 μ m. Les imatges van ser captades amb el microscopi d'epifluorescència l'Olympus BX60.

3.4. El tractament agut amb BML-210 redueix els dèficits de memòria de reconeixement i localització a llarg termini en els ratolins R6/1

Per analitzar si l'activació de MEF2 produeix millores en els dèficits de la memòria a llarg termini en els ratolins R6/1, els ratolins WT i R6/1 van ser tractats de manera aguda amb BML-210 (150 mg/kg/dia) o amb vehicle. Aquests compostos van ser administrats als ratolins durant quatre dies consecutius. El quart dia de tractament es va realitzar l'avaluació de la memòria a llarg termini. Aquesta avaluació es va realitzar quan els ratolins tenien una edat d'entre 15 i 16 setmanes, ja que és l'edat en què els ratolins R6/1 mostren clarament dèficits de memòria. La valoració de la memòria de reconeixement es va dur a terme amb el NORT (figura 44A). Vam observar que, mentre els ratolins WT passaven més temps explorant l'objecte nou que l'objecte vell, aquesta preferència no era present en els ratolins R6/1 tractats amb vehicle. És important remarcar que els ratolins R6/1 tractats amb el BML-210 mostraven una preferència per a l'objecte nou similar a l'observada en els ratolins WT.

Per tal de confirmar la millora de memòria a llarg termini també es va estudiar la memòria a llarg termini espacial amb el NOLT (figura 44B). Durant el test, els animals R6/1 tractats amb vehicle no mostraven cap preferència per l'objecte que es trobava en una nova localització respecte l'objecte que es trobava en la localització vella. Tot i això, els ratolins R6/1 tractats amb BML-210 exploraven més l'objecte que es trobava en una nova localització. En cap dels dos tests es van observar diferències entre els ratolins WT tractats amb vehicle o amb BML-210. Per tant, l'administració del compost BML-210 millora els dèficits de memòria de reconeixement i espacials que presenten els ratolins R6/1.

IV. Resultats

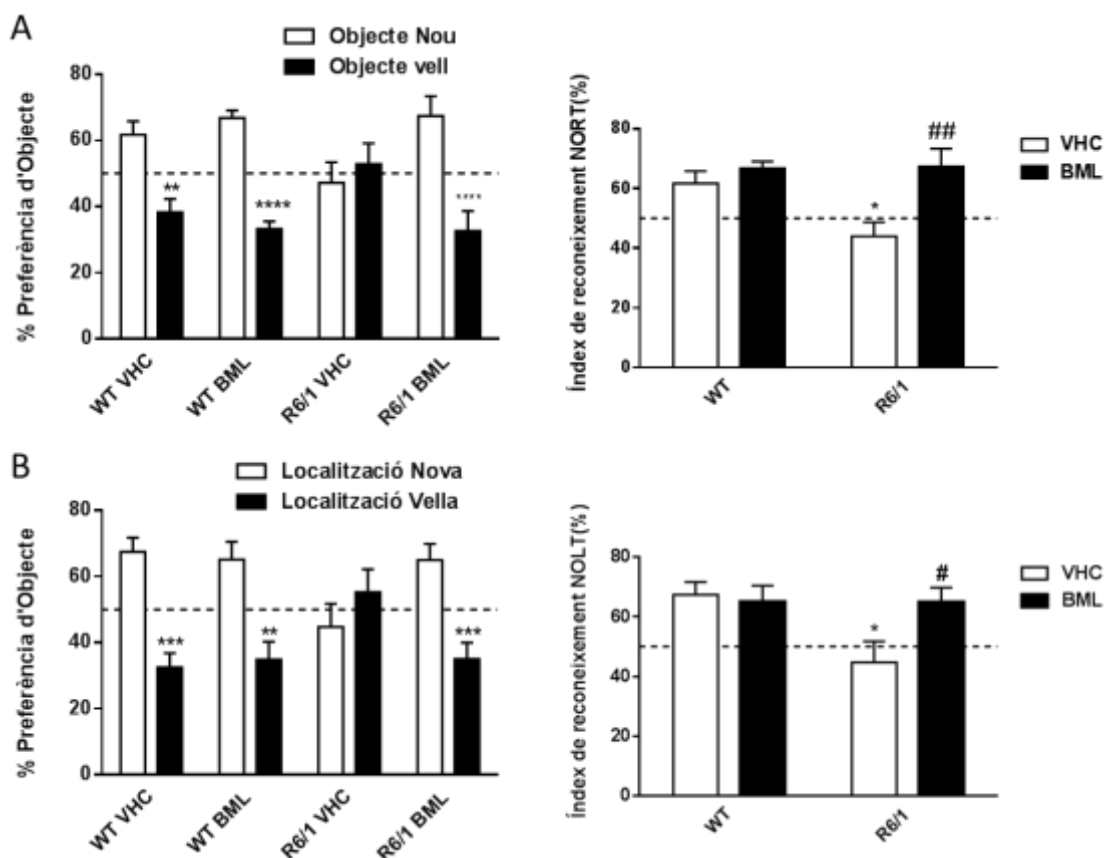


Figura 44. El tractament agut amb BML-210 millora els dèficits de memòria a llarg termini dels ratolins R6/1

Els ratolins WT i R6/1 de 15-16 setmanes d'edat van ser tractats diàriament amb BML-210 (150mg/kg/dia) o amb vehicle (VHC) durant quatre dies. L'avaluació de la memòria de reconeixement i espacial es va realitzar amb (A) el NORT i (B) el NOLT, respectivament. Els gràfics mostren el % d'exploració dels objectes representat com % de preferència d'objecte o com a índex de reconeixement. La línia discontinua indica la probabilitat d'exploració dels objectes. n= 10-15 animals per grup. Els resultats van ser analitzats amb el test estadístic Two-way ANOVA amb el post hoc anàlisi de Newman-Keuls. *p<0,05, ** p<0,01 i ***p<0,001 versus WT VHC; #p<0,05 versus R6/1 VHC.

3.5. El tractament amb el compost BML-210 inhibeix la interacció entre MEF2 i la HDAC4 (HDAC de la classe IIa) i recupera els nivells de les proteïnes Sinaptofisina i Arc

Per tal d'analitzar si el tractament amb BML-210 estava activant a MEF2 es va estudiar la interacció entre aquest i la HDAC4 que pertany a la classe IIa d'HDAC. Aquesta interacció es va mesurar en mostres corticals de ratolins WT i R6/1 tractats de manera i.p. durant quatre dies amb BML-210 (150mg/kg/dia) o amb vehicle (VHC) per immunoprecipitació. Vam observar que després del tractament amb el BML-210 tant els ratolins WT com els R6/1 mostraven menys interacció entre MEF2 i la HDAC4 (figura 45).

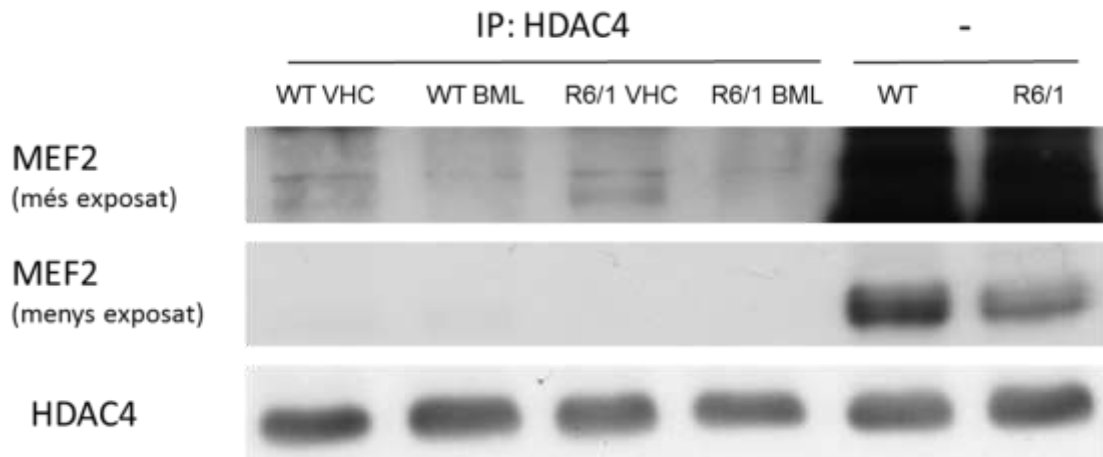


Figura 45. El tractament amb BML-210 redueix la interacció entre MEF2 i la HDAC4 de la classe IIa

La interacció entre MEF2 i la HDAC4 va ser analitzada en extractes proteics d'escorça cerebral d'animals WT i R6/1 d'entre 15-16 setmanes per IP. Els animals WT i R6/1 van ser tractats amb BML-210 (150mg/kg/dia) o amb vehicle (VHC) durant quatre dies. La IP es va realitzar amb mostres d'animals que havien realitzat el NORT. La IP es va dur a terme amb l'anticòs de la HDAC4. Les membranes després van ser incubades amb diferents anticossos tal i com es mostra a les imatges representatives. – indica l'extracte proteic sense immunoprecipitar.

Seguidament, vam analitzar si les millores en la memòria observades després del tractament amb BML-210 correlacionaven amb canvis en l'expressió de proteïnes relacionades amb la memòria i amb la densitat sinàptica. Amb aquesta finalitat vam analitzar els nivells proteics d'Arc en els ratolins WT i R6/1 després del tractament agut amb BML-210 i d'haver realitzat el NORT o el NOLT. Arc és un gen de resposta immediata d'activitat sinàptica, i ha estat àmpliament usat com a marcador de plasticitat sinàptica i memòria (336,349,352). Per altra banda, diversos articles han descrit que Arc és un gen diana de MEF2 (345,351–354). Després de realitzar l'experiment, vam observar que els ratolins R6/1 vehicle mostraven una disminució significativa dels nivells proteics d'Arc comparats amb els ratolins WT. En canvi, els ratolins R6/1 tractats amb BML-210 mostraven un augment dels nivells proteics d'Arc (figura 46A).

Finalment, vam analitzar els nivells proteics de Sinaptofisina. La Sinaptofisina és una proteïna vesicular presinàptica que representa un marcador específic de la densitat sinàptica (382–384). Com s'observa en la figura 46B, els ratolins R6/1 mostren una disminució dels nivells de Sinaptofisina. És interessant ressaltar que el tractament amb BML-210 recupera els nivells de Sinaptofisina en els ratolins R6/1. Aquests resultats indiquen que el tractament amb BML-210 està activant la transcripció regulada per MEF2 en els ratolins R6/1, ja que Arc és un gen diana d'aquest. A més, aquests resultats també assenyalen que el tractament amb BML-210 està modulant la plasticitat sinàptica en els ratolins R6/1.

IV. Resultats

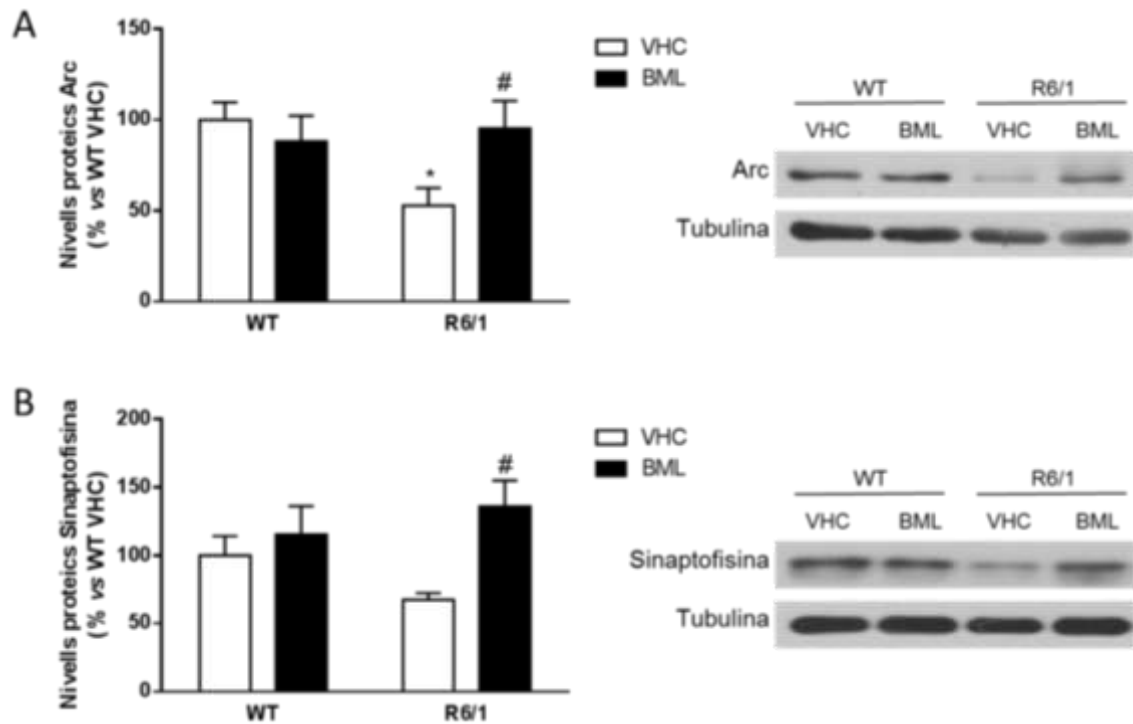


Figura 46. El tractament amb BML-210 evita la disminució de les proteïnes Arc i Sinaptofisina en els ratolins R6/1

Els nivells proteics (A) d'Arc i (B) de Sinaptofisina van ser determinats per *Western Blot* d'extractes proteics hipocàmpals d'animals WT i R6/1 tractats amb BML- 210 (150mg/kg/dia) o amb vehicle (VHC) durant quatre dies, després d'haver sigut avaluats amb el NORT. En els gràfics es representa la mitjana \pm SEM de la relació dels nivells proteics d'Arc o Sinaptofisina *versus* els nivells proteics d' α -tubulina. Aquesta mitjana està expressada com a percentatge del valor dels animals WT VHC (n=10-15 animals per grup). Els resultats van ser analitzats amb el test estadístic Two-way ANOVA amb el post hoc anàlisi de Newman-Keuls. *p<0,05 *versus* WT VHC; #p<0,05 *versus* R6/1 VHC. Els immunoblots mostren imatges representatives dels nivells d'Arc, Sinaptofisina i d' α -tubulina en les diferents condicions.

V. Discussió

*Entre el mar i el cel
només imaginació
l'anomenem horitzó.*

Joan Reguant Aleix

La creativitat requereix tenir el valor de desprendre's de les certeses.

Erich Fromm

La recerca de noves dianes terapèutiques en la MH és una àrea de gran interès científic, ja que actualment no hi ha tractaments que puguin retardar o pal·liar la progressió de la malaltia. Per tant, per tal de descriure noves dianes terapèutiques és essencial l'estudi de mecanismes moleculars que contribueixen a la patologia de la malaltia a causa de la presència de la httm. En les últimes dècades, molts estudis han corroborat que la httm produeix dèficits en diferents nivells de la maquinària cel·lular, com són l'alteració en els receptors cel·lulars (143–145), la desregulació en les vies de senyalització (125,227,228,230,231) i els dèficits transcripcionals (146,147,385). Alteracions en un o més d'aquests nivells s'han postulat com a mecanismes causals de la disfunció i la mort neuronal en la MH (142,229,386).

Per altra banda, la MH està caracteritzada per la disfunció i degeneració estriatal i també d'altres àrees cerebrals com l'escorça i l'hipocamp (2,77,387). Actualment, està àmpliament acceptat que la mort neuronal no es produeix fins etapes avançades de la malaltia i que la disfunció neuronal i sinàptica són els principals causants de la simptomatologia i de la progressió de la MH (96,388). Per tant, el camp de recerca de noves dianes farmacològiques en la MH es centra en la restauració de la disfunció neuronal i sinàptica i la prevenció de la mort neuronal característica de les fases finals de la malaltia.

Un altre dels àmbits que és font d'investigació en la MH és la contribució de la funció hipocampal en els dèficits cognitius característics de la malaltia. Molts estudis han demostrat que l'aparició dels dèficits cognitius té lloc abans de l'inici de la simptomatologia motora, en l'estadi premanifest de la MH (29,30,389). Aquests símptomes clínics han estat atribuïts principalment a la disfunció cortico-estriatal (30,100,390,391), encara que actualment cada cop està més establert que la causa de la disfunció cognitiva no és només deguda a la disfunció dels ganglis basals i de la via cortico-estriatal, sinó a un defecte més extens en la connectivitat i la funcionalitat cerebral (20,77,392,393). De fet, s'han descrit moltes alteracions patològiques hipocampals en la MH, com l'aparició d'agregats de httm i la reducció del volum hipocampal en etapes inicials de la malaltia (2,107,108,393,394). A més, cada cop hi ha més evidències que demostren la implicació de l'hipocamp en les alteracions cognitives presents en la MH (77,109,110,113,114,125).

L'objectiu central d'aquesta tesi ha estat estudiar el paper fisiopatològic de diferents proteïnes a nivell estriatal i hipocampal amb la finalitat de definir nous candidats que permetin realitzar un abordatge terapèutic sobre més d'una diana i així fer front a la complexitat de la MH.

V. Discussió

Les tres dianes terapèutiques investigades per a incidir en les alteracions presents en la MH en els diferents nivells cel·lulars mencionats són: els receptors cel·lulars, les vies de senyalització i la regulació transcripcional. En primer lloc hem estudiat l'activació del receptor EP2 i la seva implicació en els dèficits cognitius dependents de la funció hipocampal. En segon lloc hem analitzat la desregulació en la senyalització estriatal de la via de la MAPK ERK5. Per últim també hem examinat la desregulació del factor de transcripció MEF2 i el seu efecte en la desregulació transcripcional en l'hipocamp. Els nostres resultats mostren que aquests tres mecanismes moleculars corregeixen el desequilibri transcripcional present en la MH induint millores cel·lulars que podrien contribuir en la restauració de la disfunció neuronal causada per la htm. A més, proposem que les tres vies estudiades podrien estabilitzar els dèficits transcripcionals convergint en la transcripció dependent de l'element genòmic de resposta a activitat sinàptica SARE (figura 47). L'estimulació del receptor EP2 (252) com també l'activació de la via de senyalització d'ERK5 (292,307) fosforilen i conseqüentment activen a CREB. A més, ERK5 controla la fosforilació i la subseqüent activació del factor de transcripció MEF2, també estudiat en aquesta tesi. Per altra banda, tant CREB com MEF2 s'uneixen a les seqüències genòmiques SARE promovent la transcripció de gens regulats per activitat neuronal produint una resposta coordinada en situacions d'activació neuronal (352–354).

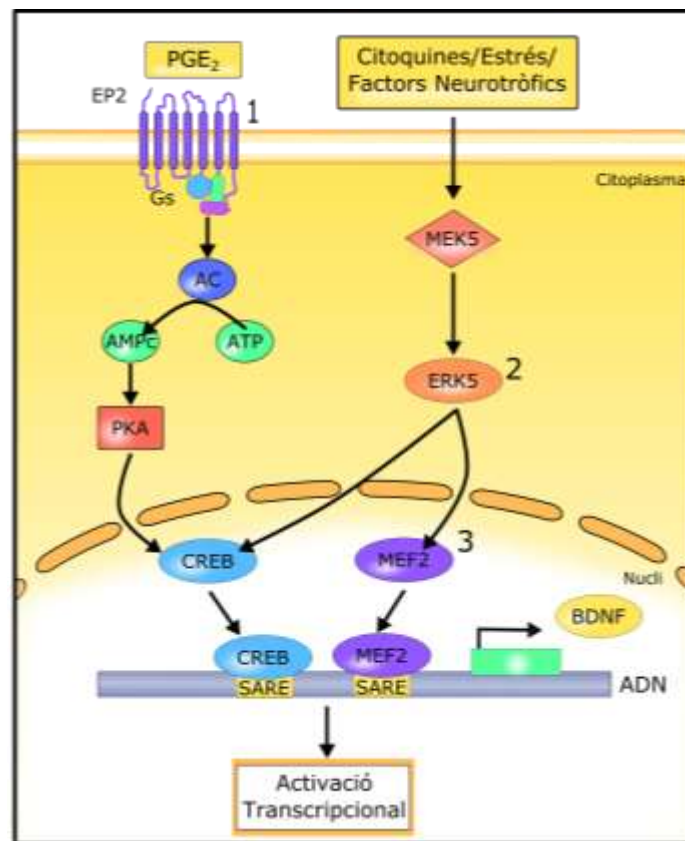


Figura 47. Caracterització de noves dianes terapèutiques en la MH

Diagrama esquemàtic on es mostren les tres proteïnes i els seus mecanismes moleculars associats, que han estat estudiats en aquesta tesi com a possibles dianes terapèutiques en la MH. 1) El receptor EP2 estimula l'activitat transcripcional de CREB estimulando la via AMPc/PKA/CREB. 2) La via de senyalització de la MAPK ERK5 regula l'activitat de CREB i MEF2. 3) El factor de transcripció MEF2 regula un complex programa transcripcional fonamental en els processos de plasticitat sinàptica i formació de memòria. Tant CREB com MEF2 s'uneixen a l'element genòmic SARE que controla l'activació transcripcional de gens implicats en la supervivència i la plasticitat sinàptica, entre els quals es troba el BDNF.

Finalment, proposem que els tres mecanismes moleculars estudiats en aquesta tesi representen bons candidats terapèutics per a tractar la disfunció neuronal i sinàptica ja que les seves alteracions s'observen des d'etapes inicials de la malaltia. En el cas d'ERK5 la seva restauració podria comportar millores cognitives i motores dependents de la funció estriatal. L'estudi del receptor EP2 i de MEF2 ens ha permès observar que la seva activació contribueix en la restauració dels dèficits cognitius dependents de l'hipocamp i també corroborar la importància de la funció hipocampal en els processos cognitius en la MH.

1. L'estimulació del receptor EP2 redeuix els dèficits cognitius de la MH estimulant la transcripció de proteïnes sinàptiques i del BDNF en l'hipocamp

La senyalització induïda per les PG té un rol central en les respostes fisiològiques i patològiques en tots els òrgans, incloent el SNC. De manera important, s'ha descrit que la PGE₂ té un paper important en malalties cerebrals, com el dany isquèmic i malalties neurodegeneratives (256). Actualment, moltes línies d'investigació sobre el rol de les PGE₂ es centren en modular la senyalització de la PGE₂ a través de la seva interacció amb els seus receptors, EP1-4. Aquests quatre receptors són receptors transmembrana acoblats a proteïnes G, que s'expressen de manera diferencial en les diferents regions del SNC tant en cèl·lules neuronals com glials (251). L'activació dels receptors de la PGE₂ mostra un rol complex i dual i pot presentar efectes neuroprotectors o neurotòxics en les malalties neurològiques depenent del context cel·lular (259,261,266,271,274,276,277,279,369). Això fa que la senyalització de la PGE₂ sigui una font potencial d'investigació. En aquesta tesi, em volgut examinar el rol del receptor EP2 en la MH utilitzant una administració i.p. del Misoprostol, un agonista del receptor EP2.

En primer lloc vam determinar que el Misoprostol induïu una activació cerebral del receptor EP2 així com determinar la dosi idònia d'aquest fàrmac. Vam utilitzar la via de senyalització més associada als efectes beneficiosos de l'activació del receptor EP2, la via AMPc/PKA/CREB (252). Una sola injecció de Misoprostol i.p. en ratolins WT induïa un augment

en el hipocamp de la fosforilació del factor de transcripció CREB una hora després del tractament. Vam observar aquest augment amb les dues dosis assajades, 50 i 500 µg/kg, tot i que l'efecte més potent el vam obtenir amb la dosi de 50 µg/kg. Per a corroborar que aquesta activació de CREB estava associada a una estimulació de la via AMPc/PKA vam estudiar la fosforilació en els substrats de PKA utilitzant la dosi de 50 µg/kg. Vam observar una hora després del tractament amb Misoprostol un important augment en la fosforilació dels substrats de PKA. Aquests resultats, doncs, ens indiquen que l'administració del Misoprostol estimula la via de senyalització associada al receptor EP2. A més, ens van permetre comprovar que el fàrmac arriba al cervell i definir una dosi òptima per a induir els efectes beneficiosos mediat per receptor EP2 en el SNC. En aquest sentit, diferents estudis mostren que l'expressió gènica controlada per CREB és necessària per a la supervivència de múltiples subtipus neuronals i també és essencial en els processos de formació de memòria (241,336,395). A més, la funció de CREB és veu danyada per la presència de la htnm (149,396). S'ha observat en models murins de la MH que la transcripció de gens regulats per CREB està disminuïda (146,367). Això suggereix que la inhibició de la transcripció controlada per CREB contribueix a la fisiopatologia de la MH (167,169). Recentment, s'ha proposat que un augment en la fosforilació de CREB exerceix efectes beneficiosos tant en models murins excitotòxics com en models genètics de la MH (245,247). Els nostres resultats indiquen que l'administració i.p. del Misoprostol promou l'activació de CREB en l'hipocamp, indicant que l'activació farmacològica del receptor EP2 pot ser una nova estratègia terapèutica per promoure la formació de memòria en el context de la MH.

Diferents estudis descriuen la implicació de la PGE₂ i en concret del receptor EP2 en la plasticitat sinàptica i en els processos de formació de memòria (270,281–283). S'ha observat que la inhibició de la síntesi de PG administrant ibuprofè promou dèficits en l'aprenentatge espacial associat a l'hipocamp, així com dèficits en la LTP (65). En aquest treball es descriu que aquestes alteracions són dependents de la PGE₂ (65). A més, s'ha descrit que ratolins deficients del receptor EP2 presenten alteracions en processos cognitius i de plasticitat sinàptica a nivell hipocampal (66, 67). Vam realitzar un tractament crònic amb Misoprostol amb la dosi de 50 µg/kg i els nostres resultats mostren que aquest tractament crònic millora els dèficits de memòria a llarg termini que presenten els ratolins R6/1. En concret, hem observat que els ratolins R6/1 tractats amb Misoprostol realitzen millor el T-SAT i el NORT, dues proves conductuals que avaluen memòria a llarg termini, que els ratolins R6/1 control. Aquest efecte beneficiós del Misoprostol en els animals R6/1 no el vam observar a la prova de *l'accelerating rotarod*, que és una tasca dependent de la via cortico-estriatal. Això sembla indicar que l'efecte

beneficis del tractament amb Misoprostol sembla ser específic de l'hipocamp, sense tenir capacitat per restablir la via cortico-estriatal en els ratolins R6/1. En aquest sentit, s'ha descrit que PGE₂ modula la transmissió sinàptica en l'hipocamp mitjançant una activació del receptor EP2 localitzat a nivell presinàptic (68).

Tot i que existeix poca bibliografia que relacioni el rol del receptor EP2 i l'activitat tròfica del BDNF, alguns treballs mostren que les PG estimulen l'alliberament del BDNF en cultius d'astròcits i de neurones (268,269). En la mateixa línia, els nostres resultats mostren que, associat a les millores conductuals, l'estimulació crònica del receptor EP2 amb el Misoprostol també indueix un augment dels nivells del BDNF en l'hipocamp dels ratolins tractats amb aquest fàrmac. Aquest augment també l'hem observat en cultius primaris hipocampals d'animals WT i R6/1 tractats amb Misoprostol.

El BDNF és un factor neurotròfic altament regulat pel factor CREB (195,243) i s'ha postulat que és un regulador central de la plasticitat sinàptica i del processament de memòria (336,395). A més, ha estat àmpliament descrit que els nivells del BDNF estan disminuïts en la MH, i que aquests canvis regulen la severitat i l'inici dels símptomes (124,192,205,226,397). No solament això, sinó que els tractaments centrats en la recuperació dels nivells del BDNF produeixen una millora en la plasticitat sinàptica, i en les funcions motores i cognitives en models murins de la MH (126,398).

Per tant, la nostra conjectura és que les millores cognitives observades en els ratolins R6/1 després del tractament crònic amb Misoprostol són degudes a la recuperació dels nivells hipocampals del BDNF. Aquesta hipòtesi es veu reforçada pel fet que l'efecte neurotròfic del Misoprostol està restringit a l'hipocamp, ja que no observem augments significatius dels nivells del BDNF en l'escorça cerebral i en l'estriat en els ratolins R6/1 després del tractament amb el Misoprostol. Aquest resultat correlaciona amb el fet de que tampoc observem millores en els ratolins R6/1 tractats en *l'accelerating rotarod*. Aquesta selectivitat hipocampal del tractament amb Misoprostol pot ser deguda a que la regió que mostra una reducció més pronunciada dels nivells proteics del BDNF a les 18 setmanes en els ratolins R6/1 és l'hipocamp. Una altra possible explicació d'aquesta selectivitat és que l'expressió del receptor EP2 és més baixa en l'escorça i en l'estriat que en l'hipocamp (73, 74).

Per tal de saber si l'augment dels nivells del BDNF observats en l'hipocamp estaven associats a una millora en la plasticitat sinàptica, vam estudiar els nivells de diferents marcadors sinàptics. Vam observar una recuperació en els nivells de les proteïnes sinàptiques PSD95 i

V. Discussió

VGLuT1 en l'hipocamp dels ratolins R6/1 després del tractament crònic amb Misoprostol. Alteracions en els nivells de PSD95 produeixen alteracions en la senyalització sinàptica i la plasticitat, que al seu torn generen alteracions en l'aprenentatge (126,368,399). Addicionalment, aquestes proteïnes serveixen de marcadors sinàptics per a avaluar la connectivitat i la densitat de sinapsis excitadores (135,400,401). Per tant, una recuperació en els nivells proteics de PSD95 i VGLuT1 pot estar associat a la recuperació de la memòria de llarg termini en els ratolins tractats amb Misoprostol, com prèviament ha estat suggerit (126,266,368).

És important mencionar que el tractament crònic amb Misoprostol també produeix un augment en els nivells del BDNF en els ratolins WT. Tot i això, aquest augment no correlaciona amb millores conductuals ni en canvis en proteïnes sinàptiques. Això concorda amb diferents estudis que mostren que canvis en els nivells del BDNF en els animals WT no necessàriament produeix canvis conductuals o bioquímics (205,206,402). Conjuntament, aquests resultats donen suport al fet de que la via del BDNF està altament regulada en la patologia de la MH i té un paper central en aquesta malaltia.

Per tal de correlacionar l'efecte beneficiós de l'administració del Misoprostol amb l'increment de BDNF vam utilitzar cultius primaris de neurones hipocampals provinents d'embrions d'animals WT i R6/1. Primer vam observar que els cultius primaris provinents d'embrions R6/1 mostren una disminució del número de neurites comparat amb els cultius provinents dels embrions WT. El tractament amb Misoprostol reverteix aquesta disminució en els cultius R6/1. A més, també promou un efecte neurotròfic en cultius primaris hipocampals WT. Hem demostrat que aquest efecte neurotròfic està relacionat directament amb l'expressió del BDNF, ja que l'augment en el nombre de neurites generat pel Misoprostol s'anul·la completament amb la presència en el medi de cultiu d'un anticòs contra el BDNF. Aquest efecte va ser confirmat observant una activació de l'expressió del BDNF després del tractament amb Misoprostol, tant en cultius WT com els cultius R6/1. No obstant, aquest increment només va ser detectat 24 hores després d'afegir el Misoprostol, i no 7 dies després de la seva addició. Aquesta diferència podria ser deguda a que el BDNF forma part de la família de gens efectors de resposta immediata. Aquests gens estan caracteritzats per tenir una activació ràpida i transitòria en resposta a una gran varietat d'estímuls cel·lulars (403,404). Per tant, podem assenyalar que l'activació del receptor EP2 promou el creixement neurític gràcies a l'activació primerenca de l'expressió del BDNF.

L'efecte beneficiós del Misoprostol descrit anteriorment en cultius primaris va ser observat amb la concentració de 10 μ M. No obstant, l'addició de 50 μ M de Misoprostol va produir efectes deleteris en les neurones hipocampals. Aquest efecte pot ser degut tant per l'acció dual del BDNF com per la interacció del Misoprostol activant el receptor EP1. Ha estat àmpliament estudiat que el BDNF pot produir efectes diametralment oposats en la supervivència neuronal dependent dels seus nivells (405–407). Per altra banda, encara que el Misoprostol interacciona principalment amb el receptor EP2 també es pot unir a altres receptors de la PGE₂ (251), produint efectes secundaris indesitjables. Un treball recent del nostre grup, mostra que el bloqueig del receptor EP1 té efectes beneficiosos en els ratolins R6/1 (266). Aquests resultats suggereixen que la concentració de Misoprostol és un factor crític per a tenir efectes neuroprotectors, com passa també en el cas de diferents neurotrofines (405). Aquest plantejament és reforçat pel fet que el tractament d'animals WT durant una hora amb altes dosis de Misoprostol (500 μ g/Kg) produeix un increment menor de la fosforilació de CREB que el tractament amb dosis més baixes (50 μ g/kg).

En aquest sentit, diferents treballs han observat que l'activació del receptor EP2 també té efectes duals i oposats en condicions patològiques en el SNC. Alguns d'aquests estudis mostren que l'activació del receptor EP2 té un efecte neuroprotector en condicions excitotòxiques i en models de neurodegeneració (271,274,276,277). Tot i això, també ha estat descrit que el receptor EP2 pot induir un efecte neurotòxic en condicions de neuroinflamació (279,280,369). Tot i que els nostres resultats indicaven un paper neuroprotector en els ratolins R6/1 vam voler corroborar que l'activació del receptor EP2 no estava induint efectes proinflamatoris, analitzant diferents marcadors en l'hipocamp dels ratolins tractats. Vam observar que l'administració crònica de Misoprostol no produïa cap canvi en l'expressió de marcadors específics gials. Ni la proteïna GFAP ni en la proteïna IBA1, que són dos marcadors específics d'activació astrocitària i microglial, respectivament, mostraven variacions significatives després del tractament amb Misoprostol en els ratolins WT i R6/1. Tampoc vam observar que aquest tractament modifiqués el patró d'expressió de les proteïnes IL6 o TNF α , dues proteïnes essencials en processos inflamatoris. Això indica que, encara que alguns estudis suggereixen que la senyalització del receptor EP2 té efectes neuroinflamatoris, els nostres resultats demostren que en el context de la MH i amb la dosi utilitzada de Misoprostol, l'activació d'aquest receptor té un rol beneficiós reduint els dèficits cognitius dels ratolins R6/1.

Finalment, per confirmar la importància terapèutica del receptor EP2, vam estudiar les IIN de httm, que són la marca histopatològica de la MH (408) en l'estriat i en tres regions de

l'hipocamp; la CA1, la CA3 i el GD. Després del tractament crònic amb Misoprostol, vam poder distingir clarament que hi havia una disminució en el nombre d'IIN de httm només en el GD de l'hipocamp, que és la regió hipocampal amb una expressió més alta del receptor EP2. No vam observar canvis en el nombre d'IIN en l'estriat, fet que enforteix la hipòtesi de l'efecte específic hipocampal del tractament amb Misoprostol. Tot i la gran controvèrsia sobre el rol de les IIN de httm, hi ha moltes evidències que indiquen que la presència d'agregats produeix neurotoxicitat i és un mecanisme molt important en la patologia de la MH (81,82,108,409–411). També s'ha demostrat que la disminució dels agregats de la httm està relacionada amb una millora conductual en els models murins de la MH (126,412,413). A més, un gran nombre de compostos que són neuroprotectors redueixen de manera significativa els agregats de httm (412,414). Per tant, l'efecte del Misoprostol no estaria només restringit a promoure la plasticitat sinàptica, sinó que l'estimulació del receptor EP2 també tindria la capacitat de reduir les IIN en la patologia de la MH.

En relació a l'especificitat de la reducció de les IIN en el GD, hem observat que la disminució en el nombre d'IIN de httm correlaciona amb un augment també específic de l'expressió de l'AMPc en el GD dels ratolins R6/1 tractats crònicament amb Misoprostol. L'AMPc activa a la proteïna PKA, que al seu torn activa el sistema ubiquitina-proteosoma, que té un paper central en l'eliminació de proteïnes mal plegades (415,416). A més, les IIN apareixen més tard en el GD que en altres regions hipocampals (108), suggerint que el Misoprostol, en aquesta fase (14 setmanes d'edat), pot estar retardant l'aparició de les IIN. El GD és la regió hipocampal que rep més entrada d'innervacions excitadores del còrtex, actuant com la porta d'entrada d'informació a l'hipocamp (105). S'ha descrit que el GD contribueix a la formació de noves memòries episòdiques i dèficits en aquesta regió hipocampal produeixen un declivi en la memòria de treball (417,418). És important ressaltar, un estudi dut a terme per Schwab et al. on mostren per primer cop que la presència d'IIN de httm en el GD genera disfuncions en la memòria a llarg termini (419). Així, una reducció en el nombre d'agregats de httm en aquesta àrea pot representar un esdeveniment favorable per a la funció hipocampal.

Moltes línies de recerca assenyalen el BDNF com una diana molecular molt prometedora per al desenvolupament de fàrmacs en diferents trastorns neurodegeneratius, i més concretament en la MH (184,192,420). Tanmateix, l'aplicació terapèutica del BDNF en humans presenta un seguit de limitacions: és un factor que no travessa la barrera hematoencefàlica, té una vida mitja molt curta i una alta difusió. Es requereixen, doncs, estratègies alternatives, eficaces i segures per tal d'estimular i restablir els nivells del BDNF en el SNC. Fins ara, s'han

descriu pocs sistemes completament no-invasius que permetin l'arribada del BDNF al SNC (184,192,421). Amb aquest treball, proposem l'estimulació del receptor EP2 com una nova aproximació terapèutica per tal d'augmentar els nivells del BDNF hipocampals i així millorar l'estat cognitiu en els ratolins R6/1. Hem descrit que aquest increment dels nivells del BDNF està associat a l'activació de la via AMPc/PKA/CREB que promouria una millora en la plasticitat sinàptica, ja que observem increments de diferents marcadors sinàptics. Finalment, l'acció del Misoprostol està associat a la reducció de les IIN en el GD de l'hipocamp. Amb tot això proposem el Misoprostol o l'activació del receptor EP2 com una eina terapèutica per combatre els dèficits cognitius de la MH (figura 48)..

Amb tot, els resultats d'aquesta tesi conjuntament amb els resultats publicats del nostre grup on es descriu la contribució de la senyalització del receptor EP1 en la MH (266), indiquen que la modulació dels receptors EP té un fort efecte terapèutic en els ratolins R6/1. Globalment els nostres resultats ens permeten suggerir que per a incrementar l'efecte beneficiós de la modulació dels receptors EP en la patologia de la MH seria una bona opció terapèutica realitzar tractaments combinats amb l'antagonista del receptor EP1 i l'agonista del receptor EP2.

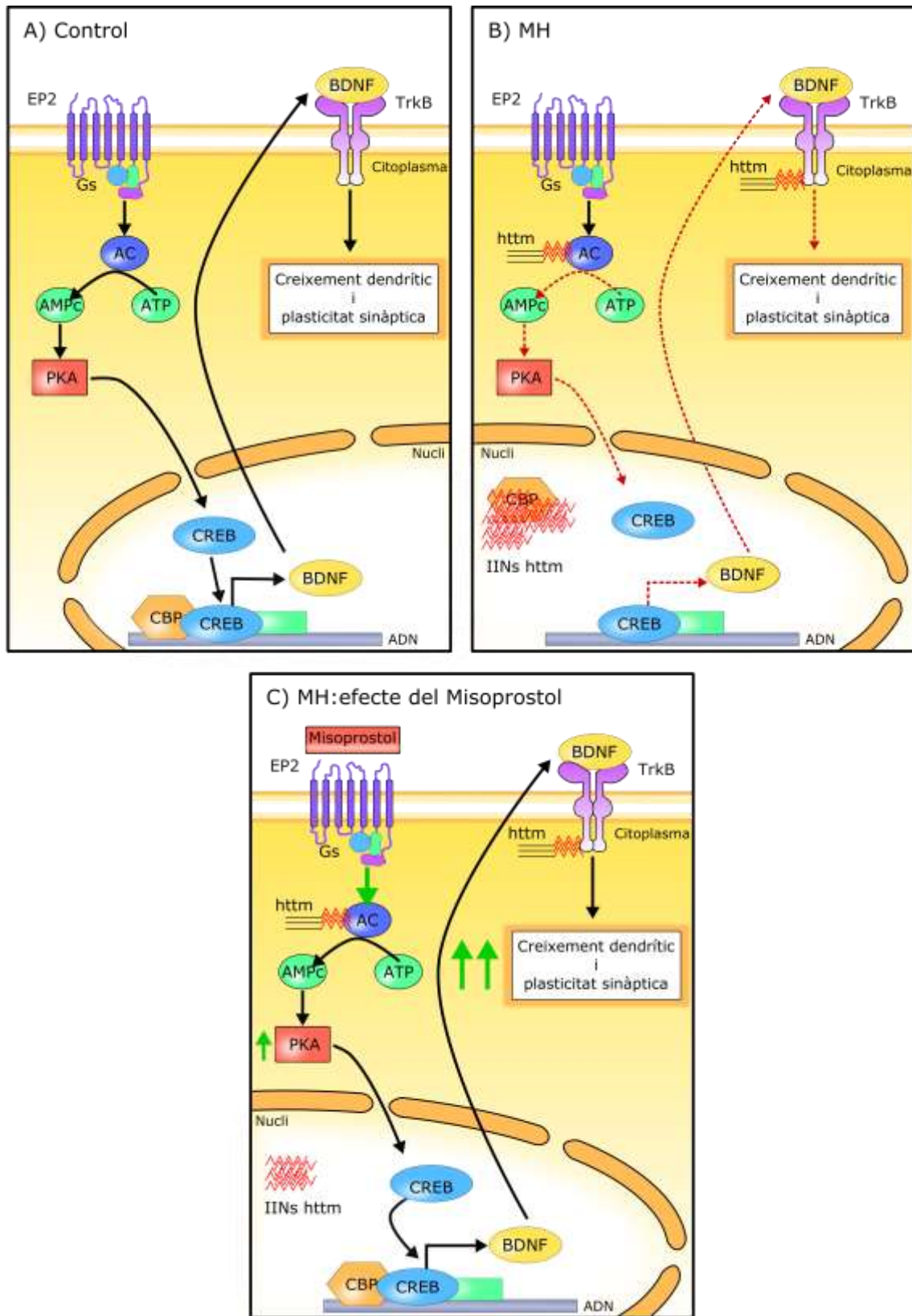


Figura 48. Activació del receptor EP2 en l'hipocamp de la MH

Il·lustració esquemàtica que representa el model proposat dels efectes beneficiosos de l'activació del receptor EP2 en la MH. A) En una situació control, el receptor EP2 activa la via AMPc/PKA/CREB induint l'activació transcripcional de CREB. B) En la MH, la presència de la httm produeix una disminució de l'AMPc, el segrest de CBP en els agregats de httm i l'alteració de l'activació de CREB. Tots aquests mecanismes generen una disrupció en la transcripció dels gens diana de CREB, entre els que es troba el

BDNF, produint alteracions en la plasticitat sinàptica que causarà dèficits en la formació de memòria. C) En el context de la MH, l'activació del receptor EP2 amb el Misoprostol, agonista d'aquest receptor, activa la via AMPc/PKA/CREB. L'activació d'aquesta via augmenta l'activitat transcripcional de CREB restaurant els nivells del BDNF. Això causarà la restauració de la plasticitat sinàptica disminuint els dèficits cognitius característics de la MH.

2. La via de senyalització d'ERK5 es troba reduïda en l'estriat de models murins i de mostres humanes de la MH, afavorint la pèrdua dels nivells estriatals de BDNF

El rol de la MAPK ERK1/2 en la supervivència, la diferenciació i la plasticitat neuronal ha estat extensament estudiat (422–425). Molts d'aquests estudis s'han basat en la inhibició de la via ERK1/2 usant els inhibidors farmacològics PD98059 i U0126. En el context de la MH, dos estudis rellevants, un dels quals ha estat publicat pel nostre grup, mostren amb l'ús d'aquests inhibidors que l'activació d'ERK1/2 és un mecanisme neuroprotector contra la toxicitat induïda per la httm. En aquests treballs es proposa que ERK1/2 representa una bona diana terapèutica en la MH (228,235). No obstant, s'ha descrit que les dosis utilitzades amb aquests inhibidors per reduir l'acció d'ERK1/2 també disminueixen l'activació d'ERK5, un altre membre de la família MAPK amb importants funcions en la supervivència i diferenciació neuronal (302,303), suggerint un paper de la proteïna ERK5 en la fisiopatologia de la MH. Per aquest motiu, i per la poca informació que existeix en la bibliografia del paper de la proteïna ERK5 en les malalties neurodegeneratives i la inexistència d'estudis sobre aquesta proteïna en la MH, vam caracteritzar la funció fisiopatològica d'ERK5 en models de la MH.

En aquesta tesi hem aportat per primer cop evidències de la implicació d'ERK5 en la fisiopatologia de la MH. En primer terme vam analitzar els nivells d'ERK5 en diferents edats a l'estriat, escorça cerebral i hipocamp dels animals R6/1. Els nostres resultats mostren una reducció específica dels nivells proteics d'ERK5 en l'estriat des de l'inici de la simptomatologia fins etapes avançades de la malaltia. Hem observat aquests disminució en dos models murins de la MH i en mostres *post mortem* de putamen provinents de pacients de la MH. Contràriament, no vam detectar cap canvi en els nivells proteics d'ERK5 en l'hipocamp dels ratolins R6/1 comparat amb els animals WT en cap de les etapes analitzades. En l'escorça d'aquests ratolins sí que hem observat una disminució en els nivells d'ERK5, tot i que aquesta disminució només té lloc a les 30 setmanes d'edat, en una fase molt avançada de la malaltia. Per tant, aquests resultats suggereixen que la via d'ERK5 pot estar contribuint a la disfunció estriatal que es produeix en la MH des d'etapes inicials de la malaltia.

V. Discussió

La desregulació transcripcional és un mecanisme patogènic clau en les etapes inicials de la MH. L'alteració en l'expressió gènica produeix la disfunció de molts mecanismes de senyalització i regulació cel·lular en la patologia de la MH (145,146,148). L'anàlisi dels nivells de l'ARNm estriatal d'ERK5 evidencia que la disminució en els nivells proteics d'ERK5 correlaciona amb una disminució en la seva transcripció. Això suggereix que la desregulació transcripcional induïda per la presència de la htt mutada està reduint la senyalització estriatal d'ERK5 disminuint la seva expressió gènica.

Adicionalment, també hem analitzat l'activació d'ERK5 estudiant els nivells de la seva fosforilació. Els nostres resultats mostren que l'activitat estriatal d'ERK5 està alterada en presència de la httm ja que tant els dos models murins com les cèl·lules estriatals *STHdh^{Q111/Q111}* presenten nivells reduïts de fosforilació d'ERK5. Hem observat que tant els ratolins R6/1 com els ratolins *KI Hdh^{Q7/Q111}* presenten un patró dual en l'activitat d'ERK5, mostrant una disminució en la seva activitat en etapes inicials de la malaltia i posteriorment un augment de la seva activació en etapes finals. En aquest cas també hem observat una alteració específica estriatal en l'activació d'ERK5 ja que no hem observat canvis significatius en els nivells de la seva fosforilació ni en l'hipocamp ni en l'escorça cerebral dels ratolins R6/1 en cap de les edats analitzades.

Per elucidar el mecanisme d'aquesta reducció hem analitzat els nivells proteics i l'activació de MEK5, la MAPKK que activa ERK5, (294,426,427). MEK5 és l'única cinasa que activa ERK5 fosforilant-la en els residus Thr218/Tyr220 (294,426,427). Els nivells proteics de MEK5 es troben disminuïts a l'estriat dels ratolins R6/1 a les 20 i 30 setmanes d'edat. Curiosament, la seva activació comença a augmentar a partir de les 20 setmanes, i és significativa a les 30 setmanes en l'estriat d'aquests ratolins. Això concorda amb el patró d'activació que mostra ERK5. Aquests resultats suggereixen que en etapes inicials de la malaltia l'activitat d'ERK5 es troba disminuïda a causa de la disminució observada en els seus nivells proteics, mentre que en etapes finals de la malaltia els nivells de fosforilació d'ERK5 es troben augmentats per un augment de l'activitat de MEK5. En el context de la MH, diferents estudis mostren que en presència de la httm la cèl·lula activa diferents mecanismes compensatoris per a contrarestar la toxicitat de la httm. Estudis realitzats en el nostre laboratori i en altres laboratoris han descrit diferents mecanismes compensatoris que s'activen a les últimes fases de la malaltia, de proteïnes com Akt (227,428), ERK1/2 (228,231), Calcineurina (213,230) i STEP (231) entre d'altres. Amb aquesta tesi, nosaltres proposem l'augment de l'activació d'ERK5 a través de l'activació de MEK5 com a mecanisme compensatori en etapes finals de la malaltia.

Per tal de saber si les variacions dels nivells proteics i de fosforilació de MEK5-ERK5 es tradueixen en variacions en l'activitat de la via, hem analitzat la fosforilació en el residu Ser387 del factor de transcripció MEF2C en el estriat de ratolins R6/1. Hem detectat una disminució estriatal en la fosforilació de MEF2c en els ratolins R6/1 a partir de les 12 setmanes d'edat, reducció que és manté fins a les 30 setmanes d'edat. Aquest fet indica que la disminució dels nivells proteics d'ERK5 està disminuint la seva activitat. Per altra banda, també assenyalava que l'augment de la fosforilació d'ERK5 a les 30 setmanes no sembla ser suficient per a estimular l'activació de la seva via. És important mencionar que la fosforilació de MEF2c en aquest residu està regulada per ERK5 però també per p38 (429). Tot i això, està descrit un augment de l'activitat de p38 en l'estriat dels ratolins R6/1 i R6/2 (231,430), portant a pensar que la reducció de MEF2C observada aquí és resultat de la disminució d'ERK5.

La via d'ERK5 ha estat descrita per la seva implicació en la senyalització cel·lular induïda per les neurotrofines i en els seus efectes neuroprotectors i de prosupervivència (291,292,304,305,307,431). Això indica que el dèficit estriatal en el suport tròfic característic de la MH podria estar afavorint la desregulació observada en la via d'ERK5. Relacionat amb aquest paper neurotròfic d'aquesta via hem observat que la sobreexpressió d'ERK5 en les cèl·lules *STHdh^{Q7/Q7}* produeix un augment en l'expressió de l'ARNm del BDNF. Addicionalment, les cèl·lules *STHdh^{Q7/Q7}* i les cèl·lules *STHdh^{Q111/Q111}* presenten un augment en els nivells proteics del BDNF després de la sobreexpressió d'ERK5. Aquestes evidències, suggereixen que la via d'ERK5 promou efectes neurotròfics estimulants l'expressió del BDNF tant en condicions fisiològiques com en el context de la MH. Diversos estudis descriuen que la via d'ERK5 fomenta la supervivència cel·lular fosforilant a la proteïna que al seu torn activa al factor de transcripció CREB (292,307). Dos treballs del nostre grup mostren la implicació de RSK en la patologia de la MH i proposen que la seva activitat protegeix contra la toxicitat induïda per la httm (432,433). Així, suggerim que els efectes neurotròfics observats després de la sobreexpressió d'ERK5 poden ser deguts a l'augment en l'activitat del factor de transcripció MEF2c i de RSK. No obstant, en aquest treball ens faltaria corroborar aquest plantejament. A més, seria necessari demostrar si l'estimulació amb neurotrofines podria restaurar l'activitat d'aquesta via i també si la restauració d'aquesta podria induir millores funcionals en processos de supervivència o morfologia neuronal.

En resum, els nostres resultats ens permeten proposar que la via d'ERK5 pot estar implicada en la disfunció neuronal de l'estriat i pot contribuir en els dèficits cognitius i motors dependents de la funció estriatal característics de la MH. També podem assenyalar que

l'activació d'aquesta via podria protegir dels dèficits neurotròfics generats per la httm. Encara que s'ha de continuar estudiant el seu paper funcional, els nostres resultats proporcionen suficients evidències per a considerar la via d'ERK5 com una bona diana estriatal per a desenvolupar noves estratègies terapèutiques. També ens permet proposar que l'estimulació farmacològica conjunta d'ERK1/2 i ERK5 podria ser una bona aproximació terapèutica en el context de la MH (figura 49).

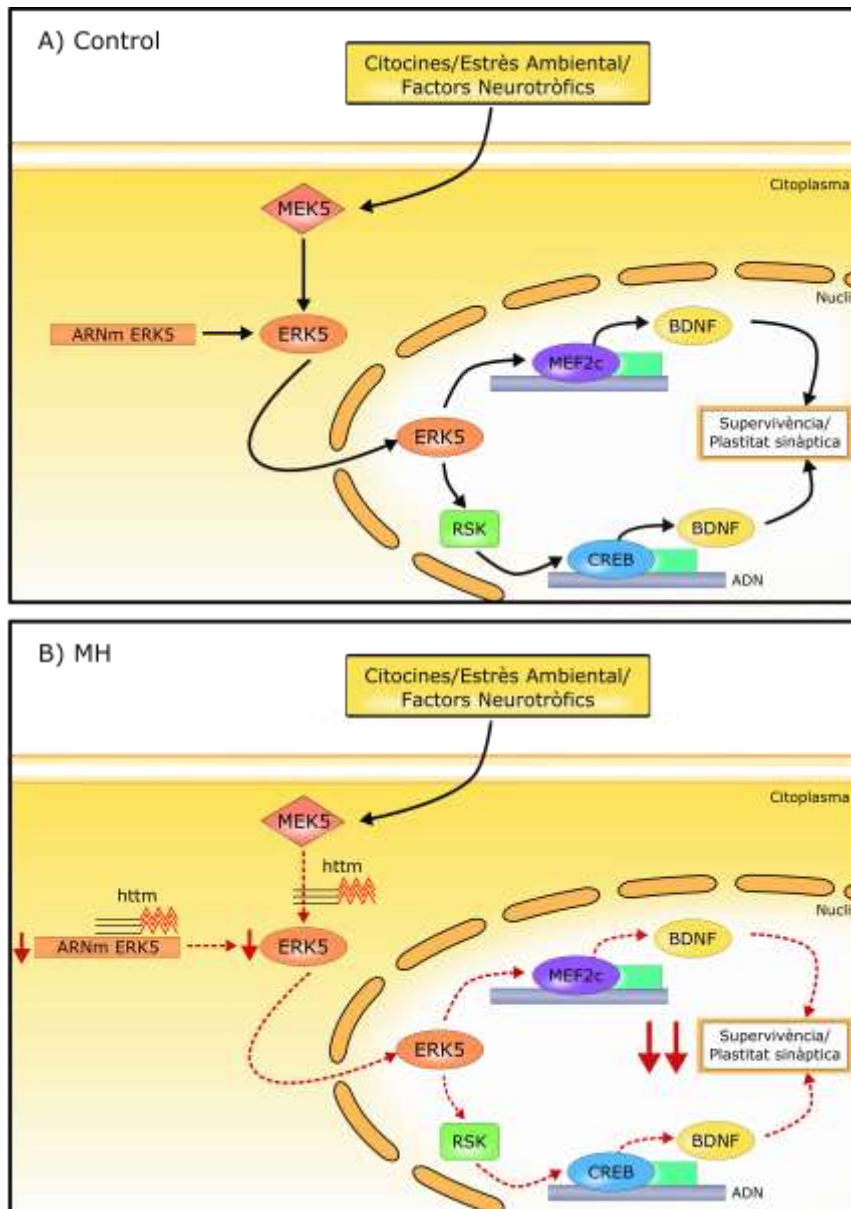


Figura 49. Alteració de la cinasa ERK5 en l'estriat de la MH

Esquema representatiu de la implicació d'ERK5 en la fisiopatologia de la MH. A) En una situació control diferents estímuls extracel·lulars, com són citocines, factors de creixement i estrès ambiental, activen la MAPKK MEK5 que fosforila i activa ERK5. L'activació d'ERK5 comporta la seva translocació al nucli on activarà a la cinasa RSK que activa al factor de transcripció CREB i també el factor de transcripció MEF2. L'activitat d'aquests dos factors de transcripció augmentarà l'expressió dels seus gens diana, com per exemple el BDNF induint supervivència cel·lular i plasticitat sinàptica. B) En el context de la MH, la presència de la httm disminueix l'activitat d'ERK5 en l'estriat reduint els nivells d'ARNm d'ERK5. Com a

conseqüència ERK5 no podrà estimular l'acció d'ERK5, produint una disminució en els nivells del BDNF que generarà una disminució de la supervivència cel·lular i problemes en la plasticitat sinàptica.

3. La família de factors de transcripció MEF2 està disminuïda en l'hipocamp de la MH, implicant dèficits transcripcionals i pèrdua de funció cognitiva

La família de factors de transcripció MEF2 ha estat àmpliament estudiada per la seva funció en el teixit muscular i la seva implicació en les patologies d'aquest teixit (322,434–437). Posteriorment, es va observar que MEF2 tenia una alta expressió en les neurones i que té una funció essencial en el SNC (324,438,439). En els últims anys, un gran nombre de treballs han mostrat que MEF2 té un paper clau en la supervivència (329,337,338), la plasticitat sinàptica (340–344,440) i els processos de formació de memòria dependent de l'hipocamp (345–347,441). A més, diversos estudis genètics han posat encara més de rellevància la importància d'aquest factor de transcripció en la funció neuronal. Per una banda, el grup de Flavell et al. va definir l'extens programa genètic que controla MEF2, on s'observa la seva implicació en el control dels processos mencionats anteriorment (351). Per altra banda, diferents grups han descrit les seqüències genòmiques SARE, que controlen l'expressió de gens regulats per activitat neuronal i que conté llocs d'unió per als factors de transcripció MEF2, CREB i SRF. Aquestes seqüències permeten l'acció i l'elaboració d'una resposta coordinada d'aquests tres factors de transcripció quan es genera activitat neuronal (352–354).

La desregulació de l'activitat de MEF2 ha estat relacionada amb diferents malalties neurològiques (349,355,356,442) i també amb malalties neurodegeneratives com la malaltia de Parkinson i la SCA1 (331,349,357,358). Tot i això, no hi ha cap estudi que vinculi a MEF2 amb l'alteració transcripcional de la MH. Com que la desregulació transcripcional és un fenomen molt ben documentat en la MH (146–148,166) i el control de l'expressió gènica per activitat neuronal és essencial en els processos cognitius d'aprenentatge i memòria (336,348,349,395), l'estudi de MEF2 en el context de la MH és necessari. En aquesta tesi, hem descrit per primer cop que MEF2 es troba desregulat en l'hipocamp de dos models murins de la MH, els ratolins R6/1 i els ratolins KI Hdh^{Q7/Q111}. Els nostres resultats mostren que aquests dos models murins presenten una disminució dels nivells proteics de MEF2 en l'hipocamp. Aquesta disminució s'inicia en els ratolins R6/1 a partir de les 12 setmanes d'edat i en els ratolins KI Hdh^{Q7/Q111} a partir dels 6 mesos d'edat, coincidint amb l'edat d'aparició dels dèficits cognitius, i es manté al llarg de la progressió de la malaltia. Aquests resultats suggereixen una associació entre la disminució del factor de

V. Discussió

transcripció MEF2 i el desenvolupament dels dèficits cognitius observats en aquests models murins de la MH.

A continuació, ens vam centrar en estudiar quin o quins mecanismes estaven causant la reducció específica de MEF2 en l'hipocamp d'aquests ratolins. Inicialment, ens vam preguntar si la disminució en els nivells de MEF2, a part d'estar contribuint a la desregulació transcripcional hipocampal també podia ser causa d'aquesta. Per aquest motiu vam analitzar els nivells d'ARNm de MEF2 en l'hipocamp dels ratolins R6/1 a les 8, 20 i 30 setmanes. No vam observar canvis en cap de les edats analitzades, fet que ens indica que la disminució de MEF2 observada en els ratolins R6/1 no és deguda a alteracions transcripcionals. Per un altre costat, el grup de Bolger et al. va demostrar que l'ataxina-1 s'uneix i colocalitza amb MEF2 en les IIN d'ataxina-1 (331). En aquest treball es mostra que l'ataxina-1 actua com un repressor de la transcripció dependent de MEF2. La sobreexpressió de MEF2 en aquest context és capaç de rescatar parcialment la toxicitat cel·lular causada per l'ataxina-1. Els autors també suggereixen que el segrest de MEF2 en les IIN d'ataxina-1 i la seva repressió poden estar contribuint a la neurotoxicitat i neurodegeneració en aquesta malaltia (331). És important tenir en compte que l'ataxina-1 és una proteïna poliQ que causa el desordre neurodegeneratiu SCA1. En el context de la MH també s'ha demostrat que la httm interactua i segresta en les IIN diversos factors de transcripció, com són TBP, CPB, p53, NF- κ B i Sp1 (149–151,166,443). Per totes aquestes raons, vam estudiar si existia una possible interacció entre MEF2 i la httm. Tanmateix, no vam detectar interacció entre MEF2 i la httm analitzada per immunoprecipitació ni tampoc vam poder distingir l'existència de colocalització entre MEF2 i les IIN de httm en l'hipocamp dels ratolins R6/1 per immunohistoquímica. Per tant, podem assegurar que les alteracions hipocampals de MEF2 presents en aquests ratolins no són causades per la retenció de MEF2 a les IIN de httm.

De manera interessant, diversos estudis han descrit que en situacions d'excitotoxicitat i estrès cel·lular es produeix una disminució en els nivells proteics de MEF2. En aquests estudis s'ha associat aquesta disminució en els nivells proteics de MEF2 amb un augment del seu clivatge per caspases (376–378). En concret s'ha descrit que l'acció de les caspases 3 i 7 són les que estan implicades en el clivatge de MEF2 (343,376). Cal ressaltar l'estudi de Chen et al. on es relaciona aquest mecanisme de degradació de MEF2 amb processos de plasticitat morfològica i funcional (343). Per tal d'estudiar si aquest mecanisme podia estar succeint en la MH, vam utilitzar cultius primaris hipocampals. En un primer terme, vam observar que els cultius primaris que provenen de l'hipocamp d'embrions R6/1 presentaven una disminució en els nivells proteics de MEF2 respecte els cultius realitzats a partir dels hipocamps d'embrions WT. L'addició d'un

pan inhibidor de caspases, el zVAD, era suficient per recuperar els nivells de MEF2 en els cultius primaris hipocampals R6/1. Paral·lelament, vam observar que la disminució de MEF2 correlacionava amb un augment de l'activitat caspasa 3 en els cultius primaris hipocampals R6/1. Com que l'activació de caspases està considerada com un dels passos finals dels esdeveniments bioquímics que generen la mort cel·lular apoptòtica, vam examinar si hi havia un augment de mort cel·lular en els cultius hipocampals primaris R6/1. No vam observar un augment en el % de mort cel·lular en els cultius R6/1. En aquest sentit, en aquesta última dècada han aparegut un nombre creixent d'articles que relacionen l'activitat subletal de les caspases amb processos de plasticitat sinàptica (344,444–446). De fet, en el treball mencionat de Chen et al. proposen la implicació de les caspases en la disminució de MEF2 com un dels nous rols no-apoptòtics associat a aquestes proteases i involucrat en la plasticitat morfològica i funcional (343). En conjunt aquests experiments poden estar indicant que les alteracions en els nivells de MEF2 que havíem observat en els models murins de la MH poden estar relacionades amb un augment del seu clivatge per caspases. Tot i que seria necessari corroborar aquesta hipòtesi *in vivo*, els nostres resultats concorden amb la bibliografia existent.

També vam voler estudiar si l'activació farmacològica de MEF2 podia induir millores cognitives en els animals R6/1 per tal d'avaluar el potencial de MEF2 com a diana terapèutica. Per això, vam utilitzar la interacció que existeix entre la família d'HDAC de la classe IIa i MEF2. Està molt ben documentat que la família d'HDAC de la classe IIa interacciona amb MEF2, reprimint la seva acció (330,332,447). De fet, alguns autors defineixen aquestes dues famílies de proteïnes com una única maquinària transcripcional, proposant el concepte d'eix MEF2-HDAC de la classe IIa (333,334). En aquest treball hem utilitzat el compost BML-210, agent farmacològic que té la capacitat d'inhibir la interacció entre MEF2 i les HDAC de la classe IIa, activant la transcripció regulada per MEF2 (359). Vam estudiar la capacitat terapèutica del BML-210 *in vitro*, en cultius primaris de neurones hipocampals de neurones WT i R6/1, i *in vivo*, en animals R6/1.

En els estudis realitzats *in vitro*, vam poder percebre que els cultius R6/1 mostraven un menor nombre de neurites i una disminució en la llargària de l'arbre neurític respecte als cultius WT. Tot seguit, vam analitzar aquests dos paràmetres morfològics després del tractament amb BML-210 i el BDNF (utilitzat com a control positiu). Vam observar que el BDNF induïa efectes beneficiosos morfològics tant en els cultius WT com en els cultius R6/1. En canvi, el tractament amb BML-210 només mostrava millores morfològiques en els cultius R6/1. Això indica un efecte específic del BML-210 en presència de la htm. MEF2 ha estat implicat en la regulació de la

V. Discussió

morfogènesis neurítica i també ha estat caracteritzat com un regulador de la plasticitat homeostàtica i del refinament neuronal (323,341–344,351). Aquest efecte específic del compost BML-210 en els cultius hipocampals R6/1 pot ser degut al fet que els cultius WT no mostren alteracions en els nivells de MEF2, i per tant el tractament amb aquest compost no produeix cap alteració en la morfologia neurítica. En canvi, en els cultius R6/1 que presenten nivells reduïts de MEF2, la seva activació amb el compost BML-210 genera una millora en la morfologia neurítica.

Aquest efecte morfològic observat *in vitro* té una correspondència funcional *in vivo*. L'administració de BML-210 en animals R6/1 en edats on presenten dèficits cognitius indueix una millora en la seva capacitat de memòria, analitzada amb el NOLT i el NORT, comparat amb animals R6/1 vehicle. La transcripció dependent de MEF2 ha estat relacionada amb mecanismes de plasticitat sinàptica i de formació de memòria dependent de la funció hipocampal (345–347,441). Hem confirmat que el tractament amb BML-210 disminueix la interacció entre MEF2 i la HDAC4, un dels membres més estudiats de les HDAC de la classe IIa, permetent un major grau d'activació d'aquest factor de transcripció. S'ha caracteritzat que la HDAC4 controla un programa genètic essencial en els processos de plasticitat sinàptica i memòria. A més, s'ha descrit que MEF2 controla una part important d'aquest programa transcripcional (332). Concordant amb això, en un model de *Drosophila* s'ha observat que la sobreexpressió de la HDAC4 afecta la formació de memòria a llarg termini a través de la interacció amb MEF2 (448). En el context de la MH s'ha descrit que de tots els models murins KD generats per a les HDAC, l'únic que ha mostrat millores conductuals i una disminució en els agregats citoplasmàtics de la httm ha estat el de la HDAC4 (176–180). Els nostres resultats i les dades bibliogràfiques indiquen que la inhibició de la interacció de MEF2 i les HDAC de la classe IIa i la conseqüent activació de MEF2 millora els dèficits cognitius en els ratolins R6/1.

Finalment, també hem observat que la millora en els dèficits cognitius en aquest model murí correlaciona amb la recuperació dels nivells de les proteïnes Arc i Sinaptofisina. Aquestes dues proteïnes tenen un paper clau en els processos de formació de memòria. Arc és un gen diana de MEF2, estimulat per l'activitat neuronal, que s'expressa ràpidament en situacions d'activació sinàptica i que està altament relacionat amb la formació de memòria (345,349,351,353,354). Tanmateix, s'ha descrit que l'expressió d'Arc es troba reduïda en l'hipocamp dels ratolins KI Hdh^{Q7/Q111} (166). La proteïna Sinaptofisina és una proteïna vesicular presinàptica usada com a marcador sinàptic ja que permet obtenir informació sobre la densitat de les estructures sinàptiques en el SNC (382–384), de manera que és probable que les millores

cognitives observades després del tractament amb BML-210 estiguin associades a la recuperació dels nivells proteics d'aquestes dues proteïnes gràcies a un augment de l'activitat de MEF2 (figura 50).

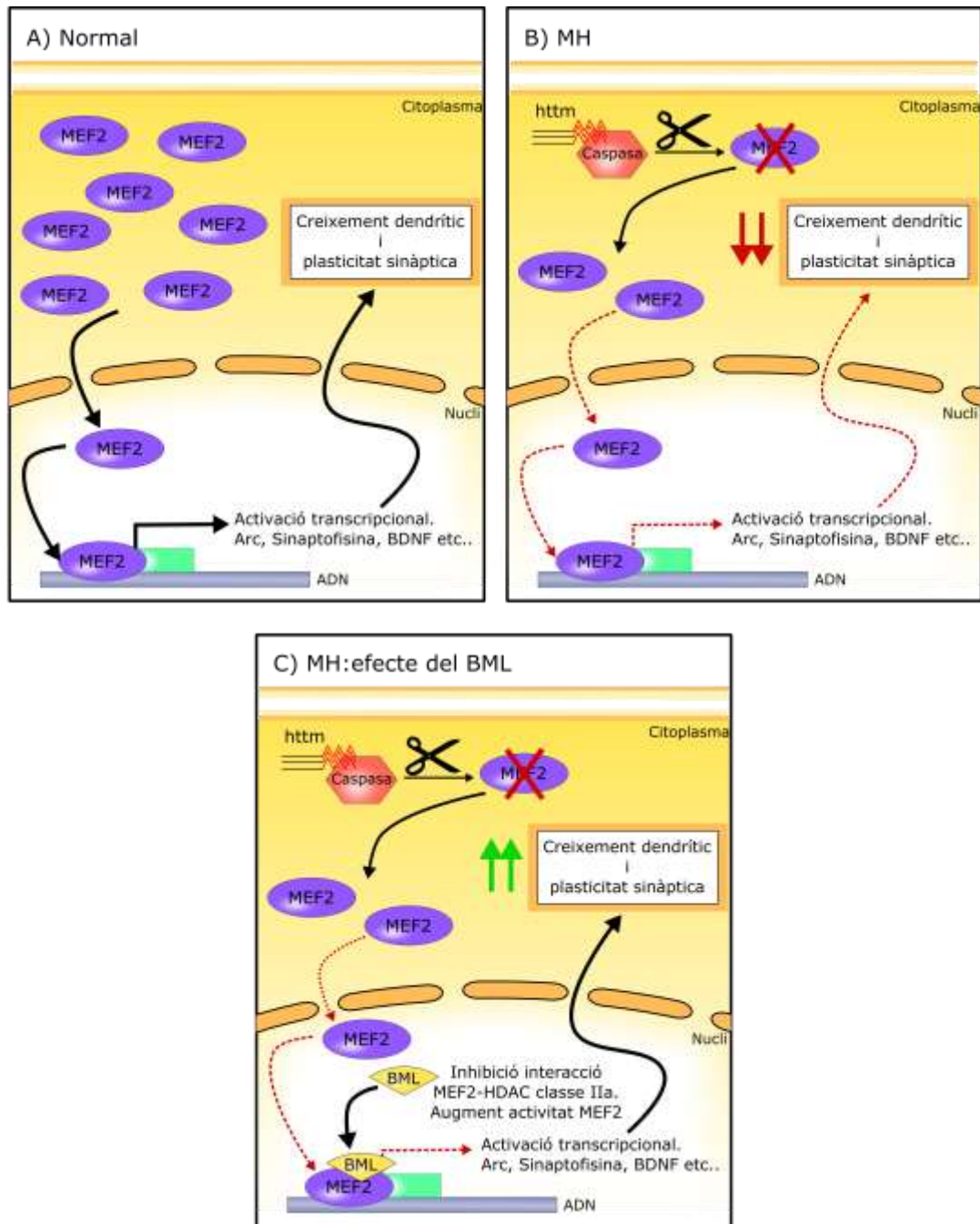


Figura 50. Activació del factor de transcripció MEF2 en l'hipocamp de la MH

Il·lustració esquemàtica de la implicació del factor de transcripció MEF2 en la fisiopatologia de la MH i de l'efecte favorable de la seva activació en aquesta malaltia. A) En una situació normal, l'activitat transcripcional de MEF2 estimula l'expressió de gens com Arc, Sinaptofisina, BDNF, entre d'altres, que són fonamentals en els processos de creixement dendrític i plasticitat sinàptica. B) En la MH, la presència de la httm disminueix els nivells de MEF2 augmentant la seva degradació per caspases. La reducció de MEF2 altera l'expressió dels seus gens diana produint alteracions en el creixement dendrític i la plasticitat sinàptica que causaran els dèficits cognitius característics de la MH. C) L'augment de l'activitat

V. Discussió

transcripcional de MEF2 degut a l'ús del compost BML-210 genera un augment de l'expressió dels seus gens diana. La recuperació de l'expressió proteica d'Arc i Sinaptofisina produirà millores en el creixement dendrític i la plasticitat sinàptica que ajudaran a disminuir els dèficits cognitius presents en la MH.

Globalment amb aquest treball, proposem que la reducció de MEF2 en l'hipocamp pot estar involucrada en la fisiopatologia de la MH. L'alteració en els nivells hipocampals de MEF2 estaria causada per alteracions en els seu clivatge per caspases i contribuint als dèficits cognitius dependents de la funció hipocampal que presenten els ratolins R6/1. També assenyaem que l'activació farmacològica de MEF2, inhibint l'efecte repressor que exerceixen sobre ell les HDAC de la classe IIa, pot representar una bona estratègia terapèutica en el context de la MH (figura 50).

VI. Conclusions

*L'ombra
delata
la llum
i la llum
la presència*

Joan Reguant Aleix

1. El receptor de la PGE₂ EP2 representa un bon candidat terapèutic en la MH ja que el tractament amb el seu agonista Misoprostol produeix millores cognitives en els ratolins R6/1.
2. Les millores cognitives observades en els ratolins R6/1 tractats amb Misoprostol estan associades a una recuperació hipocampal dels nivells proteics dels marcadors sinàptics PSD95 i VGlut1, suggerint que el receptor EP2 té la capacitat de promoure la plasticitat sinàptica en el context de la MH.
3. L'activació del receptor EP2 amb Misoprostol indueix increments del BDNF específics de l'hipocamp, però no en el còrtex ni en l'estriat. El tractament amb Misoprostol en cultius primaris hipocampals incrementa el creixement neurític d'una manera dependent del BDNF, i per tant atenua els dèficits tròfics característics de la MH.
4. L'estimulació del receptor EP2 amb Misoprostol té la capacitat de reduir les IIN de httm en el Gir Dentat de l'hipocamp en els ratolins R6/1.
5. La reducció dels nivells proteics d'ERK5 és un procés específic en l'estriat de la MH, observat en dos models murins de la MH i en mostres *post mortem* de pacients de la MH. Aquesta reducció està associada a una disminució de l'ARNm d'ERK5.
6. La reducció d'ERK5 implica una menor activació de la seva via de senyalització, ja que es troba associada a una disminució de la fosforilació dels seus substrats transcripcionals.
7. La reducció de l'activitat de la via de senyalització ERK5 contribueix en els dèficits tròfics de la MH, ja que la inducció d'un augment en els nivells d'ERK5 en un model cel·lular de la MH és suficient per incrementar els nivells del BDNF.
8. La família de factors de transcripció MEF2 es troba reduïda en l'hipocamp de la MH indicant que pot contribuir en els dèficits transcripcionals característics de la MH.

VI. Conclusions

9. La disminució en els nivells proteics de MEF2 es veu bloquejada en presència d'un pan inhibidor de caspases, suggerint que la reducció dels nivells proteics de MEF2 podria ser deguda a un augment del seu clivatge per caspases.
10. L'activació de MEF2 amb el compost BML-210 produeix millores neurotròfiques millorant la complexitat neurítica en cultius primaris hipocampals R6/1.
11. El tractament amb BML-210 restaura els dèficits cognitius i transcripcionals associats a la funció hipocampal en els ratolins R6/1, augmentant els nivells de proteïnes regulades per MEF2, com són Arc i Sinaptofisina.

VII. Referències

*“Quan sigui l'arbre,
esdevindran els boscos
només naufragi”
Salvador Espriu*

1. Huntington G. On chorea. *Med Surg Report*. 1872;26(19).
2. Vonsattel JP, DiFiglia M. Huntington disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1998;57(5):369–84.
3. Martin JB, Gusella JF, Martin JB, Gusella JF. Huntington's disease. Pathogenesis and management. *N Engl J Med*. 1986;315(20):1267–76.
4. Harper PS. The epidemiology of Huntington's disease. *Hum Genet*. 1992;89(4):365–76.
5. Rawlins M. Huntington's disease out of the closet? *Lancet*. 2010;376(9750):1372–3.
6. Evans S, Douglas I, Rawlins M, Wexler N, Tabrizi S, Smeeth L. Prevalence of adult Huntington's disease in the UK based on diagnoses recorded in general practice records. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013;84(10):1156–60.
7. Rawlins MD, Wexler NS, Wexler AR, Tabrizi SJ, Douglas I, Evans SJW, et al. The prevalence of huntington's disease. *Neuroepidemiology*. 2016;46(2):144–53.
8. Pringsheim T, Wiltshire K, Day L, Dykeman J, Steeves T, Jette N. The incidence and prevalence of Huntington's disease: A systematic review and meta-analysis. *Mov Disord*. 2012;27(9):1083–91.
9. Morrison PJ. Prevalence estimates of Huntington disease in Caucasian populations are gross underestimates. *Mov Disord*. 2012;27(13):1707–8.
10. Wexler A. The art of medicine : Stigma, history, and Huntington's disease. *Lancet*. 2010;376(9734):18–9.
11. Davenport C, Muncey E. Huntington's chorea in relation to heredity and eugenics. *Am J Psychiatry*. 1916;73(2):195–222.
12. HD CRG. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*. 1993;72(6):971–83.
13. Gusella JF, Wexler NS, Conneally PM, Naylor SL, Anderson M a, Tanzi RE, et al. A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature*. 1983;306(5940):234–8.
14. Nopoulos PC. Huntington disease: A single-gene degenerative disorder of the striatum.

VII. Referències

- Dialogues Clin Neurosci. 2016;18(1):91–8.
15. Rubinsztein DC, Leggo J, Coles R, Almqvist E, Biancalana V, Cassiman JJ, et al. Phenotypic characterization of individuals with 30-40 CAG repeats in the Huntington disease (HD) gene reveals HD cases with 36 repeats and apparently normal elderly individuals with 36-39 repeats. *Am J Hum Genet.* 1996 Jul;59(1):16–22.
 16. European Huntington's disease Network (EHDN). About Huntington's Disease [Internet]. 2016 [cited 2017 Aug 28]. Available from: <http://www.ehdn.org>.
 17. Squitieri F, Jankovic J. Huntington's disease: How intermediate are intermediate repeat lengths? *Mov Disord.* 2012;27(14):1714–7.
 18. Ghosh R, Tabrizi SJ. Clinical Aspects of Huntington's Disease. *Curr Top Behav Neurosci.* 2015;22:3–31.
 19. Langbehn DR, Brinkman RR, Falush D, Paulsen JS, Hayden MR. A new model for prediction of the age of onset and penetrance for Huntington's disease based on CAG length. *Clin Genet.* 2004;65(4):267–77.
 20. Tabrizi SJ, Scahill RI, Owen G, Durr A, Leavitt BR, Roos RA, et al. Predictors of phenotypic progression and disease onset in premanifest and early-stage Huntington's disease in the TRACK-HD study: Analysis of 36-month observational data. *Lancet Neurol.* 2013;12(7):637–49.
 21. Alberch J, López M, Badenas C, Carrasco J, Milà M, Muñoz E, et al. Association between BDNF Val66Met polymorphism and age at onset in Huntington disease. *Neurology.* 2005;27;65(6):964–5.
 22. Wexler N, Lorimer J, Porter J, et al. Venezuelan kindreds reveal that genetic and environmental factors modulate Huntington's disease age of onset. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;9;101(10):3498–503.
 23. Quarrell OWJ, Nance MA, Nopoulos P, Paulsen JS, Smith JA, Squitieri F. Managing juvenile Huntington's disease. *Neurodegener Dis Manag.* 2013;3(3).
 24. Wheeler VC, Persichetti F, McNeil SM, Mysore JS, Mysore SS, MacDonald ME, et al. Factors associated with HD CAG repeat instability in Huntington disease. *J Med Genet.* 2007;44(11):695–701.

25. Agostinho LA, dos Santos SR, Alvarenga RMP, Paiva CLA. A systematic review of the intergenerational aspects and the diverse genetic profiles of Huntington's disease. *Genet Mol Res.* 2013;12(2):1974–81.
26. Almqvist EW, Elterman DS, MacLeod PM HM. High incidence rate and absent family histories in one quarter of patients newly diagnosed with Huntington disease in British Columbia. *Clin Genet.* 2001;60(3):198–205.
27. Shoulson I, Fahn S. Huntington disease: clinical care and evaluation. *Neurology.* 1979;29(1):1–3.
28. Huntington Study Group. Unified Huntington's Disease Rating Scale: Reliability and Consistency. *Mov Disord.* 1996;11(2):136142.
29. Paulsen JS, Langbehn DR, Stout JC, Aylward E, Ross CA, Nance M, et al. Detection of Huntington's disease decades before diagnosis: the Predict-HD study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2008;79(8):874–80.
30. Lawrence AD, Hodges JR, Rosser AE, Kershaw A, Ffrench-Constant C, Rubinsztein DC, et al. Evidence for specific cognitive deficits in preclinical Huntington's disease. *Brain.* 1998;121:1329–41.
31. Peavy GM, Jacobson MW, Goldstein JL, Hamilton JM, Kane A, Gamst AC, et al. Cognitive and functional decline in Huntington's disease: Dementia criteria revisited. *Mov Disord.* 2010;25(9):1163–9.
32. Craufurd D, Snowden J. Neuropsychological and neuropsychiatric aspects of Huntington's disease. In: Bates G, Harper P, Jones L, editors. *Huntington's Disease.* 3rd edn. Oxford University Press; 2002. p. 62–94.
33. Paulsen JS, Ready RE, Hamilton JM, Mega MS, Cummings JL. Neuropsychiatric aspects of Huntington's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2001;71:310–4.
34. Thompson JC, Harris J, Sollom AC, Stopford CL, Howard E, Snowden JS, et al. Longitudinal Evaluation of Neuropsychiatric Symptoms in Huntington's Disease. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 2012;24(1):53–60.
35. Rothlind JC, Bylsma FW, Peyser C, Folstein SE, Brandt J. Cognitive and motor correlates of everyday functioning in early Huntington's disease. *J Nerv Ment Dis.* 1993;181(3):194–

VII. Referències

- 9.
36. Borrell-Pagès M, Zala D, Humbert S, Saudou F. Huntington's disease: From huntingtin function and dysfunction to therapeutic strategies. *Cell Mol Life Sci.* 2006;63(22):2642–60.
37. Marques Sousa C, Humbert S. Huntingtin: here, there, everywhere! *J Huntingtons Dis.* 2013;2(4):395–403.
38. Chiu E, Alexander L. Causes of death in Huntington's disease. *Med J Aust.* 1982;1(4):153.
39. DiFiglia M, Sapp E, Chase KO, Davies SW, Bates GP, Vonsattel JP, et al. Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science.* 1997;277(5334):1990–3.
40. Liu N, Bonini NM. Host cell neurotoxicity in polyglutamine disease. *Cell.* 2006;127(7):1299–300.
41. Landwehrmeyer GB, McNeil SM, Dure LS, Ge P, Aizawa H, Huang Q, et al. Huntington's disease gene: Regional and cellular expression in brain of normal and affected individuals. *Ann Neurol.* 1995;37(2):218–30.
42. Ferrante RJ, Gutekunst C a, Persichetti F, McNeil SM, Kowall NW, Gusella JF, et al. Heterogeneous topographic and cellular distribution of huntingtin expression in the normal human neostriatum. *J Neurosci.* 1997;17(9):3052–63.
43. Ko J, Ou S, Patterson PH. New anti-huntingtin monoclonal antibodies: Implications for huntingtin conformation and its binding proteins. *Brain Res Bull.* 2001;56(3–4):319–29.
44. Hoogeveen AT, Willemsen R, Meyer N, de Rooij KE, Roos RA, van Ommen GJ, et al. Characterization and localization of the Huntington disease gene product. *Hum Mol Genet.* 1993;2(12):2069–73.
45. Trottier Y, Devys D, Imbert G, Saudou F, An I, Lutz Y, et al. Cellular localization of the Huntington's disease protein and discrimination of the normal and mutated form. *Nat Genet.* 1995;10:196–201.
46. Saudou F, Humbert S. The Biology of Huntingtin. *Neuron.* 2016;89(5):910–26.

47. Bhide PG, Day M, Sapp E, Schwarz C, Sheth A, Kim J, et al. Expression of normal and mutant huntingtin in the developing brain. *J Neurosci*. 1996;16(17):5523–35.
48. Arndt J, Chaibva M, Legleiter J. The emerging role of the first 17 amino acids of huntingtin in Huntington's disease. *Biomol Concepts*. 2015;6(1):33–46.
49. Rockabrand E, Slepko N, Pantalone A, Nukala VN, Kazantsev A, Marsh JL, et al. The first 17 amino acids of Huntingtin modulate its sub-cellular localization, aggregation and effects on calcium homeostasis. *Hum Mol Genet*. 2007;16(1):61–77.
50. Harjes P, Wanker EE. The hunt for huntingtin function: interaction partners tell many different stories. *Trends Biochem Sci*. 2003;28(8):425–33.
51. Ignatova Z, Gierasch LM. Inhibition of protein aggregation in vitro and in vivo by a natural osmoprotectant. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(36):13357–61.
52. Faber P, Barnes G, Srinidhi J, Chen J, Gusella JF, MacDonald M. Huntingtin interacts with a family of WW domain proteins. *Hum Mol Genet*. 1998;7(9):1463–74.
53. Andrade MA, Bork P. HEAT repeats in the Huntington's disease protein. *Nat Genet*. 1995;11(2):115–6.
54. Palidwor GA, Shcherbinin S, Huska MR, Rasko T, Stelzl U, Arumughan A, et al. Detection of alpha-rod protein repeats using a neural network and application to huntingtin. *PLoS Comput Biol*. 2009;5(3):e1000304.
55. Steffan JS, Agrawal N, Pallos J, Rockabrand E, Trotman L, Slepko N, et al. SUMO modification of Huntingtin and Huntington's disease pathology. *Science* (80-). 2004;304(5667):100–4.
56. Cong X, Held JM, DeGiacomo F, Bonner A, Chen JM, Schilling B, et al. Mass spectrometric identification of novel lysine acetylation sites in huntingtin. *Mol Cell Proteomics*. 2011;10(10):M111.009829.
57. Yanai A, Huang K, Kang R, Singaraja RR, Arstikaitis P, Gan L, et al. Palmitoylation of huntingtin by HIP14 is essential for its trafficking and function. *Nat Neurosci*. 2006;9(6):824–31.
58. Luo S, Vacher C, Davies JE, Rubinsztein DC. Cdk5 phosphorylation of huntingtin reduces

VII. Referències

- its cleavage by caspases: Implications for mutant huntingtin toxicity. *J Cell Biol.* 2005;169(4):647–56.
59. Xia J, Lee D, Taylor J, Vandelft M, Truant R. Huntingtin contains a highly conserved nuclear export signal. *Hum Mol Genet.* 2003;12(12):1393–403.
60. Bessert DA, Gutridge KL, Dunbar JC, Carlock LR. The identification of a functional nuclear localization signal in the Huntington disease protein. *Brain Res Mol Brain Res.* 1995;33(1):165–73.
61. Futter M, Diekmann H, Schoenmakers E, Sadiq O, Chatterjee K, Rubinsztein DC. Wild-type but not mutant huntingtin modulates the transcriptional activity of liver X receptors. *J Med Genet.* 2009;46(7):438–46.
62. Seong IS, Woda JM, Song JJ, Lloret A, Abeyrathne PD, Woo CJ, et al. Huntingtin facilitates polycomb repressive complex 2. *Hum Mol Genet.* 2009;19(4):573–83.
63. Zuccato C, Tartari M, Crotti A, Goffredo D, Valenza M, Conti L, et al. Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes. *Nat Genet.* 2003;35(1):76–83.
64. Zuccato C, Ciammola A, Rigamonti D, Leavitt BR, Goffredo D, Conti L, et al. Loss of Huntingtin-Mediated BDNF Gene Transcription in Huntington's Disease. *Science* (80-). 2001;293(5529):493–8.
65. Caviston JP, Zajac AL, Tokito M, Holzbaur ELF. Huntingtin coordinates the dynein-mediated dynamic positioning of endosomes and lysosomes. *Mol Biol Cell.* 2011;22(4):478–92.
66. Gauthier LR, Charrin BC, Borrell-Pagès M, Dompierre JP, Rangone H, Cordelières FP, et al. Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell.* 2004;118(1):127–38.
67. Wong YC, Holzbaur ELF. The regulation of autophagosome dynamics by huntingtin and HAP1 is disrupted by expression of mutant huntingtin, leading to defective cargo degradation. *J Neurosci.* 2014;34(4):1293–305.
68. Waelter S, Scherzinger E, Hasenbank R, Nordhoff E, Lurz R, Goehler H, et al. The huntingtin interacting protein HIP1 is a clathrin and alpha-adaptin-binding protein

- involved in receptor-mediated endocytosis. *Hum Mol Genet.* 2001;10(17):1807–17.
69. Parsons MP, Kang R, Buren C, Dau A, Southwell AL, Doty CN, et al. Bidirectional control of Postsynaptic Density-95 (PSD-95) clustering by Huntingtin. *J Biol Chem.* 2014;289(6):3518–28.
 70. Zheng C-Y, Seabold GK, Horak M, Petralia RS. MAGUKs, Synaptic Development, and Synaptic Plasticity. *Neurosci.* 2011;17(5):493–512.
 71. Rigamonti D, Sipione S, Goffredo D, Zuccato C, Fossale E, Cattaneo E. Huntingtin's Neuroprotective Activity Occurs via Inhibition of Procaspase-9 Processing. *J Biol Chem.* 2001;276(18):14545–8.
 72. Zhang Y, Leavitt BR, Van Raamsdonk JM, Dragatsis I, Goldowitz D, Macdonald ME, et al. Huntingtin inhibits caspase-3 activation. *EMBO J.* 2006;25:5896–906.
 73. Dragatsis I, Efstratiadis A, Zeitlin S. Mouse mutant embryos lacking huntingtin are rescued from lethality by wild-type extraembryonic tissues. *Development.* 1998;125(8):1529–39.
 74. Gervais FG, Singaraja R, Xanthoudakis S, Gutekunst C-A, Leavitt BR, Metzler M, et al. Recruitment and activation of caspase-8 by the Huntingtin-interacting protein Hip-1 and a novel partner Hipp1. *Nat Cell Biol.* 2002;4(2):95–105.
 75. Nasir J, Floresco SB, O'Kusky JR, Diewert VM, Richman JM, Zeisler J, et al. Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes. *Cell.* 1995;81(5):811–23.
 76. Vonsattel J, Myers R, Stevens T, Ferrante R, Bird E, Richardson E. Neuropathological classification of Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1985;44(6):559–77.
 77. Rosas HD, Koroshetz WJ, Chen YI, Skeuse C, Vangel M, Cudkovic ME, et al. Evidence for more widespread cerebral pathology in early HD: an MRI-based morphometric analysis. *Neurology.* 2003;60(10):1615–20.
 78. Pillai JA, Hansen LA, Masliah E, Goldstein JL, Edland SD, Corey-Bloom J. Clinical severity of Huntington's disease does not always correlate with neuropathologic stage. *Mov Disord.* 2012;27(9):1099–103.

VII. Referències

79. Waldvogel HJ, Kim EH, Tippett LJ, Vonsattel JPG, Faull RLM. The neuropathology of Huntington's disease. *Curr Top Behav Neurosci*. 2014;22:33–80.
80. Reiner A, Dragatsis I, Dietrich P. Genetics and Neuropathology of Huntington's disease. *Int Rev Neurobiol*. 2011;98(325–372).
81. Davies SW, Turmaine M, Scherzinger E, Wanker EE, Mangiarini L, Bates GP. Formation of Neuronal Intranuclear Inclusions Underlies the Neurological Dysfunction in Mice Transgenic for the HD Mutation. *Cell*. 1997;90:537–48.
82. Gutekunst C a, Li SH, Yi H, Mulroy JS, Kuemmerle S, Jones R, et al. Nuclear and neuropil aggregates in Huntington's disease: relationship to neuropathology. *J Neurosci*. 1999;19(7):2522–34.
83. Arrasate M, Mitra S, Schweitzer ES, Segal MR, Finkbeiner S. Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature*. 2004;431(7010):805–10.
84. Balleine BW, Liljeholm M, Ostlund SB. The integrative function of the basal ganglia in instrumental conditioning. *Behav Brain Res*. 2009;199(1):43–52.
85. Bolam JP, Hanley JJ, Booth PAC, Bevan MD. Synaptic organisation of the basal ganglia. *J Anat*. 2000 May;196(4):527–42.
86. Picconi B, Passino E, Sgobio C, Bonsi P, Barone I, Ghiglieri V, et al. Plastic and behavioral abnormalities in experimental Huntington's disease: A crucial role for cholinergic interneurons. *Neurobiol Dis*. 2006;22(1):143–52.
87. Ferrante RJ, Kowall NW, Richardson EP. Proliferative and degenerative changes in striatal spiny neurons in Huntington's disease: a combined study using the section-Golgi method and calbindin D28k immunocytochemistry. *J Neurosci*. 1991;11(12):3877–87.
88. Smith Y, Bevan MD, Shink E, Bolam JP. Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience*. 1998;86(2):357–87.
89. Raymond LA. Striatal synaptic dysfunction and altered calcium regulation in Huntington disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;483(4):1051–62.
90. Albin RL, Reiner A, Anderson KD, Dure LS, Handelin B, Balfour R, et al. Preferential loss of

- striato-external pallidal projection neurons in presymptomatic Huntington's disease. *Ann Neurol.* 1992;31(4):425–30.
91. Altar CA, Cai N, Bliven T, Juhasz M, Conner JM, Acheson AL, et al. Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain. *Nature.* 1997;389(6653):856–60.
 92. Perez-Navarro E, Canals JM, Ginés S, Alberch J. Cellular and molecular mechanisms involved in the selective vulnerability of striatal projection neurons in Huntington's disease. *Histol Histopathol.* 2006;1993:1217–32.
 93. Cha JH, Kosinski CM, Kerner JA, Alsdorf SA, Mangiarini L, Davies SW, et al. Altered brain neurotransmitter receptors in transgenic mice expressing a portion of an abnormal human huntington disease gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(11):6480–5.
 94. Cepeda C, Ariano MA, Calvert CR, Flores-Hernández J, Chandler SH, Leavitt BR, et al. NMDA receptor function in mouse models of Huntington disease. *J Neurosci Res.* 2001;66(4):525–39.
 95. Zeron MM, Hansson O, Chen N, Wellington CL, Leavitt BR, Brundin P, et al. Increased Sensitivity to N-Methyl-D-Aspartate in a Mouse Model of Huntington ' s Disease. 2002;33:849–60.
 96. Cepeda C, Wu N, André VM, Cummings DM, Levine MS. The corticostriatal pathway in Huntington's disease. *Prog Neurobiol.* 2007;81(5–6):253–71.
 97. de la Monte SM, Vonsattel JP, Richardson EP. Morphometric demonstration of atrophic changes in the cerebral cortex, white matter, and neostriatum in Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1988;47(5):516–25.
 98. Cudkovicz M, Kowall NW. Degeneration of pyramidal projection neurons in Huntington's disease cortex. *Ann Neurol.* 1990;27(2):200–4.
 99. Hedreen JC, Peyser CE, Folstein SE, Ross CA. Neuronal loss in layers V and VI of cerebral cortex in Huntington's disease. *Neurosci Lett.* 1991;133(2):257–61.
 100. Rosas HD, Hevelone ND, Zaleta AK, Greve DN, Salat DH, Fischl B. Regional cortical thinning in preclinical Huntington disease and its relationship to cognition. *Neurology.* 2005;65(5):745–7.

VII. Referències

101. Turmaine M, Raza A, Mahal A, Mangiarini L, Bates GP, Davies SW. Nonapoptotic neurodegeneration in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(14):8093–7.
102. Witter MP, Wouterlood FG, Naber PA, Van Haeften T. Anatomical organization of the parahippocampal-hippocampal network. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;911:1–24.
103. Bliss TV, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol*. 1973;232(2):331–56.
104. van Strien NM, Cappaert NLM, Witter MP. The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nat Rev Neurosci*. 2009;10(4):272–82.
105. Schultz C, Engelhardt M. Anatomy of the hippocampal formation. In: *The Hippocampus in Clinical Neuroscience*. 2014. p. 6–17.
106. Small SA, Schobel SA, Buxton RB, Witter MP, Barnes CA. A pathophysiological framework of hippocampal dysfunction in ageing and disease. *Nat Rev Neurosci*. 2011;12(10):585–601.
107. Spargo E, Everall IP, Lantos PL. Neuronal loss in the hippocampus in Huntington's disease: a comparison with HIV infection. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1993;56(5):487–91.
108. Murphy KP, Carter RJ, Lione LA, Mangiarini L, Mahal A, Bates GP, et al. Abnormal synaptic plasticity and impaired spatial cognition in mice transgenic for exon 1 of the human Huntington's disease mutation. *J Neurosci*. 2000;20(13):5115–23.
109. Miguez A, Barriga GGD, Brito V, Straccia M, Giralt A, Ginés S, et al. Fingolimod (FTY720) enhances hippocampal synaptic plasticity and memory in Huntington's disease by preventing p75NTR up-regulation and astrocyte-mediated inflammation. *Hum Mol Genet*. 2015;24(17):4958–70.
110. Brito V, Giralt A, Enriquez-barreto L, Puigdemívol M, Suelves N, Zamora-moratalla A, et al. Neurotrophin receptor p75 NTR mediates Huntington's disease – associated synaptic and memory dysfunction. *J Clin Invest*. 2014;124(10):4411–28.
111. Milnerwood AJ, Cummings DM, Dallérac GM, Brown JY, Vatsavayai SC, Hirst MC, et al.

- Early development of aberrant synaptic plasticity in a mouse model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet.* 2006;15(10):1690–703.
112. Davis JD, Filoteo JV, Kesner RP, Roberts JW. Recognition memory for hand positions and spatial locations in patients with Huntington's disease: differential visuospatial memory impairment? *Cortex.* 2003;39(2):239–53.
 113. Lawrence AD, Watkins LH, Sahakian BJ, Hodges JR, Robbins TW. Visual object and visuospatial cognition in Huntington's disease: implications for information processing in corticostriatal circuits. *Brain.* 2000;1349–64.
 114. Begeti F, Schwab LC, Mason SL, Barker RA. Hippocampal dysfunction defines disease onset in Huntington's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2016;87(9):975–81.
 115. Coyle JT. An animal model for Huntington's disease. *Biol Psychiatry.* 1979;14(2):251–76.
 116. Coyle JT, Schwarcz R. Lesion of striatal neurones with kainic acid provides a model for Huntington's chorea. *Nature.* 1976;263(5574):244–6.
 117. Beal MF, Kowall NW, Ellison DW, Mazurek MF, Swartz KJ, Martin JB. Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature.* 1986 May;321(6066):168–71.
 118. Beal MF, Brouillet E, Jenkins BG, Ferrante RJ, Kowall NW, Miller JM, et al. Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J Neurosci.* 1993;13(10):4181–92.
 119. Pouladi MA, Morton a J, Hayden MR. Choosing an animal model for the study of Huntington's disease. *Nat Rev Neurosci.* 2013;14(10):708–21.
 120. Bates GP, Mangiarini L, Mahal A, Davies SW. Transgenic models of Huntington's disease. *Hum Mol Genet.* 1997;6(10):1633–7.
 121. Mangiarini L, Sathasivam K, Seller M, Cozens B, Harper A, Hetherington C, et al. Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell.* 1996;87(3):493–506.
 122. Carter RJ, Lione LA, Humby T, Mangiarini L, Mahal A, Bates GP, et al. Characterization of progressive motor deficits in mice transgenic for the human Huntington's disease

VII. Referències

- mutation. *J Neurosci.* 1999;19(8):3248–57.
123. Lione LA, Carter RJ, Hunt MJ, Bates GP, Morton AJ, Dunnett SB. Selective discrimination learning impairments in mice expressing the human Huntington's disease mutation. *J Neurosci.* 1999;19(23):10428–37.
 124. Giralt A, Rodrigo T, Martín ED, Gonzalez JR, Milà M, Ceña V, et al. Brain-derived neurotrophic factor modulates the severity of cognitive alterations induced by mutant huntingtin: Involvement of phospholipaseC γ activity and glutamate receptor expression. *Neuroscience.* 2009;158(4):1234–50.
 125. Giralt A, Saavedra A, Carretón O, Xifró X, Alberch J, Pérez-navarro E. Increased PKA signaling disrupts recognition memory and spatial memory: Role in Huntington's disease. *Hum Mol Genet.* 2011;20(21):4232–47.
 126. Giralt A, Carretón O, Lao-Peregrin C, Martín ED, Alberch J. Conditional BDNF release under pathological conditions improves Huntington's disease pathology by delaying neuronal dysfunction. *Mol Neurodegener.* 2011;6(1):71.
 127. Klapstein GJ, Fisher RS, Zanjani H, Cepeda C, Jokel ES, Chesselet MF, et al. Electrophysiological and morphological changes in striatal spiny neurons in R6/2 Huntington's disease transgenic mice. *J Neurophysiol.* 2001;86(6):2667–77.
 128. Hodgson JG, Agopyan N, Gutekunst CA, Leavitt BR, LePiane F, Singaraja R, et al. A YAC mouse model for Huntington's disease with full-length mutant huntingtin, cytoplasmic toxicity, and selective striatal neurodegeneration. *Neuron.* 1999;23(1):181–92.
 129. Seo H, Kim W, Isacson O. Compensatory changes in the ubiquitin-proteasome system, brain-derived neurotrophic factor and mitochondrial complex II/III in YAC72 and R6/2 transgenic mice partially model Huntington's disease patients. *Hum Mol Genet.* 2008;17(20):3144–53.
 130. Van Raamsdonk JM, Pearson J, Slow EJ, Hossain SM, Leavitt BR, Hayden MR. Cognitive dysfunction precedes neuropathology and motor abnormalities in the YAC128 mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci.* 2005;25(16):4169–80.
 131. Slow EJ, van Raamsdonk J, Rogers D, Coleman SH, Graham RK, Deng Y, et al. Selective striatal neuronal loss in a YAC128 mouse model of Huntington disease. *Hum Mol Genet.*

- 2003;12(13):1555–67.
132. Van Raamsdonk JM, Warby SC, Hayden MR. Selective degeneration in YAC mouse models of Huntington disease. *Brain Res Bull.* 2007;72(2–3):124–31.
 133. Wheeler VC, White JK, Gutekunst CA, Vrbanac V, Weaver M, Li XJ, et al. Long glutamine tracts cause nuclear localization of a novel form of huntingtin in medium spiny striatal neurons in HdhQ92 and HdhQ111 knock-in mice. *Hum Mol Genet.* 2000;9(4):503–13.
 134. Levine MS, Klapstein GJ, Koppel A, Gruen E, Cepeda C, Vargas ME, et al. Enhanced sensitivity to N-methyl-D-aspartate receptor activation in transgenic and knockin mouse models of Huntington’s disease. *J Neurosci Res.* 1999;58(4):515–32.
 135. Puigdellívol M, Cherubini M, Brito V, Giralt A, Suelves N, Ballesteros J, et al. A role for Kalirin-7 in corticostriatal synaptic dysfunction in Huntington’s disease. *Hum Mol Genet.* 2015;24(25):ddv426.
 136. Menalled LB, Sison JD, Dragatsis I, Zeitlin S, Chesselet M-F. Time course of early motor and neuropathological anomalies in a knock-in mouse model of Huntington’s disease with 140 CAG repeats. *J Comp Neurol.* 2003;465(1):11–26.
 137. Lin C-H, Tallaksen-Greene S, Chien W-M, Cearley JA, Jackson WS, Crouse AB, et al. Neurological abnormalities in a knock-in mouse model of Huntington’s disease. *Hum Mol Genet.* 2001;10(2):137–44.
 138. Heng MY, Tallaksen-Greene SJ, Detloff PJ, Albin RL. Longitudinal evaluation of the Hdh(CAG)150 knock-in murine model of Huntington’s disease. *J Neurosci.* 2007;27(34):8989–98.
 139. Bates GP, Dorsey R, Gusella JF, Hayden MR, Kay C, Leavitt BR, et al. Huntington disease. *Nat Rev Dis Prim.* 2015;1:15005.
 140. Cattaneo E, Zuccato C, Tartari M. Normal huntingtin function: an alternative approach to Huntington’s disease. *Nat Rev Neurosci.* 2005;6(12):919–30.
 141. Di Prospero N, Tagle D. Normal and mutant huntingtin: partners in crime. *Nat Med.* 2000;6(11):1208–9.
 142. Zuccato C, Valenza M, Cattaneo E. Molecular Mechanisms and Potential Therapeutical

VII. Referències

- Targets in Huntington ' s Disease. 2010;905–81.
143. Cha JH, Kosinski CM, Kerner JA, Alsdorf SA, Mangiarini L, Davies SW, et al. Altered brain neurotransmitter receptors in transgenic mice expressing a portion of an abnormal human huntington disease gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(11):6480–5.
 144. Augood SJ, Faull RL, Emson PC. Dopamine D1 and D2 receptor gene expression in the striatum in Huntington's disease. *Ann Neurol*. 1997;42(2):215–21.
 145. Weeks RA, Piccini P, Harding AE, Brooks DJ. Striatal D1 and D2 dopamine receptor loss in asymptomatic mutation carriers of Huntington's disease. *Ann Neurol*. 1996;40(1):49–54.
 146. Luthi-Carter R, Strand A, Peters NL, Solano SM, Hollingsworth ZR, Menon AS, et al. Decreased expression of striatal signaling genes in a mouse model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet*. 2000;9(9):1259–71.
 147. Luthi-Carter R, Hanson SA, Strand AD, Bergstrom DA, Chun W, Peters NL, et al. Dysregulation of gene expression in the R6/2 model of polyglutamine disease: parallel changes in muscle and brain. *Hum Mol Genet*. 2002;11(17):1911–26.
 148. Hodges A, Strand AD, Aragaki AK, Kuhn A, Sengstag T, Hughes G, et al. Regional and cellular gene expression changes in human Huntington's disease brain. *Hum Mol Genet*. 2006;15(6):965–77.
 149. Steffan JS, Kazantsev A, Spasic-Boskovic O, Greenwald M, Zhu YZ, Gohler H, et al. The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(12):6763–8.
 150. Marcora E, Kennedy MB. The Huntington's disease mutation impairs Huntingtin's role in the transport of NF- κ B from the synapse to the nucleus. *Hum Mol Genet*. 2010;19(22):4373–84.
 151. Dunah AW, Jeong H, Griffin A, Kim Y-M, Standaert DG, Hersch SM, et al. Sp1 and TAFII130 transcriptional activity disrupted in early Huntington's disease. *Science*. 2002;296(5576):2238–43.
 152. Zuccato C, Tartari M, Crotti A, Goffredo D, Valenza M, Conti L, et al. Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes. *Nat Genet*. 2003;35(1):76–83.

153. Ng CW, Yildirim F, Yap YS, Dalin S, Matthews BJ, Velez PJ, et al. Extensive changes in DNA methylation are associated with expression of mutant huntingtin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(6):2354–9.
154. Ferrante RJ, Kubilus JK, Lee J, Ryu H, Beesen A, Zucker B, et al. Histone deacetylase inhibition by sodium butyrate chemotherapy ameliorates the neurodegenerative phenotype in Huntington's disease mice. *J Neurosci*. 2003;23(28):9418–27.
155. Vashishtha M, Ng CW, Yildirim F, Gipson TA, Kratter IH, Bodai L, et al. Targeting H3K4 trimethylation in Huntington disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(32):E3027-36.
156. Kurdistani SK, Tavazoie S, Grunstein M. Mapping global histone acetylation patterns to gene expression. *Cell*. 2004;117(6):721–33.
157. Igarashi S, Morita H, Bennett KM, Tanaka Y, Engelender S, Peters MF, et al. Inducible PC12 cell model of Huntington's disease shows toxicity and decreased histone acetylation. *Neuroreport*. 2003;14(4):565–8.
158. McFarland KN, Das S, Sun TT, Leyfer D, Xia E, Sangrey GR, et al. Genome-wide histone acetylation is altered in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *PLoS One*. 2012;7(7):e41423.
159. Sadri-Vakili G, Bouzou B, Benn CL, Kim M-O, Chawla P, Overland RP, et al. Histones associated with downregulated genes are hypo-acetylated in Huntington's disease models. *Hum Mol Genet*. 2007;16(11):1293–306.
160. Thomas E, Coppola G, Desplats P, Tang B, Soragni E, Burnett R, et al. The HDAC inhibitor 4b ameliorates the disease phenotype and transcriptional abnormalities in Huntington's disease transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(40):15564–9.
161. Gardian G, Browne SE, Choi D-K, Klivenyi P, Gregorio J, Kubilus JK, et al. Neuroprotective effects of phenylbutyrate in the N171-82Q transgenic mouse model of Huntington's disease. *J Biol Chem*. 2005;280(1):556–63.
162. Steffan JS, Bodai L, Pallos J, Poelman M, McCampbell A, Apostol BL, et al. Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in *Drosophila*. *Nature*. 2001;413(6857):739–43.
163. Alarcón JM, Malleret G, Touzani K, Vronskaya S, Ishii S, Kandel ER, et al. Chromatin

VII. Referències

- acetylation, memory, and LTP are impaired in CBP+/- mice: a model for the cognitive deficit in Rubinstein-Taybi syndrome and its amelioration. *Neuron*. 2004;42(6):947–59.
164. Chen G, Zou X, Watanabe H, van Deursen JM, Shen J. CREB Binding Protein Is Required for Both Short-Term and Long-Term Memory Formation. *J Neurosci*. 2010;30(39):13066–77.
165. McCampbell A, Taylor JP, Taye AA, Robitschek J, Li M, Walcott J, et al. CREB-binding protein sequestration by expanded polyglutamine. *Hum Mol Genet*. 2000;9(14):2197–202.
166. Giralt A, Puigdellívol M, Carretón O, Paoletti P, Valero J, Parra-damas A, et al. Long-term memory deficits in Huntington's disease are associated with reduced CBP histone acetylase activity. *Hum Mol Genet*. 2012;21(6):1203–16.
167. Jiang H, Nucifora FC, Ross CA, DeFranco DB. Cell death triggered by polyglutamine-expanded huntingtin in a neuronal cell line is associated with degradation of CREB-binding protein. *Hum Mol Genet*. 2003;12(1):1–12.
168. McCampbell A, Taye AA, Whitty L, Penney E, Steffan JS, Fischbeck KH. Histone deacetylase inhibitors reduce polyglutamine toxicity. *Proc Natl Acad Sci*. 2001;98(26):15179–84.
169. Nucifora FC, Sasaki M, Peters MF, Huang H, Cooper JK, Yamada M, et al. Interference by huntingtin and atrophin-1 with cbp-mediated transcription leading to cellular toxicity. *Science*. 2001;291(5512):2423–8.
170. Hockly E, Richon VM, Woodman B, Smith DL, Zhou X, Rosa E, et al. Suberoylanilide hydroxamic acid, a histone deacetylase inhibitor, ameliorates motor deficits in a mouse model of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(4):2041–6.
171. Seto E, Yoshida M. Erasers of Histone Acetylation: The Histone Deacetylase Enzymes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014;6(4):a018713–a018713.
172. Mielcarek M, Benn CL, Franklin S a, Smith DL, Woodman B, Marks P a, et al. SAHA decreases HDAC 2 and 4 levels in vivo and improves molecular phenotypes in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *PLoS One*. 2011;6(11):e27746.
173. Jia H, Pallos J, Jacques V, Lau A, Tang B, Cooper A, et al. Histone deacetylase (HDAC)

- inhibitors targeting HDAC3 and HDAC1 ameliorate polyglutamine-elicited phenotypes in model systems of Huntington's disease. *Neurobiol Dis.* 2012;46(2):351–61.
174. Jia H, Wang Y, Morris CD, Jacques V, Gottesfeld JM, Rusche JR, et al. The Effects of Pharmacological Inhibition of Histone Deacetylase 3 (HDAC3) in Huntington's Disease Mice. *PLoS One.* 2016;11(3):e0152498.
 175. Suelves N, Kirkham-McCarthy L, Lahue RS, Ginés S. A selective inhibitor of histone deacetylase 3 prevents cognitive deficits and suppresses striatal CAG repeat expansions in Huntington's disease mice. *Sci Rep.* 2017;7(1):6082.
 176. Bobrowska A, Donmez G, Weiss A, Guarente L, Bates G. SIRT2 ablation has no effect on tubulin acetylation in brain, cholesterol biosynthesis or the progression of Huntington's disease phenotypes in vivo. *PLoS One.* 2012;7(4):e34805.
 177. Bobrowska A, Paganetti P, Matthias P, Bates GP. Hdac6 knock-out increases tubulin acetylation but does not modify disease progression in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *PLoS One.* 2011;6(6):e20696.
 178. Mourné L, Campbell K, Howland D, Ouyang Y, Bates GP. Genetic Knock-Down of Hdac3 Does Not Modify Disease-Related Phenotypes in a Mouse Model of Huntington's Disease. *PLoS One.* 2012;7(2):e31080.
 179. Benn CL, Butler R, Mariner L, Nixon J, Moffitt H, Mielcarek M, et al. Genetic knock-down of HDAC7 does not ameliorate disease pathogenesis in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *PLoS One.* 2009;4(6):e5747.
 180. Mielcarek M, Landles C, Weiss A, Bradaia A, Seredenina T, Inuabasi L, et al. HDAC4 reduction: a novel therapeutic strategy to target cytoplasmic huntingtin and ameliorate neurodegeneration. *PLoS Biol.* 2013;11(11):e1001717.
 181. Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: Roles in Neuronal Development and Function. *Annu Rev Neurosci.* 2001;24(1):677–736.
 182. Lewin GR, Barde Y-A. Physiology of the Neurotrophins. *Annu Rev Neurosci.* 1996;19(1):289–317.
 183. Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science.* 2001;294(5548):1945–8.

VII. Referències

184. Zuccato C, Cattaneo E. Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurol*. 2009;5(6):311–22.
185. Binder DK, Scharfman HE. Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors*. 2004;22(3):123–31.
186. Lu B. BDNF and Activity-Dependent Synaptic Modulation. *Learn Mem*. 2003;10(2):86–98.
187. Bekinschtein P, Cammarota M, Izquierdo I, Medina JH. Reviews: BDNF and Memory Formation and Storage. *Neurosci*. 2008;14(2):147–56.
188. Baquet ZC, Gorski JA, Jones KR. Early striatal dendrite deficits followed by neuron loss with advanced age in the absence of anterograde cortical brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci*. 2004;24(17):4250–8.
189. Gorski JA, Zeiler SR, Tamowski S, Jones KR. Brain-derived neurotrophic factor is required for the maintenance of cortical dendrites. *J Neurosci*. 2003;23(17):6856–65.
190. Pérez-Navarro E, Alberch J, Neveu I, Arenas E. Brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3 and neurotrophin-4/5 differentially regulate the phenotype and prevent degenerative changes in striatal projection neurons after excitotoxicity in vivo. *Neuroscience*. 1999;91(4):1257–64.
191. Pérez-Navarro E, Canudas AM, Akerund P, Alberch J, Arenas E. Brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4/5 prevent the death of striatal projection neurons in a rodent model of Huntington's disease. *J Neurochem*. 2000;75(5):2190–9.
192. Zuccato C, Cattaneo E. Role of brain-derived neurotrophic factor in Huntington's disease. *Prog Neurobiol*. 2007;81(5–6):294–330.
193. Zuccato C, Belyaev N, Conforti P, Ooi L, Tartari M, Papadimou E, et al. Widespread disruption of repressor element-1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencer factor occupancy at its target genes in Huntington's disease. *J Neurosci*. 2007;27(26):6972–83.
194. Ginés S, Seong IS, Fossale E, Ivanova E, Trettel F, Gusella JF, et al. Specific progressive cAMP reduction implicates energy deficit in presymptomatic Huntington's disease knock-in mice. *Hum Mol Genet*. 2003;12(5):497–508.

195. Tao X, Finkbeiner S, Arnold DB, Shaywitz AJ, Greenberg ME. Ca²⁺ influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron*. 1998;20(4):709–26.
196. del Toro D, Canals JM, Ginés S, Kojima M, Egea G, Alberch J. Mutant huntingtin impairs the post-Golgi trafficking of brain-derived neurotrophic factor but not its Val66Met polymorphism. *J Neurosci*. 2006;26(49):12748–57.
197. Ventriglia M, Bocchio Chiavetto L, Benussi L, Binetti G, Zanetti O, Riva MA, et al. Association between the BDNF 196 A/G polymorphism and sporadic Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry*. 2002;7(2):136–7.
198. Skibinska M, Hauser J, Czerski PM, Leszczynska-Rodziewicz A, Kosmowska M, Kapelski P, et al. Association analysis of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene Val66Met polymorphism in schizophrenia and bipolar affective disorder. *World J Biol Psychiatry*. 2004;5(4):215–20.
199. Egan MF, Kojima M, Callicott JH, Goldberg TE, Kolachana BS, Bertolino A, et al. The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell*. 2003 Jan;112(2):257–69.
200. Baker SJ, Reddy EP. Transducers of life and death: TNF receptor superfamily and associated proteins. *Oncogene*. 1996 Jan 4;12(1):1–9.
201. Brito V, Ginés S. in *Huntington's disease: beyond the basal ganglia*. *Oncotarget*. 2015;7(1):1–2.
202. Brito V, Puigdemívol M, Giralt A, del Toro D, Alberch J, Ginés S. Imbalance of p75(NTR)/TrkB protein expression in Huntington's disease: implication for neuroprotective therapies. *Cell Death Dis*. 2013;4:e595.
203. Ginés S, Bosch M, Marco S, Gavaldà N, Díaz-Hernández M, Lucas JJ, et al. Reduced expression of the TrkB receptor in Huntington's disease mouse models and in human brain. *Eur J Neurosci*. 2006;23(3):649–58.
204. Strand AD, Baquet ZC, Aragaki AK, Holmans P, Yang L, Cleren C, et al. Expression Profiling of Huntington's Disease Models Suggests That Brain-Derived Neurotrophic Factor Depletion Plays a Major Role in Striatal Degeneration. *J Neurosci*. 2007;27(43):11758–

VII. Referències

- 68.
205. Canals JM, Pineda JR, Torres-Peraza JF, Bosch M, Martín-Ibañez R, Muñoz MT, et al. Brain-derived neurotrophic factor regulates the onset and severity of motor dysfunction associated with enkephalinergic neuronal degeneration in Huntington's disease. *J Neurosci*. 2004;24(35):7727–39.
206. Gharami K, Xie Y, An JJ, Tonegawa S, Xu B. Brain-derived neurotrophic factor over-expression in the forebrain ameliorates Huntington's disease phenotypes in mice. *J Neurochem*. 2008;105(2):369–79.
207. Poduslo JF, Curran GL. Permeability at the blood-brain and blood-nerve barriers of the neurotrophic factors: NGF, CNTF, NT-3, BDNF. *Mol Brain Res*. 1996;36(2):280–6.
208. Yan Q, Matheson C, Sun J, Radeke MJ, Feinstein SC, Miller JA. Distribution of intracerebral ventricularly administered neurotrophins in rat brain and its correlation with trk receptor expression. *Exp Neurol*. 1994;127(1):23–36.
209. Lichter DG, Hershey LA. Before chorea: pre-Huntington mild cognitive impairment. *Neurology*. 2010;75(6):490–1.
210. Milnerwood AJ, Raymond LA. Corticostriatal synaptic function in mouse models of Huntington's disease: early effects of huntingtin repeat length and protein load. *J Physiol*. 2007;585(Pt 3):817–31.
211. Fan MMY, Raymond LA. N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor function and excitotoxicity in Huntington's disease. *Prog Neurobiol*. 2007;81(5–6):272–93.
212. Glass M, Faull RL, Dragunow M. Loss of cannabinoid receptors in the substantia nigra in Huntington's disease. *Neuroscience*. 1993;56(3):523–7.
213. Xifró X, García-Martínez JM, Del Toro D, Alberch J, Pérez-Navarro E. Calcineurin is involved in the early activation of NMDA-mediated cell death in mutant huntingtin knock-in striatal cells. *J Neurochem*. 2008;105(5):1596–612.
214. Milnerwood AJ, Gladding CM, Pouladi MA, Kaufman AM, Hines RM, Boyd JD, et al. Early increase in extrasynaptic NMDA receptor signaling and expression contributes to phenotype onset in Huntington's disease mice. *Neuron*. 2010;65(2):178–90.

215. Elias GM, Funke L, Stein V, Grant SG, Brecht DS, Nicoll RA. Synapse-specific and developmentally regulated targeting of AMPA receptors by a family of MAGUK scaffolding proteins. *Neuron*. 2006;52(2):307–20.
216. Lin Y, Skeberdis VA, Francesconi A, Bennett MVL, Zukin RS. Postsynaptic density protein-95 regulates NMDA channel gating and surface expression. *J Neurosci*. 2004;24(45):10138–48.
217. Migaud M, Charlesworth P, Dempster M, Webster LC, Watabe AM, Makinson M, et al. Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein. *Nature*. 1998;396(6710):433–9.
218. Sattler R, Xiong Z, Lu WY, Hafner M, MacDonald JF, Tymianski M. Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein. *Science*. 1999;284(5421):1845–8.
219. Sun Y, Savanenin A, Reddy PH, Liu YF. Polyglutamine-expanded Huntingtin Promotes Sensitization of N-Methyl-D-aspartate Receptors via Post-synaptic Density 95. *J Biol Chem*. 2001;276(27):24713–8.
220. Segal M. Dendritic spines and long-term plasticity. *Nat Rev Neurosci*. 2005;6(4):277–84.
221. Nithianantharajah J, Barkus C, Vijiaratnam N, Clement O, Hannan AJ. Modeling brain reserve: experience-dependent neuronal plasticity in healthy and Huntington's disease transgenic mice. *Am J Geriatr Psychiatry*. 2009;17(3):196–209.
222. Xie Y, Hayden MR, Xu B. BDNF overexpression in the forebrain rescues Huntington's disease phenotypes in YAC128 mice. *J Neurosci*. 2010;30(44):14708–18.
223. Guidetti P, Charles V, Chen EY, Reddy PH, Kordower JH, Whetsell WO, et al. Early degenerative changes in transgenic mice expressing mutant huntingtin involve dendritic abnormalities but no impairment of mitochondrial energy production. *Exp Neurol*. 2001;169(2):340–50.
224. Murmu RP, Li W, Holtmaat A, Li J-Y. Dendritic spine instability leads to progressive neocortical spine loss in a mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci*. 2013;33(32):12997–3009.
225. Cummings DM, Milnerwood AJ, Dallérac GM, Waights V, Brown JY, Vatsavayai SC, et al.

VII. Referències

- Aberrant cortical synaptic plasticity and dopaminergic dysfunction in a mouse model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet.* 2006;15(19):2856–68.
226. Lynch G, Kramar EA, Rex CS, Jia Y, Chappas D, Gall CM, et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor Restores Synaptic Plasticity in a Knock-In Mouse Model of Huntington's Disease. *J Neurosci.* 2007 Apr;27(16):4424–34.
227. Saavedra a, García-Martínez JM, Xifró X, Giralt a, Torres-Peraza JF, Canals JM, et al. PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase 1 contributes to maintain the activation of the PI3K/Akt pro-survival pathway in Huntington's disease striatum. *Cell Death Differ.* 2010;17(2):324–35.
228. Ginés S, Paoletti P, Alberch J. Impaired TrkB-mediated ERK1/2 activation in huntington disease knock-in striatal cells involves reduced p52/p46 Shc expression. *J Biol Chem.* 2010;285(28):21537–48.
229. Saavedra A, Perez-Navarro E, Alberch J. Don't Take Away My P: Phosphatases as Therapeutic Targets in Huntington's Disease. In: InTech, editor. *Huntington's Disease — Core Concepts and Current Advances.* 2012. p. 465–94.
230. Xifró X, Giralt A, Saavedra A, García-Martínez JM, Díaz-Hernández M, Lucas JJ, et al. Reduced calcineurin protein levels and activity in exon-1 mouse models of Huntington's disease: Role in excitotoxicity. *Neurobiol Dis.* 2009;36(3):461–9.
231. Saavedra A, Giralt A, Rué L, Xifró X, Xu J, Ortega Z, et al. Striatal-enriched protein tyrosine phosphatase expression and activity in Huntington's disease: a STEP in the resistance to excitotoxicity. *J Neurosci.* 2011;31(22):8150–62.
232. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev.* 2001;22(2):153–83.
233. Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev.* 1999;79(1):143–80.
234. Lu Z, Xu S. ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis. *IUBMB Life.* 2006;58(11):621–31.

235. Apostol BL, Illes K, Pallos J, Bodai L, Wu J, Strand A, et al. Mutant huntingtin alters MAPK signaling pathways in PC12 and striatal cells: ERK1/2 protects against mutant huntingtin-associated toxicity. *Hum Mol Genet.* 2006;15(2):273–85.
236. Gokce O, Runne H, Kuhn A, Luthi-Carter R. Short-term striatal gene expression responses to brain-derived neurotrophic factor are dependent on MEK and ERK activation. *PLoS One.* 2009;4(4):e5292.
237. Sarantos MR, Papanikolaou T, Ellerby LM, Hughes RE. Pizotifen Activates ERK and Provides Neuroprotection in vitro and in vivo in Models of Huntington's Disease. *J Huntingtons Dis.* 2012;1(2):195–210.
238. Maher P, Dargusch R, Bodai L, Gerard PE, Purcell JM, Marsh JL. ERK activation by the polyphenols fisetin and resveratrol provides neuroprotection in multiple models of Huntington's disease. *Hum Mol Genet.* 2011;20(2):261–70.
239. Laprairie RB, Bagher AM, Kelly MEM, Denovan-Wright EM. Biased Type 1 Cannabinoid Receptor Signaling Influences Neuronal Viability in a Cell Culture Model of Huntington Disease. *Mol Pharmacol.* 2016;89(3):364–75.
240. Tully T, Bourtchouladze R, Scott R, Tallman J. Targeting the CREB pathway for memory enhancers. *Nat Rev Drug Discov.* 2003;2(4):267–77.
241. Lee J, Kim C-H, Simon DK, Aminova LR, Andreyev AY, Kushnareva YE, et al. Mitochondrial cyclic AMP response element-binding protein (CREB) mediates mitochondrial gene expression and neuronal survival. *J Biol Chem.* 2005;280(49):40398–401.
242. Lonze BE, Ginty DD. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron.* 2002;35(4):605–23.
243. Shieh PB, Hu SC, Bobb K, Timmusk T, Ghosh A. Identification of a signaling pathway involved in calcium regulation of BDNF expression. *Neuron.* 1998;20(4):727–40.
244. Sugars KL, Brown R, Cook LJ, Swartz J, Rubinsztein DC. Decreased cAMP response element-mediated transcription: an early event in exon 1 and full-length cell models of Huntington's disease that contributes to polyglutamine pathogenesis. *J Biol Chem.* 2004;279(6):4988–99.
245. DeMarch Z, Giampà C, Patassini S, Bernardi G, Fusco FR. Beneficial effects of rolipram in

VII. Referències

- the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *Neurobiol Dis.* 2008;30(3):375–87.
246. Giampà C, Patassini S, Borreca A, Laurenti D, Marullo F, Bernardi G, et al. Phosphodiesterase 10 inhibition reduces striatal excitotoxicity in the quinolinic acid model of Huntington's disease. *Neurobiol Dis.* 2009;34(3):450–6.
247. Giralt A, Saavedra A, Carretón O, Arumí H, Tyebji S, Alberch J, et al. PDE10 inhibition increases GluA1 and CREB phosphorylation and improves spatial and recognition memories in a Huntington's disease mouse model. *Hippocampus.* 2013;23(8):684–95.
248. Iijima-Ando K, Wu P, Drier EA, Iijima K, Yin JCP. cAMP-response element-binding protein and heat-shock protein 70 additively suppress polyglutamine-mediated toxicity in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(29):10261–6.
249. Simmons DL, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev.* 2004;56(3):387–437.
250. Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev.* 1999;79(4):1193–226.
251. Breyer RM, Bagdassarian CK, Myers SA, Breyer MD. Prostanoid receptors: subtypes and signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001;41(1):661–90.
252. Regan JW. EP2 and EP4 prostanoid receptor signaling. *Life Sci.* 2003;74(2–3):143–53.
253. Carlson NG, Rojas MA, Black J-D, Redd JW, Hille J, Hill KE, et al. Microglial inhibition of neuroprotection by antagonists of the EP1 prostaglandin E2 receptor. *J Neuroinflammation.* 2009;6(1):5.
254. Cimino PJ, Keene CD, Breyer RM, Montine KS, Montine TJ. Therapeutic targets in prostaglandin E2 signaling for neurologic disease. *Curr Med Chem.* 2008;15(19):1863–9.
255. Oka T, Oka K, Scammell TE, Lee C, Kelly JF, Nantel F, et al. Relationship of EP(1-4) prostaglandin receptors with rat hypothalamic cell groups involved in lipopolysaccharide fever responses. *J Comp Neurol.* 2000;428(1):20–32.
256. Andreasson K. Emerging roles of PGE2 receptors in models of neurological disease. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2010;91(3–4):104–12.

257. Bhattacharya M, Peri KG, Almazan G, Ribeiro-da-Silva A, Shichi H, Durocher Y, et al. Nuclear localization of prostaglandin E2 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(26):15792–7.
258. Kawano T, Anrather J, Zhou P, Park L, Wang G, Frys KA, et al. Prostaglandin E2 EP1 receptors: downstream effectors of COX-2 neurotoxicity. *Nat Med*. 2006;12(2):225–9.
259. Carrasco E, Casper D, Werner P. PGE(2) receptor EP1 renders dopaminergic neurons selectively vulnerable to low-level oxidative stress and direct PGE(2) neurotoxicity. *J Neurosci Res*. 2007;85(14):3109–17.
260. Zhen G, Kim YT, Li R, Yocum J, Kapoor N, Langer J, et al. PGE2 EP1 receptor exacerbated neurotoxicity in a mouse model of cerebral ischemia and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2012;33(9):2215–9.
261. Ahmad AS, Saleem S, Ahmad M, Doré S. Prostaglandin EP1 receptor contributes to excitotoxicity and focal ischemic brain damage. *Toxicol Sci*. 2006;89(1):265–70.
262. Abe T, Kunz A, Shimamura M, Zhou P, Anrather J, Iadecola C. The neuroprotective effect of prostaglandin E2 EP1 receptor inhibition has a wide therapeutic window, is sustained in time and is not sexually dimorphic. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2009;29(1):66–72.
263. Liu M, Zhang Y, Zhang Y, Pei L, Liu X. Prostaglandin E2 receptor 1 activity regulates cell survival following hypoxia in cultured rat cortical neurons. *Neurosci Lett*. 2012;508(1):31–6.
264. Ahmad AS, Maruyama T, Narumiya S, Doré S. PGE2 EP1 receptor deletion attenuates 6-OHDA-induced Parkinsonism in mice: old switch, new target. *Neurotox Res*. 2013;23(3):260–6.
265. Li X, Rose SE, Montine KS, Keene CD, Montine TJ. Antagonism of neuronal prostaglandin E(2) receptor subtype 1 mitigates amyloid β neurotoxicity in vitro. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2013;8(1):87–93.
266. Anglada-Huguet M, Xifró X, Giralt A, Zamora-Moratalla A, Martín ED, Alberch J. Prostaglandin E2 EP1 receptor antagonist improves motor deficits and rescues memory decline in R6/1 mouse model of Huntington's disease. *Mol Neurobiol*. 2014;49(2):784–95.

VII. Referències

267. Sands WA, Palmer TM. Regulating gene transcription in response to cyclic AMP elevation. Vol. 20, Cellular Signalling. 2008. p. 460–6.
268. Hutchinson AJ, Chou C-L, Israel DD, Xu W, Regan JW. Activation of EP2 prostanoid receptors in human glial cell lines stimulates the secretion of BDNF. *Neurochem Int.* 2009;54(7):439–46.
269. Toyomoto M, Ohta M, Okumura K, Yano H, Matsumoto K, Inoue S, et al. Prostaglandins are powerful inducers of NGF and BDNF production in mouse astrocyte cultures. *FEBS Lett.* 2004;562(1–3):211–5.
270. Shaw KN, Commins S, O'Mara SM. Deficits in spatial learning and synaptic plasticity induced by the rapid and competitive broad-spectrum cyclooxygenase inhibitor ibuprofen are reversed by increasing endogenous brain-derived neurotrophic factor. *Eur J Neurosci.* 2003;17(11):2438–46.
271. Ahmad AS, Zhuang H, Echeverria V, Doré S. Stimulation of prostaglandin EP2 receptors prevents NMDA-induced excitotoxicity. *J Neurotrauma.* 2006;23(12):1895–903.
272. Zhang J, Rivest S. Distribution, regulation and colocalization of the genes encoding the EP2- and EP4-PGE2 receptors in the rat brain and neuronal responses to systemic inflammation. *Eur J Neurosci.* 1999;11(8):2651–68.
273. Ahmad M, Saleem S, Shah Z, Maruyama T, Narumiya S, Doré S. The PGE2 EP2 receptor and its selective activation are beneficial against ischemic stroke. *Exp Transl Stroke Med.* 2010;2(1):12.
274. Liu D, Wu L, Breyer R, Mattson MP, Andreasson K. Neuroprotection by the PGE2 EP2 receptor in permanent focal cerebral ischemia. *Ann Neurol.* 2005;57(5):758–61.
275. McCullough L, Wu L, Haughey N, Liang X, Hand T, Wang Q, et al. Neuroprotective Function of the PGE2 EP2 Receptor in Cerebral Ischemia. *J Neurosci.* 2004;24(1):257–68.
276. Carrasco E, Werner P, Casper D. Prostaglandin receptor EP2 protects dopaminergic neurons against 6-OHDA-mediated low oxidative stress. *Neurosci Lett.* 2008;441(1):44–9.
277. Bilak M, Wu L, Wang Q, Haughey N, Conant K, St Hillaire C, et al. PGE2 receptors rescue motor neurons in a model of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 2004;56(2):240–

- 8.
278. Echeverria V, Clerman A, Doré S. Stimulation of PGE receptors EP2 and EP4 protects cultured neurons against oxidative stress and cell death following beta-amyloid exposure. *Eur J Neurosci*. 2005;22(9):2199–206.
279. Jin J, Shie F-S, Liu J, Wang Y, Davis J, Schantz AM, et al. Prostaglandin E2 receptor subtype 2 (EP2) regulates microglial activation and associated neurotoxicity induced by aggregated alpha-synuclein. *J Neuroinflammation*. 2007;4(1):2.
280. Liang X, Wang Q, Shi J, Lokteva L, Breyer RM, Montine TJ, et al. The prostaglandin E2 EP2 receptor accelerates disease progression and inflammation in a model of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 2008;64(3):304–14.
281. Sang N, Zhang J, Marcheselli V, Bazan NG, Chen C. Postsynaptically synthesized prostaglandin E2 (PGE2) modulates hippocampal synaptic transmission via a presynaptic PGE2 EP2 receptor. *J Neurosci*. 2005;25(43):9858–70.
282. Savonenko A, Munoz P, Melnikova T, Wang Q, Liang X, Breyer RM, et al. Impaired cognition, sensorimotor gating, and hippocampal long-term depression in mice lacking the prostaglandin E2 EP2 receptor. *Exp Neurol*. 2009;217(1):63–73.
283. Yang H, Zhang J, Breyer RM, Chen C. Altered hippocampal long-term synaptic plasticity in mice deficient in the PGE2 EP2 receptor. *J Neurochem*. 2009;108(1):295–304.
284. Ahmadi S, Lippross S, Neuhuber WL, Zeilhofer HU. PGE(2) selectively blocks inhibitory glycinergic neurotransmission onto rat superficial dorsal horn neurons. *Nat Neurosci*. 2002;5(1):34–40.
285. Burks SR, Wright CL, McCarthy MM. Exploration of prostanoid receptor subtype regulating estradiol and prostaglandin E2 induction of spinophilin in developing preoptic area neurons. *Neuroscience*. 2007;146(3):1117–27.
286. Chen C, Magee JC, Bazan NG. Cyclooxygenase-2 regulates prostaglandin E2 signaling in hippocampal long-term synaptic plasticity. *J Neurophysiol*. 2002;87(6):2851–7.
287. Lee JD, Ulevitch RJ, Han JH. Primary Structure of BMK1: A New Mammalian MAP Kinase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;213(2):715–24.

VII. Referències

288. Drew B a, Burow ME, Beckman BS. MEK5/ERK5 pathway: the first fifteen years. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Jan;1825(1):37–48.
289. Nithianandarajah-Jones GN, Wilm B, Goldring CEP, Müller J, Cross MJ. ERK5: structure, regulation and function. *Cell Signal*. Elsevier Inc.; 2012 Nov;24(11):2187–96.
290. Yan L, Carr J, Ashby PR, Murry-Tait V, Thompson C, Arthur JSC. Knockout of ERK5 causes multiple defects in placental and embryonic development. *BMC Dev Biol*. 2003;3(1):11.
291. Liu L, Cavanaugh JE, Wang Y, Sakagami H, Mao Z, Xia Z. ERK5 activation of MEF2-mediated gene expression plays a critical role in BDNF-promoted survival of developing but not mature cortical neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(14):8532–7.
292. Watson FL, Heerssen HM, Bhattacharyya A, Klesse L, Lin MZ, Segal RA. Neurotrophins use the Erk5 pathway to mediate a retrograde survival response. *Nat Neurosci*. 2001;4(10):981–8.
293. Wang X, Tournier C. Regulation of cellular functions by the ERK5 signalling pathway. *Cell Signal*. 2006;18(6):753–60.
294. Chao TH, Hayashi M, Tapping RI, Kato Y, Lee JD. MEKK3 directly regulates MEK5 activity as part of the big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) signaling pathway. *J Biol Chem*. 1999;274(51):36035–8.
295. Buschbeck M, Ullrich A. The unique C-terminal tail of the mitogen-activated protein kinase ERK5 regulates its activation and nuclear shuttling. *J Biol Chem*. 2005;280(4):2659–67.
296. Yan C, Luo H, Lee JD, Abe J, Berk BC. Molecular cloning of mouse ERK5/BMK1 splice variants and characterization of ERK5 functional domains. *J Biol Chem*. 2001;276(14):10870–8.
297. Nishimoto S, Nishida E. MAPK signalling: ERK5 versus ERK1/2. *EMBO Rep*. 2006;7(8):782–6.
298. English JM, Pearson G, Baer R, Cobb MH. Identification of substrates and regulators of the mitogen-activated protein kinase ERK5 using chimeric protein kinases. *J Biol Chem*. 1998;273(7):3854–60.

299. Morimoto H, Kondoh K, Nishimoto S, Terasawa K, Nishida E. Activation of a C-terminal transcriptional activation domain of ERK5 by autophosphorylation. *J Biol Chem.* 2007;282(49):35449–56.
300. Vauzour D, Vafeiadou K, Rice-Evans C, Williams RJ, Spencer JPE. Activation of pro-survival Akt and ERK1/2 signalling pathways underlie the anti-apoptotic effects of flavanones in cortical neurons. *J Neurochem.* 2007;103(4):1355–67.
301. Cavanaugh JE. Role of extracellular signal regulated kinase 5 in neuronal survival. *Eur J Biochem.* 2004;271(11):2056–9.
302. Kamakura S, Moriguchi T, Nishida E. Activation of the protein kinase ERK5/BMK1 by receptor tyrosine kinases. Identification and characterization of a signaling pathway to the nucleus. *J Biol Chem.* 1999;274(37):26563–71.
303. Mody N, Leitch J, Armstrong C, Dixon J, Cohen P. Effects of MAP kinase cascade inhibitors on the MKK5/ERK5 pathway. *FEBS Lett.* 2001;502(1–2):21–4.
304. Shalizi A, Lehtinen M, Gaudilliere B, Donovan N, Han J, Konishi Y, et al. Characterization of a neurotrophin signaling mechanism that mediates neuron survival in a temporally specific pattern. *J Neurosci.* 2003;23(19):7326–36.
305. Cavanaugh JE, Ham J, Hetman M, Poser S, Yan C, Xia Z. Differential regulation of mitogen-activated protein kinases ERK1/2 and ERK5 by neurotrophins, neuronal activity, and cAMP in neurons. *J Neurosci.* 2001;21(2):434–43.
306. Cavanaugh JE, Jaumotte JD, Lakoski JM, Zigmond MJ. Neuroprotective role of ERK1/2 and ERK5 in a dopaminergic cell line under basal conditions and in response to oxidative stress. *J Neurosci Res.* 2006;84(6):1367–75.
307. Finegan KG, Wang X, Lee E, Robinson AC, Tournier C. Regulation of neuronal survival by the extracellular signal- regulated protein kinase 5. *Cell Death Differ.* 2009;16(5):674–83.
308. Pazyra-Murphy MF, Hans A, Courchesne SL, Karch C, Cosker KE, Heerssen HM, et al. A retrograde neuronal survival response: target-derived neurotrophins regulate MEF2D and bcl-w. *J Neurosci.* 2009;29(20):6700–9.
309. van Oterendorp C, Sgouris S, Schallner N, Biermann J, Lagrèze WA. Retrograde Neurotrophic Signaling in Rat Retinal Ganglion Cells Is Transmitted via the ERK5 but Not

VII. Referències

- the ERK1/2 Pathway. *Investig Ophthalmology Vis Sci.* 2014;55(2):658.
310. Doi Y, Takeuchi H, Mizoguchi H, Fukumoto K, Horiuchi H, Jin S, et al. Granulocyte-colony stimulating factor attenuates oligomeric amyloid β neurotoxicity by activation of neprilysin. *PLoS One.* 2014;9(7).
311. Wang R-M, Zhang Q-G, Li C-H, Zhang G-Y. Activation of extracellular signal-regulated kinase 5 may play a neuroprotective role in hippocampal CA3/DG region after cerebral ischemia. *J Neurosci Res.* 2005;80(3):391–9.
312. Parmar MS, Jaumotte JD, Zigmond MJ, Cavanaugh JE. ERK1, 2, and 5 expression and activation in dopaminergic brain regions during postnatal development. *Int J Dev Neurosci.* 2015;46:44–50.
313. Zou J, Pan Y-W, Wang Z, Chang S-Y, Wang W, Wang X, et al. Targeted Deletion of ERK5 MAP Kinase in the Developing Nervous System Impairs Development of GABAergic Interneurons in the Main Olfactory Bulb and Behavioral Discrimination between Structurally Similar Odorants. *J Neurosci.* 2012;32(12):4118–32.
314. Pan Y-W, Chan GCK, Kuo CT, Storm DR, Xia Z. Inhibition of Adult Neurogenesis by Inducible and Targeted Deletion of ERK5 Mitogen-Activated Protein Kinase Specifically in Adult Neurogenic Regions Impairs Contextual Fear Extinction and Remote Fear Memory. *J Neurosci.* 2012;32(19):6444–55.
315. Wang W, Pan Y-W, Zou J, Li T, Abel GM, Palmiter RD, et al. Genetic activation of ERK5 MAP kinase enhances adult neurogenesis and extends hippocampus-dependent long-term memory. *J Neurosci.* 2014;34(6):2130–47.
316. Obara Y, Yamauchi A, Takehara S, Nemoto W, Takahashi M, Stork PJS, et al. ERK5 activity is required for nerve growth factor-induced neurite outgrowth and stabilization of tyrosine hydroxylase in PC12 cells. *J Biol Chem.* 2009;284(35):23564–73.
317. Rosário M, Franke R, Bednarski C, Birchmeier W. The neurite outgrowth multiadaptor RhoGAP, NOMA-GAP, regulates neurite extension through SHP2 and Cdc42. *J Cell Biol.* 2007;
318. Dwivedi Y, Rizavi HS, Teppen T, Sasaki N, Chen H, Zhang H, et al. Aberrant extracellular signal-regulated kinase (ERK) 5 signaling in hippocampus of suicide subjects.

- Neuropsychopharmacology. 2007;32(11):2338–50.
319. Poon WW, Carlos AJ, Aguilar BL, Berchtold NC, Kawano CK, Zograbyan V, et al. β -Amyloid (A β) oligomers impair brain-derived neurotrophic factor retrograde trafficking by down-regulating ubiquitin C-terminal hydrolase, UCH-L1. *J Biol Chem*. 2013;288(23):16937–48.
 320. Goalstone ML. ERK5: a novel IKK α -kinase in rat hippocampal neurons. *Can J Neurol Sci*. 2011;38(4):639–48.
 321. Potthoff MJ, Olson EN. MEF2: a central regulator of diverse developmental programs. *Development*. 2007;134(23):4131–40.
 322. Olson EN, Perry M, Schulz RA. Regulation of muscle differentiation by the MEF2 family of MADS box transcription factors. *Dev Biol*. 1995;172(1):2–14.
 323. Pulipparacharuvil S, Renthal W, Hale CF, Taniguchi M, Xiao G, Kumar A, et al. Cocaine regulates MEF2 to control synaptic and behavioral plasticity. *Neuron*. 2008;59(4):621–33.
 324. Lyons GE, Micales BK, Schwarz J, Martin JF, Olson EN. Expression of *mef2* genes in the mouse central nervous system suggests a role in neuronal maturation. *J Neurosci*. 1995;15(August):5727–38.
 325. Lyons MR, Schwarz CM, West AE. Members of the myocyte enhancer factor 2 transcription factor family differentially regulate *Bdnf* transcription in response to neuronal depolarization. *J Neurosci*. 2012;32(37):12780–5.
 326. McKinsey T a, Zhang CL, Olson EN. MEF2: a calcium-dependent regulator of cell division, differentiation and death. *Trends Biochem Sci*. 2002;27(1):40–7.
 327. Andrés V, Cervera M, Mahdavi V. Determination of the consensus binding site for MEF2 expressed in muscle and brain reveals tissue-specific sequence constraints. *J Biol Chem*. 1995;270(40):23246–9.
 328. Rashid a J, Cole CJ, Josselyn S a. Emerging roles for MEF2 transcription factors in memory. *Genes Brain Behav*. 2014;13(1):118–25.
 329. Mao Z. Neuronal Activity-Dependent Cell Survival Mediated by Transcription Factor MEF2. *Science (80-)*. 1999;286(5440):785–90.

VII. Referències

330. Miska E a, Karlsson C, Langley E, Nielsen SJ, Pines J, Kouzarides T. HDAC4 deacetylase associates with and represses the MEF2 transcription factor. *EMBO J.* 1999;18(18):5099–107.
331. Bolger T a, Zhao X, Cohen TJ, Tsai C-C, Yao T-P. The neurodegenerative disease protein ataxin-1 antagonizes the neuronal survival function of myocyte enhancer factor-2. *J Biol Chem.* 2007;282(40):29186–92.
332. Sando R, Gounko N, Pieraut S, Liao L, Yates J, Maximov A. HDAC4 governs a transcriptional program essential for synaptic plasticity and memory. *Cell.* ; 2012;151(4):821–34.
333. Clocchiatti A, Di E, Demarchi F, Brancolini C. Beside the MEF2 axis : Unconventional functions of HDAC4. *Cell Signal.* 2013;25(1):269–76.
334. Martin M, Kettmann R, Dequiedt F. Class IIa histone deacetylases: regulating the regulators. *Oncogene.* 2007;26(37):5450–67.
335. Grozinger CM, Hassig CA, Schreiber SL. Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda1p. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(9):4868–73.
336. Cohen S, Greenberg ME. Communication Between the Synapse and the Nucleus in Neuronal Development, Plasticity, and Disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2008;24(1):183–209.
337. Mao Z, Wiedmann M. Calcineurin enhances MEF2 DNA binding activity in calcium-dependent survival of cerebellar granule neurons. *J Biol Chem.* 1999;274(43):31102–7.
338. Okamoto S, Krainc D, Sherman K, Lipton SA. Antiapoptotic role of the p38 mitogen-activated protein kinase-myocyte enhancer factor 2 transcription factor pathway during neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(13):7561–6.
339. Dietrich J-B. The MEF2 family and the brain: from molecules to memory. *Cell Tissue Res.* 2013;352(2):179–90.
340. Flavell SW, Cowan CW, Kim T-K, Greer PL, Lin Y, Paradis S, et al. Activity-dependent regulation of MEF2 transcription factors suppresses excitatory synapse number. *Science.* 2006;311(5763):1008–12.

341. Shalizi A, Gaudillière B, Yuan Z, Stegmüller J, Shirogane T, Ge Q, et al. A calcium-regulated MEF2 sumoylation switch controls postsynaptic differentiation. *Science*. 2006;311(5763):1012–7.
342. Fiore R, Khudayberdiev S, Christensen M, Siegel G, Flavell SW, Kim TK, et al. Mef2-mediated transcription of the miR379-410 cluster regulates activity-dependent dendritogenesis by fine-tuning Pumilio2 protein levels. *Embo J*. 2009;28(6):697–710.
343. Chen SX, Cherry A, Tari PK, Podgorski K, Kwong YKK, Haas K. The transcription factor MEF2 directs developmental visually driven functional and structural metaplasticity. *Cell*. 2012;151(1):41–55.
344. Brusco J, Haas K. Interactions between mitochondria and the transcription factor myocyte enhancer factor 2 (MEF2) regulate neuronal structural and functional plasticity and metaplasticity. *J Physiol*. 2015;16(July 2014):1–25.
345. Cole CJ, Mercaldo V, Restivo L, Yiu AP, Sekeres MJ, Han J-H, et al. MEF2 negatively regulates learning-induced structural plasticity and memory formation. *Nat Neurosci*. 2012;15(9):1255–64.
346. Barbosa AC, Kim M-S, Ertunc M, Adachi M, Nelson ED, McAnally J, et al. MEF2C, a transcription factor that facilitates learning and memory by negative regulation of synapse numbers and function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(27):9391–6.
347. Akhtar MW, Kim M-S, Adachi M, Morris MJ, Qi X, Richardson J a, et al. In vivo analysis of MEF2 transcription factors in synapse regulation and neuronal survival. *PLoS One*. 2012;7(4):e34863.
348. Kandel ER. The molecular biology of memory storage: A dialogue between gene and synapses. *Science (80-)*. 2001;294(5544):1030–1038.
349. Flavell SW, Greenberg ME. Signaling Mechanisms Linking Neuronal Activity to Gene Expression and Plasticity of the Nervous System. *Annu Rev Neurosci*. 2008;31:563–90.
350. Impey S, McCorkle SR, Cha-Molstad H, Dwyer JM, Yochum GS, Boss JM, et al. Defining the CREB Regulon. *Cell*. 2004;119(7):1041–54.
351. Flavell SW, Kim T-K, Gray JM, Harmin D a, Hemberg M, Hong EJ, et al. Genome-wide analysis of MEF2 transcriptional program reveals synaptic target genes and neuronal

VII. Referències

- activity-dependent polyadenylation site selection. *Neuron*. 2008;60(6):1022–38.
352. Kawashima T, Okuno H, Nonaka M, Adachi-Morishima A, Kyo N, Okamura M, et al. Synaptic activity-responsive element in the Arc/Arg3.1 promoter essential for synapse-to-nucleus signaling in activated neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(1):316–21.
353. Rodríguez-Tornos FM, San Aniceto I, Cubelos B, Nieto M. Enrichment of conserved synaptic activity-responsive element in neuronal genes predicts a coordinated response of MEF2, CREB and SRF. *PLoS One*. 2013;8(1):e53848.
354. Inoue M, Yagishita-Kyo N, Nonaka M, Kawashima T, Okuno H, Bito H. Synaptic activity-responsive element (SARE): A unique genomic structure with an unusual sensitivity to neuronal activity. *Commun Integr Biol*. 2010;3(5):443–6.
355. Le Meur N, Holder-Espinasse M, Jaillard S, Goldenberg A, Joriot S, Amati-Bonneau P, et al. MEF2C haploinsufficiency caused by either microdeletion of the 5q14.3 region or mutation is responsible for severe mental retardation with stereotypic movements, epilepsy and/or cerebral malformations. *J Med Genet*. 2010;47(1):22–9.
356. Greer PL, Hanayama R, Bloodgood BL, Mardinly AR, Lipton DM, Flavell SW, et al. The Angelman Syndrome protein Ube3A regulates synapse development by ubiquitinating arc. *Cell*. 2010;140(5):704–16.
357. Chu Y, Mickiewicz AL, Kordower JH. α -synuclein aggregation reduces nigral myocyte enhancer factor-2D in idiopathic and experimental Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*. 2011;41(1):71–82.
358. Ryan SD, Dolatabadi N, Chan SF, Zhang X, Akhtar MW, Parker J, et al. Isogenic Human iPSC Parkinson's Model Shows Nitrosative Stress-Induced Dysfunction in MEF2-PGC1 α Transcription. *Cell*. 2013;155:1351–64.
359. Jayathilaka N, Han A, Gaffney KJ, Dey R, Jarusiewicz J a., Noridomi K, et al. Inhibition of the function of class IIa HDACs by blocking their interaction with MEF2. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(12):5378–88.
360. Lucas JJ, Ortega Z. Modelos animales de enfermedades neurodegenerativas: ejemplo de la enfermedad de Huntington. In: Monografía XXV: Avances en Neurociencia: Neurotransmisores y Patologías Nerviosas. REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA;

2010. p. 237–72.
361. Pang TYC, Stam NC, Nithianantharajah J, Howard ML, Hannan AJ. Differential effects of voluntary physical exercise on behavioral and brain-derived neurotrophic factor expression deficits in Huntington's disease transgenic mice. *Neuroscience*. 2006;141(2):569–84.
 362. Ferreira T, Blackman A, Oyrer J, Jayabal A, Chung A, Watt A, et al. Neuronal morphometry directly from bitmap images. *Nat Methods*. 2014;11(10):982–984.
 363. Ferreira T. Sholl Analysis (Fiji). *Imagej.net*. 2012.
 364. Jones TR, Kang IH, Wheeler DB, Lindquist RA, Papallo A, Sabatini DM, et al. CellProfiler Analyst: data exploration and analysis software for complex image-based screens. *BMC Bioinformatics*. 2008;9(1):482.
 365. Lamprecht MR, Sabatini DM, Carpenter AE. CellProfiler: free, versatile software for automated biological image analysis. *Biotechniques*. 2007;42(1):71–5.
 366. Carpenter A, Jones T. CellProfiler Analyst [Internet]. Broad Institute of Harvard and MIT. Available from: <http://cellprofiler.org/>
 367. Wyttenbach A, Swartz J, Kita H, Thykjaer T, Carmichael J, Bradley J, et al. Polyglutamine expansions cause decreased CRE-mediated transcription and early gene expression changes prior to cell death in an inducible cell model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet*. 2001;10(17):1829–45.
 368. Nithianantharajah J, Barkus C, Murphy M, Hannan AJ. Gene–environment interactions modulating cognitive function and molecular correlates of synaptic plasticity in Huntington's disease transgenic mice. *Neurobiol Dis*. 2008;29(3):490–504.
 369. Liang X, Wang Q, Hand T, Wu L, Breyer RM, Montine TJ, et al. Deletion of the prostaglandin E2 EP2 receptor reduces oxidative damage and amyloid burden in a model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2005 Nov;25(44):10180–7.
 370. Horch HW, Katz LC. BDNF release from single cells elicits local dendritic growth in nearby neurons. *Nat Neurosci*. 2002;5(11):1177–84.
 371. Xifro X, Malagelada C, Miñano A, Rodríguez-Álvarez J. Brief exposure to NMDA produces

VII. Referències

- long-term protection of cerebellar granule cells from apoptosis. *Eur J Neurosci.* 2005;21(4):827–40.
372. Kato Y, Kravchenko V V, Tapping RI, Han J, Ulevitch RJ, Lee JD. BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor MEF2C. *EMBO J.* 1997;16(23):7054–66.
373. Kato Y, Tapping R, Huang S, Watson M. Bmk1/Erk5 is required for cell proliferation induced by epidermal growth factor. *Nature.* 1998;395(October):713–6.
374. Dong F. Granulocyte Colony-stimulating Factor Induces Erk5 Activation, Which Is Differentially Regulated by Protein-tyrosine Kinases and Protein Kinase C. *J Biol Chem.* 2001;276(14):10811–6.
375. Pan YW, Zou J, Wang W, Sakagami H, Garelick MG, Abel G, et al. Inducible and conditional deletion of extracellular signal-regulated kinase 5 disrupts adult hippocampal neurogenesis. *J Biol Chem.* 2012;287(28):23306–17.
376. Okamoto S, Li Z, Ju C, Scholzke MN, Mathews E, Cui J, et al. Dominant-interfering forms of MEF2 generated by caspase cleavage contribute to NMDA-induced neuronal apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(6):3974–9.
377. Li M, Linseman DA, Allen MP, Meintzer MK, Wang X, Laessig T, et al. Myocyte Enhancer Factor 2A and 2D Undergo Phosphorylation and Caspase-Mediated Degradation during Apoptosis of Rat Cerebellar Granule Neurons. 2001;21(17):6544–52.
378. Martorell-Riera A, Segarra-Mondejar M, Muñoz JP, Ginet V, Olloquequi J, Pérez-Clausell J, et al. Mfn2 downregulation in excitotoxicity causes mitochondrial dysfunction and delayed neuronal death. *EMBO J.* 2014;33(20):1–20.
379. Koleske AJ. Molecular mechanisms of dendrite stability. *Nat Rev Neurosci.* 2013;14(8):536–50.
380. Kulkarni VA, Firestein BL. The dendritic tree and brain disorders. *Mol Cell Neurosci.* 2012;50(1):10–20.
381. Park SW, Nhu LH, Cho HY, Seo MK, Lee CH, Ly NN, et al. P11 mediates the BDNF-protective effects in dendritic outgrowth and spine formation in B27-deprived primary hippocampal cells. *J Affect Disord.* 2016;196:1–10.

382. Kolos YA, Grigoriyev IP, Korzhevskiy DE. [A synaptic marker synaptophysin]. *Morfologiya*. 2015;147(1):78–82.
383. Thiel G. Synapsin I, synapsin II, and synaptophysin: marker proteins of synaptic vesicles. *Brain Pathol*. 1993;3(1):87–95.
384. Calhoun ME, Jucker M, Martin LJ, Thinakaran G, Price DL, Mouton PR. Comparative evaluation of synaptophysin-based methods for quantification of synapses. *J Neurocytol*. 1996;25(12):821–8.
385. Luthi-Carter R, Strand AD, Hanson SA, Kooperberg C, Schilling G, La Spada AR, et al. Polyglutamine and transcription: gene expression changes shared by DRPLA and Huntington's disease mouse models reveal context-independent effects. *Hum Mol Genet*. 2002;11(17):1927–37.
386. Labbadia J, Morimoto RI. Huntington's disease: underlying molecular mechanisms and emerging concepts. *Trends Biochem Sci*. 2013;38(8):378–85.
387. Hadzi TC, Hendricks AE, Latourelle JC, Lunetta KL, Cupples LA, Gillis T, et al. Assessment of cortical and striatal involvement in 523 Huntington disease brains. *Neurology*. 2012;79(16):1708–15.
388. Levine MS, Cepeda C, Hickey MA, Fleming SM, Chesselet M-F. Genetic mouse models of Huntington's and Parkinson's diseases: illuminating but imperfect. *Trends Neurosci*. 2004;27(11):691–7.
389. Stout JC, Paulsen JS, Queller S, Solomon AC, Whitlock KB, Campbell JC, et al. Neurocognitive signs in prodromal Huntington disease. *Neuropsychology*. 2011;25(1):1–14.
390. Rosas HD, Salat DH, Lee SY, Zaleta AK, Pappu V, Fischl B, et al. Cerebral cortex and the clinical expression of Huntington's disease: complexity and heterogeneity. *Brain*. 2008;131(Pt 4):1057–68.
391. Rosas HD, Tuch DS, Hevelone ND, Zaleta AK, Vangel M, Hersch SM, et al. Diffusion tensor imaging in presymptomatic and early Huntington's disease: Selective white matter pathology and its relationship to clinical measures. *Mov Disord*. 2006;21(9):1317–25.
392. van den Bogaard SJA, Dumas EM, Acharya TP, Johnson H, Langbehn DR, Scahill RI, et al.

VII. Referències

- Early atrophy of pallidum and accumbens nucleus in Huntington's disease. *J Neurol.* 2011;258(3):412–20.
393. van den Bogaard SJA, Dumas EM, Ferrarini L, Milles J, van Buchem MA, van der Grond J, et al. Shape analysis of subcortical nuclei in Huntington's disease, global versus local atrophy — Results from the TRACK-HD study. *J Neurol Sci.* 2011;307(1–2):60–8.
394. Morton AJ, Lagan MA, Skepper JN, Dunnett SB. Progressive formation of inclusions in the striatum and hippocampus of mice transgenic for the human Huntington's disease mutation. *J Neurocytol.* 2000;29(9):679–702.
395. West AE, Greenberg ME. Neuronal Activity – Regulated Gene Transcription in Synapse Development and Cognitive Function. 2011;1–21.
396. Sugars KL, Rubinsztein DC. Transcriptional abnormalities in Huntington disease. *Trends Genet.* 2003;19(5):233–8.
397. Zuccato C, Marullo M, Conforti P, MacDonald ME, Tartari M, Cattaneo E. Systematic assessment of BDNF and its receptor levels in human cortices affected by Huntington's disease. *Brain Pathol.* 2008;18(2):225–38.
398. Simmons DA, Rex CS, Palmer L, Pandeyarajan V, Fedulov V, Gall CM, et al. Up-regulating BDNF with an ampakine rescues synaptic plasticity and memory in Huntington's disease knockin mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(12):4906–11.
399. Xu W. PSD-95-like membrane associated guanylate kinases (PSD-MAGUKs) and synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol.* 2011;21(2):306–12.
400. Buren C, Parsons MP, Smith-Dijak A, Raymond LA. Impaired development of cortico-striatal synaptic connectivity in a cell culture model of Huntington's disease. *Neurobiol Dis.* 2016;87:80–90.
401. Ippolito DM, Eroglu C. Quantifying Synapses: an Immunocytochemistry-based Assay to Quantify Synapse Number. *J Vis Exp.* 2010;(45).
402. Carretón O, Giralto A, Torres-Peraza JF, Brito V, Lucas JJ, Ginés S, et al. Age-dependent decline of motor neocortex but not hippocampal performance in heterozygous BDNF mice correlates with a decrease of cortical PSD-95 but an increase of hippocampal TrkB levels. *Exp Neurol.* 2012;237(2):335–45.

403. Rickhag M, Teilum M, Wieloch T. Rapid and long-term induction of effector immediate early genes (BDNF, Neurtin and Arc) in peri-infarct cortex and dentate gyrus after ischemic injury in rat brain. *Brain Res.* 2007;1151(1):203–10.
404. Lanahan A, Worley P. Immediate-Early Genes and Synaptic Function. *Neurobiol Learn Mem.* 1998;70:37–43.
405. Lu B, Pang PT, Woo NH. The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci.* 2005;6(8):603–14.
406. Nykjaer A, Willnow TE, Petersen CM. p75NTR – live or let die. *Curr Opin Neurobiol.* 2005;15(1):49–57.
407. Ip NY, Stitt TN, Tapley P, Klein R, Glass DJ, Fandl J, et al. Similarities and differences in the way neurotrophins interact with the Trk receptors in neuronal and nonneuronal cells. *Neuron.* 1993;10(2):137–49.
408. Brooks SP, Jones L, Dunnett SB. Comparative analysis of pathology and behavioural phenotypes in mouse models of Huntington’s disease. *Brain Res Bull.* 2012;88(2–3):81–93.
409. Scherzinger E, Lurz R, Turmaine M, Mangiarini L, Hollenbach B, Hasenbank R, et al. Huntingtin-encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates in vitro and in vivo. *Cell.* 1997;90(3):549–58.
410. Rubinsztein DC, Carmichael J. Huntington’s disease: molecular basis of neurodegeneration. *Expert Rev Mol Med.* Universitat De Barcelona UB; 2003;5(20):1–21.
411. Graham RK, Deng Y, Slow EJ, Haigh B, Bissada N, Lu G, et al. Cleavage at the Caspase-6 Site Is Required for Neuronal Dysfunction and Degeneration Due to Mutant Huntingtin. *Cell.* 2006;125(6):1179–91.
412. Chen X, Wu J, Lvovskaya S, Herndon E, Supnet C, Bezprozvanny I. Dantrolene is neuroprotective in Huntington’s disease transgenic mouse model. *Mol Neurodegener.* 2011;6(1):81.
413. Yamamoto A, Lucas JJ, Hen R, Papaioannou V., Efstratiadis A, Joyner A., et al. Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a conditional model of Huntington’s disease. *Cell.* 2000;101(1):57–66.

VII. Referències

414. Ferrante RJ, Andreassen OA, Dedeoglu A, Ferrante KL, Jenkins BG, Hersch SM, et al. Therapeutic effects of coenzyme Q10 and remacemide in transgenic mouse models of Huntington's disease. *J Neurosci.* 2002;22(5):1592–9.
415. Zhang F, Hu Y, Huang P, Toleman CA, Paterson AJ, Kudlow JE. Proteasome function is regulated by cyclic AMP-dependent protein kinase through phosphorylation of Rpt6. *J Biol Chem.* 2007;282(31):22460–71.
416. Glickman MH, Ciechanover A. The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway: Destruction for the Sake of Construction. *Physiol Rev.* 2002;82(2).
417. Amaral DG, Scharfman HE, Lavenex P. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Prog Brain Res.* 2007;163:3–22.
418. Gilberto Fernando X, Costa VCI. Dentate gyrus and spatial behaviour. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry.* 2009;33(5):762–73.
419. Schwab L, Richetin K, Barker R, Déglon N. Formation of hippocampal mHTT aggregates leads to impaired spatial memory, hippocampal activation and adult neurogenesis. *Neurobiol Dis.* 2017;102:105–12.
420. Lu B, Nagappan G, Guan X, Nathan PJ, Wren P. BDNF-based synaptic repair as a disease-modifying strategy for neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci.* 2013;14(6):401–16.
421. Giampà C, Montagna E, Dato C, Melone MAB, Bernardi G, Fusco FR. Systemic Delivery of Recombinant Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) in the R6/2 Mouse Model of Huntington's Disease. *PLoS One.* 2013;8(5):e64037.
422. Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science.* 1995;270(5240):1326–31.
423. English JD, Sweatt JD. A requirement for the mitogen-activated protein kinase cascade in hippocampal long term potentiation. *J Biol Chem.* 1997;272(31):19103–6.
424. Impey S, Smith DM, Obrietan K, Donahue R, Wade C, Storm DR. Stimulation of cAMP response element (CRE)-mediated transcription during contextual learning. *Nat Neurosci.* 1998;1(7):595–601.

425. Hetman M, Kanning K, Cavanaugh JE, Xia Z. Neuroprotection by brain-derived neurotrophic factor is mediated by extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem.* 1999;274(32):22569–80.
426. Sun W, Kesavan K, Schaefer BC, Garrington TP, Ware M, Johnson NL, et al. MEKK2 associates with the adapter protein Lad/RIBP and regulates the MEK5-BMK1/ERK5 pathway. *J Biol Chem.* 2001;276(7):5093–100.
427. Mody N, Campbell DG, Morrice N, Peggie M, Cohen P. An analysis of the phosphorylation and activation of extracellular-signal-regulated protein kinase 5 (ERK5) by mitogen-activated protein kinase kinase 5 (MKK5) in vitro. *Biochem J.* 2003;372(Pt 2):567–75.
428. Humbert S, Bryson EA, Cordelières FP, Connors NC, Datta SR, Finkbeiner S, et al. The IGF-1/Akt pathway is neuroprotective in Huntington's disease and involves Huntingtin phosphorylation by Akt. *Dev Cell.* 2002;2(6):831–7.
429. Han J, Jiang Y, Li Z, Kravchenko V V., Ulevitch RJ. Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation. *Nature.* 1997;386(6622):296–9.
430. Gianfriddo M, Melani A, Turchi D, Giovannini MG, Pedata F. Adenosine and glutamate extracellular concentrations and mitogen-activated protein kinases in the striatum of Huntington transgenic mice. Selective antagonism of adenosine A2A receptors reduces transmitter outflow. *Neurobiol Dis.* 2004;17(1):77–88.
431. Suzaki Y, Yoshizumi M, Kagami S, Koyama AH, Taketani Y, Houchi H, et al. Hydrogen peroxide stimulates c-Src-mediated big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) and the MEF2C signaling pathway in PC12 cells: potential role in cell survival following oxidative insults. *J Biol Chem.* 2002;277(11):9614–21.
432. Xifró X, Anglada-Huguet M, Rué L, Saavedra A, Pérez-Navarro E, Alberch J. Increased 90-kDa ribosomal S6 kinase (Rsk) activity is protective against mutant huntingtin toxicity. *Mol Neurodegener.* 2011;6:74.
433. Anglada-Huguet M, Giralta A, Rué L, Alberch J, Xifró X. Loss of striatal 90-KDa Ribosomal S6 kinase (Rsk) is a key factor for motor, synaptic and transcription dysfunction in Huntington's disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2016;1862(7):1255–66.
434. Molkenin JD, Black BL, Martin JF, Olson EN. Cooperative activation of muscle gene

VII. Referències

- expression by MEF2 and myogenic bHLH proteins. *Cell*. 1995;83(7):1125–36.
435. Gossett LA, Kelvin DJ, Sternberg EA, Olson EN. A new myocyte-specific enhancer-binding factor that recognizes a conserved element associated with multiple muscle-specific genes. *Mol Cell Biol*. 1989;9(11):5022–33.
436. Kolodziejczyk SM, Wang L, Balazsi K, DeRepentigny Y, Kothary R, Megeney LA. MEF2 is upregulated during cardiac hypertrophy and is required for normal post-natal growth of the myocardium. *Curr Biol*. 1999;9(20):1203–6.
437. Black BL, Olson EN. Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1998;14(1):167–96.
438. Leifer D, Krainc D, Yu YT, McDermott J, Breitbart RE, Heng J, et al. MEF2C, a MADS/MEF2-family transcription factor expressed in a laminar distribution in cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(4):1546–50.
439. Leifer D, Golden J, Kowall NW. Myocyte-specific enhancer binding factor 2C expression in human brain development. *Neuroscience*. 1994;63(4):1067–79.
440. Tian X, Kai L, Hockberger PE, Wokosin DL, Surmeier DJ. MEF-2 regulates activity-dependent spine loss in striatopallidal medium spiny neurons. *Mol Cell Neurosci*. 2010;44(1):94–108.
441. Vetere G, Barbato C, Pezzola S, Frisone P, Aceti M, Ciotti M, et al. Selective inhibition of miR-92 in hippocampal neurons alters contextual fear memory. *Hippocampus*. 2014;24(12):1458–65.
442. Morrow EM, Yoo S-Y, Flavell SW, Kim T-K, Lin Y, Hill RS, et al. Identifying autism loci and genes by tracing recent shared ancestry. *Science*. 2008;321(5886):218–23.
443. Huang CC, Faber PW, Persichetti F, Mittal V, Vonsattel JP, MacDonald ME, et al. Amyloid formation by mutant huntingtin: threshold, progressivity and recruitment of normal polyglutamine proteins. *Somat Cell Mol Genet*. 1998;24(4):217–33.
444. Jiao S, Li Z. Non-apoptotic function of BAD and BAX in long-term depression of synaptic transmission. *Neuron*. 2011;70(4):758–72.
445. Li Z, Jo J, Jia J, Lo S, Whitcomb DJ, Cho K, et al. Caspase-3 activation via mitochondria is

- required for long-term depression and AMPA receptor internalization. *Cell*. 2010;141(5):859–71.
446. Unsain N, Barker PA. New Views on the Misconstrued: Executioner Caspases and Their Diverse Non-apoptotic Roles. *Neuron*. 2015;88(3):461–74.
447. Wang AH, Bertos NR, Vezmar M, Pelletier N, Crosato M, Heng HH, et al. HDAC4, a human histone deacetylase related to yeast HDA1, is a transcriptional corepressor. *Mol Cell Biol*. 1999;19(11):7816–27.
448. Fitzsimons HL, Schwartz S, Given FM, Scott MJ. The histone deacetylase HDAC4 regulates long-term memory in *Drosophila*. *PLoS One*. 2013;8(12):e83903.