



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Facultat de Ciències Biològiques

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Estudio del papel de la proteína activadora de apoptosis Apaf-1 en modelos celulares de la enfermedad de Huntington

Trabajo original presentado para optar al grado de doctor en Bioquímica y Biomedicina por la Universitat de València

Andrés Herrera Aguilar

València, 2012

Directores de tesis:

Dra. Mónica Sancho Medina

Dr. Enrique Pérez Payá



PRINCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION

Enrique Pérez Payá, Doctor en Ciencias Químicas, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y Mónica Sancho Medina, Doctora en Biología, Investigadora del Centro de Investigación Príncipe Felipe:

CERTIFICAN, que el trabajo **“Estudio del papel de la proteína activadora de apoptosis Apaf-1 en modelos celulares de la enfermedad de Huntington”** ha sido desarrollado por Andrés Herrera Aguilar bajo su dirección en el Centro de Investigación Príncipe Felipe, como proyecto de tesis doctoral para optar al grado de Doctor por la Universitat de València.

Prof. Enrique Pérez Payá

Dra. Mónica Sancho Medina

AGRADECIMIENTOS

Aquí me encuentro cuatro años después escribiendo la última parte de una tesis doctoral y sin idea de cómo agradecer a tantas personas que me han ayudado a ser la persona que soy hoy, no solo en el ámbito profesional sino en el personal.

Al inicio de los tiempos, bastó con que un amigo, Renato, me llamara al celular en horas de trabajo, para saber que había sido aceptado en un viaje lleno de nuevas experiencias personales y profesionales. Agradezco infinitamente a este amigo por siempre haber creído en mí y ayudarme a cumplir un sueño como este.

En segundo lugar, agradecer a mi familia. A algunos se les hizo normal el que yo buscara nuevos rumbos, a otros un poco extraño, pero todos en general apoyaron mi decisión. A mi madre, creo que de las que más sufrió al ver a su hijo volar fuera del nido por un tiempo indefinido. A Jorge (Coqui) que siempre ha estado allí para nuestra familia y el cual, en conjunto con mi madre, hizo el esfuerzo de venir a visitarme y beber vino Marqués de Cáceres todos los días durante su estancia en Europa. Agradezco a mis hermanos y a mi amado sobrino, que siempre han estado en mi mente durante estos años y a los que espero algún día se les presenten este tipo de oportunidades. Por último al resto de mi familia, a mis grandes tías que siempre han estado allí para apoyarme y brindarme sus cálidas palabras de cariño. En especial mi tía Rosa, la cual ha sido mi punto de contacto durante estos años para enterarme de la vida cotidiana del resto de mi familia. Muchas gracias a todos porque, aunque estando a casi 8000 Km de distancia siempre sentí que estaban pensando en mí.

Seguidamente a mi jefe Quique (han pasado casi cuatro años para que lo llamaré así, en vez de Doctor), el cual ha sido un ejemplo a seguir en el campo profesional y el que me ha permitido tener la gran experiencia de estar en su laboratorio.

Una de las personas más difíciles para agradecer y ni siquiera sé cómo hacerlo, es a la gran jefa pero más aún a mi gran amiga Mónica. Hemos compartido tanto en años, trabajo sin parar, algunas comidas y cenas fuera del laboratorio y sobre todo discusiones sobre nuestros puntos de vista en diversos temas. Me ha ayudado a madurar como profesional y como persona más de lo que ella se imagina. Ha tenido una mano fuerte cuando es debido y una palmadita en la espalda cuando he estado desanimado. Siempre quedará el hecho de que soy su primer estudiante de tesis y el aprendizaje que eso

conlleve es algo que siempre recordaré. Muchas gracias por todo el esfuerzo de convertirme en un excelente científico, pero sobre todo por ser mi amiga. Espero que ella cumpla su palabra, vaya a Costa Rica y se ponga unos chalets en la playa y me permita administrárselos.

Gracias a aquellas personas que pertenecen o han estado en el laboratorio: Mar, Susana, Anna, Ana, Rosa, Yadira (mami yadi), Inmita (mi mamá Española), Ally, Eliana (parte del equipo Huntington), Rebequiña (mi primera profesora en el mundo de la ciencia), Ainhoa: muchas gracias por su constante apoyo, por soportarme y por tantas risas que hemos tenido juntos.

Casi terminando, quiero agradecer al grupo de los llamados "predocs" del I-12 entre ellos Fede, Cristina, Pablo, Guille, Vicente (mae) y Taty. Estos últimos tres son como mis hermanos de la ciencia, hemos estado juntos por tanto tiempo, con tantas conversaciones, con mil y uno consejos sobre tantos temas y una que otra escapada para pegarnos una gran fiesta, practicar deporte, entre otras cosas. En fin, agradeceremos que siempre me hayan apoyado dentro y fuera del laboratorio, pero sobre todo que me hayan permitido convertirme en su amigo. Espero verlos pronto por algún lugar del mundo.

Finalmente, a todas aquellas personas que han hecho de mi paso por España una experiencia inolvidable: Pepe, Sergio, Cristian, Fabián, Rich americano (Ricky), Stuart, Dave (master), Beatriz, Rich England, Aroa, Caro, Miriam, Marian, Pam, Laurent, el laboratorio del Juanjo Calvete en el IBV. Gracias por todas las experiencias compartidas.

Muchas gracias a todos los mencionados y espero no haberme dejado a ninguno.

Pura vida!!!

A mis hermanos y sobrino

*“Try not to become a man of success,
but rather, try to become a man of value”*

Albert Einstein

ÍNDICE

ABREVIATURAS	v
INTRODUCCIÓN	1
1. Apoptosis	3
1.1 Definición	3
1.2 Cambios morfológicos y bioquímicos durante la apoptosis	4
1.3 Rutas de activación de la apoptosis.....	5
1.3.1 Vía extrínseca de apoptosis.....	6
1.3.2 Vía intrínseca de apoptosis.....	7
1.4 El apoptosoma: componentes y regulación celular.....	9
1.4.1 Regulación endógena del apoptosoma.....	11
1.4.2 Modulación química del apoptosoma	16
1.4.3 Funciones no apoptóticas de la proteína Apaf-1	18
1.5 Apoptosis y enfermedad	19
2. La Enfermedad de Huntington (HD).....	23
2.1 Generalidades de la HD.....	23
2.2 Herencia y diagnóstico	266
2.3 Tratamiento.....	26
2.4 Función de la proteína huntingtina (Htt)	28
2.5 Base molecular de la HD.....	31
2.5.1 La formación de los agregados moleculares.....	33
2.5.2 Implicación de la vía proteosomal en la HD	34
2.5.3 Papel de la ruta de la autofagia en la HD.....	36

2.6 Modelos de estudio para la HD.....	38
2.6.1 Modelos celulares de toxicidad dependientes de poliQ.....	40
2.6.2 Modelos <i>in vivo</i>	41
OBJETIVOS	45
RESULTADOS	49
1. Implicación de Apaf-1 en la fisiopatología de la HD.....	51
1.1 Apaf-1 participa en la formación de los agregados de poliQ	52
1.2 El papel de Apaf-1 en HD es caspasa independiente	55
2. Modulación química de Apaf-1 y sus efectos en el modelo de HD	57
2.1 Caracterización del inhibidor de Apaf-1, SVT016426	57
2.2 Caracterización de minociclina como inhibidor de Apaf-1	61
2.2.1 Minociclina inhibe la actividad del apoptosoma <i>in vitro</i>	63
2.2.2 Mecanismo de acción de minociclina	66
2.2.3 Validación de la diana en un modelo celular.....	71
2.3 Papel de ambos inhibidores de Apaf-1 en el modelo de la HD.....	77
2.3.1 Minociclina	77
2.3.2 SVT016426	79
3. Mecanismo funcional de Apaf-1 en la HD.....	80
3.1 Descripción de la interacción entre Apaf-1 y Huntingtina.....	81
3.2 Hipótesis exploradas para explicar el papel de Apaf-1.....	88
3.2.1 Apaf-1 y formación de <i>novos</i> de agregados.....	88
3.2.2 Apaf-1 y rutas de limpieza celular	91
DISCUSIÓN GENERAL	95
CONCLUSIONES	105

MATERIAL Y MÉTODOS.....	109
1. Líneas celulares de mamíferos y condiciones de cultivo	111
2. Plásmidos	111
3. Materiales y reactivos.....	112
4. Anticuerpos	114
5. Obtención de proteínas recombinantes.....	115
5.1 Expresión y purificación de Apaf-1 recombinante	115
5.2 Obtención de Apaf-1 1-541 recombinante	116
5.3 Purificación de procaspasa-9 recombinante	117
5.4 Purificación de caspasa-3 recombinante	118
6. Ensayos de actividad in vitro	118
6.1 Ensayo de reconstitución del apoptosoma	118
6.2 Reconstitución del apoptosoma con extractos celulares.....	119
6.3 Ensayo de activación de caspasa-9	120
6.4 Ensayo de activación de caspasa-3	120
7. Experimentos de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	121
8. Ensayo celular de activación de caspasa-3	121
9. Ensayo de viabilidad celular	122
10. Inmunoprecipitación.....	122
11. Ensayo de cromatografía de afinidad de níquel.....	123
12. Purificación de los agregados	123
13. Inmunodetección de proteínas (<i>westernblot</i>)	124
14. Inmunofluorescencia	125
15. Análisis de imagen	126

16. Análisis estadístico.....	127
BIBLIOGRAFÍA	129
ANEXO.....	143

ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
AG	Ácidos grasos
AIF	Factor inductor de apoptosis
Apaf-1	Proteína activadora de apoptosis
Bcl-2	Familia de proteínas derivadas del protooncogén Bcl-2
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BH	Dominios de homología con Bcl-2
BIR	Dominios repetidos IAP de baculovirus
BSA	Albumina de suero bovino
c-Abl	Abelson tirosina quinasa de la leucemia
CARD	Dominio de reclutamiento de caspasas
CAS	Proteína de susceptibilidad celular a la apoptosis
Cdk	Ciclina dependiente de quinasa
Cit <i>c</i>	Citocromo <i>c</i>
DTBP	Peróxido de tert-butilo
DARK	Proteína homóloga de Apaf-1 en <i>Drosophila</i>
dATP/ATP	Desoxiadenosina-5'-trifosfato/Adenosina-5'-trifosfato
DISC	Complejo de señalización inductor de muerte
DMEM	Medio de cultivo
DMSO	Dimetilsulfóxido

DR	Receptor de muerte
DRPLA	Atrofia dentato-rubro-pallido-lusian
DTT	Diotiotreitol
GFP	Proteína verde fluorescente
Erk	Quinasas reguladoras de señales extracelulares
FADD	Dominio de muerte asociado a Fas
FIV	Fertilización <i>in vitro</i>
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
HAP	Proteína asociada a huntingtina
HD	Enfermedad de Huntington
HDSA	Sociedad Americana de la Enfermedad de Huntington
HEK293	Células embrionarias humanas de riñón
HeLa	Células derivadas de cáncer cérvico-uterino humano
Hsp	Proteína de choque térmico
Htt	Huntingtina
IAP	Proteína inhibidora de la apoptosis
IDN	Acido pentanoico 3{2-(2-tert-Butil-fenilaminooxalil)-amino-propionilamino}-4-oxo-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-fenoxy)
IgG	Inmunoglobulina G
IP	Inmunoprecipitación

IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
LC3	Cadena ligera 3
MEFS	Fibroblastos embrionarios de ratón
MOMP	Permeabilización de la membrana externa mitocondrial
MOI	Multiplicidad de infección
mtHtt	Huntingtina mutante
mTOR	Diana de la rapamicina en mamíferos
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NES	Secuencia de reconocimiento de exportación nuclear
NLS	Secuencia de localización nuclear
NMDA	<i>N</i> -metil-D-aspartato
NOD	Dominio de oligomerización para nucleótidos
OD	Densidad óptica
PBS	Tampón de fosfato salino
pc9	Procasasa 9
pc9si	Silenciador de pc9
PE	Fosfatidiletalonamina
PETCM	(α -Triclorometil)-4-piridinaetanol
PGD	Análisis genético preimplantacional
PHAP	Proteínas putativas asociadas con regulación mitocondrial

poliQ	Cola de poliglutaminas
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
ProT	Protimosina- α
rApaf-1	Apaf-1 recombinante
RIPK	Serina-treonina quinasa de interacción con receptores
RMN	Resonancia magnética nuclear
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
SBMA	Atrofia bulbo-espinal
SCA	Ataxia espinocerebelosa
siRNA	ARN de interferencia pequeño
SOD	Superóxido dismutasa
SSRI	Inhibidores de la recaptura de serotonina
STD	Espectroscopia de diferencia de transferencia de saturación
tARN	ARN de transferencia
TGasa	Transglutaminasa
TNF α	Factor de necrosis tumoral α
TNFR	Receptor del factor de necrosis tumoral
TRAIL	Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF
UPS	Sistema ubiquitin-proteosoma

UV	Ultravioleta
z-VAD	Z-Val-Ala-Asp (OMe)-fluorometilcetona

INTRODUCCIÓN

1. Apoptosis

1.1 Definición

En 1972 John Kerr de la universidad de Queensland incorporó el término apoptosis (del griego “caída de hojas de los árboles”) al panorama científico para distinguir una muerte espontánea, sin control e inesperada, de una muerte con procesos y características definidas [1]. La apoptosis es un programa de muerte celular controlado, responsable de la eliminación de células del organismo que no son necesarias o están dañadas [2]. Se trata de un proceso altamente conservado desde los nemátodos hasta el ser humano y trata de evitar la liberación del contenido celular al medio (necrosis) y en consecuencia, la activación de la respuesta inflamatoria [3]. No obstante, se han caracterizado otros tipos de muerte celular que pueden compartir características entre sí y que en ocasiones pueden darse de manera simultánea (Tabla 1).

Tabla 1. Resumen de las principales características de los diferentes tipos de muerte celular (modificado de [4]).

Tipo de muerte celular	Características morfológicas
Apoptosis	Redondeamiento de las células Reducción del volumen celular y nuclear Fragmentación nuclear No existe destrucción de la membrana celular Condensación de cromatina
Autofagia	No existe condensación de cromatina Alta vacuolización del citoplasma Formación de vesículas autofágicas de doble membrana Poco o nula acción de la células fagocíticas <i>in vivo</i>
Necrosis/Necroptosis	Hinchamiento del citoplasma Ruptura de la membrana plasmática Agrandamiento de orgánulos citoplasmáticos Moderada condensación de cromatina
Catastrofe mitótica	Micronucleación Multinucleación
Cornificación	Eliminación de orgánulos citosólicos Modificación de la membrana plasmática Exposición de lípidos en el espacio extracelular

1.2 Cambios morfológicos y bioquímicos durante la apoptosis

Los cambios morfológicos que se dan durante el proceso de apoptosis se caracterizan por alteraciones a nivel nuclear (condensación del núcleo y de la cromatina) y en la membrana plasmática (redondeo de la célula y reducción del volumen celular) (Figura 1). Los cambios nucleares incluyen el aumento de la densidad de la cromatina que comienza formando parches alrededor de la membrana nuclear debido a la rotura de la misma. Por otro lado, los cambios en la membrana plasmática hacen que la célula disminuya de tamaño y se redondee. Se generan unas estructuras a modo de pequeñas evaginaciones esféricas, surgidas a partir de la membrana (llamadas *b/lebs*), que le confieren a la célula un aspecto de “palomita de maíz” en los últimos estadios. Cuando la célula pierde prácticamente su identidad y se produce la unión de restos citoplasmáticos con el contenido nuclear recibe el nombre de cuerpos apoptóticos [5].

A nivel bioquímico, se dan principalmente tres cambios: a) activación de las caspasas, b) rotura del ADN y degradación de proteínas y c) cambios en la membrana celular que contribuyen al reconocimiento por las células fagocíticas [6]. La activación de la maquinaria celular para llevar a cabo el programa de apoptosis y la amplificación de la ruta de señalización, confluyen en la familia de proteasas denominadas caspasas que ejecutan la apoptosis hidrolizando proteínas clave [6]. Las caspasas son proteasas que hidrolizan el enlace peptídico en el C-terminal de un aspártico de la cadena polipeptídica. Actualmente, se han descrito 14 miembros de esta familia de proteasas, clasificadas en caspasas iniciadoras o efectoras que son sintetizadas en la célula como moléculas inactivas en forma de zimógeno o proenzima que requieren ser activadas. En las fases finales de apoptosis ocurre una pérdida de la asimetría de la membrana caracterizada por la externalización de la fosfatidilserina induciendo una señal de reconocimiento por células del sistema inmunitario. El ADN se hidroliza por endonucleasas, a su vez activadas

por caspasas, formando fragmentos de 50 a 300 kilobases, deteniéndose así el proceso de transcripción. Finalmente, todos estos procesos están activados concomitantemente y finalizan con la muerte celular y la endocitosis de los cuerpos apoptóticos por las células fagocíticas.

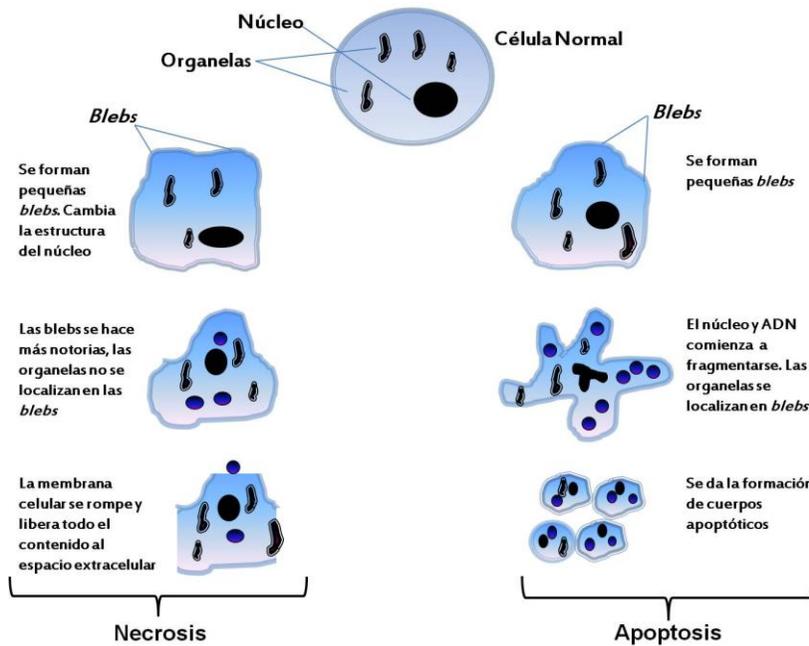


Figura 1. Esquema de las principales diferencias morfológicas entre apoptosis y necrosis.

1.3 Rutas de activación de la apoptosis

La apoptosis puede ser iniciada por diferentes estímulos. Agentes infecciosos o cancerígenos, tóxicos, la irradiación, cambios de temperatura, isquemia y procesos degenerativos son algunos de dichos estímulos [7, 8]. Dependiendo de la naturaleza del estímulo inductor se pueden activar dos vías canónicas de apoptosis: la vía extrínseca y la vía intrínseca (Figura 2).

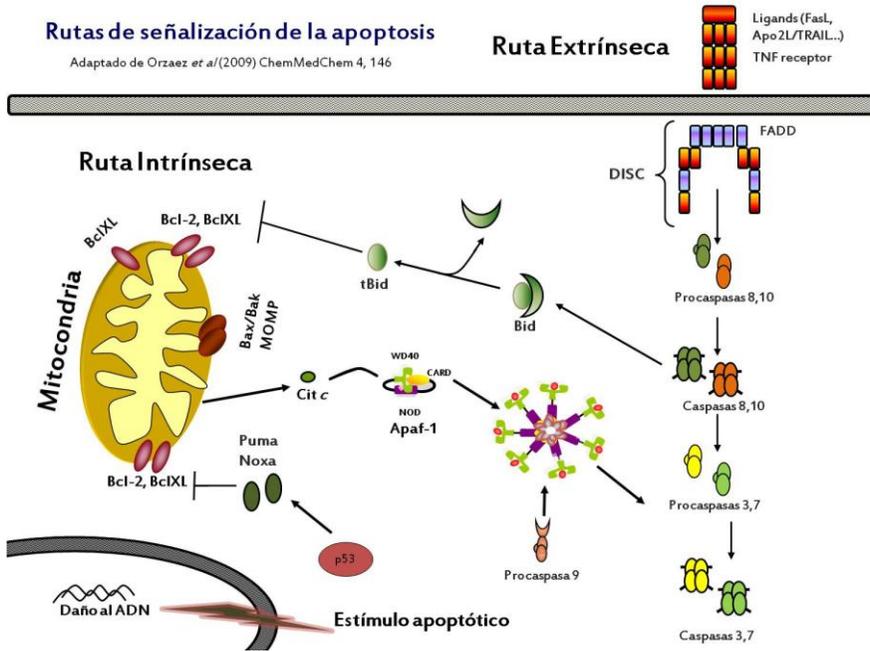


Figura 2. Representación de las principales rutas canónicas de apoptosis.

1.3.1 Vía extrínseca de apoptosis

La vía extrínseca, o vía mediada por receptor, se activa cuando un determinado ligando externo se une en la membrana a su receptor de muerte correspondiente (DR, por sus siglas en inglés). Los receptores de muerte mejor conocidos son TNFR1 (receptor 1 del factor de necrosis tumoral), Fas (también conocido como CD95) y TRAIL (ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF)-R1 y R2 cuyos ligandos son TNF, FasL y TRAIL, respectivamente. La unión del ligando induce la oligomerización del receptor y la transducción de señal a través del reclutamiento del complejo DISC (complejo de señalización inductor de muerte). De forma general, el complejo está formado por proteínas adaptadoras como FADD (dominio de muerte asociado a Fas) que forman una plataforma de reclutamiento de procaspasa-8 y 10. Posteriormente, la procaspasa-8 es activada proteolíticamente y liberada del DISC al citoplasma formando un heterotetrámero de dos subunidades

pequeñas y dos grandes. La caspasa-8 a su vez, activa a procaspasa-3 y -7, encargadas de ejecutar el proceso de muerte celular [2, 9].

1.3.2 Vía intrínseca de apoptosis

Cuando una señal interna como un daño al ADN, la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) o altas concentraciones de calcio citosólico Ca^{+2} , es percibido por la célula se producen cambios en la familia de proteínas Bcl-2 (Familia de proteínas derivadas del protooncogen Bcl-2) que en conjunto, promueven la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP) y la liberación de factores proapoptóticos. Una de las proteínas liberadas al espacio citosólico es el Citocromo *c* (Cit *c*), el cual interactúa con la proteína activadora de apoptosis (Apaf-1) y procaspasa-9 (pc9) dando lugar a un macrocomplejo molecular llamado apoptosoma. Este complejo activa caspasa-9 y éste a su vez, promueve la activación de las caspasas efectoras -3 y -7, desencadenando el proceso de muerte celular [2].

La MOMP es un proceso regulado por la familia de proteínas Bcl-2, cuyos miembros pueden ser anti o proapoptóticos. Se clasifican de acuerdo a su función y la mayoría de los procesos apoptóticos que tienen lugar en la mitocondria están regulados por el equilibrio entre los diferentes miembros de esta familia. Todos ellos presentan en su estructura al menos uno de los cuatro dominios conservados denominados dominios de homología con Bcl-2 (BH) y que se enumeran desde BH1 a BH4. Actualmente, se ha demostrado que el dominio BH3 determina el papel proapoptótico mientras que el resto de dominios la actividad antiapoptótica (Figura 3). Cabe mencionar que existen una serie de proteínas que presenta solamente el dominio BH3 (*BH3-only*). Su función está fuertemente controlada a nivel transcripcional debido a que, ante un estímulo apoptótico, estas proteínas se comportan como activadores directos de toda la ruta de señalización apoptótica.

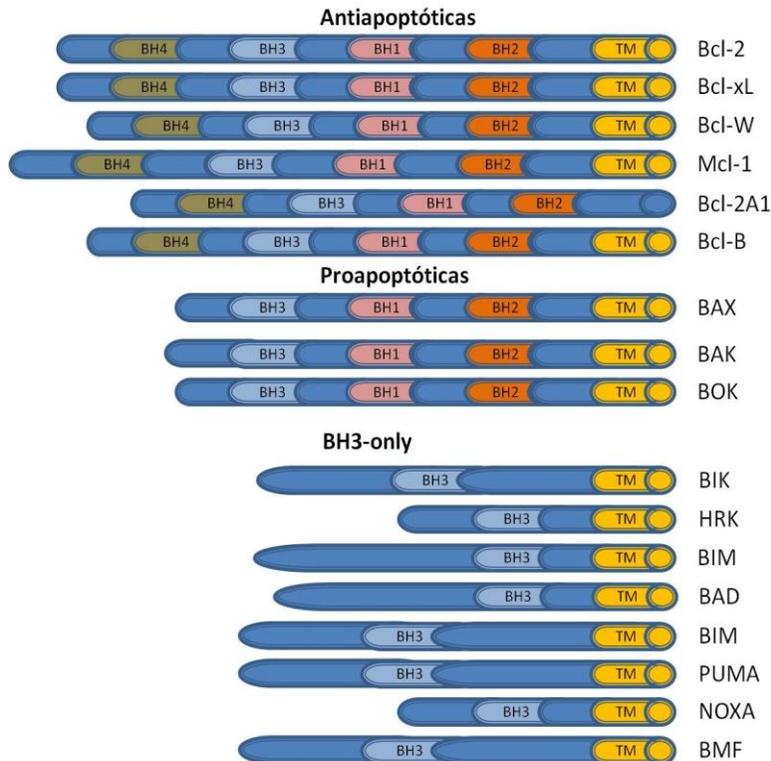


Figura 3. Representación esquemática de los dominios presentes en los diferentes miembros de la familia de proteínas Bcl-2.

Por otro lado, y como se ha mencionado anteriormente, las caspasas son una familia de proteasas encargadas del desmantelamiento celular. Estas proteínas presentan una estructura bien definida: un dominio N-terminal muy variable tanto en su secuencia como en su longitud y al que se le atribuyen funciones de regulación y activación; y una región catalítica formada por dos dominios, uno grande y otro pequeño, que darán lugar a las dos subunidades de la enzima una vez hidrolizada (Figura 4) [10].

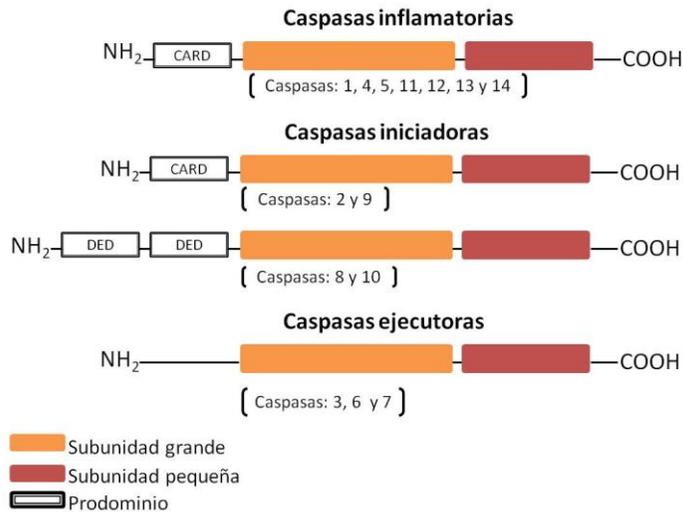


Figura 4. Estructura general de la familia de las caspasas. La familia de caspasas se clasifican en 2 grupos: las caspasas inflamatorias y las iniciadoras con prodominios grandes y las caspasas efectoras con prodominios pequeños.

Las caspasas se dividen en dos grupos según la longitud de su región reguladora N-terminal o prodominio. Las caspasas con prodominio largo como son la -1,-2, -4, -5, -8, -9 y -10 parecen estar involucradas en funciones de regulación de la activación, tanto de la ruta apoptótica (caspasas iniciadoras - 8, -9 y -10) como de inflamación (-1, -4 y -5). El segundo grupo está compuesto por las caspasas con prodominio corto como son las caspasas -3, -6 y -7, las cuales son responsables del desmantelamiento celular una vez activadas por las iniciadoras.

1.4 El apoptosoma: componentes y regulación celular

El apoptosoma fue descrito por primera vez por el laboratorio de Wang [11] como un complejo formado por la proteína Apaf-1, Cit *c* y el cofactor dATP/ATP, que recluta y activa pc9. El Cit *c* (14 kDa) en condiciones homeostáticas se localiza en la membrana interna y en el espacio intermembrana mitocondrial donde transporta electrones entre los complejos

III y IV de la cadena respiratoria. Cuando MOMP es activada el Cit *c* es liberado al citosol.

Apaf-1 (130kDa) es considerado el componente central del apoptosoma. Contiene tres dominios diferenciados: un dominio CARD (dominio de reclutamiento de caspasas) en el extremo N-terminal responsable de la interacción con el dominio CARD de pc9, un dominio central (NOD) de oligomerización y unión a nucleótidos (dATP o ATP) y de 12 a 13 repeticiones WD40 en el extremo C-terminal, responsables de la interacción con Cit *c* y de la formación de una estructura heptamérica (Figura 5) [12]. Existen cinco isoformas de Apaf-1 que se dividen en activas y no activas, las primeras se caracterizan por la presencia de un dominio WD40 extra (Figura 5) [13].

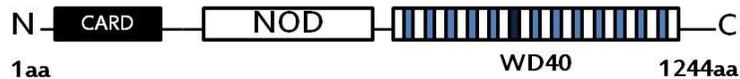


Figura 5. Esquema de los dominios de la proteína Apaf-1.

La formación del apoptosoma se desencadena con la liberación desde la mitocondria del Cit *c* mediada por la familia Bcl-2. Una vez liberado, el Cit *c* se une a Apaf-1 a través de los dominios WD40. En condiciones de inactividad el dominio CARD está secuestrado por dos de los dominios WD40. La unión de Cit *c* y el intercambio de una molécula de dATP/ATP en el dominio NOD provocan la oligomerización del complejo. Finalmente pc9 se recluta y se autoprocasa dando lugar a su forma activa que es capaz de activar a caspasas efectoras como caspasa-3 [9, 14]. La estructura del apoptosoma, descrita por criomicroscopía electrónica, revela una forma de "rueda". El dominio de unión a nucleótidos y siete dominios CARD están localizados en el eje central mientras que las repeticiones WD40 representan los radios de la rueda (Figura 6) [15, 16].

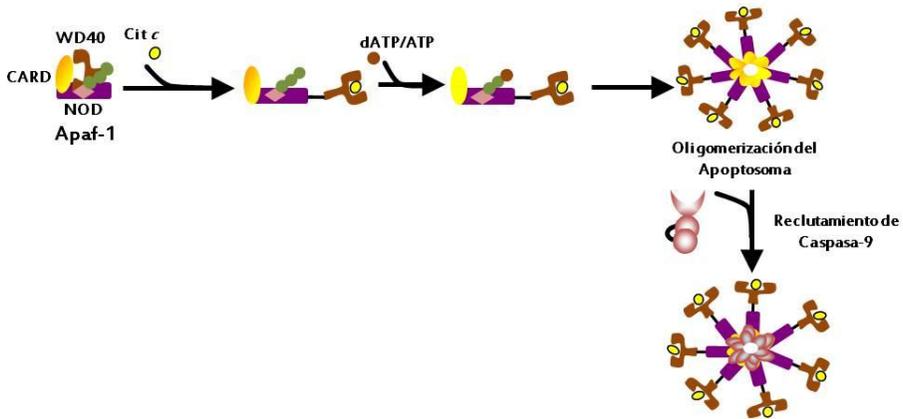


Figura 6. Modelo de formación del apoptosoma. La interacción con Cit *c* y la unión de una molécula de dATP inducen un cambio conformacional en Apaf-1 que promueve la oligomerización y reclutamiento de pc9 para su activación.

Se han propuesto dos modelos para explicar cómo actúa el apoptosoma: el modelo de proximidad inducida [17], y el modelo alostérico [18]. El modelo de proximidad inducida fue propuesto en 1998 y se basa en que las caspasas iniciadoras se autoprocetan al aumentar la concentración local en el apoptosoma [12, 19, 20]. Sin embargo en el modelo alostérico se propone que dicho aumento de concentración local induce posiblemente la dimerización y cambio conformacional en el zimógeno de pc9 y su activación [18]. La activación de las caspasas iniciadoras induce la activación de las caspasas efectoras [18].

1.4.1 Regulación endógena del apoptosoma

Debido al papel crucial que tiene el apoptosoma en los procesos apoptóticos, existen gran número de mecanismos y proteínas que regulan su activación (Tabla 2). En primer lugar, se han descrito diversas quinasas que modulan la actividad de caspasa-9 a través de fosforilaciones principalmente en los residuos Thr125 o Tyr153. Por ejemplo, la quinasa reguladora de señales extracelulares 2 (Erk2) y el complejo ciclina dependiente de quinasa 1 (Cdk1)-ciclina B1 fosforilan a caspasa-9 en el residuo Thr125 e inhiben su hidrólisis, mientras que c-Abl (Abelson tirosina quinasa de la leucemia) es capaz de

fosforilar caspasa-9 en el residuo Tyr153 resultando en su activación [9, 21-23]. Sin embargo, cabe destacar que en la mayoría de los casos mencionados es desconocido el mecanismo por el cual la fosforilación inactiva o activa caspasa-9. Otros reguladores son las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs) [24], las cuales presentan uno o tres dominios BIR (Dominios repetidos IAP de baculovirus) de 70-80 aa responsables de la interacción con los dominios de las caspasas y su consecuente inhibición. El mecanismo, inicialmente propuesto por Deveraux *et al*, consiste en que las IAPs logran interactuar con algunas caspasas entre ellas caspasa-3 y -7 [25]. Sin embargo, fue el laboratorio de Cohen el que demostró que la inhibición del apoptosoma se presenta a través de la interacción de los dominios BIR3 con pc9 y BIR2 con caspasa-3 [26].

Otros moduladores de la actividad del apoptosoma incluyen al ARN de transferencia (tARN), varios nucleótidos (a concentraciones fisiológicas) y cationes como el K^+ y Ca^{+2} y lo hacen a través de la inhibición de la oligomerización de Apaf-1 por unión con el Cit *c* [27-29]. Sin embargo, el papel de los nucleótidos es polémico debido a las altas concentraciones de éstos presentes en la célula y al desconocimiento de cómo sus niveles pueden afectar al apoptosoma. Chandra *et al* mostraron que los nucleótidos interactúan directamente con algunos residuos de lisina del Cit *c* evitando su asociación con Apaf-1 [29].

Se ha descrito un nivel de regulación adicional mediante proteínas que modulan la actividad del apoptosoma por su unión a Apaf-1. La familia de chaperonas está altamente conservada y responde al estrés celular para proteger a la célula catalizando el correcto plegamiento de las proteínas. Diferentes autores señalan a Apaf-1 como una de las dianas de la chaperona Hsp70. Al respecto, se ha identificado un papel dual de esta chaperona. Por un lado, dos laboratorios independientes demostraron que Hsp70 interactúa con Apaf-1 evitando el reclutamiento de pc9 [30, 31]. Por otro lado, Hsp70,

PHAPI (proteínas putativas asociadas con regulación mitocondrial) y la proteína apoptótica CAS (proteína de susceptibilidad celular a la apoptosis) mostraron capacidad de estimular la formación del apoptosoma debido al aumento en la capacidad de intercambio de nucleótido necesaria en su formación [32]. Otra chaperona descrita en la modulación del apoptosoma es Hsp90 β la cual muestra afinidad por el dominio WD40 de Apaf-1 inhibiendo de esta forma la oligomerización de Apaf-1 mediada por Cit *c* [33]. Contrariamente a la regulación a través de Apaf-1, Hsp27 está considerada como un regulador negativo de la muerte celular por unión con el Cit *c* [34].

Por último, diversos estudios han relacionado positiva y negativamente, a las proteínas de la familia Bcl-2 con la regulación del apoptosoma. Estudios de inmunoprecipitación en *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) proponen que Bcl-xL, una proteína antiapoptótica de la familia Bcl-2, interacciona directamente con Apaf-1 de manera que la interacción de esta proteína con pc9 se ve interrumpida deteniendo la maquinaria apoptótica. [35]. Sin embargo, a pesar de que Newmeyer *et al* obtuvieron resultados similares, en sus estudios Bcl-xL fue incapaz de inhibir la activación de caspasas posterior a la adición de Cit *c* en un sistema con extractos celulares [36]. Otro estudio identificó una región de Bcl-xL que podría interaccionar con el dominio NOD de Apaf-1, logrando que en condiciones normales ambas proteínas se encuentren unidas de manera que se evite la formación accidental del apoptosoma, pero al ser liberado Cit *c*, Bcl-xL es desplazado de Apaf-1 [37]. Basado en la habilidad de Bcl-xL para inhibir la apoptosis, un estudio utilizando el sistema de doble híbrido permitió realizar el cribado de una colección de ADNc utilizando un mutante de Bcl-xL el cual retiene la actividad antiapoptótica pero que no logra interactuar con Bax o Bak (proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2 que forman el poro de transición a permeabilidad mitocondrial). El resultado del estudio identificó a Aven, una proteína antiapoptótica, como una proteína nueva que interacciona con Bcl-xL [38]. Esta proteína inhibe la apoptosis en diferentes líneas celulares, aumenta

la función antiapoptótica de Bcl-xL y se considera una proteína de unión a Apaf-1 que previene su oligomerización. Por otro lado, un estudio realizado por Marsden *et al* [39] describe un papel regulatorio de Bcl-2 independiente del apoptosoma. La sobreexpresión de Bcl-2 inhibe diversos estímulos apoptóticos en células linfocíticas, sin embargo la ausencia de Apaf-1 o caspasa-9 no los inhibe, e inclusive cierta actividad caspasa fue detectada. Por lo tanto, se sugiere que Bcl-2 pueda regular la activación de las caspasas independiente del apoptosoma y que su papel es de amplificador más que de iniciador de la ruta.

Tabla 2. Resumen de los principales reguladores del apoptosoma (adaptado de [9]).

Factor	Diana	Mecanismo de acción	Referencia(s)
Quinasas			
AKT/PKB	Casp-9 (Ser196-P)	Inhíbe el procesamiento de casp-9	Cardone et al, 1998
CDK1-ciclina B1	Casp-9 (Thr125-P)	Inhíbe el procesamiento de casp-9	Allan and Clarke, 2007
DYRK1A	Casp-9 (Thr125-P)	Inhíbe el procesamiento de casp-9	Seifert et al, 2008; Seifert et al, 2009
ERK2	Casp-9 (Thr125-P)	Inhíbe el procesamiento de casp-9	Allan et al, 2003; Martin et al, 2008
PKA	Casp-9 (Ser99-P, Ser183-P)	Inhíbe el reclutamiento de casp-9 al apoptosoma?	Martin et al, 2005
c-Abl	Casp-9 (Tyr153-P)	Promueve el procesamiento de casp-9	Raina et al, 2005
JNK	Apaf-1	Interacción con Apaf-1 y retraso del procesamiento de caspasa-9	Tran et al, 2007
Chaperonas			
Hsp27	Citocromo <i>c</i>	Inhíbe la oligomerización de Apaf-1	Bruey et al, 2000
Hsp70	Apaf-1/Apoptosoma?	Inhíbe la oligomerización de Apaf-1 o el reclutamiento de casp-9	Beere et al, 2000; Saleh et al, 2000
Hsp90B	Apaf-1	Inhíbe la oligomerización de Apaf-1	Pandey et al, 2000
CAS, PHAP y Hsp70	Apaf-1	Promueve la oligomerización de Apaf-1 y el intercambio de nucleótidos	Kurokawa et al, 2008 Jiang et al, 2003 Hill et al, 2004 Kim et al, 2008
Ciclo celular			
Nucling	Apaf-1/Casp-9	Aumento en la expresión de Apaf-1 y pc9	Sakai et al, 2003 Sakai et al, 2004
PARCS	Apaf-1	Mantiene Apaf-1 activo para ensamblaje de dATP y cit <i>c</i>	Sanchez-Olea et al 2008
Otros			
tRNA	Citocromo <i>c</i>		Mei et al, 2010
AVEN	Apaf-1	Inhíbe la oligomerización de Apaf-1	Chau et al, 2000
HCA66	Apaf-1	Promueve el reclutamiento de casp-9 o su retención en el apoptosoma	piddubnyak et al, 2007
Histona H1.2	Apoptosoma	Promueve activación de caspasas (mecanismo no conocido)	Ruiz-Vela et al, 2007
TUCAN	Casp-9	Inhíbe la interacción entre Apaf-1 y casp-9	Pathan et al, 2007
XIAP	Casp-9	Inhíbe la casp-9 procesada	Deveraux et al, 1998; Bratton et al, 2002
Apo-citocromo <i>c</i>	Apaf-1	Inhíbe la oligomerización de Apaf-1	Srinivasula et al, 2001; Shiozaki et al 2003 Martin et al, 2004
Moléculas pequeñas			
Nucleótidos	Citocromo <i>c</i>	Inhíbe la oligomerización de Apaf-1	Chandra et al, 2006
K+	Citocromo <i>c</i>	Inhíbe la oligomerización de Apaf-1	Purring-Koch et al, 2000
Ca ²⁺	Apaf-1	Inhíbe el intercambio de nucleótidos y la oligomerización de Apaf-1	Cain et al, 2001 Bao et al, 2007
Oxido nítrico	Apaf-1	Inhíbe la oligomerización de Apaf-1	Zech et al, 2003

1.4.2 Modulación química del apoptosoma

La apoptosis es un mecanismo de muerte celular que es esencial en la homeostasis y en el desarrollo celular. Una apoptosis desregulada contribuye a la aparición de diversas patologías. En el caso de una apoptosis defectuosa la patología más frecuente incluye al cáncer, mientras que un exceso participa de enfermedades neurodegenerativas. Debido a la importancia de regular estos procesos patológicos la modulación del apoptosoma ha sido objeto de atención en programas dirigidos a la identificación de moduladores sintéticos de la actividad del apoptosoma y, en particular, de Apaf-1 [40-44].

Activadores

Diversos tipos de cánceres se caracterizan por presentar una baja activación de la ruta intrínseca de apoptosis que produce resistencia al tratamiento con agentes quimioterapéuticos. Por lo tanto no es de extrañar que una de las estrategias bajo estudio sea la búsqueda de activadores de apoptosis. Una de las estrategias propuestas fue la activación de Apaf-1. El primer activador de Apaf-1 descrito fue propuesto por el grupo de Wells [44]. El denominado "compuesto 2" (Figura 7), fue obtenido a partir del cribado de una quimioteca y posterior optimización en un ensayo de reconstitución del apoptosoma con proteínas recombinantes y extractos celulares. El compuesto 2, presenta actividad a concentraciones micromolares e induce apoptosis en diferentes líneas celulares. El mecanismo de acción propuesto se sustenta en que el compuesto 2 facilita la oligomerización de Apaf-1 [44]. Otros estudios han propuesto al compuesto (α -Triclorometil)-4-piridinaetanol (PETCM) como activador de la ruta apoptótica a través la activación general de la vía intrínseca [45]. Posteriormente, se describió que el mecanismo de acción de esta molécula se basa en suprimir la inhibición que ejerce ProT (Protimosina- α) sobre PHAPI, la cual promueve la activación de pc9 posterior a la formación

del apoptosoma. En este mecanismo, la proteína CAS, junto a PHAPI y Hsp70, parece ser un regulador del intercambio de nucleótido en Apaf-1 [32].

Inhibidores

En la búsqueda de inhibidores del apoptosoma, cabe destacar los estudios pioneros del laboratorio de Jäättelä. Mediante el cribado de una quimioteca en extractos citosólicos de células derivadas de cáncer cérvico-uterino humano (HeLa) [41] se identificaron compuestos derivados de diarilureas como posibles inhibidores de la activación del apoptosoma. El compuesto más activo en su estudio, NS3694, se propuso que ejercía una acción inhibitoria sobre la interacción entre Apaf-1 y pc9 [41] (Figura 7). Sin embargo, no se han descrito nuevos datos sobre la evolución farmacológica del compuesto ni sobre el mecanismo de acción.

En nuestro laboratorio se abordó la identificación de inhibidores de la actividad del apoptosoma con una doble vertiente, la identificación de herramientas moleculares para el estudio de rutas de señalización en apoptosis y para el posible desarrollo de nuevos fármacos antiapoptóticos. Inicialmente, se llevó a cabo un cribado de una quimioteca de N-alquilglicinas (peptoides) [46, 47] utilizando un modelo de formación del apoptosoma *in vitro* [42]. Se identificó el denominado peptoide 1 (Figura 7) y se postuló que mediante la inhibición de la interacción Apaf-1/pc9 se inhibía la actividad del apoptosoma en extractos celulares e *in vitro*. No obstante, el compuesto presentaba dificultad para su internalización en la célula lo que llevó a realizar diferentes aproximaciones químicas para mejorar sus propiedades físico-químicas [43, 48, 49]. La ciclación del peptoide 1 (SVT016426, Figura 7) incrementó la actividad antiapoptótica en diferentes modelos celulares [43, 50]. Recientemente en el laboratorio se ha demostrado que el compuesto de tercera generación SVT016426 se une a Apaf-1 e inhibe la muerte celular en distintos modelos celulares y animales de apoptosis patológica. Más aún, la utilización de este

compuesto ha sido determinante para proponer un importante papel de Apaf-1 en la mitocondria (Orzáez et al. *submitted*).

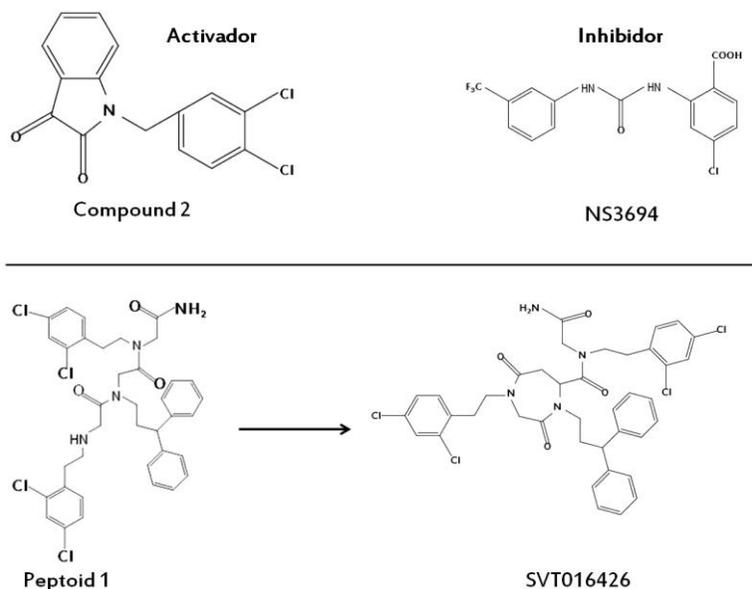


Figura 7. Estructura química de diferentes moduladores sintéticos de Apaf-1.

1.4.3 Funciones no apoptóticas de la proteína Apaf-1

Además de la función apoptótica descrita para Apaf-1, algunos autores señalan funciones no relacionadas con procesos de muerte celular. Una de las funciones atribuidas a Apaf-1 consiste en su capacidad para regular el ciclo celular. Esta observación se basa en la incapacidad que muestran los ratones *knock-out* de Apaf-1 y células humanas privadas de Apaf-1 (*knock-down* de Apaf-1) en detenerse en la fase S del ciclo celular ante la inducción de un daño al ADN con el tratamiento con cisplatino o irradiación ultravioleta (UV). Una posible explicación es que Apaf-1 está implicado en la activación de Chk1, quinasa relacionada con los puntos de control que posee el ciclo celular. Reforzando esta teoría, se ha observado que la traslocación nuclear de Apaf-1 en células cancerígenas de pulmón se correlaciona con la activación endógena de Chk1 [50-52].

Otra de las funciones que conciernen a Apaf-1 es su papel en la regulación de la morfología y funciones del centrosoma, una estructura microtubular organizada que se caracteriza por estar formada por los centriolos que a su vez se componen por γ -tubulina. Los centrosomas son importantes durante la fase S de la división celular en la cual, se separan para formar los ejes mitóticos. Se ha observado que HCA66, una proteína que previamente se había descrito como proteína de unión a Apaf-1 [53], es necesaria para la estabilidad de las γ -tubulinas. Esta cadena de interacciones ha llevado al laboratorio de Cecconi a proponer que Apaf-1 juega un papel en la estabilidad del centrosoma al favorecer el reclutamiento de HCA66 durante la fase S del ciclo celular. Fallos en este proceso conllevan a una pobre asociación entre las proteínas y a una formación aberrante de los microtúbulos afectando así la formación de los ejes mitóticos, la división celular y la organización mitocondrial [54].

1.5 Apoptosis y enfermedad

Las enfermedades en las que la apoptosis se ha implicado pueden dividirse en dos grupos: aquellas en las que hay un incremento en la supervivencia celular debido a una inhibición de la apoptosis, y aquellas en las que ocurre una apoptosis excesiva (Tabla 3).

Tabla 3. Compendio de enfermedades asociadas a alteraciones en los procesos apoptóticos.

Enfermedad	Categoría
Defecto de apoptosis	
Colorrectal Glioma Hígado Neuroblastoma Próstata	Cáncer
Miastenia grave Lupus erimatoso sistémico	Enfermedades autoinmunes
Enfermedad inflamatoria intestinal Inflamación pulmonar	Enfermedades inflamatorias
Adenovirus Baculovirus	Infecciones víricas
Exceso de apoptosis	
Linfocitos T	SIDA
Enfermedad de Alzheimer Esclerosis lateral amiotrófica Enfermedad de Parkinson Enfermedad de Huntington	Enfermedades neurodegenerativas
Anemia aplásica Síndrome mielodisplásico Linfocitopenia T CD4+	Enfermedades hematológicas
Infarto de miocardio Accidente cerebrovascular Daño isquémico renal	Daño tisular

Entre las enfermedades asociadas a un defecto en la apoptosis se encuentra el cáncer. En gran parte de tumores se ha demostrado que las células cancerosas responden de forma anómala a la inducción de apoptosis. De hecho, además de las alteraciones descritas en genes reguladores de ciclo celular, también se han observado alteraciones en genes moduladores de apoptosis. No sólo existe una correlación entre la inhibición de la apoptosis y la malignización celular sino que se ha comprobado que un amplio grupo de

terapias antineoplásicas inducen apoptosis en la célula tumoral. En el caso del apoptosoma, se ha observado que la expresión de Apaf-1 está disminuida o inactivada en diferentes tipos de tumores como neurofibromatosis tipo 1, linfoma de Burkitt, varios tipos de melanoma y en tumores pulmonares y renales, entre otros [55-57]. Análisis de pacientes con neurofibromatosis tipo 1, un desorden cutáneo que tiene alta probabilidad de convertirse en tumor, ha revelado una baja expresión de Apaf-1 y consecuentemente una apoptosis defectuosa [53]. Por otro lado, diversos cánceres renales se han asociado con la supresión de Apaf-1 debido a la hipermetilación de su promotor [55].

En cuanto a las enfermedades asociadas a un aumento en la apoptosis celular se hallan las enfermedades neurodegenerativas, el SIDA y enfermedades con daño tisular por isquemia como por ejemplo el infarto de miocardio. Un amplio grupo de enfermedades neurodegenerativas, entre las que se incluye la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) o Huntington (HD), se asocian con la apoptosis selectiva de neuronas. Esta muerte neuronal parece asociarse con un incremento en la susceptibilidad a la apoptosis que ocurre en estas células. Como agentes inductores de la muerte neuronal se han postulado el estrés oxidativo, defectos mitocondriales o sustancias neurotóxicas. El estudio de los mecanismos de apoptosis con el fin de inhibir o controlar este proceso en estas enfermedades es de gran interés médico para avanzar en los tratamientos administrados.

El apoptosoma y en particular Apaf-1, se han relacionado a modelos de patologías neurodegenerativas aunque su papel todavía es desconocido. El laboratorio de Cecconi demostró que la presencia de Apaf-1 en un modelo celular de ELA es crítica para incrementar el daño ocasionado por la proteína superóxido dismutasa (SOD) alterada. En su modelo, la proteína SOD alterada ocasionaba daño mitocondrial con disrupción de la cadena respiratoria y consecuente generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y salida de Cit c , lo que activa la formación del apoptosoma y la cascada apoptótica. Sus

estudios demostraron que la ausencia de Apaf-1 presentaba un fenotipo de resistencia a la apoptosis iniciada por SOD [58]. Por otro lado, Mochizuki *et al* demostraron que la expresión de un dominante negativo de Apaf-1 que presenta una alteración en el dominio CARD de interacción con pc9 lograba disminuir la muerte neuronal y la neurodegeneración en un modelo *in vivo* de la enfermedad de Parkinson [59].

Otros estudios han relacionado al homólogo de Apaf-1 en *Drosophila melanogaster*, DARK (proteína homóloga de Apaf-1 en *Drosophila*), en la fisiopatología de HD, la cual forma parte de la enfermedades dependientes de poliglutaminas (poliQ). La huntingtina (ver más abajo) es una proteína que contiene en su extremo N-terminal una cadena de poliQ que si excede las 40 repeticiones al ser hidrolizada por diversas proteasas forman agregados citosólicos e intranucleares [60]. En este modelo, el sistema GAL4/UAS permitió expresar en el tejido ocular de la mosca un polipéptido que contenía 108 repeticiones de glutaminas, lo que resultó en una rápida degeneración ocular en la retina que se evidenciaba por la disminución de los rabadómeros (orgánulos fotosensibles en las neuronas fotorreceptoras), alta presencia de vacuolas en los fotorreceptores degenerados y presencia de agregados difundidos por el citoplasma y núcleo. El papel de DARK en el fenotipo de la patología de HD queda reflejado tras observar que la proteína mutada logra recuperar el fenotipo ocular normal. Además, se ha demostrado que la mutación no solamente disminuye la disrupción de la morfología de la retina y el aumento en la cantidad de rabadómeros, sino que existe menor presencia de agregados citosólicos y perinucleares. Por tanto se propuso que DARK no solo tiene un papel importante en el proceso de neurodegeneración sino que también puede participar en cierta manera en la formación de los agregados dependientes de poliQ.

Por último, cabe destacar que otros reguladores de Apaf-1 como las chaperonas moleculares, también han sido implicados en la fisiopatología de

las enfermedades dependientes de poliQ [30, 31]. Warrick *et al* demostraron que la sobreexpresión de la Hsp70 disminuía la neurodegeneración *in vivo* y la presencia de agregados de poliQ en un modelo en *D. melanogaster* de la enfermedad de Machado-Joseph (ataxia espinocerebelar tipo 3) [61]. Coincidiendo con estos resultados, Guzhova *et al* propusieron que el efecto observado con Hsp70 en la disminución de agregados en HD se debe a que esta chaperona inhibe a la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) la cual ha sido implicada en enfermedades que presentan agregación de proteínas alteradas [62].

2. La Enfermedad de Huntington (HD)

2.1 Generalidades de la HD

La HD o corea de Huntington, es un desorden genético irreversible con herencia autosómica dominante. Esta enfermedad neurodegenerativa está causada por la expansión del triplete CAG (aa glutamina; Q) en el exón 1 del gen que codifica para la proteína denominada "huntingtina" (Htt) y se caracteriza por la acumulación, en las neuronas afectadas, de fragmentos agregados de la proteína alterada (mtHtt). Esta enfermedad produce una degeneración y muerte neuronal continua que, a día de hoy, carece de cura.

La HD forma parte del grupo de enfermedades neurodegenerativas dependientes de poliQ que se caracterizan por la expansión de una cola de glutaminas en genes únicos que no comparten homología. Cuando las glutaminas repetidas exceden un determinado número la proteína presenta una función alterada, se cree que por una ganancia de función [63]. Esta alteración puede llegar a inducir la patología y el número de repeticiones necesarias varía entre las distintas enfermedades. Actualmente, se conocen al menos nueve enfermedades con esta característica (Tabla 4) que causan degeneración progresiva principalmente de las neuronas motoras. En todas

ellas el inicio de la sintomatología de la enfermedad es inversamente proporcional al número de repeticiones de glutaminas. Otra característica común es la presencia de agregados formados por la proteína mutante o alterada.

Tabla 4. Sumario de enfermedades dependientes de poliQ.

Enfermedad	Proteína	# de repeticiones de PoliQ	
		Normal	Patológica
SBMA	Receptor Androgénico	6-36	38-62
DRPLA	Atrofina-1	3-38	49-88
HD	Huntingtina	6-35	36-128
SCA1	Ataxina-1	6-39	41-83
SCA2	Ataxina-2	14-32	34-77
SCA3	Ataxina-3	12-40	62-86
SCA6	CACNA 1A	4-18	21-30
SCA7	Ataxina-7	7-18	38-200
SCA17	Proteína de unión a TATA	25-43	45-63

SBMA: atrofia bulbo-espinal; DRPLA: atrofia dentato-rubro-pallido-lusiana; HD: Enfermedad de Huntington; SCA: ataxia espinocerebelosa.

Descrita por el Dr. George Huntington en el año 1872 [64], pertenece al grupo de las denominadas enfermedades raras puesto que su incidencia es de 4-10 casos por cada 100000 personas. La enfermedad se presenta por igual en ambos sexos y en cualquier grupo étnico, sin embargo su incidencia es mayor en los países europeos [65, 66]. Las personas que presentan la mutación en el gen pueden volverse sintomáticos a cualquier edad desde 1 hasta los 80 años sin que haya signos detectables previamente [67]. No obstante, la edad media de inicio de los síntomas es entre los 30 y 50 años [65]. Los primeros síntomas que se presentan en la fase pre-diagnóstica son cambios de personalidad, entre ellos depresión, olvido de hechos recientes, agresividad, presencia de movimientos involuntarios o coreicos, torpeza y falta de coordinación. Conforme avanza la enfermedad se acentúa la pérdida de coordinación, rigidez, dificultad para hablar y tragar (Tabla 5). La muerte de estos pacientes se produce debido a problemas de salud derivados de la

enfermedad como atragantamiento, infecciones (neumonía) y/o fallo cardíaco [65].

Tabla 5. Resumen de características físicas y cognitivas de la HD.

	Etapas iniciales	Etapas avanzadas
Físicos	Dificultad para moverse. Rígidez.	Falta de coordinación. Corea. Acinesia. Dificultad para tragar.
Emocionales/Cognitivos	Irritabilidad. Falta de concentración Ansiedad. Desinhibición	Agresividad. Pérdida de memoria de corto plazo. Aislamiento social.

La repetición poliQ se considera normal hasta 35 unidades de CAG. Cuando el gen de Htt contiene más de 40 repeticiones de glutaminas, se producirá la mtHtt aumentando las posibilidades de la HD. Las personas con número de repeticiones intermedias (36 y 39) puede que nunca desarrollen los síntomas de la enfermedad o que estos aparezcan a una edad avanzada. Existe una relación inversa entre el número de glutaminas y la edad de inicio: en general, a mayor número de repeticiones, más temprano aparece la enfermedad [67, 68]. El efecto patológico de la mutación es la ganancia de función o adquisición de nuevas propiedades de la mtHtt. Por un lado, es posible que la mtHtt ejerza su acción interfiriendo en procesos de reparación utilizados normalmente por las células y cuya necesidad se acentúa con la edad, de ahí la tardía aparición de los síntomas y su progresividad. Por otro lado, mtHtt interfiere con la función de la proteína Htt (descrita posteriormente) alterando todas las funciones de la misma. En resumen, la degeneración neuronal que ocurre en la HD es consecuencia de un efecto combinado de ganancia de función de la mtHtt aunado a la pérdida de función de la proteína silvestre.

2.2 Herencia y diagnóstico

La HD es de carácter autosómica dominante, con lo cual la descendencia presenta 50% de posibilidades de heredar un alelo con el gen mutante y desarrollar los síntomas de la enfermedad. El diagnóstico de la enfermedad se basa en pruebas tanto clínicas (examen neurológico detallado y el historial familiar) como genéticas.

La prueba genética se denomina “test predictivo” y se realiza en personas presintomáticas. En resumen, consiste en tomar una muestra de sangre y analizar el número de repeticiones CAG del gen de Htt detectando si se posee o no la mutación. Debido a la preocupación que puede ejercer el conocimiento de desarrollar la enfermedad cada persona debe decidir si desea o no realizarse el test. En este aspecto es fundamental el consejo genético, en donde ante la duda de realizar el test, médicos y genetistas guían a las personas en el proceso. Los especialistas aconsejan que la edad mínima para realizarse el test sea 18 años. La duración media de la enfermedad desde el comienzo de los síntomas hasta el fallecimiento es de 15 años, por lo que tomar cualquier decisión debe ser realizada a la mayor brevedad posible con las mayorías garantías y seguridad para el paciente. En la actualidad existen tanto un análisis prenatal que compara el patrón genético del feto con el de los abuelos para conocer si el feto es portador de la enfermedad, como un análisis genético preimplantacional (PGD) o análisis embrionario, el cual se realiza en combinación con la técnica de fertilización *in vitro* (FIV) donde los embriones son analizados antes de proceder a su implantación. Mediante esta técnica solo se implantan aquellos que no tienen el gen alterado de la HD.

2.3 Tratamiento

Hoy en día no existe ningún fármaco cuya eficacia en disminuir los síntomas o en modificar el proceso de la enfermedad haya sido totalmente demostrada en HD. Los tratamientos están dirigidos a paliar los síntomas y

signos a medida que se presentan y a tratar de retrasar la aparición de los mismos con el objetivo de proporcionar una mejor calidad de vida al paciente [65]. El tratamiento se centra en dos grandes áreas de acción. La primera incluye la administración de fármacos inhibidores de la recaptura de serotonina y/o dopamina y antipsicóticos, entre otros, con el fin de controlar los síntomas como la ansiedad, apatía, depresión, insomnio y rigidez. La segunda se encuentra en constante experimentación y busca disminuir la progresión de la enfermedad con tratamientos neuroprotectores. De acuerdo con la Sociedad Americana de la Enfermedad de Huntington (HDSA), los tres síntomas que más presentan los pacientes son: irritabilidad, comportamiento obsesivo-compulsivo y los movimientos coreicos. La irritabilidad se refleja en extrema sensibilidad, rápida excitabilidad y sobrerreacción a sentimientos o eventos. Los inhibidores de la recaptura de serotonina (SSRI) y en ocasiones antipsicóticos, son la primera línea para el tratamiento de este síntoma. Entre los más utilizados se encuentra el valproato de sodio, carbamacepina y lamotrigina. Los movimientos coreicos, que dificultan acciones como caminar o hablar, son otro de los síntomas que más se presentan y que empeoran con el avance de la patología. Se utilizan fármacos como el haloperidol (antipsicótico), amantadina (inhibidor de N-metil-D-aspartato, NMDA), y tetrabenazina (antidopaminérgico) de distintos mecanismos de acción. De forma complementaria, se ha debatido sobre los beneficios que tiene una dieta rica en vitaminas, coenzimas y otros compuestos como por ejemplo, creatina y coenzima Q10, sin embargo, no existen datos clínicos suficientes que respalden su uso.

La segunda área de tratamiento contempla todos aquellos tratamientos en fase de experimentación que intentan disminuir la formación de los agregados, evitar el estrés oxidativo y mantener activas las rutas denominadas de "limpieza intracelular" (Figura 8). En la mayoría de los casos el mecanismo de acción es incompleto o desconocido. No obstante, el beneficio en modelos animales del uso de algunas de estas moléculas ha sido

demostrado, inclusive algunos de ellos se encuentran en fase clínica actualmente.

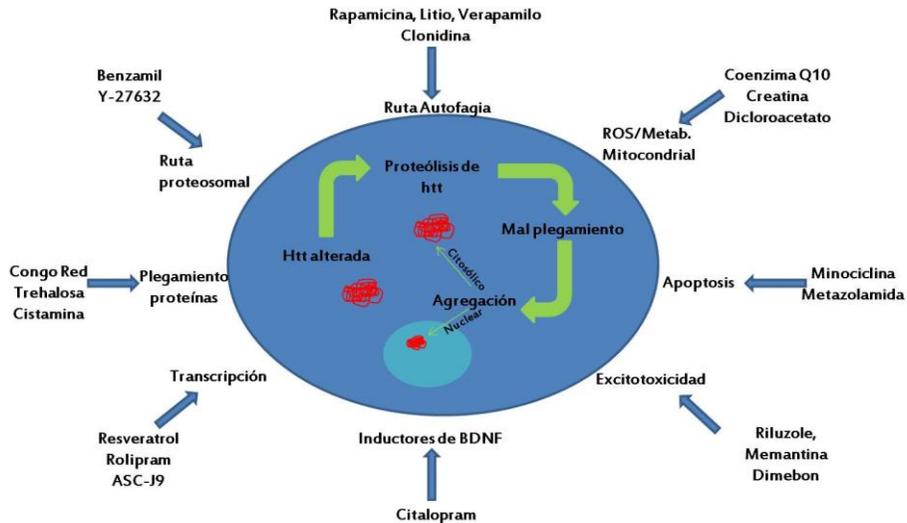


Figura 8. Esquema representativo de los diferentes compuestos y estrategias bajo estudio para el tratamiento de la HD.

Algunos ejemplos son la coenzima Q10 y minociclina. La coenzima Q10 ha sido estudiada en modelos de ratón de la HD donde se ha demostrado que logra disminuir el daño cerebral [69] y aumentar el metabolismo energético [70]. Por el otro lado, minociclina ha sido de amplio estudio en diversas enfermedades neurodegenerativas debido a su papel multidisciplinar. Sus propiedades antiinflamatorias, su capacidad para prevenir el daño y la muerte celular lo han hecho una molécula de estudio interesante.

2.4 Función de la proteína huntingtina (Htt)

Htt se expresa constitutivamente en todas las células humanas, con altas concentraciones en cerebro y testículos, y cantidades moderadas en hígado, corazón y pulmones [67, 68]. Se trata de una proteína soluble de peso molecular 348 kDa y 3144 aa. En vertebrados superiores, la región poliQ está seguida de una zona de prolinas la cual es responsable de la alta solubilidad

que presenta. Además de esta zona de prolinas, la proteína presenta hasta 37 regiones llamadas HEAT cada una de 40 aminoácidos de longitud y que se cree son dominios de interacción con otras proteínas [68] (Figura 9). En el extremo C-terminal presenta una secuencia de reconocimiento de exportación nuclear (NES) y una secuencia menos importante de localización nuclear (NLS), lo cual indica el papel de transportador de moléculas del núcleo al citoplasma. Por último, se han descrito tres sitios consenso de corte de la proteína por diferentes proteasas. La proteína mtHtt es más susceptible a la proteólisis generando fragmentos que agregan intracelularmente y que se localizan tanto en el citoplasma como en núcleo. Entre las proteasas implicadas se encuentran las caspasas-2 y -3, y las calpaínas [68]. Estudios de localización subcelular la sitúan en varios orgánulos intracelulares como núcleo (perinuclear e intranuclear), retículo endoplásmico y aparato de Golgi.

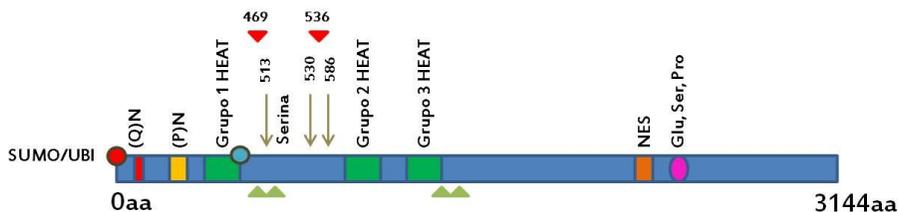


Figura 9. Esquema de la proteína Htt. La proteína está formada por una cadena de poliQn, seguida de una secuencia de prolinas (P)n. Los cuadrados verdes indican dominios HEAT. La figura muestra los sitios de corte por caspasas (flechas rojas) y calpaínas (triángulos rojos). Las flechas verdes señalan regiones de aa consenso para otras proteasas. NES: Secuencia de reconocimiento de exportación nuclear. Los círculos rojo y azul indican modificaciones post-transcripcionales: ubiquitinación y/o sumoilación (SUMO). Se muestran zonas ricas en ácido glutámico (Glu), serina (Ser) y prolina (Pro).

La función(es) de la proteína es desconocida, puesto que su homología estructural no es similar a otras proteínas con su tamaño y su estructura. Sin embargo, se ha establecido que participa en el desarrollo embrionario, tráfico vesicular, neurogénesis y control a nivel transcripcional (Figura 10).

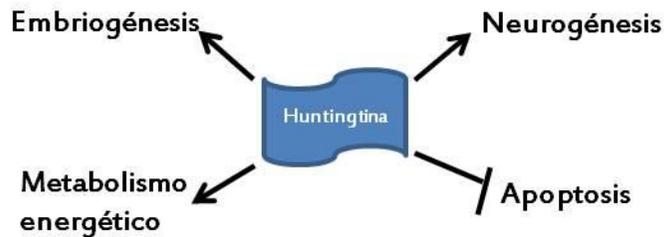


Figura 10. Resumen de las diferentes funciones atribuidas a Htt.

Htt durante el desarrollo

Se ha descrito un papel fundamental de la proteína Htt en el desarrollo embrionario. Su completa inactivación en ratones *knock-out* causa la muerte del embrión antes de la fase de gastrulación y la formación del sistema nervioso. Otra función descrita en los tejidos extraembrionarios encargados del mantenimiento del embrión, es independiente de las repeticiones de poliQ y se basa en el posible fallo en el transporte de nutrientes al feto, conllevando a la muerte del embrión aproximadamente en el día 8 de gestación [71]. En paralelo, se ha observado que la presencia de un alelo funcional es compatible con la vida. Al respecto, se ha observado que ratones con niveles de Htt menores al 50% muestran malformaciones en el cortex, estriado y neurogénesis disminuida. En resumen, Htt participa de la formación del sistema nervioso central.

Htt y su función antiapoptótica

Otras de las propiedades atribuidas a la Htt es su propiedad antiapoptótica. Rigamonti *et al* [72, 73], describieron la protección que ejerce la proteína silvestre en neuronas inmortalizadas tras exponerlas a diferentes inductores apoptóticos. Estudios acerca del mecanismo molecular apuntan a que la acción antiapoptótica se debe a una inhibición en el procesamiento de pc9. Más aún, la sobreexpresión de la proteína silvestre protege del daño por

isquemia *in vivo* y de la excitotoxicidad mediada por NMDA en modelos de ratón [74, 75].

Htt y transporte vesicular

El papel de Htt en transporte vesicular consiste en ser un facilitador del transporte de diversas proteínas. Se ha observado que promueve el transporte del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) a nivel neuronal. Esta habilidad está ampliamente relacionada con la proteína asociada a huntingtina (HAP1) y con la subunidad p150 de la dinactina. Se ha descrito que Htt interacciona con la subunidad p150 vía HAP1 estimulando el transporte de BDNF [68]. Apoyando esta función, estudios en *D. melanogaster* en los cuales los niveles de Htt fueron reducidos, han demostrado defectos en el tráfico axonal y degeneración ocular similares a los observados cuando se sobreexpresa exógenamente la mtHtt [76]. Por otro lado, Htt está implicada en la maquinaria que controla la transmisión sináptica interactuando con proteínas citoesqueléticas que son esenciales en la exo- y endocitosis a nivel de las terminaciones sinápticas [77].

Htt y transcripción de genes

Algunos estudios han relacionado a Htt con la transcripción de genes. Zuccato *et al*/ observaron que Htt promueve la transcripción de BDNF a través del secuestro de elementos co-represores de su transcripción como lo son REST/NRSF. La presencia de mtHtt promueve la entrada de REST/NRSF al núcleo inhibiendo la transcripción de BDNF reforzando el rol indirecto que tiene la proteína silvestre en transcripción [78].

2.5 Base molecular de la HD

La vía mayoritariamente activa en la muerte neuronal es la ruta de apoptosis. La activación de las caspasas y la liberación de Cit *c*, así como los cambios en los miembros pro y antiapoptóticos de la familia de proteínas Bcl-2

son claves para determinar el destino muerte/supervivencia de las células en la HD [79]. Por un lado, células que expresan la mtHtt presentan mayor liberación de Cit *c* al espacio citosólico que aquellas células que expresan la proteína silvestre [80] [63]. En la misma dirección, Chow *et al*/describieron la posibilidad de que la porción N-terminal de la mtHtt esté en contacto con la membrana externa de la mitocondria provocando especies reactivas de oxígeno y una desestabilización del potencial de membrana con lo que se facilitaría la salida de Cit *c* y la activación de la vía intrínseca de la apoptosis [81]. Por otro lado, el papel de las caspasas sigue siendo discutido [80, 82]. En un modelo de células neuronales que expresan mtHtt se asoció la presencia de la proteína mutante a la aparición de un corte de laminina B hidrolizada por caspasas activadas. Además, la activación de caspasas también se ha asociado a un aumento de los agregados de mtHtt que contienen el residuo N-terminal de la proteína, lo que defiende el hecho de que algunas caspasas son las responsables, no sólo de la muerte apoptótica, sino del corte de la proteína y la generación de los agregados [82]. Este hecho, también ha sido estudiado en modelos de ratones transgénicos R6/2 (R6 representa el único ratón macho obtenido luego de la implantación del exón 1 de Htt humana en 6 embriones. El número 2 representa uno de los 5 posibles lugares del genoma donde se introdujo el fragmento) a los cuales el tratamiento con minociclina reduce los niveles de estas proteasas activas, disminuye los signos y retrasa la muerte [83]. Sin embargo, no solo las caspasas de la vía intrínseca son activadas en el desarrollo de la muerte neuronal en los distintos modelos. La activación de caspasa-8 también ha sido demostrada en un cultivo primario de neuronas y en tejidos de pacientes con la HD [84].

Finalmente, otros mecanismos no relacionados con la activación de caspasas también están implicados. Por ejemplo, el tratamiento con necrostatina 1, un inhibidor de RIPK1 (serina-treonina quinasa de interacción

con receptores), en ratones modelo R6/2 disminuye el inicio de los primeros síntomas y el deterioro de las habilidades motoras [85].

2.5.1 La formación de los agregados moleculares

El exceso de poliQ en la mtHtt induce cambios conformacionales en la Htt, formando agregados intracelulares. Se ha demostrado que la activación de proteasas como calpaína y algunas caspasas promueven la proteólisis del extremo N-terminal de la proteína Htt lo que genera fragmentos tóxicos y la formación de agregados. Wellington *et al*/demostraron que la activación de las caspasas-3 y -6 genera un corte en la mtHtt formando fragmentos más tóxicos que con la proteína silvestre [86]. La formación de los agregados promueve a la vez la activación de otras proteasas de cisteína como la apopaína y la calpaína que, de manera poliQ dependiente, proteolizan a Htt aumentando los niveles de agregación [87, 88]. A pesar de estos estudios, el mecanismo exacto por el cual se promueve la formación de los agregados está aún por ser elucidado. Diversos estudios intentan concluir si la formación de estos agregados es un mecanismo celular de protección o de neurotoxicidad. La controversia se basa en algunas teorías que explican que la formación de los agregados genera estrés oxidativo, alteración de la función de las vías de degradación y activación de las rutas apoptóticas [89]. Por el contrario, otros estudios defienden que la agregación es una forma de proteger a las células de los fragmentos tóxicos de la proteína cortada que no pueden ser degradadas por las rutas normales de limpieza. Por consiguiente, con el tiempo se produce una saturación de los mecanismos de limpieza provocando acumulación de agregados que altera la homeostasis celular. Se llega a un punto de “no retorno” donde se activan las rutas de apoptosis e inflamación.

Debido a la formación de los agregados posterior a la proteólisis de la proteína Htt y la saturación de las rutas de limpieza, diversos laboratorios han centrado sus esfuerzos en disminuir la proteólisis de Htt. La mutación de Htt en el sitio de corte para la caspasa-3 disminuye la actividad apoptótica, la

formación de fragmentos derivados del N-terminal de Htt y en consecuencia, hay menos agregación [86, 90, 91]. Sin embargo, a pesar de los resultados obtenidos hasta el momento para inhibir el corte de la proteína Htt por las caspasas u otras proteasas, los resultados clínicos no han sido del todo satisfactorios. Debido a esto, se ha promovido el estudio de rutas alternativas que permitan la activación de las vías de degradación de proteínas no deseadas. Existen dos vías principales que llevan a cabo este procedimiento: el sistema ubiquitina-proteosoma (UPS) y la ruta de autofagia. Ambos procesos están fuertemente regulados en células sanas pero completamente alterados en la patología de HD.

2.5.2 Implicación de la vía proteosomal en la HD

La vía proteosomal se encarga de la degradación de proteínas citosólicas y nucleares que sean pequeñas y de vida corta. El sistema ubiquitina-proteosoma (UPS) se compone de dos subunidades. La primera subunidad catalítica es la 20S la cual contiene tres enzimas: quimi tripsina, tripsina y peptidil-glutamil que cortan residuos hidrofóbicos, básicos y ácidos, respectivamente [92]. La segunda subunidad o 19S, la cual presenta una función reguladora, se une a la subunidad 20S formando el proteosoma o subunidad 26S. Una serie de enzimas permiten que las ubiquitinas realicen un marcaje de aquellas moléculas que deben ser degradadas utilizando para ello las ubiquitin-ligasas [71]. Finalmente, una vez dentro de la subunidad 26S las enzimas catalíticas degradan la proteínas en aminoácidos que posteriormente se utilizarán en la síntesis de proteínas de *novo* (Figura 11).

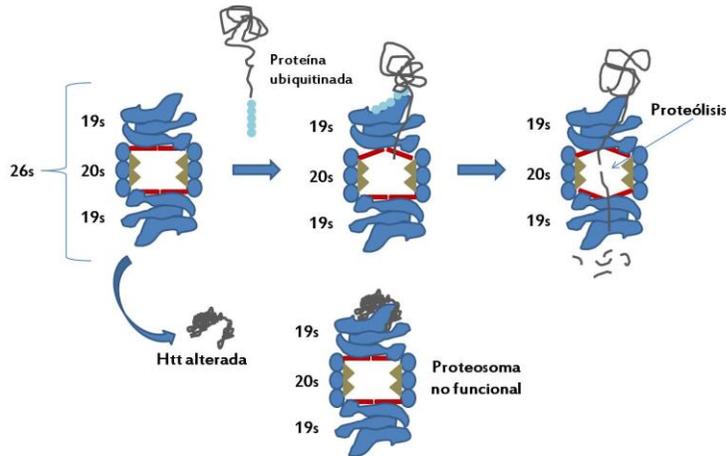


Figura 11. Esquema del sistema ubiquitina-proteosoma (UPS). El sistema se compone de dos subunidades 19S y 20S, que en conjunto conforman la subunidad 26S. Cuando una proteína poliubiquitinada entra en el complejo es degradada en aminoácidos por la acción de enzimas proteolíticas. Ante la presencia de agregados macromoleculares de una proteína alterada (mtHtt en la figura) el sistema se bloquea.

El sistema proteosomal no es solamente utilizado para regular el recambio de proteínas dentro de la célula, sino que su actividad proteolítica funciona regulando otros procesos importante tales como la progresión del ciclo celular, oncogénesis, transcripción, desarrollo y crecimiento y eliminación de proteínas anormales [92]. Este sistema no es capaz de degradar las proteínas con una expansión en la cadena de poliQ de manera que éstas se quedan "atascadas" en el proteosoma y bloquean la entrada de otros sustratos a la subunidad catalítica 20S [71]. Diferentes estudios han demostrado que durante el progreso de este tipo de enfermedades el sistema se encuentra alterado, imposibilitando su función de degradación. La tasa de degradación de los agregados es inversamente proporcional a la longitud de la repetición de poliQ probablemente por la saturación del sistema de degradación conllevando a una modificación en el potencial de membrana mitocondrial y la subsecuente activación de la vía intrínseca de la apoptosis [93]. Otros estudios apuntan a que la vía se encuentra altamente activa pero incapaz de llevar a cabo su función por la presencia de proteínas, como la RECgamma, que impide

a las proteasas romper los enlaces glutamina-glutamina, de aquí que la activación de la vía proteosomal, aunque no en todos los modelos de la enfermedad, logre disminuir la presencia de los agregados [94].

Diferentes terapias que promueven la correcta funcionalidad del sistema UPS en la HD están bajo estudio. Una de ellas es la sobreexpresión de moléculas endógenas tales como PA700 y PA28, con las cuales se ha observado una recuperación de la actividad de la vía proteosomal en fibroblastos de piel de pacientes con HD y un aumento en la viabilidad de neuronas estriadas que contienen mtHtt [95].

2.5.3 Papel de la ruta de la autofagia en la HD

La autofagia es un proceso en el cual los orgánulos y proteínas de mayor tamaño son secuestrados en vesículas autofágicas y marcados para ser degradados a través de la fusión con el lisosoma [96, 97]. Esta respuesta está muy conservada entre especies y se activa ante diferentes estímulos. Uno de ellos es la privación de nutrientes, lo cual activa la autodigestión del citoplasma y orgánulos en aminoácidos y ácidos grasos (AG) que son fuente de energía [98]. Por otro lado, la acumulación de proteínas y orgánulos alterados a causa de diferentes patologías es otro ejemplo de estímulos que activan a la autofagia.

El proceso de autofagia consta de los siguientes pasos: iniciación, nucleación, elongación y maduración. El inicio del proceso presenta la formación de una estructura de doble membrana llamada autofagosoma, la cual es mediada por una serie de genes específicos de la autofagia (Atg) que responden a funciones como la de formación de las vesículas de nucleación y activación de un sistema de conjugación para la formación, y otro para el desmembramiento del autofagosoma [98, 99]. En el paso de elongación, la doble membrana se construye por la unión del complejo Atg5/12 y la fusión de LC3 (cadena ligera 3) a fosfatidiletanolamina (PE). Eventualmente, la

membrana se sella manteniendo dentro las moléculas a ser degradadas y dirigiéndose al lisosoma donde las hidrolasas y el pH ácido logran la degradación total (Figura 12).

El principal regulador de la activación o inhibición de la autofagia es la proteína mTOR (diana de la rapamicina en mamíferos). Esta proteína fue descrita como una quinasa de serina/treonina clave en procesos de crecimiento y proliferación celular, síntesis de proteínas y autofagia. Esta quinasa cumple con un papel inhibitorio de la ruta de la autofagia en condiciones fisiológicas. Es decir, bajo condiciones favorables de crecimiento, mTOR promueve la síntesis de proteínas y la inhibición de su degradación, mientras que en condiciones desfavorables, mTOR es inhibida con la consiguiente activación de mecanismos de degradación de proteínas, entre ellas la autofagia. Otros mecanismos que inactivan a mTOR, aparte de la privación de nutrientes son los agentes infecciosos, daños a orgánulos, proteínas tóxicas y, químicamente, la rapamicina [96, 97].

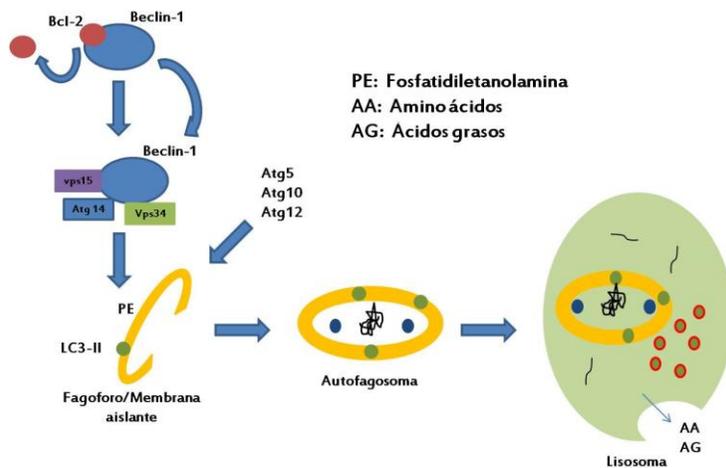


Figura 12. Esquema de la ruta de autofagia. El proceso consta de una fase de iniciación con la intervención de beclin-1 para la formación del complejo de nucleación, el cual ante la presencia de diversas Atg, entre ellas Atg5, Atg10 y Atg12 forma el fagóforo. Posterior a la formación del autofagosoma éste se internaliza en los lisosomas donde es degradado.

Diversos estudios han revelado que la activación de la autofagia disminuye la presencia de los agregados y otras especies solubles de Htt y en consecuencia, se produce una reducción de la toxicidad en modelos celulares y animales de la enfermedad [99]. La diana terapéutica a la que mayor atención se ha prestado es mTOR. Ravimukar *et al*, demostraron que el tratamiento con rapamicina de células PC12 que expresan el exón 1 de la Htt indujo la disminución del número de agregados y de la muerte celular asociada [100-102]. El laboratorio de Rubinsztein ha puesto de manifiesto que la inhibición de Rab5, una proteína involucrada en endocitosis, detiene la maquinaria de la macroautofagia, a través de la interacción con Vps34 [103]. Estos estudios abrieron la puerta para buscar moduladores de la ruta de la autofagia como potenciales dianas terapéuticas en el tratamiento de las enfermedades dependientes de poliQ [103].

2.6 Modelos de estudio para la HD

El desarrollo de modelos que permitan el estudio exhaustivo de los procesos que se alteran en las diversas patologías es importante en ciencia. Actualmente, no existe un modelo animal o celular que recapitule completamente todo el progreso de la HD. La tabla 6 resume algunos de los modelos utilizados actualmente por la comunidad científica.

Tabla 6. Resumen de los diferentes modelos para el estudio de la HD utilizados en la actualidad.

Modelo	Tamaño del trasgen (repeticiones de CAG)	Fenotipo	Otras
<i>C. elegans</i> (<i>nemátodo</i>)	Htt humana completa con 150Q	Fallo en test motores	Muerte apoptótica con ced-3 activa, presencia de agregados en neuronas
	Primeros 57 aa de proteína humana con 19Q, 88Q o 128Q	Fallo con 128Q en test motores	Acumulación perinuclear y nuclear de htt, alto grado de inclusiones observadas en axones con 128Q.
<i>D. megalogaster</i> (<i>Mosca de la fruta</i>)	N-terminal con 2Q, 75Q o 120Q	Degeneración de la retina Fallo en test motores	Neurodegeneración correlacionada con repeticiones de poliQ Presencia nuclear de htt
	Htt humana completa con 16Q o 128Q	Degeneración de la retina Fallo en test motores Imposibilidad para volar	Presencia nuclear de htt Fallo en transmisión sináptica No formación visible de agregados
Ratón R6/1-R6/2	Exón 1/116Q-144Q Huntingtina humana	Deficit en test rotarod temblor, corea, distonía dificultad para tragar hipoquinesia pérdida de peso	Muerte y atrofia neuronal Presencia de inclusiones en hipocampo y estriado
	N171-82Q 171 aa con 82Q, 44Q, 18Q Proteína del prio murino	Deficit en test rotarod Temblores, dificultad para tragar, hipoquinesia, muerte temprana	Muerte mayor a nivel del estriado, atrofia cerebral, inclusiones en hipocampo y estriado
	YAC Htt complet con 72Q, 128Q Huntingtina humana	Ataxia, hiperactividad hipoquinesia, pérdida de peso, dificultad para tragar.	Muerte y atrofia solo en estriado

Los más utilizados actualmente son:

1. Modelos celulares de toxicidad dependientes de poliQ.
2. Modelos *in vivo*

2.6.1 Modelos celulares de toxicidad dependientes de poliQ

El uso de cultivos primarios provee un importante pero aún limitada y heterogénea aproximación para la obtención de células para el estudio de diversas patologías. El desarrollo de líneas celulares clonales representa una herramienta interesante para el estudio de diferenciación celular y la expresión de genes de interés [104, 105]. Las líneas celulares más utilizadas actualmente en el estudio de los diferentes mecanismos subyacentes en la patología de HD son: la línea ST14A y la STHdh. ST14A se obtuvo de embriones de ratas Sprague-Dawley con 14 días de gestación [104]. Al respecto, existen cuatro líneas celulares que expresan de manera constitutiva la proteína Htt completa (FL) o un fragmento de ella (1-548) con 15 (silvestre) o 120 (alterada) repeticiones de glutamina. Esta línea se ha immortalizado utilizando el alelo A58/U19 del antígeno T largo SV40 que permite el correcto crecimiento de las células a la temperatura permisiva (33°C), sin embargo, ante un cambio a la no permisiva (39°C) se presenta toxicidad y muerte celular dependiente de poliQ. La línea STHdh, se obtuvo de ratones *knock-in* Hdh^{Q111}/Hdh^{Q111} con 14 días de gestación [106]. Esta línea neuronal presenta de manera constitutiva el exón 1 con 7 (silvestre) o 111 (alterada) repeticiones de glutamina. Sin embargo, al contrario de las células ST14A, este modelo celular no requiere del cambio de temperatura, sino que ante la inducción de estrés celular con un agente externo, como la privación de suero, la muerte que se presenta es poliQ dependiente. De manera similar a las ST14A, esta línea ha sido immortalizada utilizando el alelo A58/U19 del antígeno T largo SV40 que permite el correcto crecimiento de las células a la temperatura permisiva (33°C).

No obstante, el trabajo con células presenta desventajas sobre los otros modelos. Una de las más importantes es la poca capacidad para reproducir a nivel celular el fenotipo completo característico de la enfermedad. Además, múltiples recomendaciones en el trabajo con este

modelo señalan la necesidad de un manejo cuidadoso debido a cierta inestabilidad genética. Por el contrario, la capacidad de estudiar los mecanismos moleculares que subyacen en la enfermedad representa la ventaja más importante para el trabajo con células.

2.6.2 Modelos *in vivo*

Drosophila melanogaster

En 1993 Brand y Perrimon diseñaron un sistema para el estudio y expresión de genes en organismos como *Drosophila melanogaster* [107]. El sistema llamado GAL4-UAS tiene dos componentes: la participación del gen GAL4 que codifica para el activador de la transcripción de la proteína GAL4 en levadura, y el elemento UAS (*Upstream activation sequence*), un promotor al cual GAL4 se une de manera específica y activa la transcripción del gen de estudio deseado. En este modelo, en una línea transgénica el gen diana se mantiene silenciado por la ausencia de su activador. Sin embargo, el entrecruzamiento con una segunda línea transgénica que contiene la proteína activadora conlleva a que la descendencia contenga al gen-diana de interés presente [107] (Figura 13).

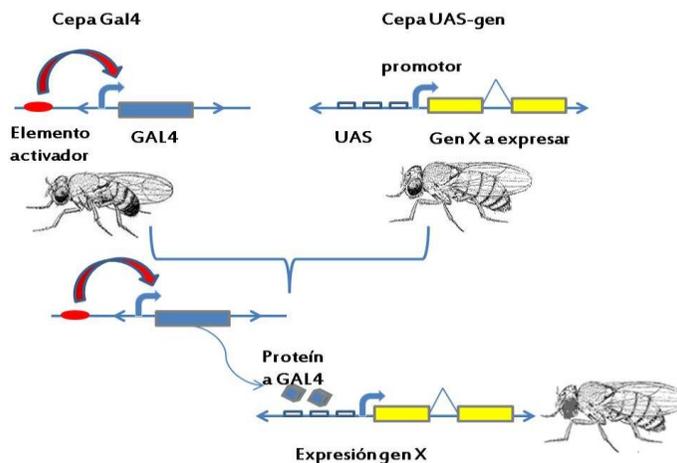


Figura 13. Modelo de GAL4/UAS utilizado en el estudio de la HD.

Como fue explicado anteriormente, mediante utilizando este modelo el laboratorio de Jackson demostró la neurodegeneración ante la presencia de un transgen de la Htt que contenía 108 repeticiones de glutamina [60]. Entre las características que respaldan el uso de este modelo se destaca que a través de lo largo de la evolución gran cantidad de genes se han conservado entre *Drosophila* y mamíferos. Este hecho aunado a la facilidad para la manipulación de la mosca, el bajo coste de mantenimiento y la alta progenie hacen de esto modelo ideal para la realización de cribados de moléculas que busquen disminuir el fenotipo de la enfermedad [108]. No obstante, los modelos de la HD actualmente existentes se basan en la expresión del extremo N-terminal con repeticiones poliQ lo cual limita los estudios a la presencia/ausencia de agregados.

Modelos de ratones

La generación de modelos en ratones para la HD ha constituido un gran avance en el estudio de la enfermedad. Los modelos existentes hasta el momento se pueden dividir en dos grupos.

1. Ratones transgénicos
2. Ratones "*knock-in*"

Los ratones transgénicos, generados por la inserción de la proteína mutante al azar en el genoma, se pueden dividir a su vez en modelos que contienen un fragmento de la proteína, por ejemplo el extremo N-terminal, o la proteína completa. En el caso de la HD se han descrito tres modelos con la proteína truncada: R6/1, N171-82Q y, el más caracterizado y frecuentemente utilizado es el R6/2, que contiene aproximadamente 150 repeticiones de poliQ [109]. Este modelo es ampliamente utilizado puesto que presenta un fenotipo homogéneo y progresivo, aunado a que la expresión del exón 1 con la expansión de poliQ es suficiente para reproducir características

neuropatológicas de la enfermedad. Por otro lado, los modelos de ratones transgénicos YAC128 y BAC97 que expresan la proteína humana completa, se correlacionan muy bien con la patología en humanos en términos de muerte neuronal y activación de las rutas apoptóticas. Sin embargo, la mayor desventaja de los modelos con ratones transgénicos es la presencia de fenotipos menos severos que los observados en humanos [63].

Los ratones "*knock-in*", representan el modelo genético más preciso utilizado en la actualidad. Son generados por la inserción de la proteína mutante en el locus propio del gen del ratón o en otros casos, el exón del ratón puede ser reemplazado por uno humano que contenga la expansión de poliQ. Uno de los modelos más utilizados es Hdh^{Q111}, consiste en la inserción de 111 repeticiones de glutamina en el exón 1 del gen de huntingtina del ratón [110]. Entre las ventajas de utilizar este modelo se encuentra la reproducción de la aparición tardía de los síntomas de la patología como la pérdida de peso y del eje de coordinación al caminar. A nivel molecular, se han observado agregados intranucleares predominantemente en el estriado. Estos modelos se correlacionan muy bien con el humano en cuanto a cambios en las capacidades físicas y la formación de fragmentos N-terminal, sin embargo, estos modelos no reproducen por completo el fenotipo de la patología y mayor caracterización del modelo es necesaria para optimizar su utilización.

Con base en las características de la patología que se desean estudiar y los recursos del laboratorio se utilizan uno o varios de los modelos explicados en este apartado, a pesar de que por el momento ninguno de ellos recapitula las características totales de la enfermedad en humanos.

OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis es el estudio de la implicación de Apaf-1, una proteína de la ruta intrínseca de la apoptosis, en la fisiopatología de la enfermedad de Huntington (HD). Diversas evidencias, principalmente en *Drosophila melanogaster*, apuntan a un papel de Apaf-1 en la patología de Huntington, nuestro objetivo consiste en descifrar el papel de esta proteína en la expresión de agregados en un modelo celular de mamíferos de la HD.

Los objetivos específicos propuestos son los siguientes:

1. Determinar si Apaf-1 juega un papel en la agregación de la proteína Htt en un modelo celular de mamífero.
2. Establecer si la participación de Apaf-1 en la enfermedad está relacionada con su función en el apoptosoma o es independiente de su actividad proapoptótica.
3. Determinar si la inhibición farmacológica de la proteína Apaf-1 afecta a su función en el modelo de agregación utilizado.
4. Comprobar la capacidad inhibitoria sobre Apaf-1 de diferentes compuestos que se encuentran actualmente en estudio para la HD.
5. Determinar si la inhibición de la proteína en el modelo de agregación correlaciona con un modelo de toxicidad.
6. Elucidar el mecanismo molecular por el cual Apaf-1 interviene en el proceso de agregación.

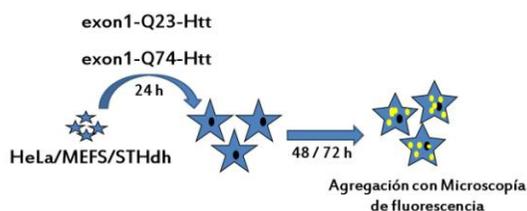
RESULTADOS

1. Implicación de Apaf-1 en la fisiopatología de la HD

Modelo de estudio de agregación

El primer paso llevado a cabo para abordar los objetivos descritos fue la estandarización de una herramienta que permitiese el estudio cuantitativo de la formación de agregados característicos de la patología (Figura 14A). Se utilizaron dos construcciones génicas, facilitadas por el Dr. Rubinsztein, que expresan el exón 1 de la Htt fusionada a la proteína fluorescente verde (GFP). La primera construcción codifica para una proteína que contiene 23 repeticiones de glutamina (EGFP-HDQ23) siendo equivalente a la forma no patológica y en la cual, no se presenta formación de agregados. La segunda construcción (EGFP-HDQ74) se caracteriza por contener 74 repeticiones de glutamina, ser patológica y formar agregados citosólicos y nucleares que son fácilmente visibles por microscopía de fluorescencia o confocal. En la figura 14B se presenta un ejemplo de imágenes de microscopía de las tres líneas celulares utilizadas a lo largo del proyecto transfectadas con las construcciones génicas mencionadas: células derivadas de cáncer cérvico-uterino humano (HeLa), fibroblastos de embriones de ratón (MEFS) y células neuronales (STHdh) derivadas del ratón *knock-in* Hdh [106].

A



B

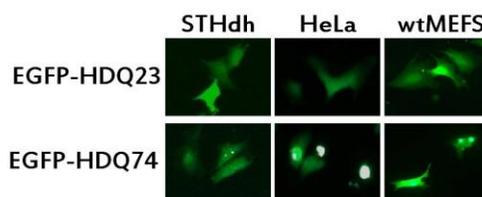


Figura 14. Modelo de agregación utilizado para el estudio de la HD. **(A)** Esquema del procedimiento utilizado donde las diferentes líneas celulares son transfectadas con los plásmidos EGFP-HDQ23 o EGFP-HDQ74. **(B)** Expresión de agregados en diferentes líneas celulares observados por microscopía de fluorescencia.

1.1 Apaf-1 participa en la formación de los agregados de poliQ

Como se ha comentado en la parte introductoria, distintas evidencias sugerían una implicación de la proteína Apaf-1 en la fisiopatología, a nivel celular, de la HD. Por tanto se analizó la influencia de Apaf-1 en la formación de agregados de mtHtt en los modelos celulares seleccionados. El análisis cuantitativo se llevó a cabo en presencia/ausencia de Apaf-1 utilizando células derivadas de fibroblastos embrionarios de ratón silvestres (wtMEFS) o *knock-out* para Apaf-1 (AkoMEFS). La transfección con el plásmido EGFP-HDQ23 no indujo la presencia de agregados dependientes de poliQ en las líneas celulares utilizadas (Figura 15). Por el contrario, la transfección con el plásmido que contiene 74 repeticiones de glutamina en wtMEFS presentó un porcentaje relativo en torno al 35% de formación de agregados mientras que las células AkoMEFS presentaron un porcentaje significativamente menor (18%) (Figura

15). Estos datos pusieron de manifiesto un papel para Apaf-1 en la formación de agregados dependientes de poliQ.

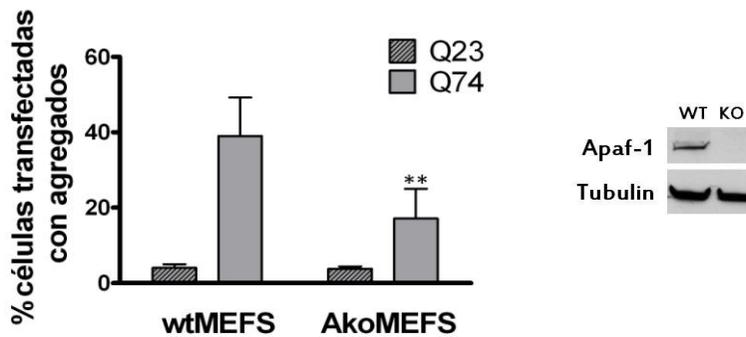


Figura 15. Papel de Apaf-1 en la formación de agregados dependientes de poliQ. MEFS silvestres (wtMEFS) y MEFS *knock-out* de Apaf-1 (AkoMEFS) fueron transfectadas con los plásmidos EGFP-HDQ23 o EGFP-HDQ74. El porcentaje de células GFP positivas que expresan agregados fue determinado mediante el conteo de 500 células totales tras 48 h de transfección. Los datos representan el promedio \pm s.d de tres experimentos (** $p < 0.05$). El panel de la derecha confirmó que efectivamente las células AkoMEFS eran deficientes en Apaf-1. Tubulina se utilizó como control de carga.

Para corroborar que la ausencia de Apaf-1 modifica la presencia de agregados dependientes de poliQ, se procedió al silenciamiento génico de Apaf-1 mediante siRNA en células HeLa. El método de silenciamiento consistió en la transfección de un siRNA de Apaf-1 comercial (Cell Signaling®). Para determinar la influencia del silenciamiento de Apaf-1 en la expresión de los agregados se procedió a transfectar las células con el plásmido EGFP-HDQ74 a las 24h de haber transfectado el siRNA de Apaf-1. Se transfectaron células con EGFP-HDQ74 y con un siRNA *random* (Rsi - no dirigido al mRNA de Apaf-1) para generar el oportuno control. Tras 40 h se analizó la presencia de agregados. La eficiencia en silenciamiento génico de Apaf-1 fue en torno al 70% (Figura 16A). Los resultados obtenidos mostraron que las células transfectadas con el silenciador control (Rsi) presentaron un porcentaje relativo de agregados similar a las células no transfectadas (Ctrl; sin siRNA). Sin

Resultados

embargo, el silenciamiento de Apaf-1 (Asi) resultó en una disminución significativa en la formación de agregados en las células HeLa (Figura 16B). La reducción dependiente de Apaf-1 del número de agregados en los experimentos basados en silenciamiento génico fue ligeramente inferior a la obtenida en los AkoMEFS posiblemente por no haber podido conseguir un silenciamiento total de Apaf-1. Finalmente, se sobreexpresó Apaf-1 mediante la transfección de un plásmido que codifica para la proteína, con el objetivo de ver si la presencia de agregados se modificaba. Los resultados mostraron que el aumento de Apaf-1 causa una mayor formación de agregados en el modelo de agregación (Figura 16C). Los resultados en conjunto confirmaron la influencia de Apaf-1 en la formación de agregados dependientes de poliQ.

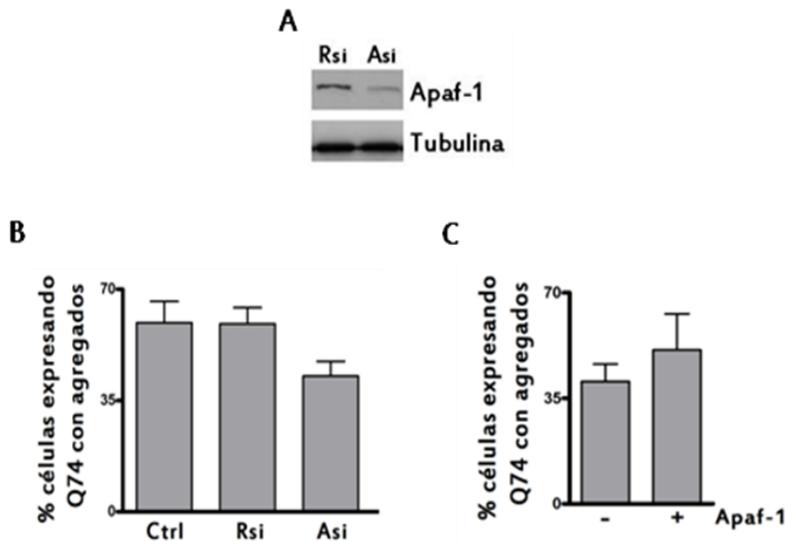


Figura 16. Efecto de Apaf-1 en la aparición de agregados dependientes de poliQ. Células HeLa fueron transfectadas con EGFP-HDQ74 tras 24h de silenciamiento de Apaf-1(Asi), o siRNA control (Rsi). **(A)** Los extractos de proteína total fueron analizados por *westernblot* para determinar el nivel de silenciamiento de Apaf-1. El revelado de tubulina se utilizó como control de carga. **(B)** El porcentaje de células GFP positivas que expresan agregados fue determinado por el conteo de 500 células totales tras 72h de transfección del siRNA. **(C)** El porcentaje de células GFP positivas que expresan agregados fue determinado con el conteo de 500 células totales tras 72h de transfección del pCDNA-Apaf-1 (suministrado por el Dr. Gabriel Núñez). Los datos representan el promedio \pm s.d de tres experimentos.

1.2 El papel de Apaf-1 en HD es caspasa independiente

Los resultados obtenidos sugerían una implicación de Apaf-1 en la formación de agregados de HD. La principal función descrita para Apaf-1 en la célula es el reclutamiento de pc9 y formación del apoptosoma en presencia de Cit *c*. Para analizar si la influencia de Apaf-1 en la formación de agregados dependía de la proteína en sí o bien del apoptosoma se llevó a cabo el silenciamiento génico mediado por siRNA de pc9. Se utilizó un siRNA comercial (Cell Signaling®) y se aplicó la misma metodología anteriormente descrita (Figura 17A). El silenciamiento génico de pc9 (pc9si) no modificó significativamente la formación de agregados en el modelo celular utilizado, sugiriendo que la disminución de agregados observada es dependiente de la presencia de Apaf-1 más que de la formación o actividad del apoptosoma (Figura 17B). Los datos obtenidos con el silenciamiento génico de pc9 sugerían la no dependencia de la formación del apoptosoma, responsable en principio de la activación de caspasas. No obstante, se analizó con más detalle la posible implicación de la actividad enzimática de las caspasas. Para ello, las células HeLa se transfectaron con la construcción EGFP-HDQ74 y se trataron con el inhibidor irreversible de caspasas z-VAD. Los resultados mostraron que la inhibición general de caspasas no influyó en la aparición de los agregados (Figura 17C).

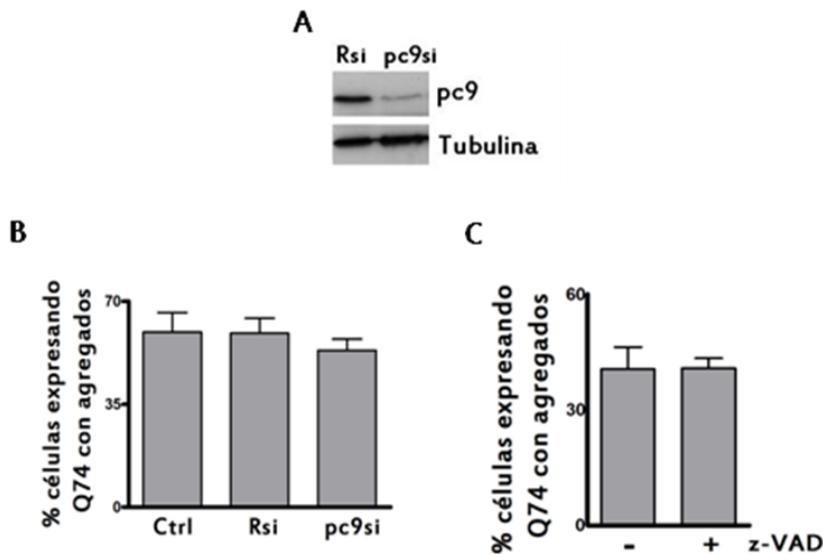


Figura 17. Efecto de las caspasas en la aparición de agregados dependientes de poliQ. Células HeLa fueron transfectadas con EGFP-HDQ74 tras 24 h de silenciamiento de pc9 (pc9si) o siRNA control (Rsi). **(A)** Los extractos de proteína total fueron analizados por *western blot* para determinar el nivel de silenciamiento pc9. El revelado de tubulina se utilizó como control de carga. **(B)** El porcentaje de células GFP positivas que expresan agregados fue determinado por el conteo de 500 células totales tras 72h de transfección del siRNA. **(C)** Las células fueron transfectadas con EGFP-HDQ74 y tratadas con z-VAD (10 μ M). El porcentaje de células GFP positivas que expresan agregados fue determinado con el conteo de 500 células totales tras 72h de transfección. Los datos representan el promedio \pm s.d de tres experimentos.

En su conjunto los resultados indican que el papel de Apaf-1 en la formación de agregados de mtHtt dependientes de poliQ no es dependiente de caspasas ni del ensamblaje del apoptosoma sino más bien se puede atribuir a una función celular de Apaf-1 todavía no descrita.

2. Modulación química de Apaf-1 y sus efectos en el modelo de HD

La búsqueda de inhibidores de apoptosis para la elaboración de posibles terapias en enfermedades caracterizadas por la presencia de apoptosis excesiva, ha tomado relevancia en los últimos años. En particular, se están tratando de identificar nuevas dianas farmacológicas debido a los problemas que están apareciendo en el desarrollo farmacológico de los inhibidores de caspasas, que fueron la primera diana explorada [59, 111]. En concreto, en el laboratorio se están desarrollando inhibidores de Apaf-1 y se ha evaluado su actividad en distintos modelos celulares y animales de patología [42, 43, 50]. Se están obteniendo resultados satisfactorios en la inhibición específica en ciertas células de la muerte celular inducida por cisplatino y de los daños celulares inducidos por hipoxia (Orzáez *et al. submitted*). Además, los inhibidores de Apaf-1 desarrollados también se pueden considerar como una herramienta de biología química para interrogar los sistemas biológicos. En este sentido, se procedió a estudiar el efecto de estos inhibidores en la formación de agregados dependientes de poliQ. De esta manera se procedió al análisis del potencial terapéutico de los inhibidores de Apaf-1 en el modelo de agregación. Además, también se han descrito compuestos que disminuyen la agregación dependiente de poliQ, pero en cambio no se ha descrito el mecanismo de acción. Así por ejemplo, de los compuestos que se han evaluado [112-114] en estudios clínicos para el tratamiento de la HD se pensó que la diana farmacológica de minociclina podía estar relacionada con Apaf-1.

2.1 Caracterización del inhibidor de Apaf-1, SVT016426

Uno de los inhibidores más estudiados de Apaf-1 es SVT016426, que se presenta como un inhibidor altamente específico, que inhibe la actividad del apoptosoma y tiene efectos paliativos en la muerte celular inducida por

distintos inductores de apoptosis (Orzáez *et al. submitted*). Dado la importancia del compuesto, en este estudio se consideró oportuno resumir los puntos más importantes de la caracterización del compuesto, con el objetivo de facilitar la comprensión y discusión de los resultados que en el apartado 2.3.2 se muestran.

En la figura 18 se muestra la estructura del compuesto SVT016426 (Figura 18A) y se detalla la capacidad inhibitoria del mismo en un ensayo de reconstitución del apoptosoma *in vitro* y en un ensayo con extractos citosólicos de células HEK293. La concentración de compuesto necesaria para inhibir el 50% de la actividad del apoptosoma *in vitro* (IC_{50}) y en extractos celulares fue de 7.9 μ M y 16.8 μ M, respectivamente (Figura 18B). El ensayo *in vitro* consistió en la incubación de Apaf-1 recombinante (rApaf-1), dATP, Cit *c* y pc9 recombinante, permitiendo la formación del apoptosoma y siguiendo la hidrólisis de un sustrato fluorogénico de caspasa-9 (Ac-LEDH-afc) mediante espectroscopía de fluorescencia. Para llevar a cabo los ensayos en extractos celulares, los extractos citosólicos de células HEK293 se obtuvieron a partir de la lisis de células en un tampón hipotónico. El lisado se fraccionó mediante cromatografía de intercambio iónico obteniéndose la fase citosólica (FT) que no contiene Apaf-1, pero sí todos los componentes adicionales para la formación del apoptosoma, de manera que al agregar rApaf-1 exógenamente se restablecía la actividad del apoptosoma (ver material y métodos) [42].

A continuación, se analizó la actividad antiapoptótica del compuesto en un modelo celular y se comparó con otros inhibidores de la apoptosis descritos como IDN (ácido pentanoico 3{2-(2-tert-Butil-fenilaminooxalil)-amino-propionilamino}-4-oxo-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-fenoxy) y z-VAD, inhibidores de caspasa-3, y un antioxidante como Ebselen. Los resultados demostraron que todos los compuestos fueron capaces de inhibir de manera similar la actividad caspasa-3 inducida por cisplatino (Figura 18D). Sin embargo, sólo SVT016426 logró trasladar su efecto inhibitorio a un aumento

moderado pero significativo de la supervivencia celular en comparación al resto de compuestos (Figura 18C). Además, SVT016426 fue capaz de inhibir la salida de Cit *c* de la mitocondria (Figura 18E), lo cual contribuye al efecto en supervivencia celular observado tanto en modelos celulares como *in vivo* (Orzáez *et al. submitted*). Por último, se muestran los resultados equivalentes a los tres ensayos anteriormente descritos para un modelo celular en donde se llevó a cabo el silenciamiento génico de Apaf-1. Estos resultados confirmaron que los fenotipos observados están mediados por la presencia de Apaf-1, diana molecular del SVT016426. Es decir, tal y como se observa en la figura 18G, SVT016426 no fue capaz de inhibir la actividad caspasa-3 en las células tratadas con el silenciador de Apaf-1. Además, en ausencia de Apaf-1 SVT016426 no inhibió la muerte celular (Figura 18F) ni modificó la salida de Cit *c* de la mitocondria, independientemente de la presencia del SVT016426, observada en el caso del silenciador control (Figura 18H).

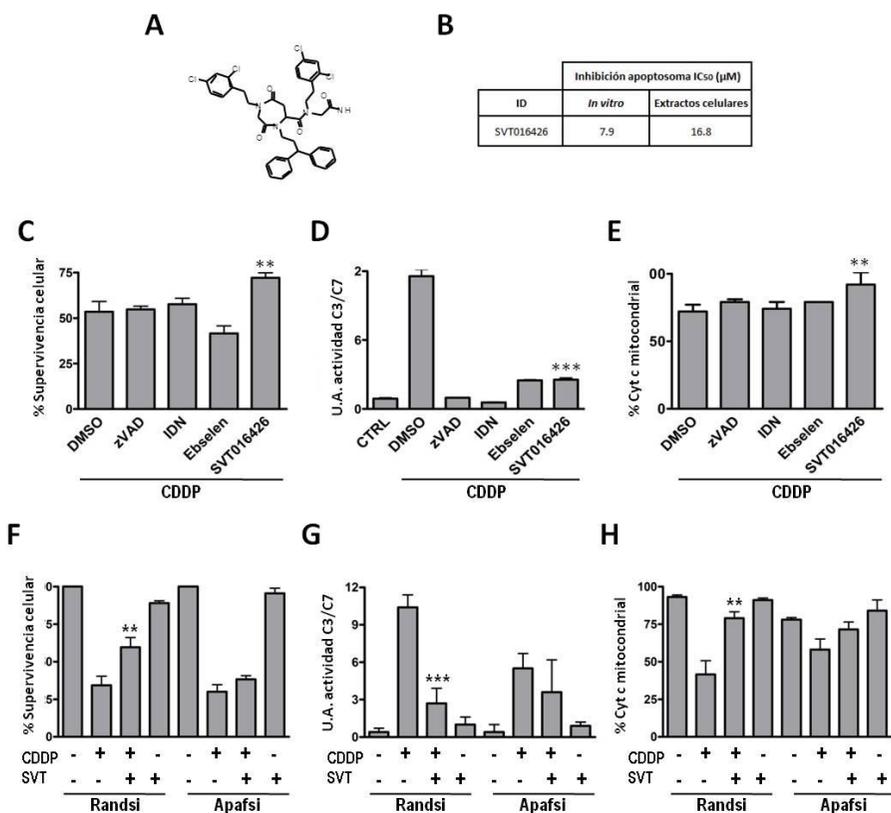


Figura 18. Caracterización de SVT016426 como inhibidor de Apaf-1. **(A)** Estructura del compuesto SVT016426. **(B)** IC₅₀ obtenida para SVT016426 en un ensayo *in vitro* de reconstitución del apoptosoma y en extractos de células HEK293 que no contienen Apaf-1 (ver material y métodos), pero a las que se les añade rApaf-1 para activar el apoptosoma. Células HeLa fueron tratadas con z-VAD (10 μM), IDN (10 μM), Ebselen (10 μM) y SVT016426 (10 μM) durante 24 h. La viabilidad celular fue medida por MTT **(C)**, la actividad caspasa-3 fue obtenida posterior a la adición del sustrato Ac-DEVD-afc **(D)**. El porcentaje de Cyt *c* mitocondrial fue analizado por citometría de flujo posterior a su marcaje **(E)**. La viabilidad celular **(F)**, actividad caspasa-3 **(G)** y el porcentaje de Cyt *c* mitocondrial **(H)** fueron registrados tras la transfección durante 24 h de un silenciador de Apaf-1 (Apaf-1si) o siRNA control (Randsi) en células HeLa en presencia o ausencia de SVT016426 (10 μM) y cisplatino (CDDP, 20 μM). Los datos representan el promedio ± s.d de tres experimentos (***p* < 0.05; ****p* < 0.001).

2.2 Caracterización de minociclina como inhibidor de Apaf-1

Diversos estudios apuntan hacia prometedoras moléculas que retrasan la muerte celular y la agregación de poliQ en modelos animales de la HD, sin embargo el mecanismo por el cual ejercen su acción neuroprotectora es desconocido. Algunos de los fármacos aprobados para ensayos clínicos con pacientes que presentan la enfermedad de HD incluyen moléculas como metazolamida, cistamina y minociclina.

La metazolamida es un fármaco diurético utilizado en glaucoma que disminuye la tensión a través de la inhibición de la anhidrasa carbónica en las células epiteliales de los túbulos proximales del riñón [115]. Interesantemente, Wang *et al.* demostraron que esta molécula tenía capacidad de inhibir la salida de Cit *c* en un ensayo con mitocondrias aisladas y en un modelo celular de la HD, donde el tratamiento con este compuesto brindó neuroprotección a través de la disminución de la salida de Cit *c* y de la activación de caspasa-3 [114].

Por otro lado, cistamina y su forma reducida (cisteamina) han sido identificados como potenciales fármacos para el tratamiento de la HD [116]. Su papel en la HD se basó en la observación de que ratones transgénicos que expresan el exón 1 de la proteína Htt con una expansión de poliQ en su extremo N-terminal muestran menos pérdida de peso y disminución de los movimientos coreicos. A pesar de que su mecanismo de acción en la patología no está del todo claro, se cree que disminuye la interacción entre Htt con la enzima transglutaminasa (TGasa), la cual interacciona con Htt promoviendo su agregación [112].

Por último, minociclina es un antibiótico de segunda generación derivado de las tetraciclinas que ha sido estudiado en diversas enfermedades neurodegenerativas debido a sus capacidades antiinflamatorias y neuroprotectoras [83, 117]. Diversos estudios apuntan a su capacidad

neuroprotectora a través de la inhibición de la apoptosis. Wang *et al.* demostraron una disminución de la muerte celular con minociclina consecuente a una menor salida del Cit *c* al espacio citosólico [113]. Aunado a lo anterior, también se le ha atribuido un papel de interacción con la familia de proteínas Bcl-2 y capacidad para disminuir la activación de la ruta de la inflamación [118, 119]. A pesar de la información descrita, no existe un mecanismo claro que explique su papel en neuroprotección.

Debido a la similitud de acción en algunos de los efectos a nivel celular de minociclina con respecto a SVT016426, se decidió analizar si alguno de estos compuestos presentaba efecto alguno en el ensayo *in vitro* de activación del apoptosoma. Para ello, se reconstituyó *in vitro* el apoptosoma en presencia de las moléculas nombradas y se analizó la actividad del complejo para activar pc9. Metazolamida y cistamina presentaron porcentajes bajos de inhibición de 15 y 17%, respectivamente, mientras que minociclina presentó un 40% de inhibición de la actividad del apoptosoma (Figura 19).

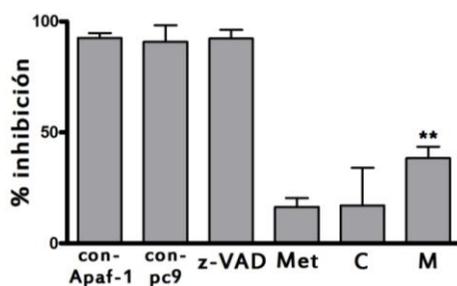


Figura 19. Inhibición *in vitro* del apoptosoma con diferentes compuestos estudiados para la HD. La actividad del apoptosoma se registró incubando pc9, Cit *c*, dATP y rApaf-1 con metazolamina (Met, 100 μ M), cistamina (C, 50 μ M), minociclina (M, 50 μ M) y z-VAD (z-VAD; 10 μ M). La actividad fue medida por la adición del sustrato Ac-LEHD-afc y se ha representado el porcentaje de inhibición con respecto al máximo de actividad obtenido en el control. con-Apaf-1 y con-pc9 significan que no se añadió al ensayo Apaf-1 o pc9, respectivamente. Los datos representan el promedio \pm s.d de tres experimentos (** $p < 0.05$).

Debido a la capacidad moderada de minociclina de inhibir la actividad del apoptosoma, se decidió continuar estudiando si sus propiedades antiapoptóticas estaban mediadas por una acción sobre Apaf-1.

2.2.1 Minociclina inhibe la actividad del apoptosoma *in vitro*

El primer paso consistió en determinar la concentración de minociclina necesaria para inhibir la actividad del apoptosoma en un 50% (IC_{50}). Para llevar a cabo este objetivo, se analizaron diferentes concentraciones de minociclina en el ensayo de reconstitución de la actividad del apoptosoma *in vitro*. El análisis de la curva dosis-respuesta mostró una IC_{50} de aproximadamente $54 \mu M \pm 0,2$ (Figura 20).

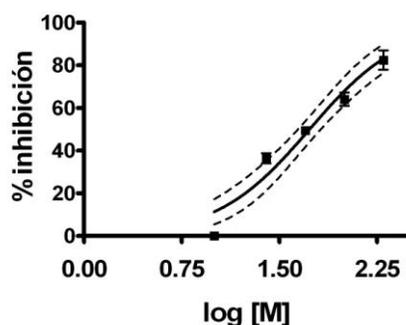


Figura 20. Curva dosis-respuesta para minociclina en el ensayo *in vitro* de reconstitución del apoptosoma. La actividad se registró incubando pc9, Cit *c*, dATP y rApaf-1 en presencia de diferentes concentraciones de minociclina (10 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM y 200 μM). La gráfica representa el porcentaje de inhibición respecto al control en cada uno de los casos frente al logaritmo de la concentración de minociclina. Los datos representan el promedio \pm s.d de tres experimentos. Las líneas punteadas representan el 95% de intervalo de confianza.

Para averiguar sobre qué proteína del apoptosoma actuaba minociclina se llevaron a cabo tres ensayos diferentes:

1. Ensayo de activación de pc9 en presencia de minociclina.
2. Ensayo de activación de caspasa-3 en presencia de minociclina.

3. Ensayo con extractos celulares deficientes de Apaf-1 donde rApaf-1 es añadido para observar su dependencia.

El ensayo de pc9 se realizó mediante un ensayo de dimerización forzada con proteínas recombinantes [120]. En resumen, se utilizan sales cosmotrópicas para estabilizar las estructuras de proteínas como pc9. En presencia de citrato sódico se produce una dimerización forzada de pc9 que lleva a su activación y consecuente hidrólisis de su sustrato. El resultado no muestra una inhibición de pc9 por minociclina a ninguna de las concentraciones examinadas (Figura 21).

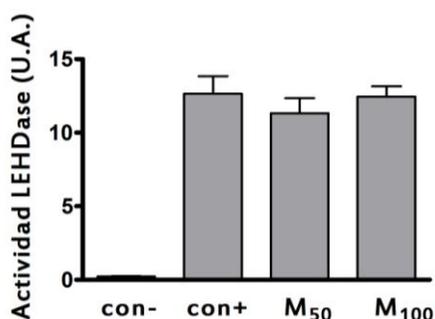


Figura 21. Efecto de minociclina en el ensayo de activación de pc9. El procesamiento de pc9 es activado por dimerización en un tampón citrato sódico en presencia de 50 y 100 μM de minociclina (M). La activación fue seguida por el corte del sustrato fluorogénico Ac-LEDH-afc. con- corresponde a la actividad basal sin presencia de pc9 recombinante y con+ a la máxima actividad. Los datos representan el promedio \pm s.d de tres experimentos.

La siguiente aproximación consistió en determinar si minociclina es capaz de inhibir la actividad caspasa-3 *in vitro*. Caspasa-3 recombinante se obtiene activada después de su producción heteróloga y purificación de bacterias. Minociclina no inhibió la actividad caspasa-3 (Figura 22). En su conjunto estos resultados sugieren que la actividad inhibitoria de minociclina está por encima de la activación de las caspasas de la vía intrínseca de la apoptosis.

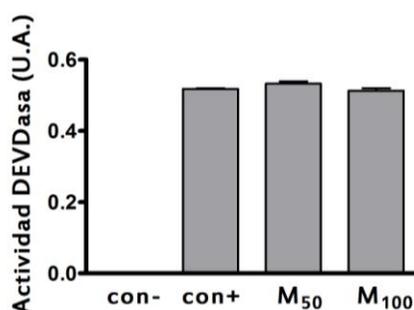


Figura 22. Efecto de minociclina en el ensayo de actividad de caspasa-3 *in vitro*. El ensayo se realizó mediante la incubación de caspasa 3 recombinante en presencia de 50 y 100 μM de minociclina (M) durante 20 min en un tampón de reacción. El procesamiento y activación de caspasa-3 fue seguida por el corte del sustrato colorimétrico Ac-DEVD-pNA. con- significa incubación sin caspasa-3 y con+ el máximo de actividad registrado. Los datos representan el promedio \pm s.d de tres experimentos.

Por último, se evaluó la capacidad inhibitoria de minociclina sobre Apaf-1. Para ello, se realizó un ensayo de reconstitución del apoptosoma en extractos celulares de HEK293 y minociclina inhibió la actividad de manera dependiente de la concentración (Figura 23).

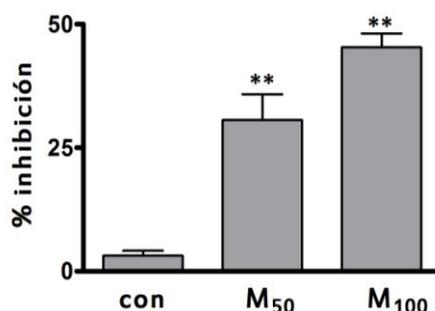


Figura 23. Inhibición *in vitro* de Apaf-1 con minociclina en el ensayo de reconstitución del apoptosoma en extractos celulares de HEK293. rApaf-1 fue preincubado con 50 o 100 μM de minociclina (M) en presencia de dATP. Tras 20 min se adicionó extracto citosólico de células HEK293 que no contiene Apaf-1. La inducción de la apoptosis fue seguida por el corte del sustrato fluorogénico de caspasa-3. Los datos se presentan como porcentaje de inhibición comparado con la muestra no tratada. La muestra control (con) se refiere al porcentaje de inhibición de la muestra tratada con el vehículo. Los datos representan el promedio \pm s.d de tres experimentos (** $p < 0.05$).

En resumen, los ensayos *in vitro* sugerían que minociclina no actúa en la inhibición de las caspasas-9 y -3 sino que inhibe la reconstitución del apoptosoma a través de la inhibición de Apaf-1.

2.2.2 Mecanismo de acción de minociclina

Con el objetivo de corroborar un posible mecanismo de acción basado en la unión de minociclina a Apaf-1 se analizó por resonancia magnética nuclear (RMN) si el compuesto y la proteína interaccionaban. Dos métodos diferentes de RMN fueron utilizados para el análisis de interacción: espectroscopia de diferencia de transferencia de saturación (STD) [121] y espectroscopia waterLOGSY [122]. En estas técnicas un exceso de ligando se mezcla con la proteína de interés (minociclina y Apaf-1) y el intercambio de los estados “unido y libre” del ligando modulan la señal del ligando libre. En la técnica STD se adquieren dos espectros simultáneamente, uno de la proteína con todos sus protones saturados y el otro sin la saturación. Si el ligando está unido a la proteína, el ligando estará saturado en el primer espectro y esta saturación será transferida al ligando libre. La diferencia entre los dos espectros representará al ligando que está unido a Apaf-1. Un ligando que no presente unión a la proteína producirá el mismo espectro con y sin saturación y por ende, las señales obtenidas se cancelarán entre sí. Por otro lado, la técnica waterLOGSY hace uso de las moléculas de agua unidas al complejo ligando-proteína para selectivamente transferir la magnetización del complejo al ligando libre. Por lo tanto, la interacción entre el ligando y su proteína está caracterizado por una señal positiva del espectro 1D ^1H o por una reducción en la señal negativa en el espectro de referencia (espectro obtenido en ausencia de la proteína). La figura 24 muestra el espectro de interacción entre rApaf-1 y minociclina mediante ambas técnicas.

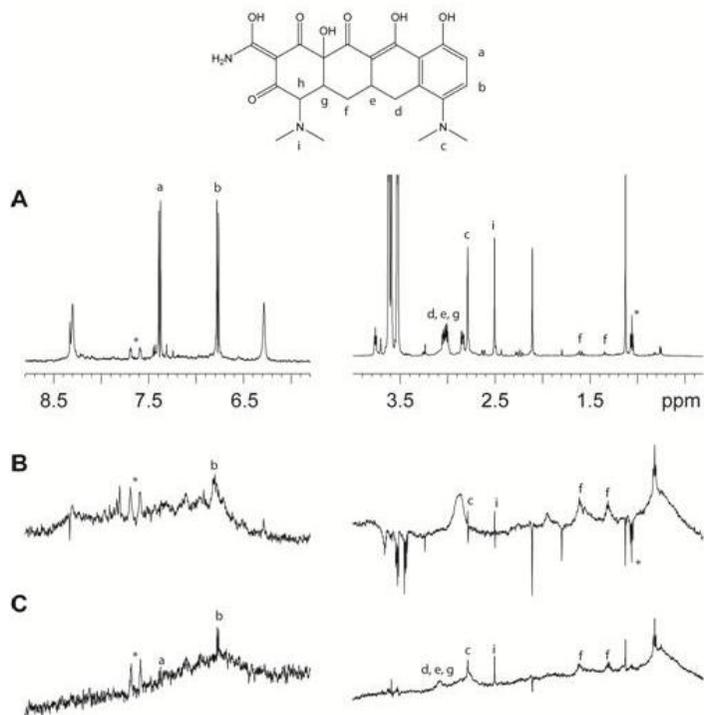


Figura 24. Análisis por RMN de la interacción entre minociclina y rApaf-1. Imagen detallada de las regiones aromáticas (izquierda) y alifáticas (derecha) del espectro de RMN resultado del experimento. **(A)** 1D ¹H RMN de la mezcla de rApaf-1 (1 μM) y minociclina (100 μM). A estas concentraciones las señales de la proteína no son visibles. Las letras de los diferentes protones en el espectro de minociclina se corresponden con los marcados en la estructura. Las señales (*) son impurezas típicas que se presentan en las muestras de RMN. **(B)** Experimento utilizando la técnica waterLOGSY: las señales positivas indican interacción (protones de la minociclina *b* y *f*); las señales negativas corresponden a componentes del tampón; los protones metil *c* e *i* muestran resultados ambiguos. **(C)** Experimento utilizando la técnica STD: las señales positivas de los protones *a*, *b*, *d-e-g*, *c*, *i* y *f* indican interacción entre minociclina y Apaf-1.

La figura 24A muestra el espectro 1D ¹H de una mezcla de rApaf-1 (1 μM) y minociclina (100 μM). Bajo estas condiciones, rApaf-1 no se observa en el espectro y las señales obtenidas son correspondientes solamente a minociclina y otros compuestos químicos presentes en la disolución tamponadora. En el experimento waterLOGSY (Figura 24B), algunas de las

señales de la molécula fueron positivas (*b* y *f*), mientras que las señales de los grupos metilo N(Me)₂ (*c* e *i*) fueron, ambas, positiva y negativa. Las señales negativas obtenidas corresponden a otros componentes del tampón utilizado. Se utilizó un control de la técnica donde rApaf-1 no fue añadido a la mezcla y se obtuvo señales negativas para minociclina. En el caso del experimento con la técnica STD (Figura 24C) se muestran señales positivas débiles que surgen de minociclina, mientras que no se obtuvo señal alguna de los componentes del tampón. Los resultados obtenidos con ambas técnicas muestran que minociclina interacciona con Apaf-1. A pesar de que la intensidad del espectro con la técnica STD puede, en principio, proveer información acerca del epítipo de unión, los resultados obtenidos no mostraron una diferencia importante en las señales de minociclina. Por ejemplo, los grupos N(Me)₂ produjeron una intensidad en la señal similar. Por lo tanto, los datos no brindan información sobre el epítipo. Apaf-1 es una proteína grande de 135 kDa que contienen un dominio N-terminal de reclutamiento de caspasas, un dominio de unión de nucleótidos y un dominio C-terminal con varias repeticiones WD40 que funcionan como sitio de unión para el Cit *c*. Para definir el dominio involucrado en la interacción entre Apaf-1 y minociclina, ambas técnicas se realizaron con rApaf-1 1-541 (proteína recombinante troncada de Apaf-1 sin los dominios WD40). No se observó interacción entre minociclina y rApaf-1 1-541 sugiriendo que el motivo de unión entre ambas moléculas implica al extremo C-terminal (Figura 25A, B y C).

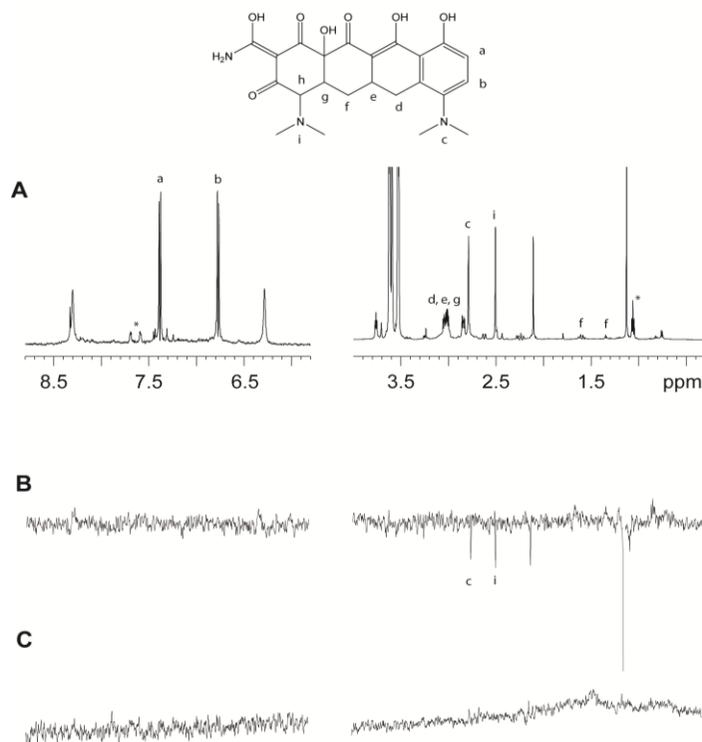


Figura 25. Análisis por RMN de la interacción entre minociclina y rApaf-1 1-541. Imagen detallada de las regiones aromáticas (izquierda) y alifáticas (derecha) del espectro de resonancia RMN resultado del experimento. **(A)** 1D ^1H RMN de la mezcla de rApaf-1 1-541 (1 μM) y minociclina (100 μM). Las letras de los diferentes protones en el espectro de minociclina corresponden a compuestos presentes en el tampón. Las señales (*) son impurezas típicas. **(B)** Experimento utilizando la técnica waterLOGSY: la ausencia de señales positivas y la presencia de las señales negativas (*c*, *i*) en el espectro indican que no hay interacción entre rApaf-1 1-541 y minociclina. **(C)** Experimento utilizando la técnica STD: la ausencia de señales positivas demuestra que no existe interacción.

Para corroborar este resultado, se realizó el ensayo de reconstitución del apoptosoma *in vitro* con rApaf-1 1-541. Como se observa en la figura 26 la ausencia del dominio WD40 en Apaf-1 no permitió a minociclina ejercer efecto inhibitorio significativo sobre la actividad del apoptosoma lo que corroboró la hipótesis (Figura 26).

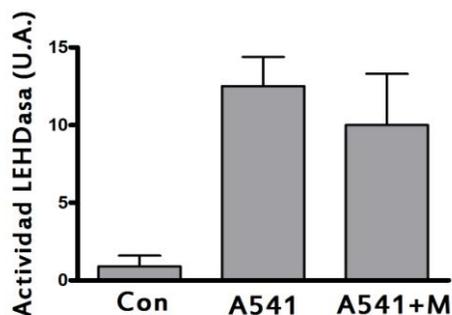


Figura 26. Efecto de minociclina en un ensayo de activación de pc9 con rApaf-1 1541. La actividad del apoptosoma se registró incubando pc9, Cit *c*, dATP y rApaf-1 1-541 (A541) en presencia o ausencia de minociclina (M, 50 μ M). La inducción de la apoptosis fue seguida por el corte del sustrato fluorogénico Ac-LEDH-afc. Con denota la actividad basal cuando rApaf-1 1-541 no es añadido al ensayo. Los datos representan el promedio \pm s.d de tres experimentos.

Por último, como se había descrito en la literatura que Cit *c* se une a Apaf-1 a través del dominio WD40 en un rango nanomolar [123], se hipotetizó que si minociclina se une a los dominios WD40 de Apaf-1, debería existir competencia por la unión con Cit *c*. Para comprobar dicha posibilidad, se llevó a cabo un ensayo en el cual diferentes concentraciones de Cit *c* fueron incubadas con minociclina. Se observó un modesto efecto competitivo ya que a bajas concentraciones de Cit *c*, minociclina presentó una mayor capacidad inhibitoria sobre el apoptosoma que cuando se llevó a cabo el ensayo en presencia de altas concentraciones de Cit *c* (Figura 27).

En resumen, la interacción entre los dominios WD40 de Apaf-1 y minociclina puede dificultar la interacción con otras proteínas como el Cit *c* lo que explica la disminución de la actividad apoptótica en condiciones de inducción de apoptosis.

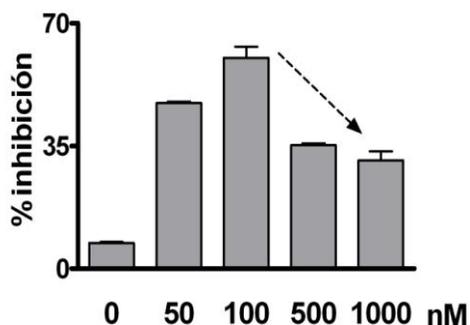


Figura 27. Ensayo de competición entre minociclina y Cit *c* por su acción sobre el apoptosoma. El ensayo de reconstitución del apoptosoma *in vitro* fue realizado utilizando diferentes concentraciones de Cit *c* en presencia de minociclina (50 μ M). La flecha denota la disminución de la capacidad inhibitoria de minociclina al aumentar la concentración de Cit *c*. Los datos representan el promedio \pm s.d de tres experimentos.

2.2.3 Validación de la diana en un modelo celular

Los resultados de los experimentos de RMN y de los ensayos *in vitro* de reconstitución del apoptosoma sugerían que minociclina se une e inhibe a Apaf-1. El siguiente paso consistió en caracterizar a Apaf-1 como la diana de minociclina en un modelo celular. Para este propósito, se desarrolló un estudio complementario en dos líneas celulares: wtMEFS y AkoMEFS. El tratamiento con etopósido, un conocido inhibidor de la topoisomerasa II que evita la correcta ligación de las cadenas del ADN [124], induce muerte celular por la vía intrínseca de la apoptosis en estas líneas celulares (Figura 28A). Es decir, se trata de una muerte dependiente de caspasa-3 en wtMEFS pero independiente en AkoMEFS puesto que estas células son incapaces de formar el apoptosoma (Figura 28B). El tratamiento con minociclina indujo inhibición de la muerte celular y de la actividad caspasa-3 en las células wtMEFS pero no en AkoMEFS (Figura 28A y B). Es decir, el efecto protector de minociclina requiere de la presencia de Apaf-1 en la célula.

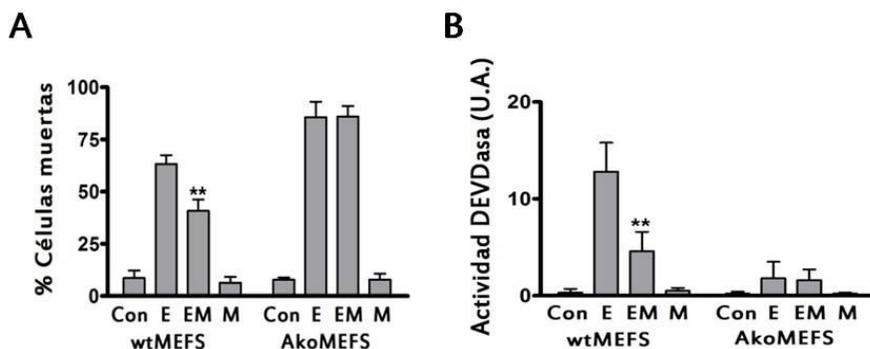


Figura 28. Validación de Apaf-1 como diana de minociclina en wtMEFS y AkoMEFS. **(A)** La viabilidad celular fue medida por MTT en células tratadas con etopósido (E, 10 μ M) en presencia o ausencia de minociclina (M, 50 μ M). **(B)** Actividad DEVDasa obtenida en el ensayo celular de caspasa-3. Los valores representan el promedio \pm s.d de tres experimentos (** $p < 0.05$).

Para confirmar el efecto protector de minociclina sobre la población celular se analizó los niveles de diversas proteínas de la ruta intrínseca mediante *westernblot*. La figura 29 muestra que, cuando la vía intrínseca de la apoptosis se activó con etopósido, se presentó una activación de las caspasas-3 y -9 y una disminución de la proteína antiapoptótica Bcl-xL (carril E). El tratamiento con minociclina logra disminuir los niveles de procesamiento de las caspasas y restaurar los niveles de Bcl-xL (carril EM), confirmándose el efecto de recuperación de minociclina observado por viabilidad y actividad enzimática (Figura 29).

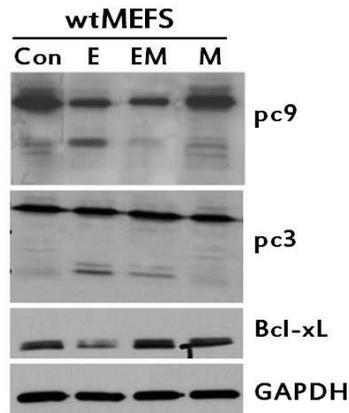


Figura 29. *Westernblot* de caspasa-9, caspasa-3 y Bcl-xL de lisados totales de wtMEFS tratadas con etopósido (E, 10 μ M) y minociclina (M, 50 μ M) por 48 h. La detección de GAPDH se realizó como control de carga.

Por último y para confirmar que el efecto protector de minociclina está principalmente dirigido hacia la ruta intrínseca de la apoptosis, se utilizaron inductores de la vía extrínseca como es el factor de necrosis tumoral α (TNF α) en células wtMEFS y AkoMEFS. Como cabía esperar, TNF α indujo actividad caspasa-3 en ambas líneas celulares, sin embargo minociclina no fue capaz de inhibir significativamente esta actividad (Figura 30).

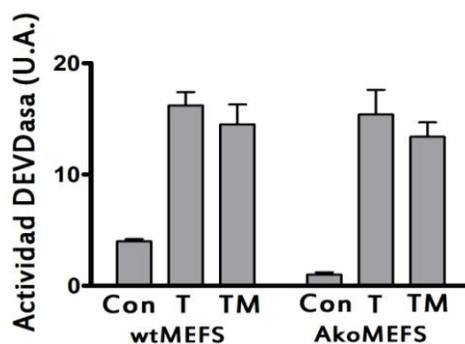


Figura 30. Evaluación del efecto de minociclina sobre la activación de la vía extrínseca de la apoptosis. Células wtMEFS y AkoMEFS fueron tratadas con TNF α (T, 50 ng/mL) y minociclina (M, 50 μ M) por 48 h y posteriormente medida la actividad caspasa-3. Los valores representan el promedio \pm s.d de tres experimentos.

El conjunto de resultados indicó que el efecto antiapoptótico de minociclina está mediado mayoritariamente por su acción sobre Apaf-1. En resumen, se propuso que el mecanismo de inhibición de Apaf-1 por minociclina se debe a la interferencia en la formación del apoptosoma posiblemente mediante la inhibición de la unión de Cit *c* a los dominios WD40 de Apaf-1.

Salida de Cit c

Diversos estudios indican que la actividad neuroprotectora de minociclina está relacionada con un decrecimiento en la salida de Cit *c*, a pesar de que el mecanismo por el cual lo hace permanece sin esclarecer [113, 125]. Se analizó si esta acción ejercida por minociclina era dependiente de la presencia de Apaf-1. Utilizando las células wtMEFS y AkoMEFS se observó que con el tratamiento con etopósido ambas líneas presentan salida de Cit *c* que se evidencia por la aparición de un patrón de tinción difuso con pérdida de la integridad celular general (Figura 31, flechas blancas). Mientras que las células wtMEFS tratadas con minociclina presentaron disminución de salida de Cit *c* con disminución del patrón difuso de tinción, tal como se evidencia en las imágenes de microscopía de fluorescencia (Figura 31A, panel EM), el tratamiento de las células AkoMEFS con minociclina no recuperó el patrón mitocondrial de la tinción de Cit *c* (Figura 31B, panel EM). El conteo del porcentaje de Cit *c* citosólico en ambas líneas celulares (Figura 31A y B) indicó que la capacidad de minociclina para disminuir la salida de Cit *c* es dependiente de la presencia de Apaf-1.

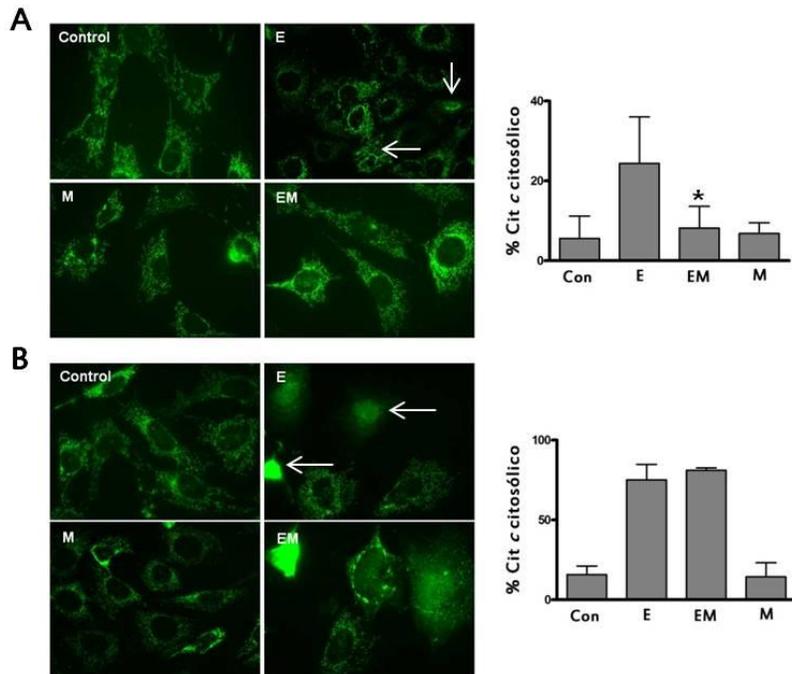


Figura 31. Influencia de minociclina en la salida de Cit *c* en wtMEFS (**A**) y AkoMEFS (**B**). Inmunofluorescencia para Cit *c* en condiciones control (Con) o con etopósido (E, 10 μ M) en presencia o ausencia de minociclina (M, 50 μ M). El porcentaje de células que muestran tinción mitocondrial o citosólica de Cit *c* fue determinado tras el conteo de al menos 500 células. Los valores representan el promedio de \pm s.d. de tres experimentos (* $p < 0.1$).

Cabe destacar que la capacidad de minociclina para disminuir la salida de Cit *c* se correlaciona con la obtenida para el compuesto SVT016426. Ambos compuestos son inhibidores de Apaf-1 lo que puede indicar que esta proteína presenta un papel en la regulación de la dinámica de salida del Cit *c* de la mitocondria.

Modelo de toxicidad celular

El siguiente objetivo se centró en tratar de correlacionar la capacidad antiapoptótica de minociclina y SVT016426 en un modelo de toxicidad celular de la HD. Para ello, se utilizaron células derivadas de un ratón *knock-in* que expresan la construcción completa de Htt humana con 7 (STHdhQ^{7/7}) o 111 (STHdhQ^{111/111}) repeticiones de glutamina. En condiciones normales, ambas líneas celulares no presentan muerte asociada a la extensión de la cadena de glutaminas. No obstante, el tratamiento con algún inductor de estrés celular como doxorubicina genera una muerte celular dependiente de poliQ. La figura 32A muestra que el tratamiento con doxorubicina fue incapaz de inducir actividad caspasa-3 en la línea no patológica (STHdhQ^{7/7}), independientemente del tratamiento con SVT016426 o minociclina. Por el contrario, el tratamiento con doxorubicina sí indujo actividad caspasa-3 dependiente de la cadena de poliQ en la línea STHdhQ^{111/111} y ambos tratamientos, minociclina y SVT016426, disminuyeron la actividad caspasa (Figura 32A). Para estudiar si este efecto de inhibición de apoptosis inducida por poliQ tenía connotaciones en la viabilidad celular, se realizó en paralelo un ensayo de viabilidad mediante MTT. Las células no tratadas con doxorubicina no presentaron cambios importantes en la viabilidad celular, a pesar de que se observó una disminución leve, pero no significativa, de la supervivencia celular en la línea patológica (Figura 32B). De manera similar al ensayo anterior, la inducción de muerte celular con doxorubicina es dependiente de la cadena de poliQ (Figura 32B). El tratamiento con minociclina y SVT016426 mostró un aumento moderado de la supervivencia celular en la línea STHdhQ^{111/111}, correlacionándose con la inhibición observada de actividad caspasa-3 (Figura 32B). Los resultados obtenidos muestran que minociclina y SVT016426 son capaces de disminuir la toxicidad asociada a poliQ.

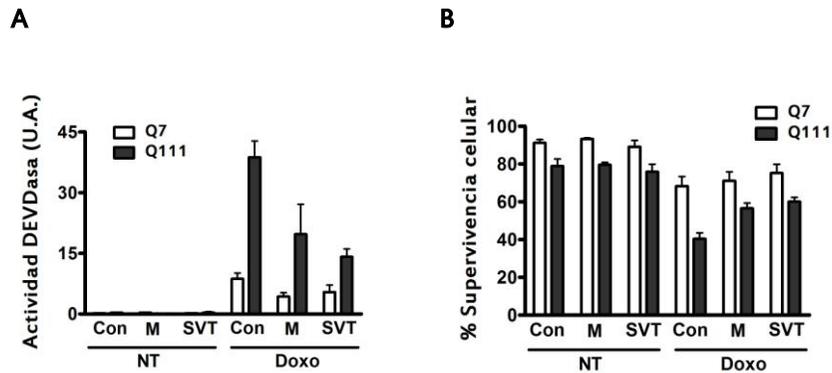


Figura 32. Estudio del efecto de SVT016426 y minociclina en un modelo de toxicidad dependiente de poliQ. Células STHdhQ⁷⁷⁷ y STHdhQ^{111/111} fueron tratadas o no (NT) con doxorubicina (Doxo, 7.5 μ M) en presencia de minociclina (M, 10 μ M) o SVT016426 (SVT, 10 μ M). Tras 30 h de tratamiento la inducción de la actividad caspasa **(A)** fue seguida por el corte del sustrato fluorogénico de caspasa-3. **(B)** La supervivencia celular se analizó por MTT y se representó el porcentaje de supervivencia celular referido al control (NT). Con se refiere al porcentaje respectivo de la muestra sin tratar. Los datos representan el promedio \pm s.d de tres experimentos.

2.3 Papel de ambos inhibidores de Apaf-1 en el modelo de la HD

Una vez caracterizadas las moléculas SVT016426 y minociclina como inhibidores de Apaf-1 se decidió evaluar su efecto sobre la formación de agregados.

2.3.1 Minociclina

Utilizando el modelo de agregación en células HeLa transfectadas con EGFP-HDQ74 se observó que el tratamiento con minociclina disminuyó aproximadamente en un 50% el número de agregados de mtHtt dependientes de poliQ (Figura 33A). Al mismo tiempo que se realizó el conteo de agregados, se cuantificó el número de células que presentan núcleos anómalos, determinados por la ausencia de una morfología redondeada, fraccionamiento nuclear y/o patrón de tinción con DAPI difuso. El objetivo era observar si existía una correlación entre la presencia de agregados y la de núcleos

anómalos. Sin embargo, los datos de la figura 33B muestran que no hubo diferencias significativas.

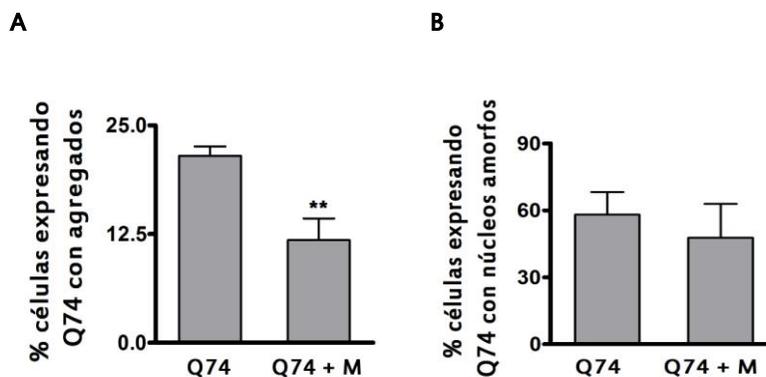


Figura 33. Efecto de minociclina en la formación de agregados. Células HeLa transfectadas con EGFP-HDQ74 y tratadas con minociclina (M; 50 μ M) por 72 h. **(A)** El porcentaje de células que expresan agregados fue determinado con el conteo de al menos 200 células. **(B)** Los núcleos de al menos 200 células fueron clasificados en normales y amorfos en presencia de minociclina (M; 50 μ M). Los valores representan el promedio \pm s.d de tres experimentos (** $p < 0.05$).

Estos resultados sugieren que minociclina es capaz de disminuir la presencia de agregados en un modelo de formación de agregados dependientes de poliQ en células HeLa.

Para confirmar que este efecto es mediado por Apaf-1 se llevaron a cabo experimentos similares en células MEFS. La transfección de la construcción EGFP-HDQ74 genera la aparición de 40% de agregados que disminuyen en presencia de minociclina en las wtMEFS. Sin embargo, el tratamiento con minociclina de células AkoMEFS no alteró el número de agregados observados. Por tanto, la disminución de agregados ejercida por minociclina es dependiente de la presencia de Apaf-1 en la célula (Figura 34).

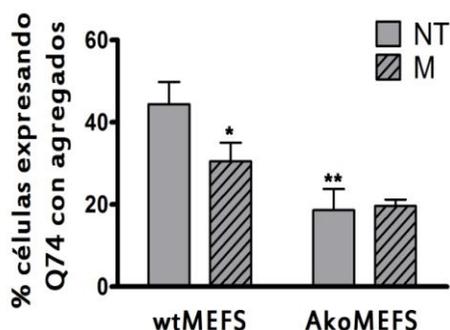


Figura 34. Efecto de minociclina en ausencia de Apaf-1 en el modelo de agregación. Células wtMEFS y AkoMEFS fueron transfectadas con EGFP-HDQ74 y tratadas o no (NT) con minociclina (M; 50 μ M) durante 48 h. El porcentaje de células GFP positivas que expresan agregados fue determinado con el conteo de 500 células. Los valores representan el promedio \pm s.d de tres experimentos (* $p < 0.1$; ** $p < 0.05$).

2.3.2 SVT016426

Se llevaron a cabo análisis similares utilizando el inhibidor de Apaf-1 SVT016426. Como se observa en la figura 35A, células Hela transfectadas con EGFP-HDQ74 y tratadas con SVT016426 presentaron una disminución de agregados intracelulares de aproximadamente el 45%. Así pues, el tratamiento con el compuesto disminuyó el porcentaje de células que forman agregados en un rango similar al obtenido con minociclina. Además, cuando se utilizó el sistema de células wtMEFS y AkoMEFS se observó que SVT016426 no manifestó actividad inhibitora en AkoMEFS pero por el contrario, disminuyó la presencia de agregados en las wtMEFS (Figura 35B). Es decir, se confirmó que el efecto protector respecto a la disminución del número de agregados dependientes de poliQ de SVT016426 está mediado por la presencia de Apaf-1.

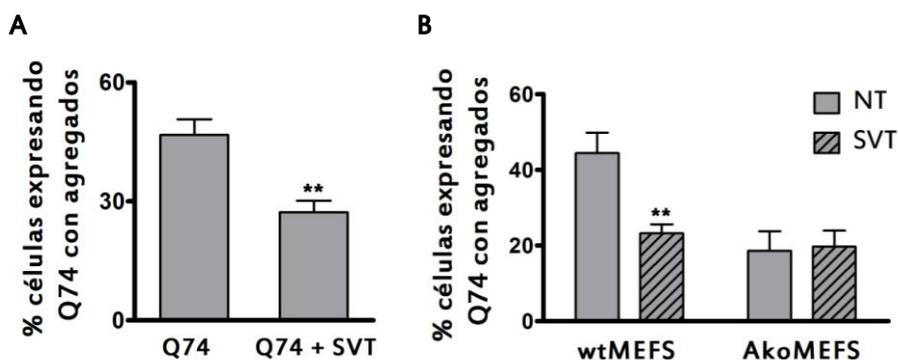


Figura 35. Efecto de SVT016426 en la formación de agregados. **(A)** Células HeLa transfectadas con EGFP-HDQ74 por 72h y tratadas con SVT016426 (SVT; 10 μ M). **(B)** Células wtMEFS y AkoMEFS fueron transfectadas con EGFP-HDQ74 y tratadas o no (NT) con SVT016426 (SVT; 10 μ M). El porcentaje de células GFP que expresan agregados fue determinado con el conteo de 500 células. Los valores representan el promedio \pm s.d de tres experimentos (** $p < 0.05$).

3. Mecanismo funcional de Apaf-1 en la HD

Una de las características más estudiadas en la HD es la muerte neuronal selectiva de células de la corteza estriada y del cortex en las que se ha observado una masiva activación del apoptosoma [126]. Los resultados hasta ahora expuestos en el presente trabajo ponen de manifiesto que Apaf-1 puede tener cierta implicación en la fisiopatología de la HD promoviendo la formación de los agregados moleculares y, que la inhibición de Apaf-1 con inhibidores químicos como minociclina y SVT016426, disminuye la formación de agregados y la toxicidad inducida por poliQ en los modelos celulares utilizados. El siguiente objetivo fue tratar de elucidar el mecanismo molecular por el cual Apaf-1 participa en la formación de agregados proteicos dependientes de poliQ.

3.1 Descripción de la interacción entre Apaf-1 y Huntingtina

Una de las primeras hipótesis que se analizó fue una posible interacción entre Apaf-1 y Htt. Para ello, cuatro estrategias fueron utilizadas: 1) estudio de la interacción de Apaf-1/Htt por cromatografía de afinidad, 2) aislamiento y análisis de agregados de la mtHtt provenientes de cultivos celulares, 3) ensayos de inmunoprecipitación de proteínas y 4) colocalización por inmunofluorescencia.

Ensayo de interacción in vitro por cromatografía de afinidad

El rApaf-1 contiene una cola de 6 histidinas en el extremo N-terminal (ver material y métodos) que permite llevar a cabo ensayos de cromatografía de afinidad de níquel en la que rApaf-1 se retiene en la columna. A esta columna con Apaf-1 incorporado se adicionó un extracto de células HEK293 previamente transfectadas con Htt. Si rApaf-1 y Htt interaccionan, Htt quedará retenida en la columna. En condiciones de elución de Apaf-1 deberían de eluir como un complejo. Por tanto, después de la elución se analizaron las fracciones por *westernblot* (Figura 36A). La figura 36B muestra el resultado del análisis por *westernblot* de las distintas fracciones eluidas de la columna. Se observó un aumento de Htt cuando rApaf-1 estuvo presente en la columna. Como control positivo de interacción se utilizó pc9, como proteína bien caracterizada de unión a Apaf-1. Sin embargo, y a modo de control negativo, se observó que la presencia del factor de transcripción Foxo (*Forkhead box*) en el eluido es independiente de la presencia de Apaf-1.

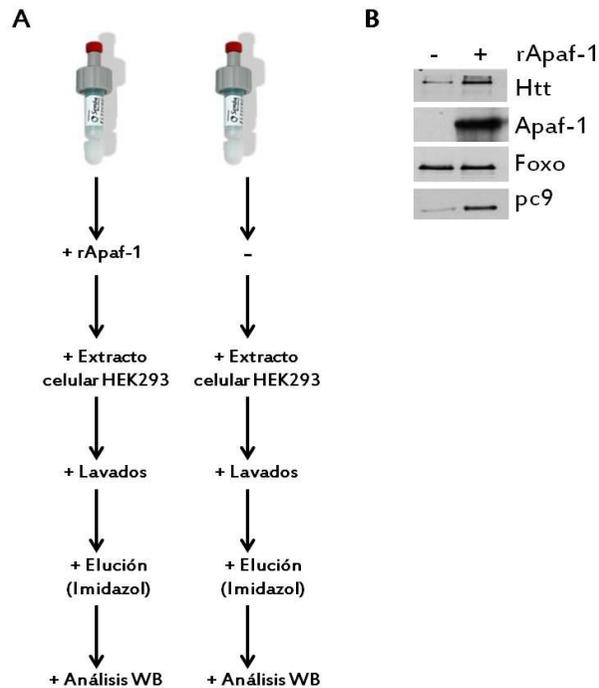


Figura 36. Ensayo *in vitro* de interacción entre Apaf-1 y Htt. **(A)** Esquema del ensayo de interacción por columna de afinidad de níquel: células HEK293 fueron transfectadas con la proteína Htt completa por 48h. El extracto fue adicionado a la columna previamente incubada con rApaf-1 y la fracción retenida se eluyó en presencia de imidazol. **(B)** Análisis por *westernblot* de la fracción eluida. La membrana fue revelada para las siguientes proteínas: Htt (350 KDa), Apaf-1 (140 KDa), Foxo (80 KDa) y pc9 (47 KDa).

Cabe destacar que estos experimentos se realizaron utilizando extractos celulares en los que se había sobreexpresado Htt. Se creyó oportuno llevar a cabo otros experimentos para tratar de determinar la interacción entre las proteínas en condiciones más fisiológicas.

Aislamiento de agregados dependientes de poliQ

Se ha descrito que los agregados de Htt característicos de la HD muestran altos niveles de ubiquitina, proteínas reguladoras del ciclo celular como p53, Hsp70 o proteínas citoesqueléticas como la actina [127, 128]. Hasta el momento no se ha descrito la presencia de Apaf-1 en los agregados que se han analizado. Se decidió llevar a cabo un estudio similar al propuesto por Hazeki y Kanazawa [129] en la que se purifican agregados proteicos a partir de células HeLa transfectadas con la construcción génica EGFP-HDQ74 y proceder mediante el análisis por *westernblot* a determinar la presencia o no de Apaf-1 en dichos agregados (Figura 37A). Además, la presencia de GFP en la construcción permitió un análisis por citometría de flujo para asegurar la pureza de la fracción soluble (S) y la agregada (Ag). La figura 37B muestra que la fracción soluble no presentó fluorescencia mientras que sí se detectó fluorescencia en la fracción agregada. A continuación se llevó a cabo el análisis de las fracciones soluble y agregada por *westernblot*. La presencia de GFP en la fracción Ag corroboró el correcto aislamiento de los agregados, sin embargo el anticuerpo para Htt no detectó a esta proteína en la fracción Ag posiblemente debido a que la presencia de GFP esté enmascarando el epítipo. En cualquier caso, se demostró que pc9 y tubulina (utilizada como control) no se encontraban presentes en los agregados dependientes de poliQ. La proteína endógena, presente en la fase S, si fue reconocida (Figura 37C).

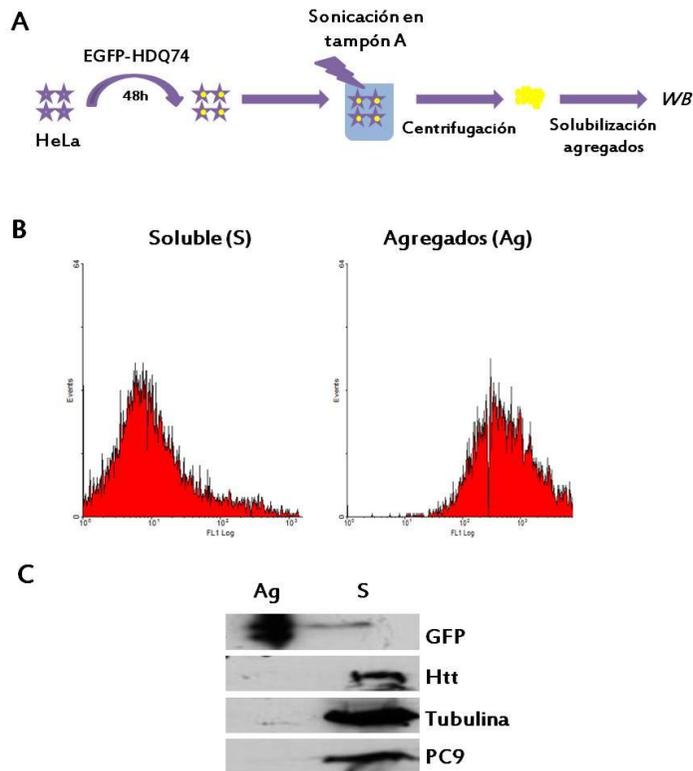


Figura 37. Análisis de los agregados dependientes de poliQ. **(A)** Esquema resumen de la metodología utilizada para el aislamiento de los agregados de poliQ. **(B)** Análisis de las fracciones soluble (S) y agregada (Ag) por citometría de flujo. **(C)** Análisis por *westernblot* de las dos fracciones, S y Ag, resultantes del aislamiento de agregados de poliQ.

No se detectó la presencia de Apaf-1 en los agregados. Este resultado contrasta con el obtenido por Sang *et al*, que sí observaron la presencia del homólogo de Apaf-1 (DARK) en agregados de Htt que contienen poliQ en el modelo de *Drosophila* utilizado en sus estudios [60]. La no detección de Apaf-1 podría deberse a distintas razones, entre ellas se podría argumentar una alteración del epítipo al tratar la muestra con ácido fórmico durante el protocolo de separación. Más aún, podría darse la circunstancia que en este tipo de experimentos alguno de los procedimientos de purificación de los agregados indujera una disociación del hipotético complejo.

Inmunoprecipitación de Apaf-1 y Huntingtina

A continuación se llevaron a cabo experimentos de inmunoprecipitación (IP). Para ello, extractos de células STHdh Q⁷⁷ o STHdh Q^{111/111} se incubaron con el anticuerpo correspondiente a la proteína de interés acoplado a un sistema de agarosa conjugadas a proteína G (*beads*). El sistema permite separar complejos proteicos arrastrados por el anticuerpo de la proteína de interés y analizarlos por *westernblot* (Figura 38). La figura 38 muestra el resultado de las inmunoprecipitaciones realizadas. Primeramente y con el objetivo de asegurarse que no existe interacción inespecífica entre las proteínas de interés y las *beads* de agarosa se procedió a realizar el protocolo sin añadir anticuerpo contra Apaf-1 o Htt (No Ab). El panel derecho de las figuras 38A y 38B muestra que en ausencia de anticuerpo, Apaf-1 y Htt se localizaron en la fracción del sobrenadante (S). Este resultado, aunado a la presencia de tubulina, el control de carga, en la fracción S descarta la existencia de interacciones inespecíficas en este ensayo. El siguiente paso consistió en determinar si los anticuerpos utilizados lograban inmunoprecipitar del extracto celular a la proteína de interés. La figura 38A muestra que el anticuerpo para Apaf-1 de BD no es capaz de inmunoprecipitar Apaf-1 pero sí el de *Cell Signaling* (CS) (Figura 38A, carril IP). Cuando se analizó el inmunoprecipitado se observó la presencia de Htt sugiriendo interacción con Apaf-1 en ambas líneas celulares. Con el objeto de corroborar estos resultados, se realizó la inmunoprecipitación inversa (Figura 38B). El resultado mostró que Htt se localiza en el carril de IP lo que significa que el anticuerpo de Htt utilizado es capaz de inmunoprecipitar a la proteína. Se observó que Apaf-1 está presente en la fracción inmunoprecipitada. Además se realizó un ensayo en paralelo, en el cual el peróxido de tert-butilo (DTBP), un entrecruzador químico de proteínas, fue utilizado con el fin de analizar si se observaba una mejor inmunoprecipitación del complejo. Sin embargo, el resultado no mostró mejoría respecto a los obtenidos en ausencia de entrecruzamiento. Los

resultados obtenidos muestran que Apaf-1 y Htt interaccionan en un extracto de células neuronales.

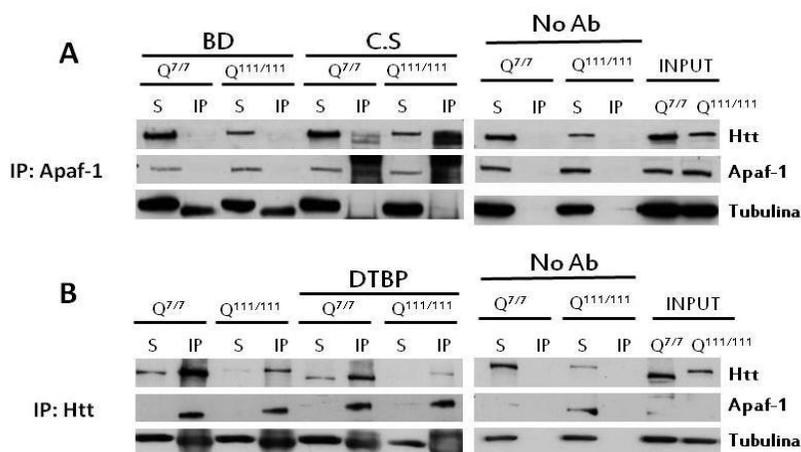


Figura 38. Inmunoprecipitación de Apaf-1 y Htt. Las *beads* fueron incubadas con anticuerpos para Apaf-1 de dos casas comerciales diferentes BD (BD) o *Cell Signaling* (CS) (A) o para Htt (B) durante 2 h a 4°C. Posteriormente un extracto de células STHdh Q^{7/7} o STHdh Q^{111/111} fue añadido e incubado durante 12 h a la misma temperatura. Tras la separación mediante centrifugación las fracciones sobrenadante (S) o inmunoprecipitado (IP) fueron analizadas por *western blot*. DTPB denota la utilización de peróxido de tert-butilo como entrecruzador. No Ab significa la realización del protocolo sin anticuerpo. INPUT significa la carga de un extracto total de cada línea celular. La detección de tubulina se realizó como control de carga.

Colocalización por inmunofluorescencia de Apaf-1 y Huntingtina

En 2005 Sang *et al*, demostraron que la proteína Apaf-1 está presente en los agregados de Htt, sin embargo su estudio no profundizó en la posible interacción de ambas proteínas. Por lo que basados en los resultados anteriores, se planteó el objetivo de determinar si ambas proteínas endógenas colocalizaban en un modelo celular de la enfermedad. Se utilizaron las líneas celulares STHdh Q^{7/7} y STHdh Q^{111/111} y se procedió a realizar estudios de inmunocolocalización de las proteínas Apaf-1 y Htt endógenas. Para ello las células se incubaron con anticuerpos que reconocen a dichas proteínas y se analizaron por microscopía confocal. El análisis cualitativo de al menos 10

imágenes obtenidas mediante microscopía confocal mostró que Apaf-1 y Htt colocalizan mayoritariamente en las células STHdhQ^{111/111} que en las STHdhQ^{7/7} (Figura 39A y B, flechas blancas).

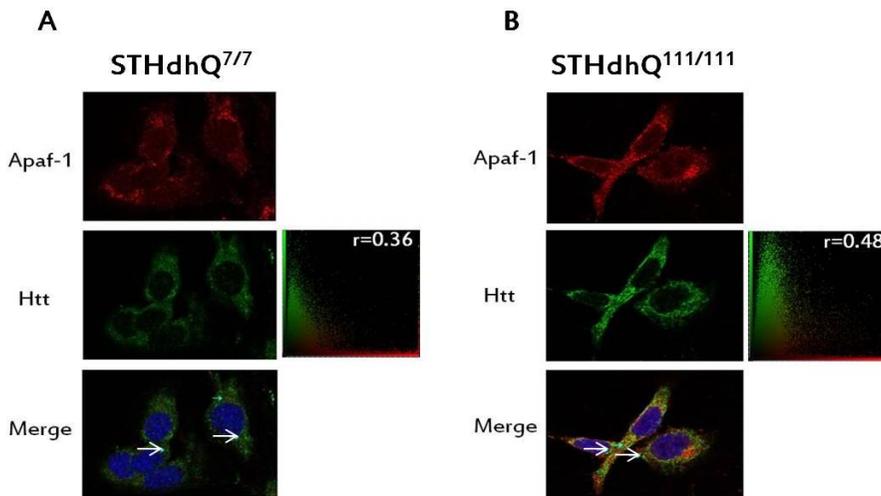


Figura 39. Inmunofluorescencia de Apaf-1 y Htt endógenas en las células STHdh. Células STHdh Q^{7/7} (A) o STHdh Q^{111/111} (B) fueron marcadas con el anticuerpo para Apaf-1 (señal roja) y Htt (señal verde). El gráfico de la derecha de cada uno de los paneles representa la distribución de la fluorescencia de Apaf-1 y Htt junto al promedio del coeficiente de Person's calculado sobre 10 imágenes. Las flechas blancas denotan sitios de colocalización de las proteínas.

A continuación se pusieron a punto métodos cuantitativos para el análisis de la colocalización de las proteínas. Inicialmente, se calculó el porcentaje de colocalización de ambas proteínas mediante el programa Metamorph 7.0 (*Molecular Devices*®), el cual mostró que Apaf-1 y Htt colocalizan en aproximadamente un 20% y 35% en las líneas STHdhQ^{7/7} y STHdhQ^{111/111}, respectivamente (Tabla 7). El análisis de las imágenes con el programa Image J 1.46i (*Wayne Rasband, National Institute of Health, USA*) permite el acceso a dos coeficientes de colocalización ampliamente utilizados [130]. El coeficiente de Pearson's correlaciona una imagen con otra por medio del solapamiento entre dos patrones generalmente rojo y verde. El rango de

colocalización es desde -1 a 1, siendo -1 una correlación negativa y 1 positiva. Según se observa en la tabla 3.1 la línea STHdhQ^{111/111} presentó un mayor coeficiente de colocalización que las células STHdhQ^{7/7}. Por último, el coeficiente de Mander's se caracteriza por evitar tomar en cuenta la diferencia en las intensidades de las señales presentes en la toma de imágenes [130]. Similar a los resultados obtenidos con los otros coeficientes de colocalización, las células STHdhQ^{7/7} mostraron menor colocalización de Apaf-1 y Htt que las células STHdhQ^{111/111}.

Tabla 7. Datos cuantitativos de la colocalización de Apaf-1 y Htt. Los porcentajes de colocalización se obtuvieron con el programa Metamorph 7.0 y los coeficientes de Pearson's y Mander's con ImageJ 1.46i. Los datos representan el promedio \pm s.d del análisis de 10 imágenes.

Línea celular	% co-localización	Coeficiente Pearson	Coeficiente de Manders	
			M ₁	M ₂
STHdhQ ^{7/7}	19.7 \pm 2.74	0.36 \pm 0.03	0.46 \pm 0.05	0.34 \pm 0.04
STHdhQ ^{111/111}	35.7 \pm 3.70	0.48 \pm 0.11	0.51 \pm 0.18	0.59 \pm 0.08

Los resultados obtenidos con estos métodos sugirieron Apaf-1 y mtHtt endógenas no solamente interaccionan sino que colocalizan en un modelo celular de la HD.

3.2 Hipótesis exploradas para explicar el papel de Apaf-1

3.2.1 Apaf-1 y formación de *novos* de agregados

Con el fin de profundizar en el mecanismo de acción y teniendo en cuenta que los resultados expuestos pusieron en evidencia la participación de Apaf-1 en el proceso de formación de los agregados proteicos de mtHtt, se planteó la hipótesis de que Apaf-1 participara directamente en el proceso de formación de estas estructuras macroscópicas.

Actualmente, no se conoce mucho sobre el mecanismo de agregación. Las chaperonas moleculares parecen estar implicadas activamente en el plegamiento de la proteína mutante. De hecho, diversos estudios apuntan que las chaperonas son una diana importante para prevenir la agregación de la proteína mtHtt a través de su capacidad antiagregante. El laboratorio de Guzhova ha demostrado la capacidad de Hsp70 para disminuir la agregación al secuestrar proteínas con predisposición a agregar como GAPDH y la propia proteína mtHtt. Además, se ha correlacionado esta actividad con una disminución de la muerte celular en modelos *in vivo* en *Drosophila melanogaster* [61, 62]. No obstante, en otros estudios se defiende que la capacidad de las chaperonas, en particular Hsp70, de inhibir la muerte neuronal en los modelos de la HD es atribuida a su capacidad para interferir con el proceso apoptótico. Este proceso se atribuye a la interacción entre Apaf-1 con Hsp70 con la consecuente inhibición del reclutamiento de las caspasas dentro del apoptosoma [30].

Basados en estas evidencias científicas, se planteó la posibilidad de que el efecto observado con Apaf-1 en la formación de agregados moleculares pudiera estar mediado por su efecto sobre Hsp70. Es decir, Hsp70 sería responsable tanto de la inhibición de Apaf-1 como de intentar plegar correctamente a mtHtt. La ausencia de Apaf-1 permitiría desplazar a Hsp70 hacia su función de chaperona sobre mtHtt, lo cual previene la formación de agregados tal y como está descrito. Una primera aproximación consistió en analizar los niveles de Hsp70 mediante *westernblot* en diferentes líneas celulares. La figura 40A muestra que los niveles de Hsp70 no se modificaron ante la transfección con el plásmido EGFP-HDQ74 ni con el silenciamiento génico de Apaf-1. Sin embargo, una leve disminución no significativa se obtuvo ante la cotransfección de la construcción más el silenciador. Por otro lado, el análisis de los niveles de Hsp70 de extractos celulares en las líneas wtMEFS y AkoMEFS mostró un cambio moderado, dependiente de la presencia

de Apaf-1, en los niveles de la proteína, mientras que en las células neuronales STHdh con 7 o 111 repeticiones de glutamina no se observaron cambios en los niveles de expresión de Hsp70 (Figura 40B).

A pesar de que los niveles elevados de Hsp70 en las células deficientes en Apaf-1 pudieran estar contribuyendo al fenotipo no parece explicar el mecanismo de inhibición de la agregación puesto que no se observaron cambios significativos en el resto de modelos.

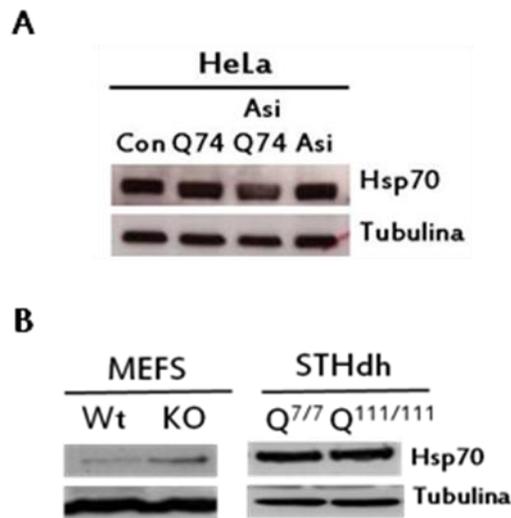


Figura 40. Papel de Apaf-1 en los niveles de expresión de Hsp70. **(A)** Células HeLa fueron transfectadas con EGFP-HDQ74 tras 24 h de silenciamiento de Apaf-1(Asi) y analizadas tras 72h de silenciamiento. **(B)** Extractos celulares totales de células wtMEFS, AkoMEFS, STHdh Q^{7/7} o STHdhQ^{111/111}. Los niveles de Hsp70 fueron analizados mediante *western blot*. El revelado de tubulina se utilizó como control de carga.

3.2.2 Apaf-1 y rutas de limpieza celular

Se ha propuesto a las rutas de limpieza celular como potenciales dianas terapéuticas para la disminución de los agregados dependientes de poliQ [94, 95, 99]. Se planteó la hipótesis de que Apaf-1 pudiera participar a este nivel. En este sentido se analizaron las rutas de limpieza de la autofagia y la ruta de estrés de retículo endoplásmico (RE).

Diversos estudios han descrito que la formación de agregados dependientes de poliQ conlleva la activación de la ruta de la autofagia [99, 131]. No obstante, la propuesta conllevaría una pérdida de eficacia del proceso con el avance de la enfermedad que facilitaría la aparición de agregados. Es por esta razón, que gran parte de los esfuerzos actuales se centran en buscar activadores de la autofagia con el fin de aumentar la limpieza de los agregados y retrasar la activación de la apoptosis. En este contexto se evaluó si la modulación química de Apaf-1, podría implicar una cierta activación de la ruta de la autofagia que podría influir en la formación de agregados dependientes de poliQ. El ensayo consistió en evaluar los niveles de activación de la autofagia a través de la detección de las proteínas LC3 I y LC3 II. Cuando se activa autofagia la proteína LC3 I es procesada y reclutada en los autofagosomas donde LC3 II es generada por un corte proteolítico y la lipidación del extremo C-terminal. La figura 41 muestra el resultado del análisis de extractos en células HeLa y STHdh, además de la cuantificación del *westernblot* atendiendo a la relación entre la forma activa (LC3 II) y la no activa (LC3 I) en las células control. Los resultados sugirieron que la construcción EGFP-HDQ74 aumenta la activación de la ruta de la autofagia en todas las líneas (carril Q74). El tratamiento con minociclina en las células HeLa pareció aumentar los niveles de autofagia, lo que podría explicar el fenotipo observado en el modelo de agregación, no obstante esta activación es moderada. Por el contrario, SVT016426 muestra una disminución leve de la

autofagia en todas las líneas celulares que parece ser poco significativa. Estos resultados no muestran una clara acción de Apaf-1 sobre esta ruta.

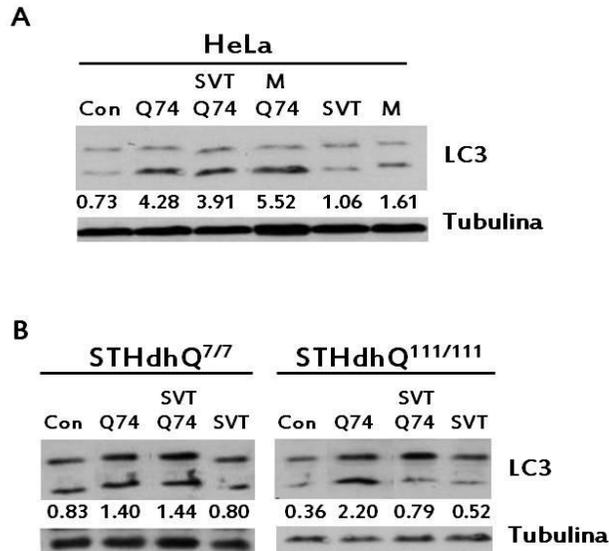


Figura 41. Modulación de la ruta de autofagia a través de Apaf-1. Células HeLa **(A)** o STHdhQ^{7/7} y STHdhQ^{111/111} **(B)** transfectadas con EGFP-HDQ74 durante 24 h fueron tratadas con SVT016426 (SVT, 10 μ M) o minociclina (M, 50 μ M). A las 48 h los niveles de la proteína LC3 I y II fueron determinados mediante *westernblot*. El revelado de tubulina se utilizó como control de carga. Se muestra la cuantificación de las bandas mediante el programa Image J 1.46i como una razón de la forma activa (LC3 II) entre la forma no activa del control (actividad basal de autofagia).

Por otro lado, estudios realizados en modelos celulares de enfermedades dependientes de poliQ han demostrado que la vía de estrés del RE se encuentra activada. En condiciones no patológicas aquellas proteínas sintetizadas que deban dirigirse al RE son diana de diversas modificaciones con el fin de ser plegadas correctamente. Se ha propuesto que mtHtt, debido a la presencia de un exceso de repeticiones de glutamina, bloquea la función fisiológica de la ruta afectando al plegamiento de otras proteínas, y por ende su agregación [71]. Por tanto, se evaluó la posible participación de Apaf-1 en el proceso. La proteína Grp78 participa en el plegamiento de proteínas en el

RE. Se ha descrito que cuando RE es sometido a distintas formas de estrés, como por ejemplo la acumulación de proteínas mal plegadas, se induce una sobreexpresión de Grp78. El análisis por *westernblot* mostró que el plásmido EGFP-HDQ74 no activa a esta ruta (Figura 42). El tratamiento con el compuesto SVT016426 no ejerció ningún cambio en los niveles de activación de la proteína Grp78 y no se observó diferencias entre la línea silvestre (STHdhQ^{7/7}) o mutante (STHdhQ^{111/111}). La cuantificación de las bandas obtenidas con el programa Image J 1.46i corrobora lo observado cualitativamente (Figura 42).

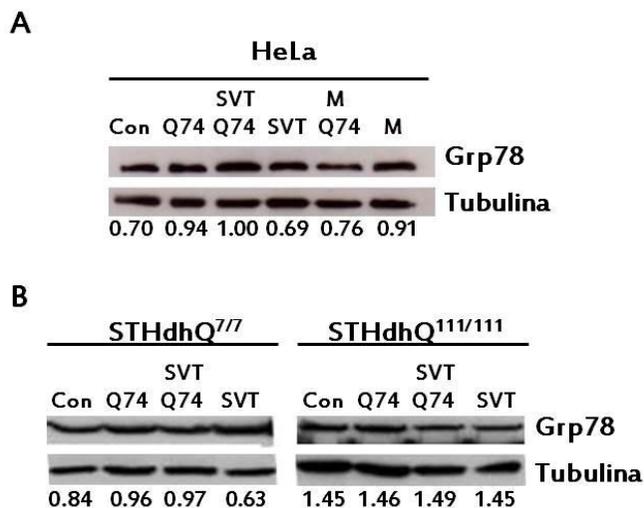


Figura 42. Papel de Apaf-1 en la ruta de estrés de retículo. Células HeLa (**A**) y STHdhQ^{7/7} o STHdhQ^{111/111} (**B**) transfectadas con EGFP-HDQ74 durante 24 h fueron tratadas con SVT016426 (SVT, 10 μ M) o minociclina (M, 10 μ M). A las 48 h los niveles de la proteína Grp78 fueron determinados por *westernblot*. El revelado de tubulina se utilizó como control de carga. Se muestra la cuantificación de las bandas mediante el programa Image J 1.46i normalizando los datos con el control de carga.

En conjunto, las rutas exploradas no parecen explicar el papel de Apaf-1 en la contribución al fenotipo de agregación de la HD, con lo cual otras aproximaciones están bajo estudio para intentar elucidar su aporte en este proceso.

DISCUSIÓN GENERAL

El presente trabajo ha demostrado que Apaf-1 está implicado en el proceso de agregación de mtHtt dependiente de poliQ característico en la HD. A pesar de la controversia existente sobre si la presencia de los agregados es un mecanismo de protección o daño neuronal [132, 133], una gran parte de estudios concuerdan en que la excesiva agregación de la mtHtt conlleva un fallo general de los mecanismos de supervivencia celular y en consecuencia, a la activación de la apoptosis [63, 84]. El fenómeno de agregación sólo se ha conseguido reproducir en alguno de los modelos animales utilizados para la enfermedad pues está ligado al factor tiempo. Desafortunadamente, para el estudio de las bases moleculares del mismo no existen modelos celulares derivados de los modelos *in vivo* que logren reproducir el fenotipo, dificultándose así su análisis. No obstante, mediante la transfección de la construcción génica EGFP-HDQ74 constituida por el exón 1 de la proteína Htt con Q74 glutaminas fusionada a la proteína GFP en diferentes modelos celulares, se puede reproducir la formación de agregados proteicos visibles por microscopía de fluorescencia. Con el uso de este modelo se observó una disminución importante en la aparición de agregados en ausencia de Apaf-1, ya sea mediante el silenciamiento génico de la proteína o en las AkoMEFS. Es decir, una disminución en los niveles celulares de Apaf-1 dificulta la agregación del fragmento N-terminal de la mtHtt. En contra, se observó que el silenciamiento génico de pc9 mediante siRNA o la inhibición química general de las caspasas con z-VAD no genera cambios considerables en el porcentaje de células que forman agregados.

Los resultados obtenidos apuntan a una nueva función no apoptótica de la proteína Apaf-1 ya que los experimentos con el inhibidor de caspasas y el silenciamiento de pc9 excluyen que se trate de una función relacionada con la activación del apoptosoma y en consecuencia, de determinadas caspasas. No obstante, diversos estudios han demostrado que Htt posee diversos puntos de corte para proteasas como calpaínas y caspasas [87, 91, 134], cuya actividad es

responsable de la generación de fragmentos N-terminal de la proteína que incluyen la cola poliQ y que desencadenan el proceso de agregación [86]. En el modelo utilizado, la construcción génica expresada carece de los sitios de corte por caspasas, descritos con anterioridad, lo cual explica la falta de contribución observada por parte de las caspasas y refuerza el papel no relacionado con el apoptosoma de la proteína Apaf-1 en el proceso de agregación. Estos resultados van en la misma dirección que los obtenidos por el laboratorio de Jackson con el homólogo de Apaf-1 en un modelo de *Drosophila*. Sus estudios demostraron que la mutación de DARK no solo suprime la formación de los agregados, sino que retrasa el inicio de la neurodegeneración inducida por la mtHtt [60]. Esta nueva posible función de la proteína podría explicarse por una participación directa en los procesos de agregación dependientes de poliQ o bien, podría tratarse de un efecto indirecto por la alteración de otras proteínas del entorno que sean las implicadas en el proceso de agregación.

En el presente trabajo también se ha demostrado que la inhibición química de Apaf-1 mimetiza el fenotipo observado en los modelos celulares deficientes de Apaf-1. Así, el inhibidor de Apaf-1 SVT016426, se une a la interfase de los dominios CARD y NOD de Apaf-1 obstaculizando el reclutamiento de pc9 y en consecuencia, inhibiendo la actividad del apoptosoma y posiblemente otras funciones de Apaf-1. Además, en presencia de SVT016426 disminuye el número de agregados en el modelo celular utilizado y se ha demostrado que este efecto está mediado por Apaf-1. Por otro lado, minociclina ha sido identificada como un nuevo inhibidor de Apaf-1 tras evaluar *in vitro* diversos fármacos causantes de fenotipos similares al observado en el modelo celular y cuyo mecanismo de acción en HD no está elucidado. Los resultados con minociclina en ensayos *in vitro* demostraron una capacidad moderada para inhibir Apaf-1 y estudios por RMN demostraron la interacción física de la molécula con Apaf-1 a través de los dominios WD40.

Estos dominios están involucrados en diferentes procesos celulares donde principalmente funcionan como plataforma de interacción entre proteína-proteína o proteína-DNA [135]. En este sentido, se ha demostrado que proteínas involucradas en la fisión mitocondrial interaccionan a través de sus dominios WD40 [136]. Los resultados sugieren que minociclina compite por el sitio de unión de Cit *c* a los dominios WD40 de Apaf-1. Minociclina es una molécula multifacética, que cruza la barrera hematoencefálica y que presenta actividad antiapoptótica en modelos *in vivo* de diversas enfermedades neurodegenerativas [111, 137, 138]. Hasta el momento, su actividad antiapoptótica era atribuida a su capacidad de regulación de proteínas de la familia Bcl-2 [125, 139] y a su retraso de la salida de Cit *c* [111, 114], además de presentar efectos diversos en otras rutas de señalización de supervivencia [138, 140]. En el presente trabajo se ha demostrado que minociclina recupera los niveles de Bcl-xL y disminuye el procesamiento de pc9 y procaspasa-3. Además, el efecto descrito para minociclina sobre la salida de Cit *c* es dependiente de la presencia de Apaf-1 y se ha observado también en el tratamiento con SVT016426, lo cual apunta a un papel de Apaf-1 en la regulación de la dinámica mitocondrial tal y como se describe en el trabajo de Orzáez *et al*, donde una pequeña proporción del total de Apaf-1 ha sido hallado anclado en la membrana mitocondrial (Orzáez *et al*, *Submitted*). Por último, se ha puesto de manifiesto la capacidad de minociclina para inhibir la agregación dependiente de poliQ en el modelo de HD a través de Apaf-1. Los resultados obtenidos presentan a minociclina como una molécula atractiva para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas a pesar de su elevada promiscuidad y de algunos estudios contradictorios.

A modo de conclusión, en este trabajo se han caracterizado dos inhibidores de Apaf-1 con mecanismos diferentes pero que presentan el mismo fenotipo antiapoptótico pues dificultan, el correcto ensamblaje del apoptosoma. Sin embargo, ambos logran disminuir la presencia de los

agregados dependientes de poliQ y su toxicidad, sugiriendo una participación de Apaf-1 compleja. Por un lado, podría darse que la unión de los compuestos indujera la degradación de la proteína. El resultado final sería una disminución de los niveles de Apaf-1 y una menor agregación, tal y como ocurre en la inhibición genética. No obstante, el tratamiento con los compuestos en diversas líneas celulares no mostró una disminución de los niveles de Apaf-1. Por otro lado, puede ser que simplemente interfieran en la unión de Apaf-1 con otras proteínas o que causen algún cambio conformacional en el plegamiento de la proteína, con la consecuente modificación de la interacción de otros complejos proteicos implicados en agregación.

Con el objetivo de proveer una visión mecanicista que explicara el papel de Apaf-1 en la disminución de agregados, se investigó una posible interacción entre Apaf-1 y Htt. Se ha demostrado que Apaf-1 y Htt endógenas coimmunoprecipitan, pero no se observaron diferencias entre la longitud de la cadena de poliQ y el nivel de interacción. Además, estudios previos realizados en el laboratorio de Jackson demostraron la presencia de DARK en los agregados dependientes de poliQ en un modelo de *Drosophila melanogaster* [60]. Sin embargo, en el análisis de los agregados de mtHtt dependiente de poliQ aislados en el laboratorio no se pudo demostrar la presencia de Apaf-1 en la fracción de agregados. Se ha pensado que pueden concurrir distintos factores que ocluyen el posible reconocimiento por parte del anticuerpo antiApaf-1, del correspondiente antígeno, cuando Apaf-1 forma parte de los agregados. Van Uem *et al* demostraron que la utilización de ácido fórmico (utilizado en la disgregación de los agregados) afectaba el reconocimiento del epítipo de la proteína 5-B6 por la proteólisis del lugar de reconocimiento por el anticuerpo [141]. Sun Anyang *et al* también demostraron que la selección del ácido a utilizar es fundamental puesto que la diferencia entre ellos afecta de manera distinta a una misma proteína [142]. En cualquier caso, la interacción entre Apaf-1 y Htt fue corroborada mediante ensayos de

colocalización por inmunofluorescencia. Los datos muestran que Apaf-1 colocaliza con Htt en mayor proporción en las células que expresan 111 que en las que expresan 7 repeticiones de glutamina. Las diferencias observadas entre la IP y la colocalización por inmunofluorescencia podrían explicarse por una localización de las proteínas diferencial, de manera que la inmunofluorescencia fuera más resolutiva que la IP al tener a las proteínas en un contexto más fisiológico y en sus localizaciones naturales.

La interacción preferencial de Apaf-1 por la mtHtt en un modelo *in vivo* donde el factor tiempo/envejecimiento está incluido podría con probabilidad aportar pistas sobre el papel de Apaf-1 en agregación. Desafortunadamente hasta donde se ha llegado en este estudio de Tesis Doctoral no se puede afirmar con seguridad si esta interacción guarda relevancia con el fenotipo observado.

Posibles vías de intervención de Apaf-1 en la fisiopatología de la HD

La familia de las chaperonas provee a la células de protección natural contra la agregación o el mal plegamiento de proteínas [143, 144]. En particular, diversos estudios proponen a Hsp70 como una de las chaperonas fundamentales en la disminución de agregados dependiente de poliQ y la neurodegeneración que esto conlleva [62, 145, 146]. Warrick *et al* demostraron, utilizando un modelo de *Drosophila melanogaster*, que la sobreexpresión de Hsp70 disminuía drásticamente la neurodegeneración *in vivo* [61]. Interesantemente, otros estudios atribuyen una acción antiapoptótica a Hsp70 a través de la interacción con el dominio CARD de Apaf-1 y la consecuente inhibición de la formación del apoptosoma [30, 31]. Estas evidencias han llevado a pensar que Apaf-1 puede estar involucrado en el proceso de agregación dependiente de poliQ a través de la interacción con Hsp70. La ausencia de Apaf-1 o su inhibición química podría favorecer la cantidad de Hsp70 disponible para ejercer su acción chaperona sobre la

proteína mtHtt retrasando de esta manera la generación de los agregados. El aumento en los niveles basales de Hsp70 observado en las células AkoMEFS podría estar contribuyendo al fenotipo de disminución de agregados, sin embargo no brinda una explicación certera puesto que en los otros modelos celulares no existen cambios significativos en sus niveles.

La eliminación de agregados mediante la activación de rutas de limpieza como la autofagia ha sido de estudio en modelos celulares de la HD. Por tanto, se planteó la hipótesis de que la inhibición química de Apaf-1 pudiese modificar la activación de la ruta de autofagia. Para el estudio de esta hipótesis se utilizó el modelo celular de agregación, el cual mostró que la formación de los agregados con EGFP-HDQ74 induce la activación de la autofagia. El tratamiento con minociclina en las células HeLa también induce la activación de autofagia lo que facilita la eliminación de agregados y podría explicar el fenotipo descrito. En la literatura se encuentran algunas referencias sobre el papel dual de minociclina en autofagia. Es decir, actuaría activando la autofagia como mecanismo neuroprotector ante la presencia de agregados, y también como mecanismo de muerte asociado a tumores en células gliales [147, 148]. Se necesitarían más experimentos para analizar si este efecto de minociclina está mediado por Apaf-1 o responde a otra acción promiscua de la molécula. Sin embargo, el tratamiento con SVT016426 no reprodujo estos resultados. Por lo tanto, los resultados mostrados no permiten demostrar si hay una intervención de Apaf-1 en el mecanismo de limpieza de agregados por autofagia y posteriores estudios deben llevarse a cabo.

El papel de las proteínas de la familia Bcl-2 y su relación como reguladores de la ruta de la apoptosis se encuentra bien descrita [149]. Sin embargo, diversos estudios apuntan a que miembros de la familia de las Bcl-2 se encuentran en la membrana del retículo endoplásmico (ER) participando en la respuesta al estrés celular al activar proteínas de respuesta del estrés reticular [150]. A pesar de los esfuerzos de proteínas con propiedades

chaperona como Grp78 del ER en evitar la agregación de la proteína mtHtt, los estudios concuerdan en que la HD se caracteriza por la activación del estrés reticular. El estrés generado por la presencia de agregados activa a miembros proapoptóticos de la familia de las Bcl-2 como Bax y Bak [151, 152] que activan la vía intrínseca de la apoptosis. La hipótesis manejada en el laboratorio consistía en determinar si la inhibición de Apaf-1 modifica los niveles de estrés del ER utilizando como marcador de estrés reticular los niveles de Grp78. Esta proteína ha sido relacionada con efectos protectores contra la apoptosis y muerte celular [153] por medio de la inhibición de la agregación de la mtHtt y la activación de caspasa-12. Los resultados muestran que en ninguna de las líneas existe alteración de los niveles de Grp78 con lo cual Apaf-1 parece no estar directamente implicada en esta ruta. Actualmente, el laboratorio continúa explorando y profundizando en diferentes rutas de señalización que podrían explicar el papel de Apaf-1 en la agregación dependiente de poliQ.

El presente trabajo ha descrito a minociclina y SVT016426 como nuevos inhibidores de Apaf-1 y por ende inhibidores de la apoptosis. Apaf-1 tiene un papel bien caracterizado en apoptosis, y en este trabajo se demostró que puede estar implicado en el proceso de agregación dependiente de poliQ característica de la HD, lo cual podría significar el descubrimiento de una nueva función no apoptótica de Apaf-1. Minociclina y SVT016426 se unen a Apaf-1 en sitios diferentes, no obstante las dos moléculas son capaces de disminuir la formación de agregados dependientes de poliQ en el modelo celular de agregación. Los resultados obtenidos en este trabajo aportan información valiosa sobre una nueva diana terapéutica, Apaf-1, para el tratamiento de la agregación en la HD y sugieren que son necesarios experimentos futuros para elucidar el mecanismo molecular de acción.

CONCLUSIONES

1. Minociclina se ha identificado como un inhibidor de Apaf-1 a través de la interacción con los dominios WD40 de Apaf-1, interfiriendo en la interacción con Cit *c*.
2. La capacidad antiapoptótica de minociclina y SVT016426 correlaciona con un aumento en la supervivencia celular en un modelo de toxicidad celular de la HD.
3. Apaf-1 está implicada en el proceso de agregación del fragmento N-terminal de Htt en base a un modelo celular de mamífero de la HD. Se trata de un papel independiente de la actividad de las caspasas y no guarda relación con su función apoptótica.
4. La inhibición química de Apaf-1 mediada por minociclina o SVT016426, disminuye la presencia de agregados dependientes de poliQ de forma similar a la obtenida en las líneas celulares deficientes en Apaf-1. Así pues, constituyen candidatos potenciales para el tratamiento de la enfermedad de HD.
5. El mecanismo molecular de modulación en el proceso de agregación mediado por Apaf-1 parece ser independiente de los procesos de autofagia y estrés de retículo, sin embargo estudios más exhaustivos deben realizarse.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Líneas celulares de mamíferos y condiciones de cultivo

Células embrionarias humanas de riñón (HEK293) y células derivadas de cáncer cérvico-uterino humano (HeLa) se compraron a la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (DMSZ, Braunschweig, Germany). Las células STHdh que expresan de manera constitutiva la proteína Htt completa humana con 7 (STHdh^{Q7/7}) o 111 (STHdh^{Q111/111}) repeticiones de glutamina fueron un regalo de la Dra. Silvia Ginés Padros del Departamento de Biología Celular, Inmunología y Neurociencia de la Universidad de Barcelona. Fibroblastos embrionarios de ratón (MEFS) inmortalizados con el antígeno SV40 silvestres (wtMEFS) y *knock-out* (*ko*) de Apaf-1 (AkoMEFS) fueron cedidos por la Dra. Elisa Ferraro del Laboratorio de Neuroembriología Molecular, IRCCS en Roma, Italia.

Todas las líneas, a excepción de las STHdh, se cultivaron en medio *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino a 37°C y 5% de CO₂. Las células STHdh se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2 mM L-glutamina, 1 mM sodio-piruvato y 400 µg/mL de G418 y se mantuvieron a 33°C en 5% CO₂.

2. Plásmidos

Los plásmidos utilizados para el modelo de agregación, EGFP-HDQ23 y EGFP-HDQ74, fueron obtenidos del Dr. Rubinsztein del *Cambridge Institute for Medical Research, University of Cambridge*, Reino Unido. El plásmido pcDNA-Apaf-1 fue cedido por el Profesor Gabriel Núñez del *Department of Pathology and Comprehensive Cancer Center, University of Michigan Medical School*, EUA.

3. Materiales y reactivos

Tabla 8. Lista de materiales y compuestos utilizados a lo largo del proyecto.

Material	Casa comercial	Referencia
Cultivos		
Albúmina de suero bovino(BSA)	Sigma-Aldrich	A3059
Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT)	Sigma-Aldrich	M5655
DMEM	Gibco	41966
G418	Sigma-Aldrich	A1720
Lipofectamina™ 2000	Invitrogen	11668-027
L-glutamina	Gibco	25030-032
silenciador Apaf-1 (siRNA)	Cell Signaling	6229
silenciador control (siRNA)	Cell Signaling	6568
Sodio piruvato	Sigma	S8636
Suero fetal bovino	Gibco	10270
Tampón de fosfato salino (PBS)	Sigma-Aldrich	D8537
Tripsina-EDTA 0,05%	Gibco	25300
Compuestos Generales		
Ac-DEVD-afc	Anaspec	25273-5
Ac-DEVD-pNA	Enzo life science	ALX-260-033-M005
Ac-LEDH-afc	Enzo life science	ALX-260-116-M005
<i>Beads</i> -proteína G/Agarosa	Millipore	16-201
Citocromo <i>c</i>	Sigma-Aldrich	C7752
dATP	Sigma-Aldrich	A9187
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Sigma-Aldrich	D2438
Ditiotreitol (DTT)	Sigma	D9779
DNAsa	ROCHE	13396200
Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)	Sigma	P-7626
Gelatina	Sigma-Aldrich	G1890
Leupeptina hemisulfato sal	Sigma	L2884
Lisozima	Sigma	L2879
Mowiol	Merck	475904
Ni-NTA Agarosa	Qiagen	30210
Pepstatina	Sigma	P-5318

Continuación Tabla 8. Lista de materiales y compuestos utilizados a lo largo del

Material	Casa comercial	Referencia
<u>Tratamientos</u>		
3-metiladenina	Sigma-Aldrich	M-9281
Lactacistina	Calbiochem	426100
Minociclina	Sigma-Aldrich	M9511
Tunicamicina	Sigma-Aldrich	T7765
z-VAD-fmk	Tocris	2163
<u>Inductores apoptóticos</u>		
Doxorubicina	Sigma-Aldrich	D1515
Etopósido	Sigma-Aldrich	E1383
TNF α	PeptotTech	300-01A
<u>Materiales generales</u>		
<i>Amaya Cell line Nucleofector Kit L</i>	LONZA	VCA-1005
<i>Amersham Hyperfilm™ ECL</i>	GE Healthcare	28906837
<i>Amicon ultra-4-cutt off 10 000 Mw</i>	Millipore	UFC-801024
<i>BCA™ Protein Assay Kit</i>	PIERCE	23225
Columnas de cromatografía	BIORAD	731-1550
Columnas PD-10	GE Healthcare	17-0851-01
<i>ECL™ western blotting detection reagents</i>	GE Healthcare	RPN2209
<i>His-Trap</i>	GE Healthcare	17-5247-0
Membrana de Nitrocelulosa 0,45 μ M	BIORAD	162-0094

proyecto.

4. Anticuerpos

Tabla 9. Lista de anticuerpos primarios y secundarios utilizados. Se detalla la dilución a la que se usa el anticuerpo, el fabricante, la referencia, el peso molecular detectado y la técnica utilizada.

Anticuerpo	Casa comercial	Ref	Dilución	Secundario	MW (kDa)	Uso
<i>Primarios</i>						
Apaf-1	CS	D5C3	1:1000	Rabbit	135 kDa	WB, IP
Apaf-1	BD	611365	1:1000	Mouse	130 kDa	IF, IP
Bcl-xL	CS	2764S	1:1000	Rabbit	30 kDa	WB
Caspasa-9	CS	9508S	1:1000	Mouse	47-37-35 kDa	WB
Caspasa-3	CS	9262S	1:1000	Rabbit	35-19-17 kDa	WB
Citocromo c	CS	4272S	1:1000	Rabbit	14 kDa	WB
Citocromo c	SC	SC13561	1:200	Mouse	14 kDa	IF
GAPDH	CS	14c10	1:3000	Rabbit	37 kDa	WB
GFP	CS	2555S	1:1000	Rabbit	27 kDa	WB
Grp78	Abcam	ab21685	1:5000	Rabbit	78 kDa	WB
Hsp70	CS	4872S	1:1000	Rabbit	70 kDa	WB
Huntingtina	Millipore	MAB2166	1:2000	Rabbit	350 kDa	WB, IF, IP
LC3	CS	2775S	1:1000	Rabbit	16-14 kDa	WB
Tubulina	CS	T8203	1:3000	Mouse	50 kDa	WB
<i>Secundarios</i>						
α -mouse	GE	NA934V	1:300	-	-	WB
α -rabbit	GE	NA931V	1:3000	-	-	WB
<i>Secundarios</i>						
<i>Fluorescentes</i>						
Alexa-Flour®488	Invitrogen	A-11008	1:400	Rabbit	-	IF
Alexa-Flour®555	Invitrogen	A-21430	1:400	Rabbit	-	IF
FITC-AffiniPure Goat Anti-Mouse	JI	115-095-146	1:200	Mouse	-	IF

WB: westernblot, **IF:** inmunofluorescencia, **IP:** inmunoprecipitación

CS: Cell Signaling technology, **SC:** Santa Cruz biotechnology, **GE:** GE Healthcare UK, **JI:** Jackson ImmunoResearch,

BD: BD Transduction Laboratories TM

MW: Peso molecular a detectar

Ref: referencia

5. Obtención de proteínas recombinantes

5.1 Expresión y purificación de Apaf-1 recombinante

Para la obtención de Apaf-1 recombinante (rApaf-1), 20 millones de células SF9 se infectaron con una multiplicidad de infección de 3 (MOI=3) a partir de un stock de baculovirus, que contiene la secuencia codificante para la proteína Apaf-1, con una titulación de 2×10^8 pfu/mL [154]. A las 40 h de cultivo, las células se centrifugaron y lavaron con tampón fosfato salino (PBS) y se lisaron en 2.5 volúmenes de tampón de lisis (20 mM Hepes-KOH pH 8.0, 10 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 1 mM Na-EDTA, 1 mM EGTA y 1 mM ditioneína (DTT)) suplementado con los siguientes inhibidores de proteasas, pepstatina (0.7 μ g/mL), leupeptina (0.5 μ g/mL) y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF; 35 μ g/mL). Las células se lisaron utilizando un homogeneizador con émbolo tipo B realizando 20 golpes. El lisado celular se centrifugó a 10000 g durante 1 h a 4°C quedándose la proteína de interés en el sobrenadante. Debido a que la proteína presenta una cola de histidinas (His) en su extremo N-terminal, queda retenida en una columna de Ni-NTA (Ni²⁺-nitriloacetato)-agarosa previamente lavada con 40 mL de tampón de lavado (20 mM Hepes-KOH pH 7.5, 10 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 1.5 mM Na-EDTA, 1 mM EGTA, 1 M NaCl, 25 mM imidazol y 1 mM DTT). Posterior a tres lavados de la columna, la proteína se eluyó en 800 μ l de tampón de elución (20 mM Hepes-KOH pH 7.5, 10 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 1 mM Na-EDTA, 1mM EGTA, 250 mM imidazol y 1 mM DTT). Para eliminar el imidazol se pasó el eluido por columnas PD-10 utilizando el tampón concentrador (20 mM Hepes-KOH pH 7.5, 10 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 1 mM Na-EDTA, 1mM EGTA, 0.1 mM PMSF y 1 mM DTT). El eluido se concentró en columnas Amicon Ultra-4 10 0000 Mw centrifugando a 5000 g durante 10 min a 4°C. La cuantificación de la proteína se realizó utilizando el espectrofotómetro Nanodrop. La proteína purificada se congeló en nitrógeno líquido y se guardó a -80°C en 20% de glicerol.

5.2 Obtención de Apaf-1 1-541 recombinante

Partiendo de un precultivo de bacterias BL21 (DE3) transformadas con el plásmido pET23b-Apaf1-591 que codifica para la proteína truncada Apaf-1 1-591 (fusionada a una cola de His en el extremo N-terminal) se escaló el cultivo hasta un volumen de 500 mL en medio 2XTY (1% triptona, 1.6% (p/v) de extracto de levadura, 0.5% (p/v) NaCl pH 7.0) que contiene ampicilina (200 µg/mL) hasta alcanzar una DO_{600nm} 0.7-0.8. La inducción de la expresión de la proteína se realizó con 0.5 mM de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) e incubando el cultivo a 20°C con una agitación de 180 rpm durante toda la noche. Después se centrifugó a 6000 rpm durante 20 min a 4°C. El *pellet* celular obtenido se resuspendió en 25 mL de tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 8.0 y 100 mM NaCl) y se añadió 1 mg/mL de lisozima, 5 µg/mL de DNAsa e inhibidores de proteasas y se incubó durante 30 min a 4°C. La lisis celular se realizó mediante tres ciclos de congelación-descongelación en nitrógeno líquido. El lisado celular se centrifugó a máxima velocidad durante 30 min a 4°C y posteriormente, el sobrenadante se purificó con la resina His-Select Nickel Affinity (Qiagen) previamente equilibrada con 20 mL de tampón de lisis. La elución se llevó a cabo con 20 mL de tampón de elución (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM NaCl y 250 mM imidazol). El eluido conteniendo Apaf-1 1-591 se volvió a purificar mediante una cromatografía de intercambio iónico. Se empleó un gradiente lineal entre el tampón A (10 mM Hepes pH 7.8, 10 mM NaCl, 5 mM EDTA, 2 mM DTT + 5%(v/v) glicerol) y el tampón B (10 mM Hepes pH 7.8, 1 M NaCl, 5 mM EDTA, 2 mM DTT + 5%(v/v) glicerol). Las fracciones correspondientes a Apaf-1 1-591 se identificaron utilizando SDS-PAGE, se unificaron y se concentraron mediante centrifugación utilizando Amicon Ultra-4 10000 Mw. La proteína se conservó a -80°C.

5.3 Purificación de procaspasa-9 recombinante

A partir de un precultivo de 1.5 mL de bacterias BL21 (DE3) pLysCodon+ transformadas con el plásmido pET23b-pc9 se inoculó un cultivo intermedio de 50 mL en medio 2XTY con ampicilina (100 µg/mL) durante 1.5 h a 37°C. Posteriormente, 25 mL de este cultivo se inocularon en 500 mL de medio y se dejaron crecer hasta alcanzar una OD_{600nm} de 0.6-0.7. Tras enfriar el cultivo a 30°C, se indujo la expresión de pc9 con 0.2 mM de IPTG durante 3 h a 30°C con 170 rpm de agitación. El *pellet* de bacterias se recogió tras una centrifugación a 3000 g durante 15 min a 4°C y se resuspendió en 50 mL de tampón A (100 mM Tris-HCl pH 8.0 y 0.1 M NaCl). La lisis celular se llevó a cabo mediante sonicación (Branson 5510) en hielo durante 3 min con pausas cada min para evitar el sobrecalentamiento de la muestra utilizando una amplitud del 35%. La muestra se centrifugó a 17000 g a 4°C durante 45 min y se recuperó el sobrenadante, el cual contiene la proteína de interés fusionada a una cola de His. La proteína se purificó por afinidad utilizando una columna de 5 mL His-Trap. La elución tuvo lugar mediante un gradiente lineal entre el tampón A y tampón B (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl y 200 mM imidazol). Bajo las condiciones de elución se obtuvo una pc9 procesada en dos subunidades diferentes p35 y p10, inactiva que requiere procesamientos adicionales para ser funcional. El eluido obtenido se purificó nuevamente utilizando cromatografía de intercambio iónico con una columna de 5 mL His-Trap Q utilizando un gradiente lineal entre el tampón A_i (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 8.5% (v/v) glicerol y 1 mM DTT) y el tampón B_i (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 8.5% (v/v) glicerol, 1 M NaCl y 1 mM DTT). El pico de elución correspondiente a pc9 fue identificado mediante SDS-PAGE y cuantificado utilizando *BCATM Protein Assay Kit* según las instrucciones del fabricante. La proteína se conservó a -80°C.

5.4 Purificación de caspasa-3 recombinante

Partiendo de un precultivo de bacterias BL21 (DE3) transformadas con el plásmido pET18-casp3 que codifica para la proteína caspasa-3 se escaló el cultivo hasta un volumen de 500 mL en medio 2XTY suplementado con ampicilina (200 µg/mL) y cloranfenicol (200 µg/mL), hasta alcanzar una DO_{600nm} 0.8. La inducción de la expresión de la proteína se realizó con 0.2 mM de IPTG e incubando el cultivo a 30°C con una agitación de 180 rpm durante 3 h. Después se centrifugó a 6000 rpm durante 20 min a 4°C. El *pellet* celular obtenido se resuspendió en 25 mL de tampón de lisis (100 mM Tris-HCl pH 8.0 y 100 mM NaCl). La lisis celular se llevó a cabo mediante sonicación (Branson 5510) en hielo durante 2 min con pausas cada 30 s para evitar el sobrecalentamiento de la muestra utilizando una amplitud del 35%. La muestra se centrifugó a 25000 rpm a 4°C durante 30 min, se recuperó el sobrenadante, el cual contiene la proteína de interés y se purificó utilizando cromatografía de intercambio iónico con una columna de 1 mL His-Trap Q utilizando un gradiente lineal entre el tampón A (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl y 20 mM imidazol) y el tampón B (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl y 500 mM imidazol). Para eliminar el imidazol se pasó el eluido por columnas PD-10 previamente equilibradas con tampón C (50 mM Hepes pH 7.4, 1 mM EDTA, 10% glicerol, 0.1% CHAPS y 100 mM NaCl). El pico de elución correspondiente a caspasa-3 se congeló a -80°C.

6. Ensayos de actividad *in vitro*

6.1 Ensayo de reconstitución del apoptosoma

Para el ensayo de reconstitución del apoptosoma, 100 nM de rApaf-1 se incubó en presencia de 10 mM dATP y 10 mM Cit *c* en tampón A (20 mM HEPES, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT y 0.1 mM PMSF) durante 30 min a 30°C. A continuación, se añadió 4 µM pc9 y se

incubó durante 40 min a 30°C. Por último, se agregó el sustrato fluorogénico de caspasa-9, Ac-LEDH-afc, que al ser hidrolizado por la caspasa-9 activada por el apoptosoma presentará fluorescencia, la cual será detectada en un espectrofluorímetro Wallac Victor2V 1420 (PerkinElmer) (λ_{exc} 390 nm; λ_{em} 510 nm).

Para ver el efecto de compuestos como minociclina y SVT016426 se efectuó una preincubación durante 15 min a 30°C de rApaf-1 con 50 μ M minociclina o 10 μ M SVT016426 previa a la adición del resto de los componentes del apoptosoma.

6.2 Reconstitución del apoptosoma con extractos celulares

Extractos citosólicos de células HEK293 deficientes de Apaf-1 se obtuvieron como previamente describió Fearnhead et al [40]. Brevemente, los extractos se prepararon a partir de 60 millones de células, las cuales se lavaron con tampón PBS y se resuspendieron en 10 mL de tampón hipotónico (50 mM PIPES pH 7.0, 10 mM KCl, 5 mM EGTA, 2 mM MgCl₂ y 1 mM DTT), con el cual se induce el hinchamiento de las células sin romperlas. Rápidamente las células se centrifugaron a 500 rpm, 5 min y se retiró el tampón sobrante. Seguidamente se llevó a cabo la lisis celular mediante tres ciclos de congelación-descongelación y los lisados se centrifugaron a 43000 rpm durante 60 min a 4°C para obtener la fracción citosólica. El sobrenadante se fraccionó mediante cromatografía de intercambio aniónico con el objetivo de separar las fracciones que contienen todos los componentes del apoptosoma a excepción de Apaf-1. Para ello se utilizó una columna de Q-sefaraosa y un gradiente lineal entre el tampón A (50 mM PIPES pH 7.0, 50 mM KCl, 5 mM EGTA, 2 mM MgCl₂ y 1 mM DTT) y el tampón B (50 mM PIPES pH 7.0, 450 mM KCl, 5 mM EGTA, 2 mM MgCl₂ y 1 mM DTT). Ninguna de las fracciones seleccionadas contiene actividad caspasa pero la adición de rApaf-1 reconstituye la actividad.

La funcionalidad de los extractos HEK293 deficientes de Apaf-1 se evaluó mediante el ensayo de reconstitución del apoptosoma. Se incubó 80 nM de rApaf-1 con 50 μ M minociclina o 10 μ M SVT016426 en tampón de reacción (20 mM Hepes-KOH pH 7.5, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 10 mM DTT y PMSF) a 30°C durante 20 min con agitación constante. Posteriormente, se añadió una concentración final de 0.3 mg/mL del extracto celular y 1 mM dATP y la mezcla se incubó a 37°C por 30 min con agitación. La actividad caspasa fue monitoreada a 37°C tras la adición de 20 μ M Ac-DEVD-afc en un espectrofluorímetro Wallac Victor2V 1420 (PerkinElmer) (λ exc 400 nm; λ em 508 nm).

6.3 Ensayo de activación de caspasa-9

El ensayo de actividad utilizando sales cosmotrópicas, en particular citrato de sodio, fue realizado como ha sido reportado previamente [120]. En la activación de pc9 dependiente de citrato sódico 5 μ M pc9 fue preactivada durante 20 min en tampón SC (50 mM Na₂HPO₄·7H₂O, 150 mM NaCl, 1.5% sacarosa y 0.05% CHAPS, 10 mM DTT y 0.7 M citrato sódico pH 7.4) a temperatura ambiente de manera que las sales de citrato logran activar a pc9. Una vez preactivada, la reacción completa se diluyó en tampón sin citrato (tampón S) y se incubó 25 min a temperatura ambiente en presencia de minociclina 50 μ M o 10 μ M SVT016426. Finalmente, se adicionó 40 μ M del sustrato fluorogénico Ac-LEHD-afc y la liberación del grupo afc se monitorizó a 25°C (λ exc 390 nm; λ em 510 nm) en un espectrofluorímetro Wallac Victor2V 1420 (PerkinElmer) a 37°C.

6.4 Ensayo de activación de caspasa-3

Para realizar el ensayo de activación de caspasa-3 se procedió a la incubación de 50 μ M minociclina o 10 μ M SVT016426 con 2 nM caspasa-3

recombinante en un tampón de reacción (50 mM Hepes pH 7.4, 100 nM NaCl, 10 mM DTT, 1 mM EDTA, 10% glicerol y 0.1% CHAPS) durante 20 min a temperatura ambiente. La actividad se midió agregando 200 μ M del sustrato fluorogénico Ac-DEVD-pNA y detectada en un espectrofluorímetro Wallac Victor2V 1420 (PerkinElmer) a λ 570 nm.

7. Experimentos de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Todos los espectros han sido obtenidos con un espectrómetro Bruker Ultrashield Plus Avance II 600 MHz equipado con una sonda TCI de 5 mm enfriada criogénicamente a una temperatura de 298 K. Una muestra típica de RMN consistió en 1 μ M rApaf-1 y 20 o 100 μ M de minociclina obtenido de un stock 50 mM disuelto en agua para obtener una relación proteína:ligando de 1:20 o 1:100 para los experimentos de waterLOGSY y STD, respectivamente. El tampón de ensayo se compone de 50 mM fosfato pH 7.0 y 50 mM NaCl. La ventana espectral de ^1H fue de 9600 Hz, utilizando 8 K de puntos para su definición y un número de acumulaciones de 1 y 4 K para los experimentos de waterLOGSY y STD, respectivamente.

8. Ensayo celular de activación de caspasa-3

El ensayo de activación de caspasa-3 se realizó sembrando 1.5×10^5 células/pocillo de, HeLa, wtMEFS, AkoMEFS, STHdhQ⁷⁷ y STHdhQ^{111/111} en placas de 9.6 cm² de área durante 24 h. Donde fuese necesario, las células se trataron con 10 μ M etopósido, 50 ng/ml TNF α o 10 μ M del inhibidor de pancaspasas Z-Val-Ala-Asp (OMe)-fluorometilcetona (z-VAD; Tocris). Al mismo tiempo las células fueron cotratadas con 50 μ M minociclina o 10 μ M STV016426 durante 24 h. A continuación, se tripsinizaron las células y se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 min a 4°C. Se procedió a eliminar el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en tampón de extracción hipotónico (50 mM PIPES pH 7.0, 50 mM KCl, 5 mM EGTA y 2 mM MgCl₂). La lisis celular

se realizó mediante congelación-descongelación en tres rondas con nitrógeno líquido/agua fría. Luego se centrifugaron las muestras a 13000 rpm 10 min a 4°C. El sobrenadante, que contiene la fracción citosólica, se cuantificó utilizando BCA™ Protein Assay Kit según las instrucciones del fabricante. La actividad caspasa-3 se monitorizó en 40 µg de proteína diluida en tampón de medición (10% glicerol en PBS, 0.1 mM EDTA y 2mM DTT) que contenía 20 µM de sustrato fluorogénico Ac-DEVD-afc y utilizando un espectrofluorímetro Wallac Victor2V 1420 (PerkinElmer) a 37°C (λ exc 400 nm; λ em 535 nm).

9. Ensayo de viabilidad celular

Células STHdhQ^{7/7}, STHdhQ^{111/111}, wtMEFS y AkoMEFS se sembraron a una densidad de 2.0×10^3 células/pocillo en placas de 96 pocillos estériles por 24 h. Las células wtMEFS y AkoMEFS se trataron con 10 µM etopósido en presencia o ausencia de 50 µM minociclina por 30 h, mientras que las células STHdhQ^{7/7} y STHdhQ^{111/111} se trataron con 7.5 µM doxorubicina en presencia o ausencia de 50 µM de minociclina o 10 µM de SVT016426 durante 24 h. En todos los casos, se agregó 20 µL de MTT de una solución a 5 mg/mL durante 4 h. La reducción metabólica del MTT realizada por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa conlleva a la formación de cristales de formazan. En el siguiente paso el medio celular fue absorbido y los cristales de formazan presentes fueron disueltos en 100% DMSO. La intensidad del color fue medida en un espectrofluorímetro Wallac Victor2V 1420 (PerkinElmer) a $\lambda = 570$ nm.

10. Inmunoprecipitación

Células STHdhQ^{7/7} y STHdhQ^{111/111} se sembraron a una densidad de 2.0×10^6 de células en placas de 20 cm² de área durante 24 h. Se lisaron en tampón IP (50mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 5mM MgCl₂ y 0.5% Tritón X-100) con inhibidores de proteasa y fosfatasa durante 20 min a 4°C en rotación orbital. Posteriormente, la solución se centrifugó a 10000 rpm durante 15 min a 4°C. El sobrenadante se cuantificó

utilizando BCATM Protein Assay Kit según las instrucciones del fabricante. Para la inmunoprecipitación, 20 μ L de *beads* fusionadas a la proteína G-Agarosa fueron conjugadas con 1 μ g de anticuerpo de Htt o Apaf-1 en PBS durante 2 h a 4°C en rotación orbital. A continuación, se incubaron con 500 μ g del extracto celular toda la noche a 4°C en rotación orbital. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados a 3000 rpm durante 5 min a 4°C. Finalmente, las muestras se hirvieron en tampón de carga durante 5 min a 95°C para separar los complejos inmunoprecipitados de las *beads* y se analizaron por *westernblot*.

11. Ensayo de cromatografía de afinidad de níquel

Células HEK293 fueron cultivadas en placas de 10 cm² a una densidad de 1.0×10^6 células/placa. A las 24 h se transfectaron con el plásmido HDFLQ128 por 40 h utilizando LipofectaminaTM 2000. Posteriormente, las células tripsinizadas fueron lisadas en tampón IP tal y como se ha descrito en el apartado anterior. El sobrenadante fue cuantificado utilizando BCATM Protein Assay Kit. Dos columnas de cromatografía (BIO-RAD) se equilibraron con 1 mL de tampón A (20 mM HEPES, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT y 0.1 mM PMSF). Seguidamente, se les añadió 100 μ L de resina para purificación de proteínas que contengan una cola de His (Ni-NTA Qiagen). A una de las columnas se le añadió 30 μ L de rApaf-1 (4 μ M) y a la otra 30 μ L de tampón A (control negativo). Posteriormente, a ambas se les agregó 50 μ L del extracto 50 mg/mL HEK293 y se incubó 10 min a temperatura ambiente. Tras tres lavados con tampón A, se eluyó con 300 μ L de 500 mM imidazol. El eluido fue liofilizado y analizado mediante *westernblot*.

12. Purificación de los agregados

Para la obtención y purificación de agregados dependientes de poliQ, las células HeLa se sembraron en placas de 10 cm² con una densidad de 1.0×10^6 células/placa. Al día siguiente, se transfectaron con 2 μ g del plásmido EGFP-HDQ74 utilizando Lipofectamina 2000TM acorde a las indicaciones del

fabricante. El procedimiento de separación y purificación de agregados fue realizado según lo descrito por Hazeki y Kanazawa [129]. Tras 48 h de transfección, las células se levantaron utilizando un *scraper*, se centrifugaron a 300 g durante 5 min a 4°C, se lavaron con PBS y se resuspendieron en tampón TBS-X (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl y 0.5% Triton X-100) con inhibidores de proteasas. La muestra se lisó por sonicación en hielo durante 15 seg con una amplitud de 10%. Seguidamente, se centrifugó la suspensión obtenida a 300 g durante 10 min a 4°C. El pellet se resuspendió en TBS-X y se repitió el procedimiento dos veces más. Para la solubilización del *pellet* que contiene los agregados se añadió 500 µL de ácido fórmico concentrado durante 1 h a 37°C. La eliminación del ácido fórmico se llevó a cabo utilizando centrifugación al vacío. Los agregados concentrados se resuspendieron en tampón de carga para SDS-PAGE. El análisis se llevó a cabo mediante *westernblot*.

13. Inmunodetección de proteínas (*westernblot*)

Las muestras celulares para analizar mediante *westernblot* se lisaron en un tampón de lisis total (25mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA y 1% SDS), calentadas a 95°C durante 10 min y centrifugadas durante 5 min a máxima velocidad. El sobrenadante fue cuantificado utilizando BCATM Protein Assay Kit. Las muestras se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10-12% y transferidas a membranas de nitrocelulosa. Posteriormente, se bloqueó con 5% de leche desnatada disuelta en tampón TBS-T (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl y 2% Tween-20) durante 1 h a temperatura ambiente y seguidamente se incubó durante toda la noche a 4°C la membrana con el anticuerpo primario de interés (ver tabla anticuerpos). Al día siguiente, se realizó tres lavados con tampón TBS-T durante 10 min a temperatura ambiente con agitación constante. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente acoplado a la enzima peroxidasa durante 1 h a temperatura ambiente en agitación. Por último, se realizaron tres

lavados con las mismas condiciones anteriores y la detección se realizó por quimioluminiscencia utilizando ECL™ *westernblotting detection reagent* según las indicaciones del fabricante.

En caso necesario, se realizó la cuantificación del área de las bandas obtenidas utilizando el programa Image J 1.46i (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA) y fueron normalizadas con respecto al control de carga.

14. Inmunofluorescencia

Para los ensayos de inmunofluorescencia, las células sembradas sobre cristales se fijaron con 4% paraformaldehído durante 20 min. Seguidamente, las células se permeabilizaron con 0.1% Tritón X-100 durante otros 20 min. Tras varios lavados con PBS se bloqueó con 3% albúmina de suero bovino (BSA) en PBS durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se realizaron tres lavados con PBS para eliminar el sobreexceso. En los casos pertinentes, las células se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado a un fluorocromo durante 1 h protegidas de la luz. Finalmente, tras tres lavados con PBS los cristales se montaron con Mowiol. Las imágenes fueron obtenidas utilizando un microscopio Leica DM 6000 (cámara Leica DC500) con un objetivo 20X o bien mediante microscopía confocal LSM 510 con un objetivo 63X.

Para el caso del estudio de la salida de Cit *c* de la membrana mitocondrial con células wtMEFS y AkoMEFS doscientas células se contabilizaron y clasificaron de acuerdo a la localización del Cit *c* en la mitocondria (morfología tubular) o en el citosol (patrón difuso).

15. Análisis de imagen

Colocalización

La toma de imágenes en las líneas celulares STHdhQ^{7/7} y STHdhQ^{111/111} se realizó en un microscopio confocal LSM 510 con un objetivo 63X. Para la eliminación del ruido de fondo de la imagen a analizar se sustrajo la señal de los anticuerpos secundarios, Alexa 555 y FITC para Apaf-1 y Htt, respectivamente. Para evitar falsos positivos se corroboró la eliminación de la señal de ruido de fondo utilizando la opción *subtract background* en los programas de análisis de imagen. Posteriormente, el porcentaje de colocalización de ambas proteínas se calculó utilizando el *plugin Measure colocalization* del programa Metamorph 7.0 de un total de 10 imágenes analizadas. En las imágenes mostradas puntos de colocalización se muestran mediante flechas blancas.

Un segundo análisis de las mismas imágenes se realizó con la ayuda del programa Image J 1.46i "JACoP plugging" (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA) obteniendo dos coeficientes de colocalización. El coeficiente de Pearson se utiliza para describir el grado de solapamiento entre dos patrones de manera lineal obteniéndose valores entre 1 y -1. Valores negativos (cercaos a -1) denotan alta exclusión de las señales evaluadas mientras que valores positivos (cercaos a 1) señalan alto solapamiento de los fluorocromos.

Coefficiente de Pearson

$$r_p = \frac{\sum (R_i - R_{aver}) * (G_i - G_{aver})}{\sqrt{\sum (R_i - R_{aver})^2 * \sum (G_i - G_{aver})^2}}$$

Donde:

R_i=intensidad roja

G_i= intensidad verde

R_i= media de la intensidad roja

G_i = media de la intensidad verde

Por otro lado, el coeficiente de Manders, M_1 y M_2 , determina la colocalización de las señales verde y roja sin tomar en cuenta el cambio en la intensidad relativa de cada una de las imágenes y sus valores rondan entre 0 y 1. Valores cercanos a 0 demuestran baja colocalización. Por el contrario, valores cercanos a 1 denotan alta colocalización de las señales.

Coeficiente de Manders

$$M_1 = \frac{\sum R_{i,coloc}}{\sum R_i} \quad M_2 = \frac{\sum G_{i,coloc}}{\sum G_i}$$

Donde:

$$G_{i,coloc} = 0 \text{ si } R_i = 0$$

$$G_{i,coloc} = G_i \text{ si } R_i > 0$$

16.Análisis estadístico

Todos los experimentos se han realizado al menos por triplicado. En los casos de existir datos cuantitativos se han representado como el promedio \pm desviación estándar. Cuando se ha requerido se ha aplicado el test estadístico correspondiente: *t- student* o ANOVA con un nivel de significancia de * $p < 0.1$ o ** $p < 0.05$.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer, 1972. **26**(4): p. 239-57.
2. Orzaez, M., et al., *Peptides and peptide mimics as modulators of apoptotic pathways*. ChemMedChem, 2009. **4**(2): p. 146-60.
3. Hay, B.A., J.R. Huh, and M. Guo, *The genetics of cell death: approaches, insights and opportunities in Drosophila*. Nat Rev Genet, 2004. **5**(12): p. 911-22.
4. Kroemer, G., et al., *Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009*. Cell Death Differ, 2009. **16**(1): p. 3-11.
5. Elmore, S., *Apoptosis: a review of programmed cell death*. Toxicol Pathol, 2007. **35**(4): p. 495-516.
6. Wong, R.S., *Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment*. J Exp Clin Cancer Res, 2011. **30**: p. 87.
7. Kroemer, G., L. Galluzzi, and C. Brenner, *Mitochondrial membrane permeabilization in cell death*. Physiol Rev, 2007. **87**(1): p. 99-163.
8. Strasser, A., L. O'Connor, and V.M. Dixit, *Apoptosis signaling*. Annu Rev Biochem, 2000. **69**: p. 217-45.
9. Bratton, S.B. and G.S. Salvesen, *Regulation of the Apaf-1-caspase-9 apoptosome*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 19): p. 3209-14.
10. Thornberry, N.A., *The caspase family of cysteine proteases*. Br Med Bull, 1997. **53**(3): p. 478-90.
11. Li, P., et al., *Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade*. Cell, 1997. **91**(4): p. 479-89.
12. Srinivasula, S.M., et al., *Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization*. Mol Cell, 1998. **1**(7): p. 949-57.
13. Benedict, M.A., et al., *Expression and functional analysis of Apaf-1 isoforms. Extra Wd-40 repeat is required for cytochrome c binding and regulated activation of procaspase-9*. J Biol Chem, 2000. **275**(12): p. 8461-8.
14. Hill, M.M., C. Adrain, and S.J. Martin, *Portrait of a killer: the mitochondrial apoptosome emerges from the shadows*. Mol Interv, 2003. **3**(1): p. 19-26.
15. Acehan, D., et al., *Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation*. Mol Cell, 2002. **9**(2): p. 423-32.
16. Yu, X., et al., *A structure of the human apoptosome at 12.8 Å resolution provides insights into this cell death platform*. Structure, 2005. **13**(11): p. 1725-35.

17. Pop, C., et al., *The apoptosome activates caspase-9 by dimerization*. Mol Cell, 2006. **22**(2): p. 269-75.
18. Shi, Y., *Caspase activation, inhibition, and reactivation: a mechanistic view*. Protein Sci, 2004. **13**(8): p. 1979-87.
19. MacCorkle, R.A., K.W. Freeman, and D.M. Spencer, *Synthetic activation of caspases: artificial death switches*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(7): p. 3655-60.
20. Yang, X., H.Y. Chang, and D. Baltimore, *Essential role of CED-4 oligomerization in CED-3 activation and apoptosis*. Science, 1998. **281**(5381): p. 1355-7.
21. Allan, L.A. and P.R. Clarke, *Phosphorylation of caspase-9 by CDK1/cyclin B1 protects mitotic cells against apoptosis*. Mol Cell, 2007. **26**(2): p. 301-10.
22. Allan, L.A., et al., *Inhibition of caspase-9 through phosphorylation at Thr 125 by ERK MAPK*. Nat Cell Biol, 2003. **5**(7): p. 647-54.
23. Cardone, M.H., et al., *Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation*. Science, 1998. **282**(5392): p. 1318-21.
24. Hunter, A.M., E.C. LaCasse, and R.G. Korneluk, *The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets*. Apoptosis, 2007. **12**(9): p. 1543-68.
25. Deveraux, Q.L., et al., *X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases*. Nature, 1997. **388**(6639): p. 300-4.
26. Bratton, S.B., et al., *XIAP inhibition of caspase-3 preserves its association with the Apaf-1 apoptosome and prevents CD95- and Bax-induced apoptosis*. Cell Death Differ, 2002. **9**(9): p. 881-92.
27. Bao, Q., et al., *Calcium blocks formation of apoptosome by preventing nucleotide exchange in Apaf-1*. Mol Cell, 2007. **25**(2): p. 181-92.
28. Cain, K., et al., *Physiological concentrations of K⁺ inhibit cytochrome c-dependent formation of the apoptosome*. J Biol Chem, 2001. **276**(45): p. 41985-90.
29. Chandra, D., et al., *Intracellular nucleotides act as critical prosurvival factors by binding to cytochrome C and inhibiting apoptosome*. Cell, 2006. **125**(7): p. 1333-46.
30. Beere, H.M., et al., *Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(8): p. 469-75.
31. Saleh, A., et al., *Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(8): p. 476-83.

32. Kim, H.E., et al., *PHAPI, CAS, and Hsp70 promote apoptosome formation by preventing Apaf-1 aggregation and enhancing nucleotide exchange on Apaf-1*. Mol Cell, 2008. **30**(2): p. 239-47.
33. Pandey, P., et al., *Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90*. EMBO J, 2000. **19**(16): p. 4310-22.
34. Bruey, J.M., et al., *Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(9): p. 645-52.
35. Hu, Y., et al., *Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(8): p. 4386-91.
36. Newmeyer, D.D., et al., *Bcl-xL does not inhibit the function of Apaf-1*. Cell Death Differ, 2000. **7**(4): p. 402-7.
37. Yajima, H. and F. Suzuki, *Identification of a Bcl-XL binding region within the ATPase domain of Apaf-1*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **309**(3): p. 520-7.
38. Chau, B.N., et al., *Aven, a novel inhibitor of caspase activation, binds Bcl-xL and Apaf-1*. Mol Cell, 2000. **6**(1): p. 31-40.
39. Marsden, V.S., et al., *Apoptosis initiated by Bcl-2-regulated caspase activation independently of the cytochrome c/Apaf-1/caspase-9 apoptosome*. Nature, 2002. **419**(6907): p. 634-7.
40. Fearnhead, H.O., *Cell-free systems to study apoptosis*. Methods Cell Biol, 2001. **66**: p. 167-85.
41. Lademann, U., et al., *Diarylurea compounds inhibit caspase activation by preventing the formation of the active 700-kilodalton apoptosome complex*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(21): p. 7829-37.
42. Malet, G., et al., *Small molecule inhibitors of Apaf-1-related caspase-3/-9 activation that control mitochondrial-dependent apoptosis*. Cell Death Differ, 2006. **13**(9): p. 1523-32.
43. Mondragon, L., et al., *Modulation of cellular apoptosis with apoptotic protease-activating factor 1 (Apaf-1) inhibitors*. J Med Chem, 2008. **51**(3): p. 521-9.
44. Nguyen, J.T. and J.A. Wells, *Direct activation of the apoptosis machinery as a mechanism to target cancer cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(13): p. 7533-8.
45. Jiang, X., et al., *Distinctive roles of PHAP proteins and prothymosin-alpha in a death regulatory pathway*. Science, 2003. **299**(5604): p. 223-6.
46. Masip, I., et al., *Design and synthesis of an optimized positional scanning library of peptoids: identification of novel multidrug resistance reversal agents*. Bioorg Med Chem, 2005. **13**(6): p. 1923-9.

47. Masip, I., E. Perez-Paya, and A. Messeguer, *Peptoids as source of compounds eliciting antibacterial activity*. Comb Chem High Throughput Screen, 2005. **8**(3): p. 235-9.
48. Orzaez, M., et al., *Conjugation of a novel Apaf-1 inhibitor to peptide-based cell-membrane transporters: effective methods to improve inhibition of mitochondria-mediated apoptosis*. Peptides, 2007. **28**(5): p. 958-68.
49. Vicent, M.J. and E. Perez-Paya, *Poly-L-glutamic acid (PGA) aided inhibitors of apoptotic protease activating factor 1 (Apaf-1): an antiapoptotic polymeric nanomedicine*. J Med Chem, 2006. **49**(13): p. 3763-5.
50. Mondragon, L., et al., *A chemical inhibitor of Apaf-1 exerts mitochondrioprotective functions and interferes with the intra-S-phase DNA damage checkpoint*. Apoptosis, 2009. **14**(2): p. 182-90.
51. Mouhamad, S., et al., *Apaf-1 Deficiency Causes Chromosomal Instability*. Cell Cycle, 2007. **6**(24): p. 3103-3107.
52. Zermati, Y., et al., *Nonapoptotic role for Apaf-1 in the DNA damage checkpoint*. Mol Cell, 2007. **28**(4): p. 624-37.
53. Piddubnyak, V., et al., *Positive regulation of apoptosis by HCA66, a new Apaf-1 interacting protein, and its putative role in the physiopathology of NF1 microdeletion syndrome patients*. Cell Death Differ, 2007. **14**(6): p. 1222-33.
54. Ferraro, E., et al., *Apaf1 plays a pro-survival role by regulating centrosome morphology and function*. J Cell Sci, 2011. **124**(Pt 20): p. 3450-63.
55. Ahmad, S.T., et al., *Methylation of the APAF-1 and DAPK-1 promoter region correlates with progression of renal cell carcinoma in North Indian population*. Tumour Biol, 2012. **33**(2): p. 395-402.
56. Fadeel, B., A. Ottosson, and S. Pervaiz, *Big wheel keeps on turning: apoptosome regulation and its role in chemoresistance*. Cell Death Differ, 2008. **15**(3): p. 443-52.
57. Niedojadlo, K., et al., *Apaf-1 expression in human cutaneous melanoma progression and in pigmented nevi*. Pigment Cell Res, 2006. **19**(1): p. 43-50.
58. Cozzolino, M., et al., *Apaf1 mediates apoptosis and mitochondrial damage induced by mutant human SOD1s typical of familial amyotrophic lateral sclerosis*. Neurobiol Dis, 2006. **21**(1): p. 69-79.
59. Mochizuki, H., et al., *An AAV-derived Apaf-1 dominant negative inhibitor prevents MPTP toxicity as antiapoptotic gene therapy for Parkinson's disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(19): p. 10918-23.

60. Sang, T.K., et al., *Inactivation of Drosophila Apaf-1 related killer suppresses formation of polyglutamine aggregates and blocks polyglutamine pathogenesis*. Hum Mol Genet, 2005. **14**(3): p. 357-72.
61. Warrick, J.M., et al., *Suppression of polyglutamine-mediated neurodegeneration in Drosophila by the molecular chaperone HSP70*. Nat Genet, 1999. **23**(4): p. 425-8.
62. Guzhova, I.V., et al., *Novel mechanism of Hsp70 chaperone-mediated prevention of polyglutamine aggregates in a cellular model of huntington disease*. Hum Mol Genet, 2011. **20**(20): p. 3953-63.
63. Bauer, P.O. and N. Nukina, *The pathogenic mechanisms of polyglutamine diseases and current therapeutic strategies*. J Neurochem, 2009. **110**(6): p. 1737-65.
64. Conneally, P.M., *Huntington disease: genetics and epidemiology*. Am J Hum Genet, 1984. **36**(3): p. 506-26.
65. <http://www.hdsa.org>. Huntington's disease Society of America. 2012 [cited; Available from: <http://www.hdsa.org/>].
66. http://www.mdvu.org/library/disease/hd/hd_epi.asp. Movement Disorder Virtual University. 2012 [cited].
67. Walker, F.O., *Huntington's disease*. Lancet, 2007. **369**(9557): p. 218-28.
68. Cattaneo, E., C. Zuccato, and M. Tartari, *Normal huntingtin function: an alternative approach to Huntington's disease*. Nat Rev Neurosci, 2005. **6**(12): p. 919-30.
69. Ferrante, R.J., et al., *Therapeutic effects of coenzyme Q10 and remacemide in transgenic mouse models of Huntington's disease*. J Neurosci, 2002. **22**(5): p. 1592-9.
70. Koroshetz, W.J., et al., *Energy metabolism defects in Huntington's disease and effects of coenzyme Q10*. Ann Neurol, 1997. **41**(2): p. 160-5.
71. Imarisio, S., et al., *Huntington's disease: from pathology and genetics to potential therapies*. Biochem J, 2008. **412**(2): p. 191-209.
72. Rigamonti, D., et al., *Wild-type huntingtin protects from apoptosis upstream of caspase-3*. J Neurosci, 2000. **20**(10): p. 3705-13.
73. Rigamonti, D., et al., *Huntingtin's neuroprotective activity occurs via inhibition of procaspase-9 processing*. J Biol Chem, 2001. **276**(18): p. 14545-8.
74. Leavitt, B.R., et al., *Wild-type huntingtin protects neurons from excitotoxicity*. J Neurochem, 2006. **96**(4): p. 1121-9.
75. Zeron, M.M., et al., *Increased sensitivity to N-methyl-D-aspartate receptor-mediated excitotoxicity in a mouse model of Huntington's disease*. Neuron, 2002. **33**(6): p. 849-60.

76. Gunawardena, S., et al., *Disruption of axonal transport by loss of huntingtin or expression of pathogenic polyQ proteins in Drosophila*. *Neuron*, 2003. **40**(1): p. 25-40.
77. Smith, R., P. Brundin, and J.Y. Li, *Synaptic dysfunction in Huntington's disease: a new perspective*. *Cell Mol Life Sci*, 2005. **62**(17): p. 1901-12.
78. Zuccato, C., et al., *Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes*. *Nat Genet*, 2003. **35**(1): p. 76-83.
79. Rosenstock, T.R., et al., *FK506 ameliorates cell death features in Huntington's disease striatal cell models*. *Neurochem Int*, 2011. **59**(5): p. 600-9.
80. Li, S.H., et al., *Intranuclear huntingtin increases the expression of caspase-1 and induces apoptosis*. *Hum Mol Genet*, 2000. **9**(19): p. 2859-67.
81. Chow, W.N., et al., *Degradation of mutant huntingtin via ubiquitin-proteasome system is modulated by FE65*. *Biochem J*, 2012.
82. Wang, G.H., et al., *Caspase activation during apoptotic cell death induced by expanded polyglutamine in N2a cells*. *Neuroreport*, 1999. **10**(12): p. 2435-8.
83. Chen, M., et al., *Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease*. *Nat Med*, 2000. **6**(7): p. 797-801.
84. Sanchez, I., et al., *Caspase-8 is required for cell death induced by expanded polyglutamine repeats*. *Neuron*, 1999. **22**(3): p. 623-33.
85. Zhu, S., et al., *Necrostatin-1 ameliorates symptoms in R6/2 transgenic mouse model of Huntington's disease*. *Cell Death Dis*, 2011. **2**: p. e115.
86. Wellington, C.L., et al., *Inhibiting caspase cleavage of huntingtin reduces toxicity and aggregate formation in neuronal and nonneuronal cells*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(26): p. 19831-8.
87. Goldberg, Y.P., et al., *Cleavage of huntingtin by apopain, a proapoptotic cysteine protease, is modulated by the polyglutamine tract*. *Nat Genet*, 1996. **13**(4): p. 442-9.
88. Southwell, A.L., et al., *Perturbation with intrabodies reveals that calpain cleavage is required for degradation of huntingtin exon 1*. *PLoS One*, 2011. **6**(1): p. e16676.
89. Arnaud, L.T., N. Myeku, and M.E. Figueiredo-Pereira, *Proteasome-caspase-cathepsin sequence leading to tau pathology induced by prostaglandin J2 in neuronal cells*. *J Neurochem*, 2009. **110**(1): p. 328-42.

90. Wellington, C.L., et al., *Toward understanding the molecular pathology of Huntington's disease*. Brain Pathol, 1997. **7**(3): p. 979-1002.
91. Wellington, C.L., et al., *Caspase cleavage of gene products associated with triplet expansion disorders generates truncated fragments containing the polyglutamine tract*. J Biol Chem, 1998. **273**(15): p. 9158-67.
92. DeMartino, G.N. and C.A. Slaughter, *The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms*. J Biol Chem, 1999. **274**(32): p. 22123-6.
93. Jana, N.R., et al., *Altered proteasomal function due to the expression of polyglutamine-expanded truncated N-terminal huntingtin induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release*. Hum Mol Genet, 2001. **10**(10): p. 1049-59.
94. Bett, J.S., et al., *Proteasome impairment does not contribute to pathogenesis in R6/2 Huntington's disease mice: exclusion of proteasome activator REGgamma as a therapeutic target*. Hum Mol Genet, 2006. **15**(1): p. 33-44.
95. Huang, Q. and M.E. Figueiredo-Pereira, *Ubiquitin/proteasome pathway impairment in neurodegeneration: therapeutic implications*. Apoptosis, 2010. **15**(11): p. 1292-311.
96. Amaravadi, R., *Autophagy can contribute to cell death when combining targeted therapy*. Cancer Biol Ther, 2009. **8**(21): p. 130-3.
97. Singh, R. and A.M. Cuervo, *Autophagy in the cellular energetic balance*. Cell Metab, 2011. **13**(5): p. 495-504.
98. Hait, W.N., S. Jin, and J.M. Yang, *A matter of life or death (or both): understanding autophagy in cancer*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(7 Pt 1): p. 1961-5.
99. Sarkar, S. and D.C. Rubinsztein, *Huntington's disease: degradation of mutant huntingtin by autophagy*. FEBS J, 2008. **275**(17): p. 4263-70.
100. Ravikumar, B., R. Duden, and D.C. Rubinsztein, *Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(9): p. 1107-17.
101. Ravikumar, B., et al., *Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease*. Nat Genet, 2004. **36**(6): p. 585-95.
102. Sarkar, S., et al., *Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and alpha-synuclein*. J Biol Chem, 2007. **282**(8): p. 5641-52.

103. Ravikumar, B., et al., *Rab5 modulates aggregation and toxicity of mutant huntingtin through macroautophagy in cell and fly models of Huntington disease*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 10): p. 1649-60.
104. Cattaneo, E. and L. Conti, *Generation and characterization of embryonic striatal conditionally immortalized ST14A cells*. J Neurosci Res, 1998. **53**(2): p. 223-34.
105. Cattaneo, E. and R. McKay, *Identifying and manipulating neuronal stem cells*. Trends Neurosci, 1991. **14**(8): p. 338-40.
106. Trettel, F., et al., *Dominant phenotypes produced by the HD mutation in STHdh(Q111) striatal cells*. Hum Mol Genet, 2000. **9**(19): p. 2799-809.
107. Brand, A.H. and N. Perrimon, *Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes*. Development, 1993. **118**(2): p. 401-15.
108. Cauchi, R.J. and M. van den Heuvel, *The fly as a model for neurodegenerative diseases: is it worth the jump?* Neurodegener Dis, 2006. **3**(6): p. 338-56.
109. Mangiarini, L., 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): p. 493-506.
110. Wheeler, V.C., 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): p. 503-13.
111. Zhu, S., et al., *Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice*. Nature, 2002. **417**(6884): p. 74-8.
112. Abdulrahman, G.O., Jr., *Therapeutic advances in the management of Huntington's disease*. Yale J Biol Med, 2011. **84**(3): p. 311-9.
113. Wang, X., et al., *Minocycline inhibits caspase-independent and -dependent mitochondrial cell death pathways in models of Huntington's disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(18): p. 10483-7.
114. Wang, X., et al., *Inhibitors of cytochrome c release with therapeutic potential for Huntington's disease*. J Neurosci, 2008. **28**(38): p. 9473-85.
115. Laurence L. Brunton, P., ed. *Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics*. eleventh edition ed. 2006, McGraw-Hill. 2021.

116. Gibrat, C. and F. Cicchetti, *Potential of cystamine and cysteamine in the treatment of neurodegenerative diseases*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2011. **35**(2): p. 380-9.
117. Tikka, T., et al., *Minocycline, a tetracycline derivative, is neuroprotective against excitotoxicity by inhibiting activation and proliferation of microglia*. J Neurosci, 2001. **21**(8): p. 2580-8.
118. Seidl, S.E. and J.A. Potashkin, *The promise of neuroprotective agents in Parkinson's disease*. Front Neurol, 2011. **2**: p. 68.
119. Tang, C.M., et al., *Neuroprotective mechanisms of minocycline against sphingomyelinase/ceramide toxicity: Roles of Bcl-2 and thioredoxin*. Free Radic Biol Med, 2011. **50**(6): p. 710-21.
120. Boatright, K.M., et al., *A unified model for apical caspase activation*. Mol Cell, 2003. **11**(2): p. 529-41.
121. Meyer, B. and T. Peters, *NMR spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors*. Angew Chem Int Ed Engl, 2003. **42**(8): p. 864-90.
122. Dalvit, C., et al., *Identification of compounds with binding affinity to proteins via magnetization transfer from bulk water*. J Biomol NMR, 2000. **18**(1): p. 65-8.
123. Purring-Koch, C. and G. McLendon, *Cytochrome c binding to Apaf-1: the effects of dATP and ionic strength*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(22): p. 11928-31.
124. van Maanen, J.M., et al., *Mechanism of action of antitumor drug etoposide: a review*. J Natl Cancer Inst, 1988. **80**(19): p. 1526-33.
125. Wang, J., et al., *Minocycline up-regulates Bcl-2 and protects against cell death in mitochondria*. J Biol Chem, 2004. **279**(19): p. 19948-54.
126. Hermel, E., et al., *Specific caspase interactions and amplification are involved in selective neuronal vulnerability in Huntington's disease*. Cell Death Differ, 2004. **11**(4): p. 424-38.
127. Suhr, S.T., et al., *Identities of sequestered proteins in aggregates from cells with induced polyglutamine expression*. J Cell Biol, 2001. **153**(2): p. 283-94.
128. Wytenbach, A., et al., *Effects of heat shock, heat shock protein 40 (HDJ-2), and proteasome inhibition on protein aggregation in cellular models of Huntington's disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(6): p. 2898-903.
129. Hazeki, N. and I. Kanazawa, *Solubilization of aggregates formed by expanded polyglutamine tract expression in cultured cells*. Methods Mol Biol, 2004. **277**: p. 129-37.

130. Manders E.M.M, V.F.J., *Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images*. Journal of Microscopy, 1993. **169**(3): p. 375-382.
131. Cheung, Z.H. and N.Y. Ip, *Autophagy deregulation in neurodegenerative diseases - recent advances and future perspectives*. J Neurochem, 2011. **118**(3): p. 317-25.
132. Orr, H.T. and H.Y. Zoghbi, *Trinucleotide repeat disorders*. Annu Rev Neurosci, 2007. **30**: p. 575-621.
133. Ross, C.A. and M.A. Poirier, *Protein aggregation and neurodegenerative disease*. Nat Med, 2004. **10 Suppl**: p. S10-7.
134. Wellington, C.L., et al., *Caspase cleavage of mutant huntingtin precedes neurodegeneration in Huntington's disease*. J Neurosci, 2002. **22**(18): p. 7862-72.
135. Xu, C. and J. Min, *Structure and function of WD40 domain proteins*. Protein Cell, 2011. **2**(3): p. 202-14.
136. Griffin, E.E., J. Graumann, and D.C. Chan, *The WD40 protein Caf4p is a component of the mitochondrial fission machinery and recruits Dnm1p to mitochondria*. J Cell Biol, 2005. **170**(2): p. 237-48.
137. Choi, Y., et al., *Minocycline attenuates neuronal cell death and improves cognitive impairment in Alzheimer's disease models*. Neuropsychopharmacology, 2007. **32**(11): p. 2393-404.
138. Faust, K., et al., *Neuroprotective effects of compounds with antioxidant and anti-inflammatory properties in a Drosophila model of Parkinson's disease*. BMC Neurosci, 2009. **10**: p. 109.
139. Castanares, M., et al., *Minocycline up-regulates BCL-2 levels in mitochondria and attenuates male germ cell apoptosis*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **337**(2): p. 663-9.
140. Bahrami, F., D.L. Morris, and M.H. Pourgholami, *Tetracyclines: drugs with huge therapeutic potential*. Mini Rev Med Chem, 2012. **12**(1): p. 44-52.
141. Van Uem, T.J., H.G. Swarts, and J.J. De Pont, *Determination of the epitope for the inhibitory monoclonal antibody 5-B6 on the catalytic subunit of gastric Mg(2+)-dependent H(+)-transporting and K(+)-stimulated ATPase*. Biochem J, 1991. **280 (Pt 1)**: p. 243-8.
142. Sun, A., X.V. Nguyen, and G. Bing, *Comparative analysis of an improved thioflavin-s stain, Gallyas silver stain, and immunohistochemistry for neurofibrillary tangle demonstration on the same sections*. J Histochem Cytochem, 2002. **50**(4): p. 463-72.
143. Meriin, A.B. and M.Y. Sherman, *Role of molecular chaperones in neurodegenerative disorders*. Int J Hyperthermia, 2005. **21**(5): p. 403-19.

144. Sakahira, H., et al., *Molecular chaperones as modulators of polyglutamine protein aggregation and toxicity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99 Suppl 4**: p. 16412-8.
145. Chafekar, S.M., et al., *Pharmacological tuning of heat shock protein 70 modulates polyglutamine toxicity and aggregation*. ACS Chem Biol, 2012. **7(9)**: p. 1556-64.
146. Lievens, J.C., et al., *AKT-sensitive or insensitive pathways of toxicity in glial cells and neurons in Drosophila models of Huntington's disease*. Hum Mol Genet, 2008. **17(6)**: p. 882-94.
147. Du, B., et al., *Minocycline attenuates ototoxicity and enhances antitumor activity of cisplatin treatment in vitro*. Otolaryngol Head Neck Surg, 2011. **144(5)**: p. 719-25.
148. Liu, W.T., et al., *Minocycline inhibits the growth of glioma by inducing autophagy*. Autophagy, 2011. **7(2)**: p. 166-75.
149. Colin, J., et al., *Mitochondria, Bcl-2 family proteins and apoptosomes: of worms, flies and men*. Front Biosci, 2009. **14**: p. 4127-37.
150. Hetz, C., et al., *Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1alpha*. Science, 2006. **312(5773)**: p. 572-6.
151. Li, J., B. Lee, and A.S. Lee, *Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) and NOXA by p53*. J Biol Chem, 2006. **281(11)**: p. 7260-70.
152. Zong, W.X., et al., *Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis*. J Cell Biol, 2003. **162(1)**: p. 59-69.
153. Jiang, Y., et al., *GRP78 counteracts cell death and protein aggregation caused by mutant huntingtin proteins*. Neurosci Lett, 2012. **516(2)**: p. 182-7.
154. Zou, H., et al., *An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9*. J Biol Chem, 1999. **274(17)**: p. 11549-56.

ANEXO

