

Una teràpia possible per a la malaltia de Huntington

Desregulació de l'activitat mTOR al nucli estriat en la malaltia de Huntington



La malaltia de Huntington, antigament coneguda per mal de Sant Vito, és un procés neurodegeneratiu que cursa amb disfuncions cognitives i motores. És una malaltia genètica causada per una mutació del gen de la huntingtina, que provoca que la proteïna resultant tingui alterades les seves funcions. Sabem que la huntingtina mutada afecta principalment un tipus neuronal determinat, les neurones de projecció estriatals, però els mecanismes moleculars concrets que participen en aquesta degeneració selectiva encara no es coneixen. Al nostre laboratori hem observat que una via de supervivència cel·lular (la via de senyalització mTOR/Akt) hi podria participar en retardar la mort cel·lular que s'observa en la malaltia de Huntington. Per tant, si aconseguíssim activar la via, podríem proposar una estratègia terapèutica.

Escrit per

Jordi Creus

Departament de Biologia Cel·lular, Immunologia i Neurociències, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona

Premi Gemma Rossell i Romero 2012

La malaltia de Huntington (de l'anglès *Huntington's disease*, HD) és una malaltia neurodegenerativa fatal descrita per primera vegada per George Huntington l'any 1872, tot i que no es va identificar la mutació concreta que causava la malaltia fins al 1993. Així doncs, és una malaltia de causa genètica amb un patró d'herència autosòmic dominant. Això significa que, si el teu pare o la teva mare tenen la malaltia, tu tens el 50% de possibilitats de patir-la, ja que, amb la mutació d'un dels dos al·lels, la malaltia ja es manifesta.

És causada per una mutació localitzada en una zona de repeticions CAG (citosina-adenina-guanina) en l'exó 1 del gen de la huntingtina, que es troba situat al cromosoma 4. Individus afectats per la HD presenten més de 35 repeticions d'aquest codó en el gen de la huntingtina. L'expansió de triplets té una llargada variable entre els individus afectats. Se sap que, com més repeticions del triplet CAG presenta un afectat, més aviat començarà a presentar la simptomatologia, però normalment es manifesta al voltant dels quaranta anys. Tot i això, hi ha una variant que s'anomena *malaltia de Huntington juvenil*,

en la qual els afectats presenten un nombre molt elevat de repeticions, i, per tant, la malaltia apareix durant l'adolescència o fins i tot en la infància.

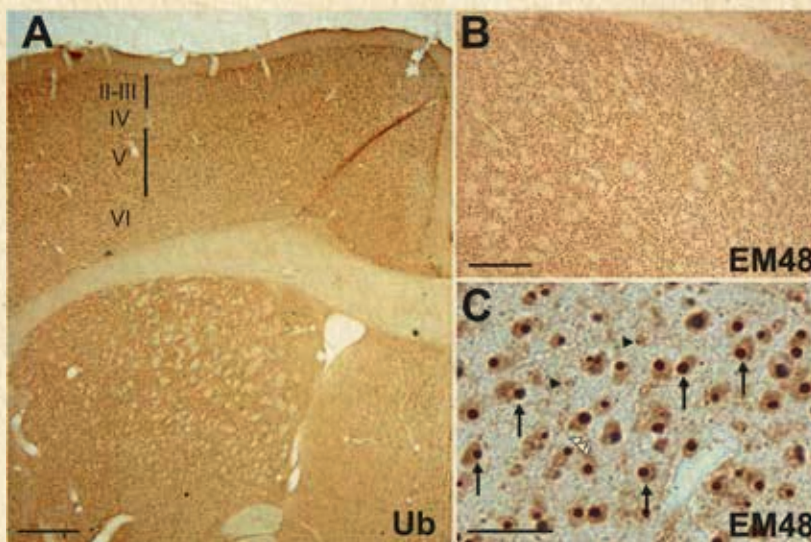
Aquest triplet de nucleòtids codifica l'aminoàcid glutamina; per tant, la proteïna resultant del gen de la huntingtina mutat tindrà una estructura anormal amb una cua de glutamines, que pot ser proteolitzada per proteases i donar lloc a un fragment tòxic que tendeix a agregar-se. Aquests agregats de huntingtina es localitzen tant al nucli com al citoplasma de les neurones i són una característica neuropatològica de la malaltia (vegeu la [figura 1](#)). Tot i que la huntingtina s'expressa en tot l'organisme, les neurones afectades principalment són les neurones gabaèrgiques de projecció del nucli estriat, les quals envien senyals al globus pàl·lid extern o a la substància negra *pars reticulata*; però també es troben afectades altres àrees cerebrals com ara el còrtex i l'hipocamp.

El nucli estriat, format pel nucli caudat i pel putamen, és una part subcortical de l'encèfal, que forma part dels ganglis basals. La seva funció principal és el control del moviment vo-

luntari, però també participa en processos cognitius. En ser aquestes les neurones més afectades, les manifestacions clíniques de la malaltia són principalment la hipercinèsia, o sigui, excés de moviment involuntari a les extremitats, al tronc i a la cara, però en fases molt avançades veiem hipocinèsia i els pacients normalment acaben morint per complicacions respiratòries. Prèviament a l'aparició de les alteracions motores, s'observen dèficits cognitius, sobretot en la memòria de treball i en les funcions executives, com també alguns trastorns psiquiàtrics. Tot i això, els mecanismes moleculars concrets que explicarien aquesta mort neuronal selectiva encara no han estat clarificats.

S'ha trobat *in vitro* que la huntingtina mutada és tòxica per a les neurones, ja que les que sobreexpressen la proteïna mutada presenten apoptosi, és a dir, es moren. A més, en pacients

Els models animals per estudiar la HD són ratolins modificats genèticament. En el nostre estudi hem utilitzat els ratolins R6/1, els quals sobreexpressen l'exó 1 de la huntingtina humana amb un nombre molt elevat de triplets CAG. Això fa que presentin molts dels trets característics de la HD, com són: presència d'agregats de huntingtina mutada, dèficits cognitius i posteriorment alteracions motores. No és l'únic model animal del qual disposem actualment, però sí que és un dels més utilitzats. Hi ha models que expressen tot el gen de la huntingtina humana, anomenats *full-length*, i d'altres anomenats *knock-in*, que expressen el mateix gen de la huntingtina murina en el qual s'ha inserit l'expansió de triplets CAG. Es distingeixen entre ells, sobretot, per la gravetat de la malaltia i per la cronologia de l'aparició de la diferent simptomatologia. Cal dir que cap d'aquests animals no presenta mort neuronal.



◀ **Figura 1.**
Agregats típics de la malaltia de Huntington que es veuen tant al citosol com al nucli de les neurones.

d'aquesta malaltia s'ha observat una disminució del volum cerebral, deguda tant a l'atròfia com a la mort neuronal. En encèfals de malalts de HD analitzats *post mortem* s'hi observa que el nucli caudat és gairebé inexistent i es conserva poca part del putamen. En total, hi ha una pèrdua del 30% del volum cerebral.

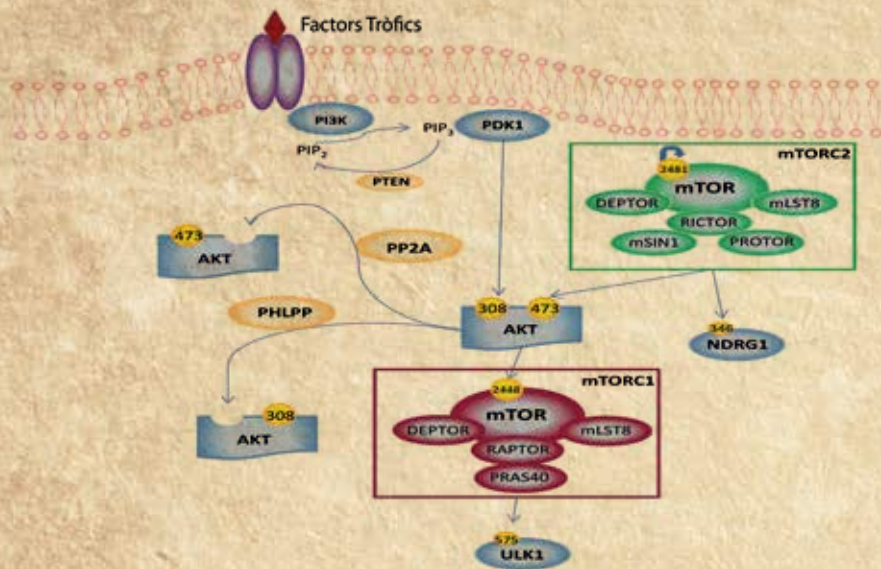
Models animals

Per poder estudiar els mecanismes que estan relacionats amb la HD i valorar possibles dianes terapèutiques que evitarien la mort de les neurones, s'han elaborat diferents models animals. No és possible estudiar els canvis cel·lulars que tenen lloc durant la progressió de la malaltia en els humans, ja que no és possible obtenir mostres per biòpsia dels cervells dels pacients afectats.

Alteracions moleculars

Tal com s'ha dit, el mecanisme concret pel qual s'explica la mort neuronal selectiva no es coneix amb claredat, però s'han proposat diversos mecanismes que la podrien explicar. La desregulació transcripcional, la manca de factors tròfics, l'estrès oxidatiu, la disfunció mitocondrial i l'excitotoxicitat són els principals. Les cèl·lules responen a estímuls tan intrínsecs, com podria ser l'expressió d'una proteïna mutada, com extrínsecs, com podrien ser factors de creixement o bé neurotransmissors. La cèl·lula respon a ambdós tipus d'estímuls per mitjà de cascades de senyalització que es produeixen en el seu interior. Les proteïnes són els principals membres participants d'aquestes cascades de senyalització, que es desenvolupen mitjançant la interacció entre





Moltes vegades, els canvis en els nivells d'aquestes proteïnes són mecanismes d'adaptació de la cèl·lula. A grans trets, el que veiem en la HD és que les fosfatases tenen reduïts els seus nivells i disminuïda la seva activitat, cosa que sembla un mecanisme compensatori induït en resposta a l'expressió de la huntingtina mutada per prevenir la mort neuronal. La disminució de les fosfatases provoca que les proteïnes que regulen es mantinguin fosforilades i, en la major part dels casos, actives. Un cas evident és el de la proteïna Akt, que desenvoluparem més endavant.

Apoptosi cel·lular

Un dels mecanismes pels quals s'explica la mort selectiva de les neurones és la inducció de l'apoptosi o mort cel·lular programada. En una cèl·lula normal hi ha d'haver equilibri entre els senyals proapoptòtics i els antiapoptòtics. Cal dir que l'apoptosi no sempre està relacionada amb una patologia; per exemple, durant el desenvolupament, l'apoptosi és imprescindible. A més, és clau per al recanvi cel·lular i per a la renovació de teixits. Tal com sabem, el sistema nerviós no es caracteritza per una renovació cel·lular evident; per això, l'apoptosi en el sistema nerviós central sí que sol estar relacionada amb processos patològics, sobretot quan ja s'ha dut a terme el desenvolupament. Hi ha diverses vies de senyalització antiapoptòtiques, però una de les més importants és la via de la PI3K/Akt, que, quan s'activa, evita que les cèl·lules morin. En models experimentals de HD s'observa que les neurones estriatals presenten una sobreactivació d'aquesta via, intentant frenar la mort neuronal.

El nostre treball

Nosaltres hem centrat el nostre estudi en la regulació de la via de supervivència de la PI3K/Akt. La fosforilació de la proteïna Akt en la serina 473 (pAkt) en regula l'activitat. Alhora, l'Akt regula la supervivència cel·lular a través de la fosforilació i, en aquest cas, la consegüent inactivació de diverses proteïnes que indueixen l'apoptosi. Curiosament, els nivells de pAkt es troben incrementats en el nucli estriat del nostre model murí (R6/1); per tant, activen la proteïna. El fet que els nivells de pAkt siguin més elevats que en cèl·lules que expressen la huntingtina normal provoca que moltes de les proteïnes que són fosforilades per la Akt, en aquest cas, disminueixin la seva funció i evitin, així, que les neurones morin. Una de les explicacions del motiu pel qual està incrementada la pAkt és per la disminució d'una fosfatasa anomenada PHLPP.

▲ **Figura 2.** Alteració de la via de senyalització mTOR/Akt en el nucli estriat de la malaltia de Huntington en ratolí salvatge.

proteïnes i també per la regulació dinàmica d'aquestes. Les proteïnes poden ser regulades per fosforilació, o sigui, per la incorporació d'un grup fosfat en algun dels seus aminoàcids, a través de les proteïnes-cinases, i per desfosforilació, o sigui, per l'eliminació d'un grup fosfat, a través de les fosfatases. La transmissió d'aquest grup fosfat fa de senyal entre diferents proteïnes.

Sabem que en la HD hi ha una desregulació de les cinases i de les fosfatases en les neurones principalment afectades (vegeu figura 2,3). Això és realment rellevant, ja que la huntingtina s'expressa en tot l'organisme, però només veiem afectat un tipus cel·lular concret. Així doncs, aquesta desregulació dels nivells de cinases i de fosfatases en aquestes neurones seria una de les possibles explicacions de la mort neuronal selectiva.

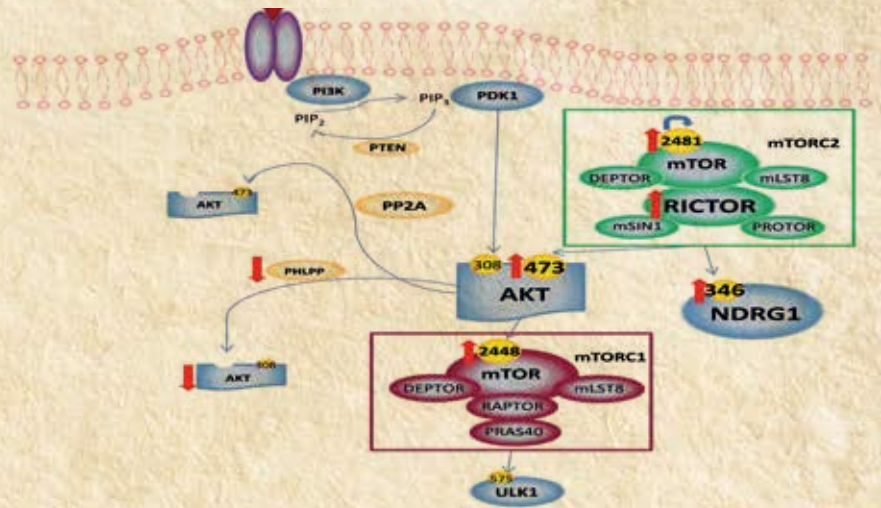
La relació més directa que hi ha entre les cinases i la mateixa huntingtina mutada és que, quan aquesta darrera es fosforila, la seva toxicitat es veu reduïda. Aquest fet va portar que s'estudiessin a fons les possibles alteracions de les cinases i de les fosfatases en les neurones afectades que podrien participar en la fosforilació de la huntingtina. A més, però, aquestes proteïnes no solament regulen la toxicitat de la huntingtina, sinó que també estan relacionades amb la regulació de senyals intracel·lulars de vies de supervivència generals.

► **Figura 3.** Desregulació de la via de senyalització mTOR/Akt en el nucli estriat d'un cervell amb la malaltia de Huntington.

Amb experiments complementaris es va evidenciar que amb la simple disminució de la fosfatasa no es podia explicar tal increment de pAkt, sinó que hi faltava algun altre mecanisme que hi contribuís. Recentment s'ha descobert que la mTOR és la cinasa que fosforila la Akt, entre moltes altres proteïnes. Així doncs, el nostre estudi s'ha basat a analitzar la regulació de l'activitat d'aquesta cinasa al nucli estriat del ratolí R6/1 al llarg de la progressió de la malaltia.

La proposta terapèutica

Els nostres resultats suggereixen que hi ha una sobreactivació de la cinasa mTOR, concretament quan s'uneix a una altra proteïna anomenada *riCTOR*, i forma el complex mTORC2. Pel fet que aquest complex regula sobretot la supervivència cel·lular, considerem rellevant l'estudi acurat de la regulació d'aquesta via per evadir la mort cel·lular observada en la HD. Sabem que en els ratolins R6/1 no hi ha mort cel·lular a diferència dels humans; per tant, la sobreactivació d'aquesta via pot ser un dels mecanismes que expliquen l'absència de la mort neuronal en els models murins. Sabem que en estadis inicials de la malaltia en humans no hi ha mort pel fet que possiblement aquestes vies estan activades; però, en fases avançades, els senyals nocius produïts principalment per la huntingtina mutada acaben induint la mort neuronal. Per tant, mantenir aquesta via activada en tota la progressió de la malaltia seria un mecanisme terapèutic a tenir en compte. |



Referències bibliogràfiques

- ALBERCH, J. [et al.] (2008). «Huntington's disease: animal models». *New Encyclopedia of Neurosciences*, vol. 11.
- KREMER, B. [et al.] (1994). «A worldwide study of the Huntington's disease mutation. The sensitivity and specificity of measuring CAG repeats». *N. Engl. J. Med.*, vol. 330, p. 1401-1406.
- PÉREZ-NAVARRO, E. [et al.] (2006). «Cellular and molecular mechanisms involved in the selective vulnerability of striatal projection neurons in Huntington's disease». *Histol Histopathol*, vol. 21, p. 1217-1232.
- SAAVEDRA, A. [et al.] (2010). «PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase 1 contributes to maintain the activation of the PI3K/Akt pro-survival pathway in Huntington's disease striatum». *Cell Death Differ*, vol. 17, p. 324-335.
- SAAVEDRA, A. [et al.] (2012). «Don't take away my P: phosphatases as therapeutic targets in Huntington's disease». *Huntington's Disease - Core Concepts and Current Advances*, Tunali NE (Ed), p. 465-494.
- SARBASSOV, D. D. [et al.] (2004). «Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton». *Curr Biol*, vol. 14, p. 1296-1302.
- SARBASSOV, D. D. [et al.] (2005). «Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex». *Science*, vol. 307, p. 1098-1101.
- WELLINGTON, C. L. [et al.] (2002). «Caspase cleavage of mutant huntingtin precedes neurodegeneration in Huntington's disease». *J Neurosci*, vol. 22, p. 7862-7872.
- ZONCU, R. [et al.] (2011). «mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing». *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 12, p. 21-35.

Jordi Creus Muncunill

(Olot, 1991)



És estudiant de ciències biomèdiques a la Universitat de Barcelona. Darreurement ha estat treballant al Departament de Biologia Cel·lular, Immunologia i Neurociències de la Universitat de Barcelona, en un projecte de recerca relacionat amb l'estudi de mecanismes moleculars implicats en la degeneració neuronal que es produeix en la malaltia de Huntington, dirigit per Esther Pérez-Navarro i en col·laboració amb l'estudiant de doctorat Laura Rué. En concret, ha participat en l'estudi presentat en aquesta memòria, el qual encara està per finalitzar, i en l'estudi de la regulació de la cinasa proapoptòtica PKCδ en models animals i cel·lulars de la malaltia de Huntington.