



Universitat de Lleida

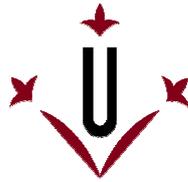
ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE LA VÍA NF-kappaB EN LAS MOTONEURONAS ESPINALES Y SU RELACIÓN CON LA ATROFIA MUSCULAR ESPINAL

Stefka Mincheva Tasheva

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Universitat de Lleida

Departament de Ciències
Mèdiques Bàsiques



Institut de Recerca
Biomèdica de Lleida

**ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE LA VÍA
NF-kappaB EN LAS MOTONEURONAS
ESPINALES Y SU RELACIÓN CON LA
ATROFIA MUSCULAR ESPINAL**

Tesis presentada por:
Stefka Mincheva Tasheva

Tesis dirigida por:
Dra. Rosa M Soler i Tatché

Lleida, 2011

*На баща ми
На майка ми
На Атанаси*

А Ariel

*Благодаря за упората която ми давате
Gracias por vuestro apoyo*

RESUMEN

RESUMEN

Las motoneuronas espinales requieren de los factores neurotróficos para su supervivencia y diferenciación. El efecto fisiológico de los factores neurotróficos está mediado por la activación de distintas vías de señalización y factores de transcripción entre los cuales está la vía NF- κ B. La desregulación en la activación de esta vía se ha relacionado con distintas patologías neuronales. Se ha propuesto a NF- κ B como una diana terapéutica en distintas enfermedades neurodegenerativas. En el presente estudio hemos analizado los mecanismos intracelulares involucrados en la activación de la vía NF- κ B y su implicación en la supervivencia de las motoneuronas inducida por los factores neurotróficos. Nuestros resultados demuestran la habilidad de los factores neurotróficos de fosforilar el complejo IKKs a través de la activación de la vía PI3-K/Akt y de inducir la translocación nuclear de RelA. Por otro lado, se ha demostrado que únicamente la activación de la vía canónica de NF- κ B tiene un efecto regulador sobre la supervivencia de las motoneuronas. El bloqueo de esta vía induce muerte celular apoptótica. Las motoneuronas que van a degenerar por la inhibición de la vía NF- κ B, se pueden rescatar mediante la sobre-expresión de la proteína Bcl-x_L o mediante la inhibición de la proteína Bax. Sin embargo, los factores neurotróficos también activan la vía no-canónica de NF- κ B aunque sin implicación en la supervivencia. En las motoneuronas, la inhibición de la vía canónica conlleva el aumento de los niveles endógenos de la proteína pro-apoptótica Bim y la reducción de la proteína *Survival Motor Neuron* (SMN) y del factor de transcripción CREB. La reducción de los niveles de proteína SMN causa la enfermedad neurodegenerativa hereditaria Atrofia Muscular Espinal (AME), que afecta específicamente a las motoneuronas de la médula espinal. En nuestro laboratorio hemos desarrollado un modelo *in vitro* de AME. La disminución de los niveles de SMN causa la degeneración de las neuritas y la muerte de las motoneuronas. Estos dos procesos pueden ser bloqueados por sobre-expresión de la proteína Bcl-x_L. En conclusión, nuestro trabajo demuestra la implicación de la vía NF- κ B en la supervivencia de las motoneuronas y aporta nuevos avances para la comprensión de la AME.

ABSTRACT

The Spinal cord motoneurons require neurotrophic factors for their survival and differentiation. The physiological effect of neurotrophic factors is mediated by activation of different signaling pathways and transcription factors including NF- κ B. Deregulation in the activation of this pathway has been associated with different neural pathologies. NF- κ B has been proposed as a therapeutic target in several neurodegenerative diseases. In this study we analyze the intracellular mechanisms involved in the activation of NF- κ B pathway and its involvement in motor neuron survival induced by neurotrophic factors. Our results demonstrate the ability of neurotrophic factors to phosphorylate the IKKs complex through the PI3-K/Akt pathway activation and induce a nuclear translocation of RelA. On the other hand, it has been analysed the involvement of different forms of NF- κ B activation pathway on motoneuron survival and the results demonstrate that only the canonical pathway has regulatory effects on the motoneuron survival. The blockade of this pathway induces apoptotic cell death. Motoneurons that will degenerate by inhibition of NF- κ B, can be rescued by overexpression of Bcl-x_L protein or by inhibiting Bax protein expression. However, neurotrophic factors also activate non-canonical pathway of NF- κ B but this pathway does not modulate motoneuron survival. In motoneurons, inhibition of the canonical pathway leads to increased levels of the endogenous pro-apoptotic protein Bim and reduction of the Survival Motor Neuron Protein (SMN) and the transcription factor CREB.

Reduced levels of SMN protein cause the hereditary neurodegenerative disease Spinal Muscular Atrophy (SMA), which specifically affects spinal cord motorneurons. In our laboratory, we developed an *in vitro* model of SMA. The decreased levels of SMN cause neurite degeneration and motorneuron death. These two processes can be blocked by overexpression of Bcl-x_L protein.

In conclusion, our study shows the involvement of NF- κ B in the survival of motor neurons and provides new advances in the understanding of the SMA pathology.

RESUM

Les motoneurons espinals requereixen factors neurotròfics per a la seva supervivència i diferenciació. L'efecte fisiològic dels factors neurotròfics és mediat per l'activació de diferents vies de senyalització i factors de transcripció entre els quals es troba la via NF- κ B. S'ha relacionat la desregulació de l'activació d'aquesta via amb diferents patologies neuronals. S'ha proposat NF- κ B com a diana terapèutica en diferents malalties neurodegeneratives. En el present estudi hem analitzat els mecanismes intracel·lulars involucrats en l'activació de la via NF- κ B i la seva implicació en la supervivència de les motoneurons induïda pels factors neurotròfics. Els nostres resultats demostren l'habilitat dels factors neurotròfics de fosforil·lar el complex IKKs a través de l'activació de la via PI3K/Akt i d'induir la translocació nuclear de RelA. Per altra banda, s'ha demostrat que únicament l'activació de la via canònica d'NF- κ B té un efecte regulador sobre la supervivència de les motoneurons. El bloqueig de la via canònica causa mort apoptòtica. Aquelles motoneurons que degeneren al inhibir la via es poden rescatar mitjançant la sobre-expressió de la proteïna Bcl- x_L o bé inhibint la proteïna Bax. No obstant, els factors neurotròfics també activen la via no canònica d'NF- κ B tot i que sense implicació en la supervivència. A les motoneurons, la inhibició de la via canònica comporta un augment de la proteïna pro-apoptòtica Bim, la disminució de la proteïna *Survival Motor Neuron* (SMN) i del factor de transcripció CREB. La reducció dels nivells de proteïna SMN causa la malaltia neurodegenerativa hereditària Atròfia Muscular Espinal (AME), que afecta específicament a les motoneurons espinals.

En el nostre laboratori hem desenvolupat un model *in vitro* d'AME. La reducció dels nivells d'SMN causa degeneració neurítica i mort de les motoneurons. Aquests dos processos es poden bloquejar amb la sobre-expressió de la proteïna Bcl- x_L . En conclusió, el nostre treball demostra la implicació de la via NF- κ B en la supervivència de les motoneurons i aporta nous avenços per a comprendre l'AME.

РЕЗЮМЕ

Гръбначно-мозъчните моторни неврони изискват невротрофични фактори за своето развитие. Физиологичният ефект на тези молекули се изразява чрез активиране на различни сигнални пътища и транскрипционни фактори, сред които се намира и NF- κ B. Десрегулация в активността на този сигнален път е свързана с невро-патологични аномалии, което прави NF- κ B терапевтична мишена. В настоящето проучване се анализират вътреклетъчните механизми, свързани с активирането на NF- κ B и неговото участие в жизнените процеси на моторните неврон. Нашите резултати показваха способността на невротрофичните фактори да фосфорилират комплекса IKKs чрез активиране на сигналния път PI3-K/Akt, водещо до ядренна транслокация на RelA. От друга страна, анализът на различни форми на активиране на NF- κ B показва, че само каноничният път има регулаторен ефект върху оцеляването на моторните неврони. Блокирането на този път, води до апоптична клетъчна смърт на моторните неврони, която беше предотвратена чрез свръх-експресия на протеина Bcl-x_L както и чрез инхибиране на протеина Bax. В същото време, бе наблюдавано активиране на не-каноничния път на NF- κ B в отговор на стимулация с невротрофични фактори, въпреки че ефект върху жизнеността на моторните неврони, след блокирането му, не бе наблюдаван. Инхибирането на каноничния път на активиране на NF- κ B, води до повишение на ендогенните нивата на про-апоптичния протеин Bim и редукция в експресията на транскрипционния фактор CREB, както и на протеина отговорен за оцеляването на моторните неврони SMN. Редукция в нивата на SMN е свързана с развитието на наследственото невро-дегенеративно заболяване *Спинална Мускулна Атрофия* (СМА). СМА засяга избирателно моторните неврони от гръбначния мозък. В нашата лаборатория, разработихме един модел *in vitro* на СМА, чрез който доказахме дегенерация на аксона и дендритите водещо до клетъчна смърт на моторните неврони предизвикани от намалението в нивата на SMN. Тези два процеса бяха блокирани от свръх-експресията на протеина Bcl-X_L.

В заключение, нашето изследване показва значението на NF- κ B в оцеляването на моторните неврони и предоставя нов напредък в разбирането на механизмите предизвикващи патологията на СМА.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi directora Rosa M Soler i Tatché (la Jefa) por darme la oportunidad de hacer mi doctorado en su grupo y poder trabajar en el campo de la neurociencia y de NF-kappaB. Gracias Jefa por todo lo que hiciste por mí durante estos cuatro años y medio. Gracias por el apoyo y la ayuda que me diste en la “lucha” con: los papeles, extranjería, la homologación del título, la escritura de mi artículo y la tesis y por enseñarme que una tortuga y una tortura no son lo mismo. ¡Gracias por todo!

A l’Agencia de Gestió d’Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR) por la beca concedida que me ha permitido realizar la tesis.

A nuestro *pequeño-grande* grupo: “Las chicas de Rosa”, Ana Garcerá, Myriam Gou-Fabregas.

A Ana (*Anichka*), gracias por todo lo que me enseñaste estos años, por tu disposición de ayudar en cada momento, por tus consejos llenos de madurez y optimismo, por ser una gran compañera y amiga durante todo este tiempo. Gracias por corregirme todos los errores gramaticales en esta tesis, que la verdad no lo tenías nada fácil por lo cual mil gracias por todo el esfuerzo de tu parte.

A Myriam (*Dobriancho*), gracias por todo lo que me diste, por tu amistad, por haber sido mi hermana, madre, amiga, fisioterapeuta y profesora estos años, por tu sinceridad, por tu paciencia y conciencia, por animarme y ayudarme, por todo lo que hemos compartido durante este tiempo. Gracias por hacerme recordar mi tierra cada vez cuando me decías “*Dobriano, Dobrianke moia gul-fidanke*” y “*Shishe*”.

A todo el grupo de Bioquímica: M. José, M. Alba, Armando, Élia, Rosa, Jordi, Isu, Verónica, Gemma, gracias por hacerme sentir desde el primer día de mi doctorado, como en casa. A los jefes Kim, Elisa y Jordi, gracias por todo lo que hacéis por nosotros por vuestra buena disposición a ayudar, enseñar y cuidar. A Maria José (Josefina) por tu amistad, buen humor y optimismo, por las charlas de trabajo y fuera de ello, por tu flexibilidad y sobre todo por ayudarme tan amablemente con el diseño de la tapa. A M. Albe, gracias por todos los consejos sobre las comisiones, papeles, así como por tu optimismo y tranquilidad con lo que llenas el laboratorio. A Vero por tu amistad y alegría y por seguir siendo parte de este grupo. A don Armando por tu alegría y buen humor. A la “pequeña” Élie por tu disponibilidad de organizar celebraciones y despedidas. A Gemma por tu optimismo y tranquilidad, que admiro. A “mi cuñada”- Claudia, por tu alegría, amistad y buen humor.

A Petya (Петруски) gracias por tu amistad, por todo lo que hemos compartido estos años como amigas, colegas y compañeras de piso. Gracias por tu ayuda para encontrarme con mi directora de tesis y por no dudar en ayudarme siempre, desde el primer día que pisé el territorio de Lleida Pirineus.

A Rosa Gómez y Berta por el soporte técnico y vuestra disposición para ayudar.

A Xavi y Mario, gracias por los plásmidos lentivirales y los consejos profesionales.

A Joaquim por las charlas en inglés científicas y no científicas.

A todo el personal del Estabulario: Roser, Jessica, Mark, Carmen, Maite, etc. por su ayuda durante estos años.

A todo el grupo búlgaro: Peter, Antón, Katia, Maya, Kaloyan, Mima y Petia por todas las cenas y celebraciones que hemos compartido. Especialmente quiero agradecer a Peter por su buena disposición para ayudar y por alojarme de vez en cuando en Barcelona.

A Enric, Celia y Gemma por prestarme su despacho donde tenía las condiciones perfectas para escribir la tesis.

A todas las personas fuera del laboratorio con las que hemos compartido muchos asados, cenas y viajes, José María, Alvaro, Martín, Ramiro.

A toda la familia Gou-Fàbregas por hacerme sentir en su casa como en la mía.

A Ariel por su paciencia y constancia, por intentar hacer flexible a una búlgara, por enseñarme que no todo en la vida es blanco y negro, si no que también hay “*azul marisco*”. Gracias por las lecciones de español (argentino), por estar a mi lado en momentos difíciles, por aguantar mis charlas sobre NF-kappaB y apoptosis y por ser mi Lito.

A mi familia.

БЛАГОДАРНОСТИ

На семейството ми, което е упората в моя живот. На теб тате, за възпитанието, което си ми дал, за приноса в изграждането ми като личност и за това, че си ме е научил да планирам всяка своя стъпка в живота и, че си ми показал, че силния човек не е този, който никога не пада, а този който знае как да се изправи и да продължи напред. На теб мамо, за твоята нежност и жертвоготовност, за спокойствието с което ме обграждаш, за позитивния ти поглед върху живота, на който искрено се възхищавам. На теб Атанаси, за вярата в мен за това, че си винаги с мен в добри и лоши моменти, за подкрепата която ми даваш когато най-много ми е нужна.

На дядо Иван, баба Нела, баба Пепа, баба Стефка и дядо Атанас, които искрено ми пожелаваха, през тези години, много здраве и късмет в моята изследователска дейност.

Благодарение на вашата подкрепа, мое семейство, успях да стигна до тук!

*“El experimentador que no sabe lo que está
buscando no comprenderá lo que encuentra”*

Claude Bernard

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	1
ABREVIATURAS.....	7
INTRODUCCIÓN.....	11
1. Las motoneuronas espinales.....	13
1.1 Desarrollo de las motoneuronas espinales.....	13
1.2 Clasificación de las MNs.....	15
2. Muerte Celular Programada, PCD.....	17
2.1 PCD durante el desarrollo embrionario de las MNs espinales.....	18
2.2 Tipos PCD en el Sistema Nervioso Central (SNC).....	18
2.2.1 Apoptosis.....	18
2.2.1.1 Familia de las caspasas.....	19
2.2.1.2 Vía extrínseca de la apoptosis.....	20
2.2.1.3 Vía intrínseca de la apoptois. Implicación de la familia Bcl-2 en la regulación de la apoptosis.....	22
2.2.2 Autofagia	26
2.2.3 Muerte celular mediada por AIF.....	27
3. Factores neurotróficos	27
3.1 Familia de las neurotrofinas.....	28
3.2 Ligandos de la familia GDNF.....	30
3.3 Familia de las citoquinas.....	32
4. Principales vías de señalización activadas por NTFs en el SNC.....	34
4.1 Vía PI3-K/Akt.....	34
4.2 Vía de señalización Ras /MAPK.....	37
5. Nuclear Factor-kappaB (NF-κB).....	38
5.1 Familia de factores de transcripción NF-κB.....	39
5.2 Inhibidores de NF-κB (IκB).....	41
5.3. IκB quinasas (IKKs).....	45
5.4 Ratones <i>knockout</i> para distintos miembros de la vía NF-κB.....	45
5.5 Señalización por la vía NF-κB	49
5.4.1 Vía canónica de activación de NF-κB.....	49
5.4.2 Vía no-canónica de activación de NF-κB.....	50
5.4.3 Vía atípica de activación de NF-κB.....	52

5.6 Regulación de la activación transcripcional.....	53
5.7 NF- κ B en el Sistema nervioso (SN).....	56
5.7.1 Activadores de la vía NF- κ B en el SN.....	56
5.7.2 Genes diana de NF- κ B y su función en el SN.....	57
5.7.3 Función de NF- κ B en el SN durante el desarrollo y en el adulto...59	
5.8 Implicación de la vía NF- κ B en la patología neurológica.....	61
5.8.1 NF- κ B y enfermedades neurodegenerativas.....	61
5.8.2 NF- κ B y lesión neuronal.....	63
6. La Atrofia Muscular Espinal.....	65
6.1 Clasificación de AME.....	66
6.2 Genética molecular de AME.....	67
6.2.1 La región de AME.....	67
6.2.2 Los genes <i>SMN1</i> y <i>SMN2</i>	68
6.2.3 Expresión de los genes <i>SMN1</i> y <i>SMN2</i>	69
6.2.4 La proteína SMN.....	70
6.2.4.1 Funciones de la proteína SMN.....	70
6.4 Causas de AME	72
6.5 Genes y proteínas modificadoras del fenotipo de AME.....	73
6.6 Posibles terapéuticos de AME.....	74
OBJETIVOS.....	77
MATERIALES Y MÉTODOS.....	81
1. Cultivos celulares.....	83
1.1 Líneas celulares:.....	83
1.2 Cultivo primario de motoneuronas de ratón.....	84
1.2.1 Preparación de placas para el cultivo primario de MNs con sustratos de adhesión celular.....	84
1.2.2 Medios de cultivos y soluciones.....	84
1.2.3 Obtención de MNs de ratón. Disección	85
1.2.4 Purificación.....	86
2. Generación de vectores lentivirales de interferencia y sobre-expresión de proteínas. Transducción lentiviral.....	87
2.1 Técnica de interferencia.....	87

2.2 Vectores Lentivirales.....	89
2.3 Transformación celular.....	90
2.4 Producción de partículas lentivirales.....	91
2.5 Titulación lentiviral.....	93
2.6 Transducción lentiviral.....	93
3. Ensayos de supervivencia neuronal.....	93
3.1 MNs no transducidas.	94
3.2 MNs transducidas con lentivirus	94
4. Inhibidores.....	95
4.1 El Inhibidor de la vía NF- κ B (SN50).....	96
4.2 El inhibidor de PI3K (LY 292004)	96
4.3 El inhibidor de el proteasoma (MG-132)	96
5. Inmunofluorescencia (IF).....	96
5.1 Valoración de la apoptosis neuronal - Hoechst 33258.....	97
5.2 Translocación nuclear de RelA (p65).....	97
6. Análisis morfométrico de la degeneración neurítica	98
7. Técnicas bioquímicas.....	99
7.1 Extracción de proteínas y preparación de las muestras.....	99
7.2 Electroforesis, transferencia y bloqueo.....	100
7.3 Inmunoblot.....	100
7.4 Eliminación del anticuerpo de la membrana (Stripping).....	100
7.5 Revelado de la señal.....	100
8. Estadística.....	102
RESULTADOS.....	103
I. Estudio de la implicación de la vía NF- κ B en la supervivencia de las MNs mediada por los NTFs.	105
II Estudio de los cambios morfológicos y de la supervivencia celular en un modelo <i>in vitro</i> de Atrofia Muscular Espinal (AME).....	135
DISCUSIÓN.....	145
CONCLUSIONES.....	167
PUBLICACIONES Y CONGRESOS.....	171
BIBLIOGRAFÍA.....	177

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Localización de las MNs en la médula espinal.....	13
Figura 2. Esquema de la formación de la médula espinal y la diferenciación de las MNs.....	14
Figura 3. Esquema de la organización de las MNs en la médula espinal.....	16
Figura 4. Esquema de las vías extrínseca e intrínseca de la apoptosis.....	21
Figura 5. Esquema de los miembros de la familia de Bcl-2 anti-apoptóticos, pro-apoptóticos y BH-3 only.....	22
Figura 6. Imágenes de microscopia de los diferentes tipos de PCD.....	26
Figura 7. Familia de las Neurotrofinas y sus receptores. Vías de señalización por TrK y p75 ^{NTR} . Modificado de (Segal, 2003).....	30
Figura 8. Esquema de la unión de GDNF con su receptor (GFR α). Señalización por Ret.....	31
Figura 9. Esquema de CNTF y CT-1 y sus receptores. Activación de la vía de señalización JAK/STAT. Adaptado de (Hendry and John, 2004).....	33
Figura 10. Componentes de la vía de señalización neuronal PI 3-quinasa.....	36
Figura 11. Esquema de la vía de señalización Ras/MAPK.....	38
Figura 12. Esquema de los miembros de la sub-familia I de NF- κ B.....	40
Figura 13. Esquema de los miembros de la sub-familia II de NF- κ B.....	40
Figura 14. Esquema de los miembros de la familia I κ B.....	42
Figura 15. Esquema de activación de la vía NF- κ B mediante la liberación del dímero NF- κ B del inhibidor I κ B.....	44
Figura 16. Esquema de los miembros del complejo IKKs.....	45
Figura 17. Activación de la vía canónica de NF- κ B.....	50
Figura 18. Activación de la vía no-canónica de NF- κ B.....	51
Figura 19. Activación de la vía atípica de NF- κ B.....	52
Figura 20. Modificaciones post-transduccionales de la proteína RelA.....	54
Figura 21. Modelo de homeostasis de la activación de la vía NF- κ B. Modificado de (Kaltschmidt et al., 2005).....	64
Figura 22. La implicación de la vía NF- κ B en la señalización entre las neuronas y las células gliales.....	65
Figura 23. Esquema del locus humano de AME. Modificado de (Lorson et al., 2010).....	68
Figura 24. Splicing del exón 7 en los genes SMN1 y SMN2.....	69
Figura 25. Funciones de la proteína SMN.....	71
Figura 26. Extracción de médula espinal de embrión de ratón de E12.5.....	86
Figura 27. Obtención de MNs de médula espinal de ratón de E12.5 tras un gradiente de densidad Optiprep. Fotos de contraste de fase a MNs e inmunofluorescencia (Islet 1/2 y Hoechst) para evaluar la eficacia de la purificación.....	87
Figura 28. Silenciamiento genético a través de shRNA. Modificado de (Hannon and Rossi, 2004).....	88
Figura 29. Esquema de ensayos de supervivencia de las MNs tratadas y no tratadas con NTFs y diversos tipos inhibidores (mirar Resultados).....	94
Figura 30. Esquema de ensayos de supervivencia de las MNs transducidas con lentivirus.....	95
Figura 31. Núcleos con morfología apoptótica comparado con el núcleo con morfología sana.....	97

<i>Figura 32. Efectos de los NTFs sobre la supervivencia de las MNs.</i>	105
<i>Figura 33. Efecto de los factores neurotróficos sobre la fosforilación de IκB quinasas (IKKs).</i>	107
<i>Figura 34. Fosforilación de IKKs por diferentes factores neurotróficos en el cultivo primario de MNs.</i>	107
<i>Figura 35. Efecto de los NTFs sobre la translocación nuclear de RelA.</i>	109
<i>Figura 36. El cóctel de NTFs causa fosforilación en los residuos de Ser32 y Ser36, y no en la Tyr42 de IκBα.</i>	111
<i>Figura 37. La inhibición de la vía NF-κB causa muerte a las MNs en presencia de NTFs.</i>	112
<i>Figura 38. Disminución de las proteínas IKKα o IKKβ en células NSC34.</i>	113
<i>Figura 39. Transducción lentiviral de MNs con shIKKβ1 o shIKKβ2.</i>	114
<i>Figura 40. Efecto de la disminución de los niveles de proteína IKKβ en la supervivencia de las MNs mediada por NTFs.</i>	115
<i>Figura 41. Transducción lentiviral de MNs con shIKKα.</i>	116
<i>Figura 42. Efecto de disminución de los niveles de proteína IKKα en la supervivencia de MNs mediada por NTFs.</i>	117
<i>Figura 43. RelA knockdown reduce la supervivencia de las MNs mediada por los NTFs.</i>	119
<i>Figura 44. Implicación de shRelA en la supervivencia inducida por BDNF, CNTF o GDNF.</i>	120
<i>Figura 45. La vía no-canónica no esta implicada en la supervivencia de las MNs inducida por los NTFs.</i>	121
<i>Figura 46. Translocación nuclear de RelA en MNs knockdown de IKKα o IKKβ</i>	123
<i>Figura 47. La disminución de los niveles de las proteínas IKKα o IKKβ o RelA causa muerte celular apoptótica.</i>	125
<i>Figura 48. La disminución a los niveles de las proteínas IKKβ o RelA o IKKα afecta la expresión de la proteína Bim, pero no de Bcl-x_L ni de Bax.</i>	126
<i>Figura 49. Efecto de la sobre-expresión de Bcl-x_L en MNs knockdown para IKKα o IKKβ RelA.</i>	127
<i>Figura 50. La sobre-expresión de Bcl-x_L protege las MNs de la muerte inducida por la disminución de las proteínas IKKβ o IKKα o RelA.</i>	128
<i>Figura 51. Efectos de los NTFs sobre la expresión de Bcl-x_L.</i>	129
<i>Figura 52. La disminución a los niveles endógenos de Bax protege a las MNs de la muerte inducida por la reducción a los niveles de proteína IKKβ o RelA.</i>	130
<i>Figura 53. Implicación de la vía PI3-K/Akt en la supervivencia y en la fosforilación de las IKKs mediadas por NTFs.</i>	132
<i>Figura 54. La shRelA causa reducción de los niveles de proteínas Smn y CREB.</i>	134
<i>Figura 55. Expresión y distribución de la proteína SMN en cultivo primario de MNs.</i>	137
<i>Figura 56. Efectos de la transducción con shSMN en los niveles endógenos de Smn.</i>	138
<i>Figura 57. La disminución de los niveles de la proteína Smn causa degeneración neurítica y muerte neuronal.</i>	140
<i>Figura 58. Efectos de la sobre-expresión de Bcl-x_L sobre la degeneración neurítica en las MNs knockdown para SMN.</i>	141

Figura 59. La sobre-expresión de *Bcl-x_L* protege las MNs de la muerte inducida por la disminución a los niveles de la proteína *Smn*..... 142

Figura 60. La disminución a los niveles de proteína *Smn* no afecta los niveles endógenos de *RelA* y *CREB*..... 143

Figura 61. Esquema propuesto de la activación de la vía *NF-κB* en las MNs mediante NTFs..... 156

Figura 62. Esquema propuesto del control de la vía *NF-κB* en la apoptosis de las MNs..... 160

Figura 63. Esquema propuesto de la interacción entre la vía *NF-κB* y los niveles de proteína *Smn* y *CREB*..... 162

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. NTFs implicados en la supervivencia de las MNs..... 28

Tabla 2 Fenotipos de ratones knockout para la familia *Rel* y *IKKs*..... 48

Tabla 3. Fenotipo de ratones doble knockout para distintos miembros de la vía *NF-κB*..... 48

Tabla 4. Moléculas activadoras de *NF-κB* en el sistema nervioso. Modificado de (Kaltschmidt et al., 2005)..... 56

Tabla 5. Genes diana de *NF-κB*..... 59

Tabla 6. Estructura de la proteína *SMN* y sus dominios..... 70

Tabla 7. Proteínas que interactúan con *SMN* o con el complejo *SMN*..... 74

Tabla 8 Fármacos usados para aumentar a los niveles de la proteína *SMN* funcional..... 75

Tabla 9. Medios de cultivo primario y preparación..... 85

Tabla 10. Vectores lentivirales, la secuencia de RNA de interferencia clonada y procedimiento..... 90

Tabla 11. Vectores lentivirales y sus promotores..... 90

Tabla 12. Vectores lentivirales y las enzimas específicas de restricción..... 90

Tabla 13. Anticuerpos primarios..... 101

Tabla 14. Anticuerpos secundarios..... 101

ABREVIATURAS

(A1) BCL-2-related protein A1	(Cox-2) Ciclooxigenasa-2
(AAV) Adeno-associated Virus	(CKII) casein quinasas II
(Aβ) amiloid beta	(CLC) Cardiotrophin-1-Like Cytokine
(Ac) acetilización	(CRE) CREB Responsive Element
(AIF) Apoptosis Inducing Factor	(CREB) cAMP response element binding
(Akt) Proteína quinasa B, PKB	(CT-1) Cardiotrophin-1
(AD) Alzheimer disease o (EA) Enfermedad de Alzheimer	(DAG) Diacilglicerol
(AME) Atrofia Muscular Espinal	(DED) death effector domain
(AMED) Artofia Muscular Espinal Distal	(DISC) Death Inducig Signaling Complex
(Apaf-1) Apoptotic Protease Activating Factor-1	(DRGs) Dorsal Root Ganglia
(Apo-1) Apoptosis antigen 1	(E número) Día Embrionario
(APP) Amyloid Precursor Protein	(E2F1) factor de transcripción
(AP-2) Factor retranscripción	(EA) Enfermedad de Alzheimer
(ARTN) Artemina	(EP) Enfermedad de Parkinson
(Bad) BCL-2 antagonist	(EH) Enfermedad de Huntington
(Bax) BCL-2-associated X protein	(ELA) Esclerosis Lateral Amiotrófica
(Bak) BCL-2-antagonist/killer-1	(ERK) extracellular-signal-regulated kinases
(Bcl-10) BCL-2-like-10	(ESE) exonic splicing enhancer
(Bcl-2) B-cell lymphoma-2	(ESS) Exonic splicing silencer
(Bcl-xL) BCL-2-like protein	(EV) Empty vector
(Bcl-W) BCL-2-like-2	(GATA-2) factor de transcripción
(BDNF) Brain Derived Neurotrophic Factor	(Fas)- proteína con un dominio de muerte celular
(Bid) BH3-interacting domain	(FasL) Fas ligand
(Bim) BCL-2-like-11	(FL) Full Length
(BimEL) -Bim extra long	(FOXO) Forkhed transcription factor
(BimE) Bim long	(GDF-15) Growth differentiation factor-15
(Bims) -Bim short	(GDNF) Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor
(Bik) BCL-2-interacting killer	(GFLs) Growth Factor Family Ligands
(Bmf) BCL-2-modifying factor	(GFP) Green Fluorescent Protein
(Bok) BCL2-related ovarian killer	(GFRα) GDNF-Family Receptor-α
(BSA) Albúmina Serica Bovina	(gp130) glicoproteína 130
(CARD) caspase-recruitment domain	(HGF) Hepatocyte Growth Factor
(CBP) CREB Binding Protein	(HMC) Columna Motora Hypaxial
(CBD) CREB Binding Domain	(hnRNP) heterogeneous nuclear ribonucleoprotein
(c-Fos) Factor de transcripción	(Htt) hungtingina
(c-Myc) Factor de transcripción	(HSP) Paraplegia Espastica Hereditaria
(CNS) Central Nervous System	(IAPs) Inhibitor of apoptosis proteins
(CNTF) Ciliary-derived Neurotrophic Factor	(IKB) Inhibitor κB
(CNTFRα) CNTF receptor alfa	(IKK) IκB quinasa
	(IL-1) interleuquina 1

(LB) Lysis Buffer	(Shh) Sonic Hedgehog
(LIF) Leuchemia Inhibitory Factor	(SIP-1) SMN Interacting Protein 1
(LIFRβ) Receptor tirosina kinasa de las citoquinas	(siRNA) small interference RNA
(LMC) Columna Motora Lateral	(shRNA) small hairpin RNA
(LPF) Lipofectamina	(SMN) Survival Motoneuron gene
(LSm) Sm Like Proteins	(SMN) human Survival Motoneuron proein
(MAPK) Mitogen-activated protein kinases	(Smn) mouse Survival Motoneuron proein
(Mcl-1) Myeloid cell leucemia	(SNC) Sistema Nervioso Central
(MMC) Columna Motora Medial	(SNP) Sistema Nervioso Periférico
(MSK) Mitogen and Stress-activated protein Kinase	(snRNA) Small Nuclear RNA
(MSH) Mullerian Inhibiting Substance	(snRNP) small nuclear ribonucleoprotein
(NAIP) Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein	(SOD1) Proteína Superoxidodismutasa 1
(NBMc) Medio Neurobasal Completo	(STAT) Signal Transducer and Activator of Transcription
(NO) nitric oxide	(SERF1) Small EDRK-Rich Factor
(NOSi) nitric oxide synthase	(TAD) transactivation damain
(NCAM) neuronal cell adhesion molecule	(TF) Transcripton factor
(NF-κB) Nuclear Factor kappa B	(TN) Tubo Neural
(NF) Neurofilament	(TNF) Tumor Necrosis Factor
(NFH) Neurofilament heavy chain	(TNFR) TNF receptor
(NLS) Nuclear Localization Sequence	(Trk) Tropomyosin-Related Kinase
(NGF) Nerve Growth Factor	(TRAF) TNFR Associated Factor
(Noxa) Phorbol-12-myristate-13-acetateinduced	(Ub) ubiquitinización
(NRTN) Neurturina	(UNRIP) UNR interacting protein
(NT-3) Neurotrophin-3	(tBid) Bid truncado
(NT-4/5) Neurotrophin-4/5	
(NTF) Neurotrophic factor	
(PCD) Muerte Celular Programada	
(RHD) rel homology damain	
(PEI) polietilenimina	
(PFA) Paraformaldehido	
(PGC) Columna motora preganglionar	
(PI3K) Phosphatidylinositol 3-kinase	
(PIP) fosfatidil Inositol	
(RISC) RNA induced silencing complex	
(PKC) Proteína Kinasa C	
(PLCγ) Phospholipase C Gamma	
(PN) Placa Neural	
(PNS) Periferic Nervous System	

INTRODUCCIÓN

1. Las motoneuronas

Las motoneuronas (MNs) son las células del sistema nervioso central (SNC) que dirigen la contracción muscular. Según su localización, se dividen en dos tipos: (i) **MNs superiores**, localizadas en la corteza motora del cerebro y en algunos núcleos del tronco encefálico; y (ii) **MNs inferiores**, situadas en el asta ventral de la médula espinal y en núcleos motores de los nervios craneales del tronco encefálico. Las MNs superiores son los responsables de dirigir y planear los movimientos corporales, y las MNs inferiores dirigen la contracción muscular (Figura 1).

En el presente estudio, hemos analizado la implicación de la vía NF-kappaB en la supervivencia de las MNs espinales (inferiores) en desarrollo. Para ello, como modelo experimental hemos utilizado el cultivo primario de MNs espinales de embriones de ratón de 12.5 días de gestación.

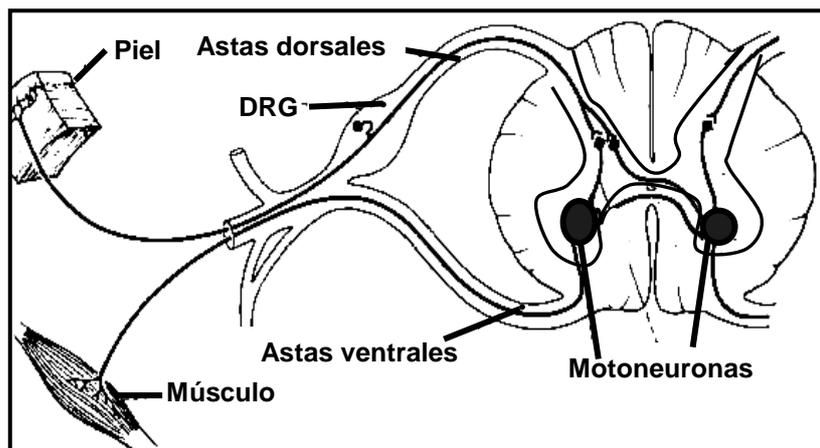


Figura 1. Localización de las MNs en la médula espinal.

1.1 Desarrollo de las motoneuronas espinales

Durante el desarrollo, el sistema nervioso (SN) se forma a partir de un engrosamiento ectodérmico conocido como *placa neural (PN)*. La fusión de los extremos terminales de la PN conduce a la formación del tubo neural (TN) compuesto por células neuro-epiteliales (Cayuso and Martí, 2005). La parte caudal del TN dará lugar a la médula espinal.

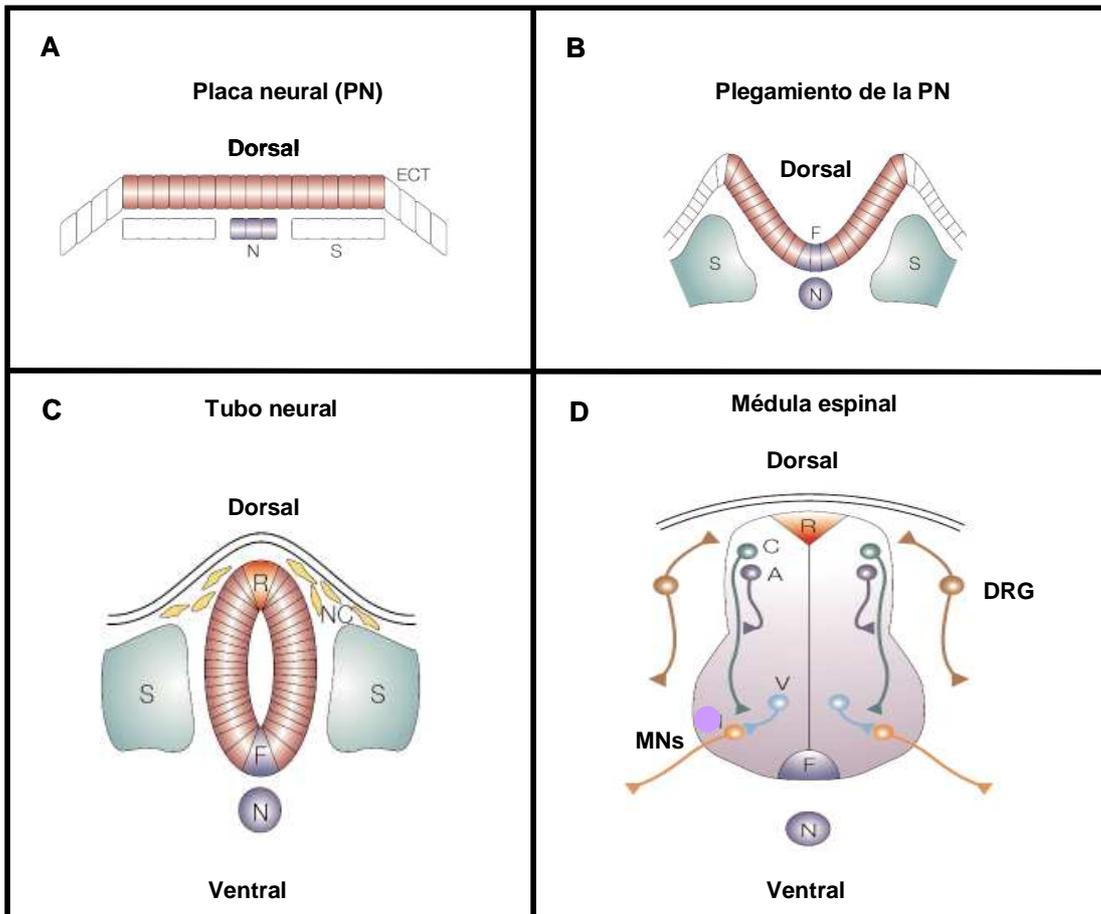


Figura 2. Esquema de la formación de la médula espinal y la diferenciación de las MNs.

A) Formación de la placa neural. B) Invaginación de la placa neural que da lugar al tubo neuronal. C) Polarización ventro-dorsal de tubo neural. D) Localización ventro-dorsal de los distintos subtipos de neuronas que forman la médula espinal: motoneuronas (MNs) y ganglios de la raíz dorsal (DRG). Imagen modificada de (Jessell, 2000).

Una vez formado el TN, en la parte ventral y próxima a la notocorda (formación mesodérmica que se encuentra debajo del TN), se empieza a formar una capa de células denominada placa de suelo (*del inglés floor plate, FP*). En la región ventral del TN que formará la médula espinal, las células de la notocorda y de la FP secretan la glicoproteína *Sonic Hedgehog* (Shh). Esta proteína, dirige la diferenciación de los precursores neuroepiteliales del TN hacia MNs. Para ello, se genera un gradiente de concentración de Shh a lo largo del eje dorso-ventral del TN, que controla la expresión/represión de determinados genes reguladores de la diferenciación neuronal regional de las células de la parte ventral del TN (Briscoe et al., 2000). La glicoproteína Shh funciona como un morfógeno induciendo la expresión de algunos factores de transcripción del homeodominio NKx, y al mismo tiempo reprimiendo la expresión de otros genes en función de su concentración (Briscoe et al. 2000).

En resumen, los progenitores de las MNs expresan: Nkx6.1, Pax6 y Olig2 (Liu et al., 2003). Estas proteínas activan a la proteína responsable de la inducción de la expresión de factores de transcripción como Islet-1, Islet-2, Lim y BH9, que son considerados marcadores específicos de las MNs.

1.2 Clasificación de las MNs

A pesar de considerarse como un grupo homogéneo, las MNs espinales son altamente diversas en términos de morfología, conectividad, y propiedades funcionales. Por ello pueden clasificarse en diferentes subpoblaciones y subtipos (Figura 1). Las distintas sub-poblaciones de MNs organizan sus somas a lo largo de la médula espinal, formando columnas motoras que dirigen sus axones selectivamente hacia diferentes dianas (revisado en (Jessell, 2000)). En los mamíferos, los genes codificados por la familia de factores de transcripción Hox, determinan la especificidad y la organización de las MNs en 4 columnas: Columna motora medial (de inglés *Medial Motor Column*, MMC); Columna motora lateral (*del inglés, Lateral Motor Column, LMC*); Columna motora preganglionar (*de inglés, Pregangliar Motor Column, PGC*) y Columna motora hypaxial (*del inglés, Hypaxial Motor Column, HMC*) (Dasen and Jessell, 2009). Las MNs de la MMC, inervan los músculos axiales; las de la LMC inervan los músculos de las extremidades; las MNs de la HMC son las responsables de la contracción a nivel de los músculos intercostales y de la pared corporal de la región ventral del cuerpo (hypaxial muscles) y finalmente, las de la PGC proyectan sus axones hacia las neuronas de los ganglios simpáticos.

Todas las MNs de las diferentes columnas durante su desarrollo expresan Islet1/2 y HB9/MNR2, y a partir de la etapa postnatal otros factores de transcripción específicos de las distintas columnas, como por ejemplo: FoxP1, Lhx-1 y/o -3, Er81 (Tsuchida et al., 1994).

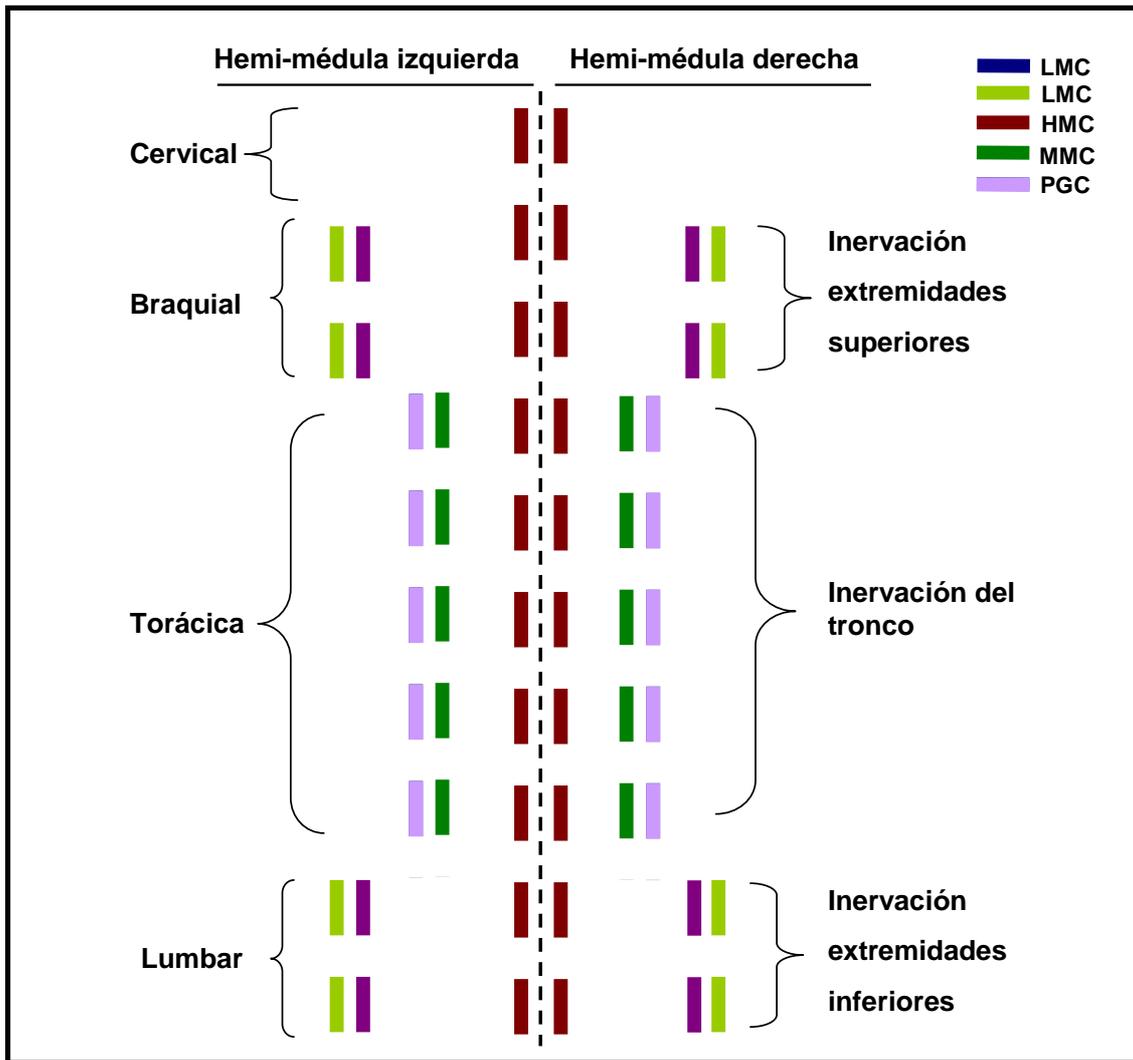


Figura 3. Esquema de la organización de las MNs en la médula espinal. Modificado de (Tsuchida et al., 1994).

Por otro lado, dependiendo de la fibra muscular que inervan las MNs se pueden clasificar en:

- **α -MNs:** inervan las fibras externas al huso muscular y dirigen la contracción muscular.
- **γ -MNs:** inervan fibras internas del huso muscular y dirigen funciones complejas en el control motor. Las MNs de este tipo se caracterizan por tener una menor arborización y axones con un diámetro inferior a las **α -MNs**, además poseen una mayor cantidad de receptores de GFR α 1 (*del inglés GDNF family receptor*) de GDNF (*del inglés, Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor*) (Shneider et al., 2009).
- **β -MNs:** son las menos abundantes y están asociadas con la inervación de fibras internas y externas al huso muscular.

2. Muerte Celular Programada, PCD

La muerte celular programada (*del inglés Programmed Cell Death, PCD*) es uno de los procesos más importantes durante el desarrollo del SN. Este proceso afecta tanto a las neuronas e interneuronas, como a las células gliales, y es fundamental para el correcto establecimiento de las poblaciones finales de estos tipos celulares. Alrededor del 50% de las células del sistema nervioso central (SNC) que se han generado mueren por PCD.

Existen evidencias de que las moléculas derivadas del entorno y del tejido diana, juegan un papel crucial en la regulación de la supervivencia neuronal durante el desarrollo. Estas moléculas, denominadas factores neurotróficos (*del inglés, Neurotrophic Factors, NTFs*), se cree que actúan de una manera específica controlando la supervivencia neuronal. Durante mucho tiempo se postuló que la causa de la PCD se debe al simple hecho de que aquellas neuronas que no logran llegar a su célula diana, no obtienen suficiente soporte trófico para seguir desarrollándose y mueren de esta forma (revisado en (LEVI-MONTALCINI, 1964; Levi-Montalcini and Angeletti, 1968)). Años más tarde, se demostró que la supervivencia neuronal durante el desarrollo no solamente depende de la disponibilidad del soporte trófico aportado por las células diana, sino también del soporte que ofrecen otras células del entorno. Se observó que las células gliales, las células de Schwann, las neuronas pre-sinápticas, la neuronas del entorno cercano (tanto en forma paracrina como autocrina), e incluso a través de los vasos sanguíneos también se aporta soporte trófico hacia las MNs (revisado en (Oppenheim, 1991; Bennet et al., 2002)). De estas observaciones se amplió y reforzó la teoría neurotrófica que propone el efecto principal de los factores neurotróficos (NTFs) en el desarrollo neuronal controlando los procesos de PCD. En apoyo a esta teoría, múltiples experimentos han demostrado que la PCD inducida por la falta de soporte trófico del entorno, se puede reproducir tanto eliminando el tejido diana como eliminando las células de Schwann (revisado en (Oppenheim 1991)).

2.1 PCD durante el desarrollo embrionario de las MNs espinales

Durante el desarrollo de las MNs, se han identificado dos etapas de PCD que suceden en diferentes períodos según la especie y la región de la médula espinal. El primer período ocurre en las etapas tempranas del desarrollo y está asociada con la inhibición de los precursores neuronales inmaduros de las zonas de proliferación (revisado en (Yeo and Gautier, 2004)). El segundo periodo de PCD conocido también como muerte celular neurotrófica, coincide con la adquisición de la dependencia trófica de las neuronas y con el momento en que la musculatura queda funcionalmente inervada, durante la sinaptogénesis (revisado en (Yeo and Gautier, 2004)).

Para el presente trabajo, aislamos y cultivamos MNs post-mitóticas diferenciadas antes de que se induzca el segundo periodo de PCD (día embrionario 12.5, E12.5). Este segundo período de PCD en los embriones de ratón ocurre entre E13 y E18 (Sun et al., 2005). En la médula espinal, el segundo periodo de PCD se inicia en la región cervical y finaliza en la región sacra. No obstante, el proceso no sigue estrictamente un patrón rostro-caudal (Yamamoto and Henderson, 1999).

2.2 Tipos PCD en el SNC:

2.2.1 Apoptosis

La apoptosis es un proceso fisiológico por el que determinadas células dirigen su propia muerte en beneficio del organismo. En la mayoría de los casos está controlado genéticamente. El término apoptosis fue introducido por Kerr en 1972, deriva del griego apo (fuera de) y ptosis (cayendo) (Kerr et al., 1972). Morfológicamente en las células apoptóticas se observa una condensación de la cromatina y del citoplasma, que acaban en una fragmentación nuclear y citoplásmica, formando los cuerpos apoptóticos. Los cambios en la morfología aparecen como resultado de la activación de un grupo de cisteína-proteasas llamadas caspasas.

La apoptosis puede iniciarse a través de dos formas distintas, como respuesta a la activación de la vía extrínseca y/o como respuesta a la vía intrínseca. La **vía extrínseca** está asociada con la activación de receptores de muerte, como Fas, y resulta en la activación de las caspasas 8, 9 o 10 (revisado en (Salvesen and Dixit, 1997; Salvesen, 1997 Caspases: intracellular signaling by proteolysis.; Choi and Benveniste, 2004) mientras que la **vía intrínseca** está relacionada con la salida de citocromo C de la mitocondria y con la activación de las caspasas 3 y 9.

2.2.1.1 Familia de las caspasa

Las caspasas son una familia de proteasas que constituyen los principales efectores de la apoptosis, y su activación es un indicador de muerte apoptótica.

En las células de mamíferos se han descrito 14 caspasas diferentes que se pueden clasificar en tres grupos distintos según su función:

- **Caspasas inflamatorias.**

Este grupo incluye las caspasas 1, 4, 5, 11, 12, 13 y 14. Estructuralmente estas caspasas se caracterizan por presentar un dominio denominado reclutamiento de caspasa- CARD (*del inglés caspase-recruitment domain*), y funcionalmente están asociadas con procesos inflamatorios.

- **Caspasas iniciadoras de la apoptosis.**

En este grupo se encuentran cuatro caspasas que pueden clasificarse en 2 grupos:

- ✓ Aquellas que contienen un dominio efector de muerte (*del inglés Death Effector Domain, DED*), la caspasa 8 y la caspasa 10.
- ✓ Aquellas que contienen un dominio CARD la caspasa 2 y la caspasa 9.

- **Caspasas ejecutoras de la apoptosis.**

Este grupo incluye la caspasa 3, caspasa 6 y caspasa 7. Para su activación los miembros de este grupo son procesados por las caspasas iniciadoras. Como resultado de su activación se forma un complejo heterotetramérico compuesto por dos subunidades cortas y dos largas (Wolf and Green, 1999). Se activan en la fase de ejecución de la apoptosis degradando

múltiples sustratos celulares (revisado en (Degterev et al., 2003 A decade of caspases.)). Muchas evidencias indican que entre todas las caspasas ejecutoras, la caspasa 3 ejerce un papel principal en la activación de la muerte apoptótica, mientras que el resto de caspasas ejecutoras parecen tener un papel redundante en las diferentes vías apoptóticas (Zheng et al., 2000). Estudios genéticos han demostrado que la pérdida de caspasa 3 produce malformaciones en el cerebro. Además el ratón *knockout* para caspasa 3 presenta una respuesta defectuosa a estímulos apoptóticos mediados tanto por la vía intrínseca como por la vía extrínseca (Kuida et al., 1996).

El efecto apoptótico, mediado por la activación de todas estas caspasas puede ser bloqueado a través de distintas proteínas entre cuales están la familia de las IAPs (*del inglés inhibitor of Apoptosis Proteins*). Las IAPs son proteínas capaces de inhibir la apoptosis mediante su unión directa a determinadas caspasas (Feng et al., 2003) y su expresión se encuentra bajo el control de diferentes vías de señalización.

2.2.1.2 Vía extrínseca de la apoptosis

La vía extrínseca se inicia por la activación de receptores de muerte de la familia del TNF (*del inglés Tumor Necrosis Factor*) que están localizados en la membrana plasmática. Entre estos receptores de muerte se encuentran: APO1/Fas/CD95 (*del inglés Apoptosis antigen-1*), TNFR1 (*del inglés TNF-receptor-1*), y TRAILR1 (*del inglés, TNF-related apoptosis inducing ligand receptor 1*). Todos estos receptores contienen un dominio intracelular conocido como dominio de muerte. Su activación se inicia a través de la unión de los ligandos específicos para cada receptor. FasL (*del inglés, Fas ligand*) se une y activa el receptor Fas, TNF α activa TNFR1 y TRAIL activa a TRAILR1. La unión del ligando al receptor activa una serie de proteínas adaptadoras que forman un complejo de señalización inductor de muerte DISC (*del inglés, Death Inducing Signalling Complex*). Una vez formado DISC, varias moléculas de procaspasa-8 se unen resultando en el procesamiento de procaspasa 8 a caspasa 8 (Salvesen, 1999). Por su parte, caspasa 8, activa directamente otros miembros ejecutores de la familia de las caspasas, como la caspasa 3. La

activación de caspasa 3, por su parte, induce la proteólisis de diferentes proteínas. La fase final de esta vía tiene como diana el DNA, causando su fragmentación y la muerte celular por apoptosis.

En la señalización mediada por Fas, se han descrito dos tipos de respuestas diferentes (Choi and Benveniste, 2004). El primer tipo está relacionado con la activación de Fas que genera suficiente caspasa 8 activa para la activación directa de caspasa 3; mientras que en el segundo tipo los niveles de caspasa 8 activa no son suficientes para la activación directa de caspasa 3. En este segundo tipo de células, los niveles de caspasa 8 activa, requieren una amplificación de la señal que pasa por la mitocondria; la caspasa 8 activa, procesa a Bid, formando Bid truncado (*del inglés truncated Bid, tBid*), y tBid se transloca a la mitocondria, donde interacciona con Bax y/o Bak, promoviendo una liberación de citocromo C de la mitocondria (Brustovetsky et al., 2003).

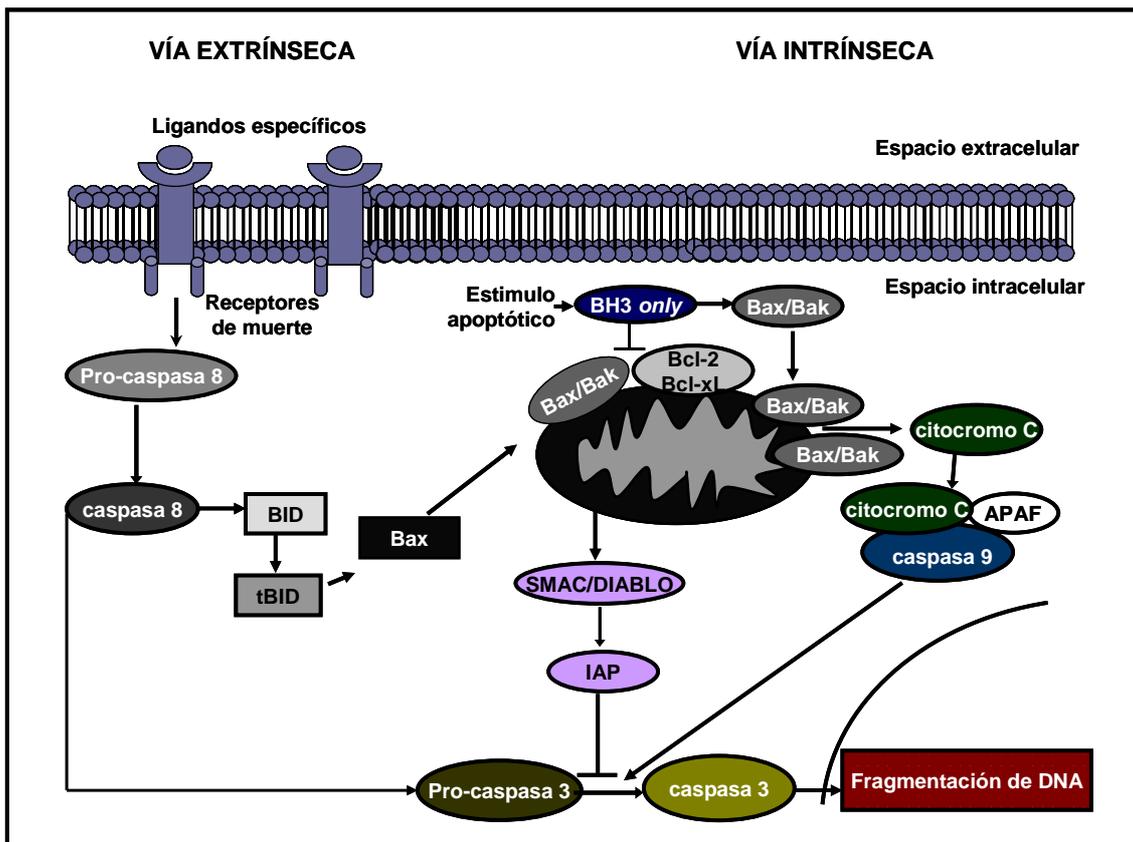


Figura 4. Esquema de las vías extrínseca e intrínseca de la apoptosis.

La implicación de la apoptosis inducida por Fas durante el desarrollo de MNs se ha demostrado en varios trabajos (Ugolini et al., 2003; Barthélémy et

al., 2004; Raoul et al., 2005). Estos estudios proponen la privación trófica, como una de las primeras causas de la muerte por Fas en las MNs *in vitro*.

2.2.1.3 Vía intrínseca de la apoptosis. Implicación de la familia Bcl-2 en la regulación de la apoptosis

La propensión que tienen las células a iniciar el proceso apoptótico depende fundamentalmente del balance de proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas de la familia de Bcl-2 (revisado en (Walensky, 2006)). Las proteínas de esta familia juegan un papel fundamental en la regulación de la integridad mitocondrial y la respuesta a las diferentes señales apoptóticas (Li et al., 2006). La familia Bcl-2 comprende miembros pro- y anti-apoptóticos. Las proteínas anti-apoptóticas evitan la liberación de moléculas apoptogénicas desde el espacio intermembrana de la mitocondria. Por otro lado, los miembros pro-apoptóticos de esta familia inducen estas liberaciones. Las proteínas de la familia Bcl-2 pueden contener hasta cuatro dominios conocidos como dominios de homología Bcl-2 (BH1- 4) (Adams and Cory, 1998). Según su estructura y función los miembros de la familia Bcl-2 se pueden clasificar en tres grupos: proteínas anti-apoptóticas, proteínas pro-apoptóticas y proteínas con un solo dominio BH-3 (BH-3 *only*).

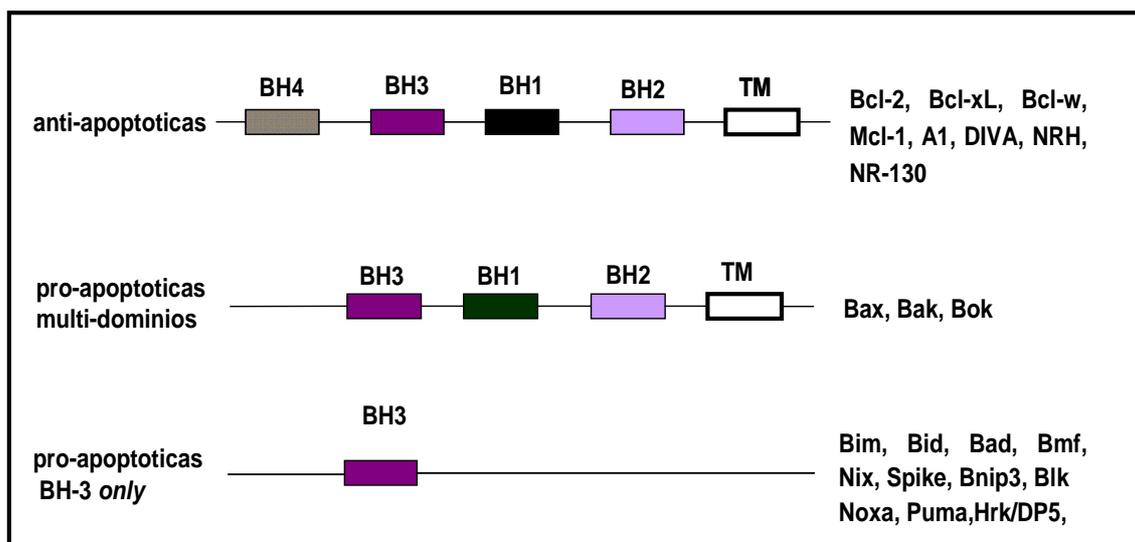


Figura 5. Esquema de los miembros de la familia de Bcl-2 anti-apoptóticos, pro-apoptóticos y BH-3 *only*.

Dominios BH (1-4) y TM (*dominio* trans-membranal). Imagen modificada de (Walensky, 2006)

- **Proteínas anti-apoptóticas**

Las proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 contienen los cuatro dominios llamados BH, BH1, BH2, BH3 y BH4, (Adams and Cory, 1998). Las proteínas Bcl-2 y Bcl-x_L pertenecen a este grupo y pueden interactuar con las proteínas pro-apoptóticas de la misma familia impidiendo su función;

- **Proteínas pro-apoptóticas multidominios**

Los miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2 presentan los dominios BH1, BH2 y BH3. A este grupo pertenecen las proteínas: Bax, Box y Bak

- **Proteínas pro-apoptóticas con un solo dominio BH3, *BH3-only*.**

Los miembros de este último grupo presentan en su estructura solamente el dominio BH3. En el este grupo pertenecen las proteínas: Bim, Bid, Bad, Bmf, Nix, Spike, Bnip3, Blk Noxa, Puma y Hrk/DP5.

Proteínas anti-apoptóticas:

Las proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 (**Bcl-x_L** y Bcl-2), tienen un papel importante en la inhibición de las vías extrínseca e intrínseca de la apoptosis. Las proteínas Bcl-2 y **Bcl-x_L** muestran una alta homología entre ellas, y esto, probablemente, define la función anti-apoptótica parecida observada en ambas (revisado en (Kim, 2005)). En condiciones fisiológicas estas proteínas se encuentran incorporadas en la membrana mitocondrial y en el retículo endoplásmico, formando complejos con los miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2, como **Bax** y Bak. De esta manera se bloquea la apoptosis inducida por la oligomerización de estas proteínas y la salida de citocromo C de la mitocondria (Figura 4) (Krajewski et al., 1993); revisado en (Cory and Adams, 2002; Reed, 2006)). Durante el PCD del desarrollo del SN se ha propuesto **Bcl-x_L** como la proteína con mayor importancia en la supervivencia neuronal. En apoyo a esta sugerencia, observaciones en los ratones *knockout* para **Bcl-x_L** demostraron una muerte apoptótica masiva en neuronas inmaduras en el estado embrionario (E13 días) (Motoyama et al., 1995). Sin embargo, el ratón *knockout* para Bcl-2 no presenta cambios en la supervivencia del SN durante su desarrollo embrionario, sino durante su desarrollo postnatal manifestando una degeneración de las MNs así como de las neuronas sensoriales (Michaelidis et al., 1996). Estas observaciones indican

una función anti-apoptótica selectiva de las proteínas **Bcl-x_L** y Bcl-2 en diferentes etapas del desarrollo. Se postuló que la proteína anti-apoptótica **Bcl-x_L** es responsable para la supervivencia neuronal post-mitótica durante el desarrollo del SN (Fujita et al., 2000). Análisis más detallados de ratones *knockout* para **Bcl-x_L** demostraron que la muerte apoptótica observada en el SN puede ser bloqueada mediante la desactivación de las caspasa 9 o 3, sugiriendo la implicación de la proteína **Bcl-x_L** en el control de la vía intrínseca de la apoptosis. Por otro lado, se ha descubierto la implicación de la proteína **Bcl-x_L** en la vía extrínseca de la apoptosis y la autofagia (revisado en (Kim, 2005; Zhou et al., 2011).

Proteínas pro-apoptóticas

Este grupo de la familia Bcl-2 incluye las proteínas que presentan los dominios BH1, BH2, BH3. Las proteínas **Bax** y Bak tienen una función redundante en la activación de la apoptosis (Lindsten et al., 2000). La proteína **Bax** se localiza predominantemente en el citosol de las células sanas y se transloca a la mitocondria cuándo la célula recibe estímulos apoptóticos (Wei et al., 2001a), mientras que Bak está constitutivamente localizada en la mitocondria (Griffiths et al., 1999). Ambas proteínas contienen una cadena hidrofóbica de aminoácidos que les permite insertarse en la membrana mitocondrial externa y en la membrana del retículo endoplasmático. Las señales de apoptosis inducen un cambio conformacional en **Bax**, que causa su translocación del retículo endoplasmático a la mitocondria, su oligomerización promoviendo la liberación del citocromo C desde la mitocondria (Korsmeyer et al., 2000; Mikhailov et al., 2003). Las neuronas necesitan la expresión endógena de **Bax** para un correcto establecimiento de las poblaciones neuronales durante el desarrollo (Deckwerth et al., 1996; Deckwerth et al., 1998). El ratón *knockout* para **Bax** presenta un mayor número de MNs faciales así como de neuronas simpáticas en el ganglio cervical superior, sugiriendo graves defectos en la PCD durante el desarrollo embrionario. Además, los cultivos neuronales del ratón *knockout* para **Bax** son resistentes a la muerte celular inducida por falta de soporte trófico, demostrando un papel fundamental de **Bax** en la regulación de muerte neuronal durante el desarrollo embrionario (Deshmukh and Johnson, 1998).

Proteínas pro-apoptóticas *BH3-only*

Las proteínas *BH3-only*: Bad, Bid, Puma, Noxa, Bim y Bmf, requieren de las proteínas Bax o Bak para inducir la disfunción mitocondrial y la muerte celular como se demuestra en ratones *knockout* para Bax y Bak (Wei et al., 2001a).

Dependiendo de su unión con proteínas pro-apoptóticas, las proteínas BH3-only se dividen en dos grupos (Letai et al., 2002):

- Activadores directos (Bim y Bid), son capaces de inducir directamente la oligomerización de Bax y Bak;
- Represores (Bad, Bik, Noxa, Puma, Bmf), no son capaces de efectuar la activación de Bax y Bid directo sino, se unen a proteínas anti-apoptóticas bloqueando de esta forma su interacción con proteínas activadores, lo que conlleva la activación de Bax y Bak.

En ausencia de estímulos apoptóticos, las proteínas BH-3 “only” están unidas con proteínas anti-apoptóticas. Mientras que las proteínas Bim, PUMA y Bid pueden unirse a todas las proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2, el resto de las proteínas BH-3 “only” muestran mayor selectividad (revisado en (Willis and Adams, 2005)). Tras un estímulo apoptótico, las proteínas BH-3 “only” represoras se unen a las proteínas anti-apoptóticas, desplazandolas de **Bim** y Bid y promoviendo la activación de Bax y Bak lo que conlleva la salida de citocromo C desde la mitocondria (revisado en (Willis and Adams, 2005)).

La regulación de las proteínas *BH3-only* a nivel transcripcional permite un control preciso de la apoptosis. Existen evidencias que demuestran la implicación de distintas vías de señalización y factores de transcripción en el control transcripcional de las proteína BH-3 “only”: **Bim**, **Noxa**, **Puma**. En concreto, las vías: JNK, ERK/MAPK y PI3-K/Akt (Putchá et al., 2001; Weston et al., 2003), así como y los factores de transcripción Foxo3a (Sunters et al., 2003) y NF-κB (Inta et al., 2006a) participan en el control de la expresión de **Bim**. Existen tres isoformas de **Bim** que son sintetizadas a partir de un mismo transcrito: Bim_{EL} (*del inglés, extra long, EL*), Bim_L, (*del inglés, long, L*) y Bim_S (*del inglés, short, S*). La forma más abundante en las células es **Bim_{EL}**, esta isoforma por un lado evita la fuerte actividad pro-apoptótica de Bim_S y por otro

lado, sus dominios adicionales permiten diferentes regulaciones post-transduccionales. En la inducción apoptosis, **Bim_{EL}** puede desplazar **Bcl-x_L** de la mitocondria y promover directamente o indirectamente la translocación y la activación de **Bax** (Zhang et al., 2008a).

Bajo control transcripcional se encuentran también las proteínas Noxa y Puma. Ciertas evidencias indican los factores de transcripción p53 y NF- κ B como posibles reguladores de la expresión de estas dos proteínas (Oda et al., 2000; Inta et al., 2006b)

2.2.2 Autofagia

La autofagia es la forma de PCD asociada con la degradación lisosomal regulada. Es la única de las formas de muerte celular que ayuda a las células a sobrevivir en condiciones de restricción nutricional (Klionsky, 2004). La autofagia se caracteriza por la formación de autofagosomas- estructuras con doble membrana que pueden tener como orígenes tanto el aparato de Golgi como el retículo endoplasmico. Una vez formados, los autofagosomas se fusionan con los lisosomas generando auto-lisosomas, en estos se degrada el contenido mediante los enzimas del lisosoma (Nixon, 2006). Como consecuencia de la degradación de moléculas y organelas a través de autofagia se obtiene energía y aminoácidos para la síntesis de proteínas. Este tipo de muerte puede observarse tanto durante el desarrollo neuronal, como en las enfermedades neurodegenerativas (Petersén A et al., 2001; Oppenheim et al., 2008).

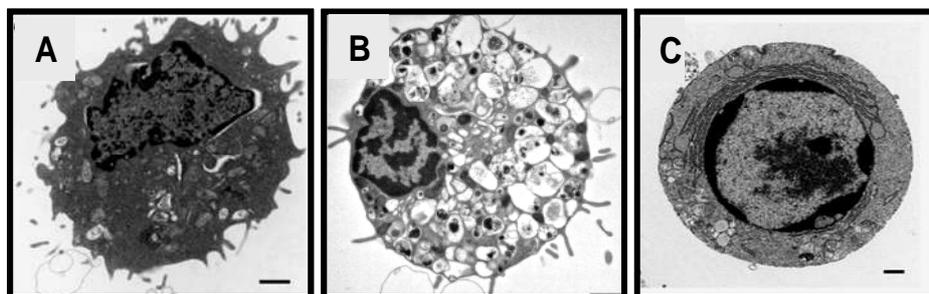


Figura 6. Imágenes de microscopia de los diferentes tipos de PCD.

A) Célula sana; B) Célula autofagica; C) Célula apoptótica. Modificado de (Edinger and Thompson, 2004).

2.2.3 Muerte celular mediada por AIF

AIF (*del inglés, Apoptosis Inducing Factor*), es una flavoproteína que está localizada en el espacio intermembrana de la mitocondria y que participa en procesos de la PCD independientes de caspasas (Daugas et al., 2000). Esta forma de PCD se induce por agentes que provocan daño de DNA, a través de la translocación de AIF de la mitocondria hacia el núcleo donde induce la fragmentación del DNA (Daugas et al., 2000; Zhang et al., 2002). La liberación mitocondrial de AIF está controlada por Bcl-2, pero una vez liberado no influye sobre su desplazamiento hacia la mitocondria y sobre el posterior desarrollo de los procesos de la muerte desencadenados (revisado en (Bras et al., 2005)).

3. Factores neurotróficos

Durante los últimos 30 años se ha caracterizado con gran detalle la supervivencia neuronal durante el desarrollo embrionario. A lo largo del desarrollo, las neuronas requieren la presencia de NTFs para su supervivencia y el correcto establecimiento de las poblaciones neuronales (revisado en (Purves et al., 1988; Schober and Unsicker, 2001)). Los NTFs, son moléculas que se unen a sus receptores específicos presentes en la membrana neuronal e inducen la activación de vías de señalización intracelular que, a su vez, activan la expresión de varios genes asociados con supervivencia, diferenciación o con el control de PCD entre otros.

Diferentes estudios han demostrado que los NTFs pueden proteger a las neuronas frente a estímulos de muerte y, además en varios modelos animales de enfermedades neurodegenerativas se ha observado un efecto neuroprotector de estos factores (enfermedad de Parkinson (Alexi et al., 2000; Kordower et al., 2000), enfermedad de Huntington (Alexi et al., 2000), enfermedad de Alzheimer (Hefti, 1994), Atrofia Muscular Espina (AME I) (Simon et al., 2010) y Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) (Manabe et al., 2002)).

Existe una gran variedad de familias de NTFs implicados en la supervivencia de las MNs tanto *in vivo* como *in vitro* (revisado en (Oppenheim, 1991)). Más de 15 factores polipeptídicos expresados en el entorno de las MNs están implicados en su supervivencia (Tabla 1). En el presente trabajo para mantener en cultivo las MNs usamos un coctel de NTFs compuesto por los

siguientes factores: **BDNF** (*del inglés, Brain Derived Neurotrophic Factor*) - pertenece a la familia de las neurotrofinas; **CNTF** (*del inglés, Ciliary Neurotrophic Factor*) o **CT-1** (*del inglés, Cardiotrophin-1*) – pertenecen a la familia de las citoquinas; y **GDNF** (*del inglés Glial cell Derived Neurotrophic Factor*) - pertenece a la familia de los ligandos de GDNF.

Tabla 1. NTFs implicados en la supervivencia de las MNs

NTFs que regulan la supervivencia de las MNs	
Neurotrofinas <i>Brain derived neurotrophic factor (BDNF)</i> <i>Neurotrophin 3 (NT-3)</i> <i>Neurotrophin 4/5 (NT-4/5)</i> <i>Nerve Growth Factor (NGF)</i>	Henderson et al. 1994b Egea et al. 2001; Dolcet et al. 1999; Hughes, Sedtner and Thoenen 1993
Ligandos de la familia del GDNF <i>Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)</i> <i>Neurtrurin (NTN)</i> <i>Persephin (PSP)</i> <i>Artemin (ART)</i>	Airaksinen and Saarma 2002; Soler et al. 1999; Pérez-García et al. 2004
Citoquinas <i>Ciliary neurotrophic factor (CNTF)</i> <i>Cardiotrophin-1 (CT-1)</i> <i>Leukemia inhibitory factor (LIF)</i>	Dolcet et al. 2001b; Soler et al. 1999; Forger et al. 2003b
Otros <i>Hepatocyte growth factor (HGF)</i> <i>Insulin growth factor (IGF-1)</i> <i>Vascular endothelial growth factor (VEGF)</i> <i>Pleiotrophin</i> <i>Neuropoetin</i> <i>Mullerian inhibiting substance (MSN)</i> <i>Growth differentiation factor-15 (GDF-15)</i> <i>Progranulin</i> <i>Angiogenin</i>	Wong et al. 1997; Neff et al. 1993; Tolosa et al. 2009; Mi, Chen and Höke 2007; Derouet et al. 2004 Wang et al. 2005; Strelau et al. 2009; Van Damme et al. 2008; Kieran et al. 2008

3.1 Familia de las neurotrofinas

La familia de las neurotrofinas incluye 5 miembros: NGF, **BDNF**, NT-3, NT-4/5 y NT-7. El primer miembro conocido de esta familia fue NGF, el cual se descubrió por su efecto sobre la supervivencia y crecimiento neurítico en las neuronas sensoriales (Levi-Montalcini and Angeletti, 1968). Años más tarde fue descubierto **BDNF** (Barde et al., 1982) y posteriormente NT-3, NT-4/5 y NT-7.

Las neurotrofinas, en particular **BDNF**, se sintetizan inicialmente como precursores o pro-neurotrofinas, las cuales deben ser proteolisadas para obtener neurotrofinas maduras (Mowla et al., 2001). Estos factores pueden ejecutar su función uniéndose a dos tipos de receptores: Trk (*del inglés, Tropomyosin-related kinase*) de los que existen tres isoformas TrkA, TrkB, TrkC y $p75^{NTR}$ (*del inglés, p75 neurotrophin receptor*). Mientras que el receptor $p75^{NTF}$ puede unir todas las neurotrofinas de esta familia, los receptores Trk tienen mayor especificidad para responder a determinadas neurotrofinas. Por ejemplo, NGF se une a TrkA y $p75^{NTF}$; BDNF y NT-4/5 se unen a TrkB y $p75^{NTF}$; y NT-3 se unen a TrkC y $p75^{NTF}$. Existen evidencias de que los dos receptores pueden estar expresados en la misma célula modulando de esta manera la respuesta de las neuronas a las neurotrófinas (revisado en (Miller and Kaplan, 2001)). La unión de la neurotrofina con el receptor Trk provoca la dimerización del mismo y la activación de los dominios quinasas intracelulares que activaran distintas vías de señalización (Figura 7). Algunas de ellas son: PLC γ (revisado en (Patapoutian and Reichardt, 2001)), Ras/MAPK (Marshall, 1995) y PI3K/Akt (Nguyen et al., 2009). Mediante la activación de estas vías, la unión de las neurotrofinas con Trk promueve la supervivencia y diferenciación celular. Estudios realizados sobre el receptor $p75^{NTR}$ demuestran que su activación puede estar implicada tanto en la supervivencia, a través de las vías de señalización PI3-K/Akt y NF- κ B, como en la apoptosis a través de la activación de la vía JNK (Holgado-Madruga et al., 1997; Du et al., 2006); revisado en Kaplan and Miller 2000)).

Las neurotrofinas ejercen una función distinta sobre diferentes poblaciones neuronales. Por ejemplo, **BDNF** promueve la supervivencia de las MNs, sin embargo, no se ha podido demostrar ningún efecto de NGF sobre esta población neuronal. Por otro lado **BDNF** induce la supervivencia no solamente en MNs, si no también y en otros tipos neuronales como las neuronas sensoriales (Gutierrez et al., 2005).

A pesar de que los ratones *knockout* para **BDNF** o TrkB, no presentan efectos sobre la supervivencia de las MNs después del período de PCD (Silos-Santiago et al., 1997), la administración exógena de **BDNF**, durante el período de PCD, rescata un porcentaje de MNs de la muerte (McKay et al., 1996; Ricart et al., 2006).

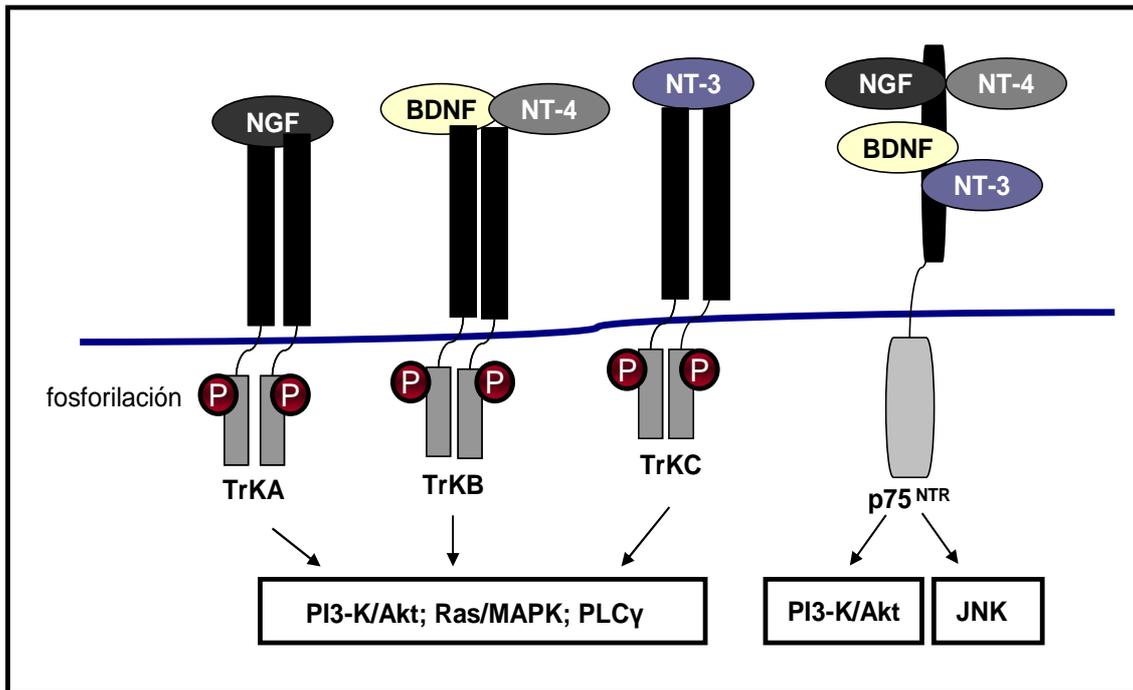


Figura 7. Familia de las Neurotrofinas y sus receptores. Vías de señalización por TrK y p75^{NTR}. Modificado de (Segal, 2003).

3.2 Ligandos de la familia GDNF

Los ligandos de la familia del GDNF (*del inglés, GDNF family ligands, GFLs*) consiste en 4 miembros: **GDNF**, NRTN (Neurturina), ARTN (Artemina) y PSPN (Persefina). El **GDNF** se descubrió en el año 1993 como un factor de crecimiento que promovía la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas (Lin et al., 1993). Un año después, Henderson y colaboradores describieron **GDNF** como un potente regulador de la supervivencia de las MNs (Henderson et al., 1994). Años después, se ha demostrado que todos los factores de GFLs regulan la supervivencia y la diferenciación de distintas poblaciones neuronales (revisado en (Airaksinen and Saarma, 2002)).

Los miembros de GFLs se sintetizan en forma de precursores. Una vez activados, se unen al receptor llamado GFR α 1-4 (*del inglés, GDNF Family Receptor alpha, 1-4*) el que a su vez dimeriza y activa el receptor Ret (*del inglés, Receptor Tyrosine Kinase proto-oncogen*) (Jing et al., 1996; Trupp et al., 1996). Los GFR α pueden activar el receptor Ret de dos formas distintas. En la forma cis-, cuando se encuentran unidos a través de un enlace glicosil fosfatidilinositol a la zona de los *lipid rafts* de la membrana celular o en la forma trans-, cuando se encuentran en forma soluble al medio extracelular. **GDNF** se

une al receptor $GFR\alpha 1$ formando un complejo de alta afinidad el que se une a dos moléculas Ret, que homodimerizan. El homodímero Ret, por su parte, se activa por autofosforilación cruzada de sus dominios de tirosina quinasa. Una vez activo, Ret activa diferentes vías de señalización intracelular dependiendo de proteínas adaptadoras específicas entre las cuales se encuentran Shc y FRS2 (revisado en (Airaksinen and Saarma, 2002)). La activación de los receptores Ret pueden dirigir la supervivencia neuronal activando varias vías de señalización intracelular entre las cuales están: ERK/MAPK (Worby et al., 1996) y PI-3K/Akt (Soler et al., 1999; Gould et al., 2008).

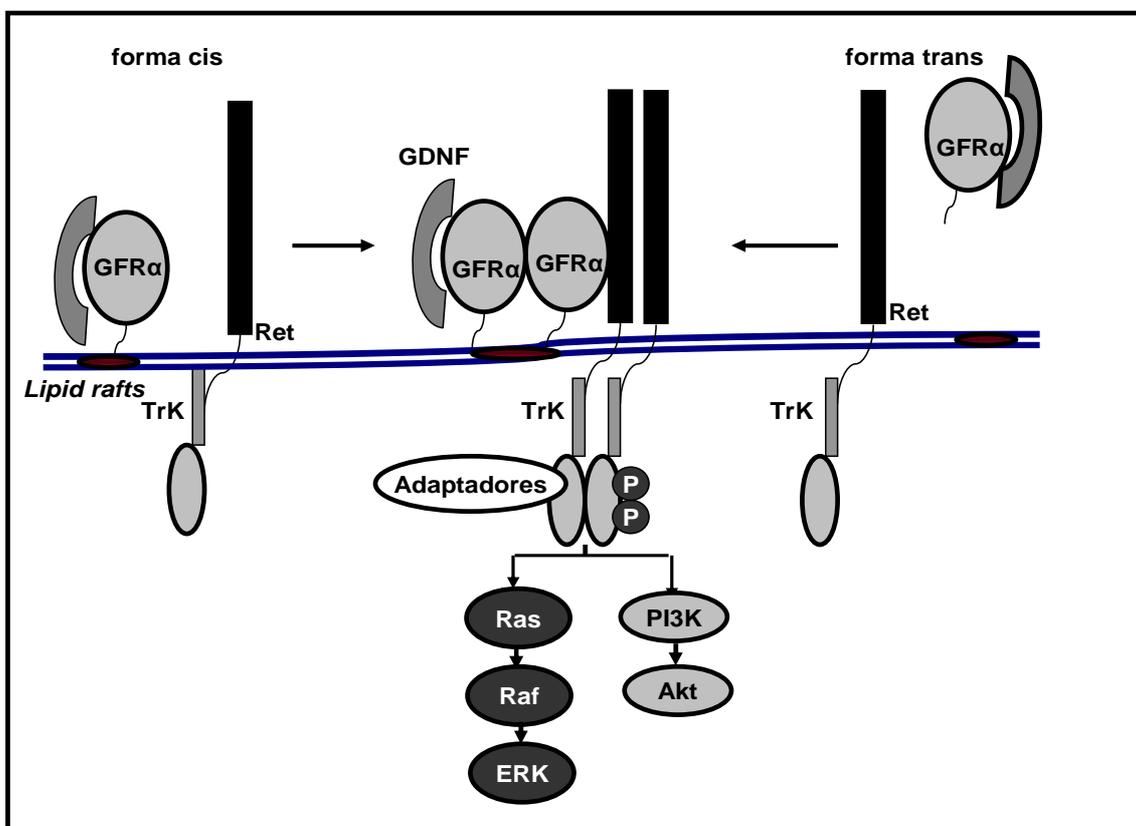


Figura 8. Esquema de la unión de GDNF con su receptor ($GFR\alpha$). Señalización por Ret. Los GFLs se unen a diferentes $GFR\alpha$ que por su parte dimerizan y se unen a Ret activando la actividad tirosina quinasa de Ret. Las $GFR\alpha$ activan Ret de dos formas distintas: cis-cuando pertenecen a *lipids rafts* y de forma trans- cuando están en la forma soluble al medio extracelular. Imagen modificado de (Airaksinen and Saarma, 2002).

Existen cuatro receptores $GFR\alpha$ distintos para cada miembro de la familia GFL donde **GDNF** muestra una afinidad especial para $GFR\alpha 1$ (Figura 8) (Treanor et al., 1996).

En las MNs, el receptor para **GDNF** se expresa antes del periodo de PCD y su depleción durante el desarrollo causa la pérdida del 20-30% de las MNs (revisado en (Gould et al., 2008)).

3.3 Familia de las citoquinas

Existen 4 miembros de la familia de Interleuquina-6 (IL-6) importantes para la supervivencia neuronal: el factor neurotrófico ciliar **CNTF**, la cardiotrofina-1 (**CT-1**), el factor inhibidor de la leucemia (*del inglés, Leucemia inhibitory factor, LIF*) y la citoquina semejante a cardiotrofina-1 (*del inglés, cardiotrophin like cytokine, CLC*). La familia de las citoquinas se ha descrito como una de las más potentes para la supervivencia *in vivo* e *in vitro* de las MNs (Arakawa et al., 1990; Sendtner et al., 1990). Los miembros de esta familia actúan mediante su unión con un receptor heterodimérico compuesto por la glicoproteína 130 (gp130) y el receptor de la tirosina quinasa LIF beta (LIFR β) (Hibi et al., 1996). La activación de estos receptores (gp130/ LIFR β) requieren unos co-activadores: para CNTF y CLC el co-activador es CNTFR α (*del inglés, Cirilary Neurotrophic Factor Receptor α*), mientras que la activación del gp130/ LIFR β por CT-1 implica la unión de otro co-receptor similar del CNTFR α , pero todavía no identificado (Figura 9). Una vez activo el receptor puede activar diferentes vías de señalización en diferentes tipos celulares entre ellas las vías JAK/STAT, PI3-K/Akt y Ras/MAPK bloqueando la vía intrínseca de la apoptosis (Dolcet et al., 2001a).

CNTF fue aislado como un NTF en las neuronas parasimpáticas del ganglio ciliar de embriones de pollo en el año 1979 (Varon et al., 1979). Años más tarde, se demostró su función trófica en neuronas y glía del SNC y SNP (revisado en (Vergara and Ramirez, 2004)). Al contrario de otros NTFs, el **CNTF** se expresa mayoritariamente en el tejido nervioso después del período de PCD. Sin embargo, **CNTF** sintetizado por las células de Schwann, se puede transportar retrógradamente a las MNs espinales (revisado en (Sendtner et al., 2000)). Estudios en ratones *knockout* para CNTF han demostrado que la inhibición de **CNTF** no afecta el número de MNs final durante el desarrollo, pero causa atrofia y pérdida de una subpoblación de MNs tras el nacimiento (revisado en (Sendtner et al., 2000)). Los ratones deficientes para los receptores CNTFR α o gp130 manifiestan una pérdida del ~40% de las MNs durante el periodo de PCD (Burek and Oppenheim, 1996).

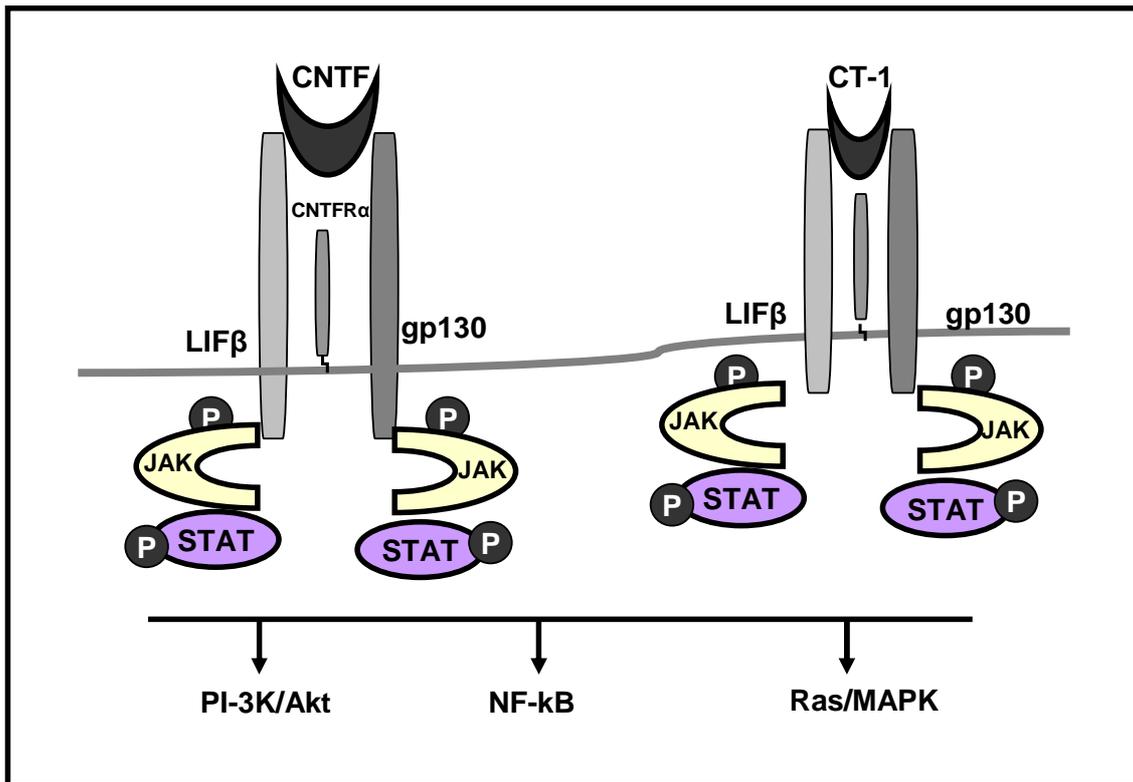


Figura 9. Esquema de CNTF y CT-1 y sus receptores. Activación de la vía de señalización JAK/STAT. Adaptado de (Hendry and John, 2004).

Se ha demostrado el efecto neuroprotector de la administración exógena de **CNTF** en las MNs tras axotomía (Sendtner et al., 1990). Además la delección de **CNTF** en un modelo murino de la enfermedad neurodegenerativa- AME, que afecta las MNs, también agrava el fenotipo de la enfermedad (Simon et al., 2010).

CT-1 fue identificada en 1996 por su actividad hipertrófica sobre las cardiomiocitos (Pennica et al., 1996a). Más tarde, se observaron sus efectos sobre la supervivencia de las MNs espinales en desarrollo (Pennica et al., 1996b). Los ratones *knockout* para **CT-1** pierden un 20-30% de las MNs durante el desarrollo embrionario (Holtmann et al., 2005). A diferencia de CNTF, **CT-1** parece que no es importante para la supervivencia de las MNs a estadios postnatales (Oppenheim et al., 2001), puesto que su ausencia postnatal no causa pérdida de las MNs (Holtmann et al., 2005). No obstante, la administración exógena de **CT-1** en ratones transgénicos modelo de ELA retrasa el inicio de la enfermedad (Bordet et al., 2001) y en modelos murino de AME modula la atrofia muscular y la degeneración axonal (Lesbordes et al., 2003).

4. Principales vías de señalización activadas por los NTFs en el SNC

Los NTFs promueven la supervivencia y diferenciación neuronal a través de su unión a receptores específicos, generando la fosforilación en residuos determinados en la parte intracelular del receptor. Un mismo receptor puede activar distintas vías de señalización formando cada una de ellas una respuesta específica. Las vías, clásicamente implicadas en la supervivencia y diferenciación neuronal activadas por los NTFs son: la vía PI3-K/Akt y la vía Ras/MAPK.

4.1 Vía PI3-K/Akt

PI3-K es una proteína heterodimérica constituida por dos subunidades: la subunidad reguladora de 85 kDa que contiene dos dominios SH2 (p85) y la subunidad catalítica de 110 kDa (p110) (Cantrell, 2001). La fosforilación en los dos residuos de tirosina en los dominios SH2 de la subunidad reguladora causa un cambio conformacional en la subunidad catalítica y la activación de **PI3-K**. Una vez activa, **PI3-K** cataliza la fosforilación de fosfatidil inositol en la posición D3 de su anillo, generando un segundo mensajero- fosfatidil inositol 3-fosfato (*del inglés Phosphatidyl Inositol 3- Phosphatos*, PIP₃). La fosforilación de estas moléculas genera lugares de unión a dominios de homología de plectrina en los PIPs (Ferguson et al., 2000). Los dominios plectrina de las proteínas PDK-1 y **Akt** se unen a PIP₃ provocando su translocación a la membrana plasmática (Figura 10).

La quinasa **Akt** (proteína quinasa B, PKB o Akt) está formada por dos dominios: regulador y quinasa. La activación de Akt depende de su fosforilación en el residuo de la serina 473 en el dominio regulador y en la treonina 308 en el dominio quinasa. Para su activación completa Akt necesita estar fosforilada en los dos residuos a la vez. La fosforilación en estos residuos depende de diferentes quinasas, mientras que la fosforilación en Ser473 está mediada por PDK1, la fosforilación del Thr308 está bajo control del complejo de proteínas mTOR-Rictor-GβL (*del inglés, mammalian target of rapamycin*) (Alessi et al., 1997; Sarbassov et al., 2005). En mamíferos existen 3 isoformas de **Akt**: Akt 1,

Akt 2 y Akt 3 (revisado en (Song et al., 2005)). Todas las isoformas contienen un dominio amino-terminal de homología a plecstrina, un dominio quinasa, y un dominio regulador (revisado en (Song et al., 2005)).

En distintos cultivos primarios de neuronas y en líneas celulares *neuronal-like* se ha demostrado que la vía de señalización PI3-K/Akt se activa respondiendo a la unión de diversos factores tróficos a sus receptores, entre cuales: NGF, BDNF, GDNF, IGF-1; así como en respuesta a neurotransmisores. La activación de Akt es capaz de proteger a las células de la apoptosis, estimular el metabolismo de la glucosa y bloquear de esta manera los cambios conformacionales en Bax que conllevan la salida de citocromo C (Rathmell et al., 2003). En el SNC, la activación final de la vía **Akt** dota a las células de una señal de supervivencia y diferenciación que a su vez bloquea la muerte apoptótica (Figura 10) (revisado en (Frebel and Wiese, 2006)). Los efectos biológicos mediados a través de la activación de **Akt** pueden ser debidos a la regulación directa de la vía apoptótica y al control transcripcional de genes que regulan la supervivencia celular (revisado en (Song et al., 2005)).

La principal función de la señalización por PI3-K es la de promover la supervivencia neuronal. En el sistema nervioso se han descrito muchas proteínas que son susceptibles de ser fosforiladas mediada por Akt, pero solo algunas de ellas han demostrado ser sustratos fisiológicos de la quinasa:

- Forkhead (FKHRL1): este factor de transcripción una vez fosforilado por Akt se retiene en el citosol, es decir queda bloqueada su función como activador de la transcripción de genes pro-apoptóticos tales como Bim y CD95L (Brunet et al., 1999; Gilley et al., 2003; Frebel and Wiese, 2006);
- Bad: Akt bloquea la apoptosis a través de la fosforilación de la proteína pro-apoptótica Bad favoreciendo de esta manera su interacción con la proteína 14-3-3 y permitiendo la liberación de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-x_L (Datta et al., 2000; Vauzour et al., 2007);

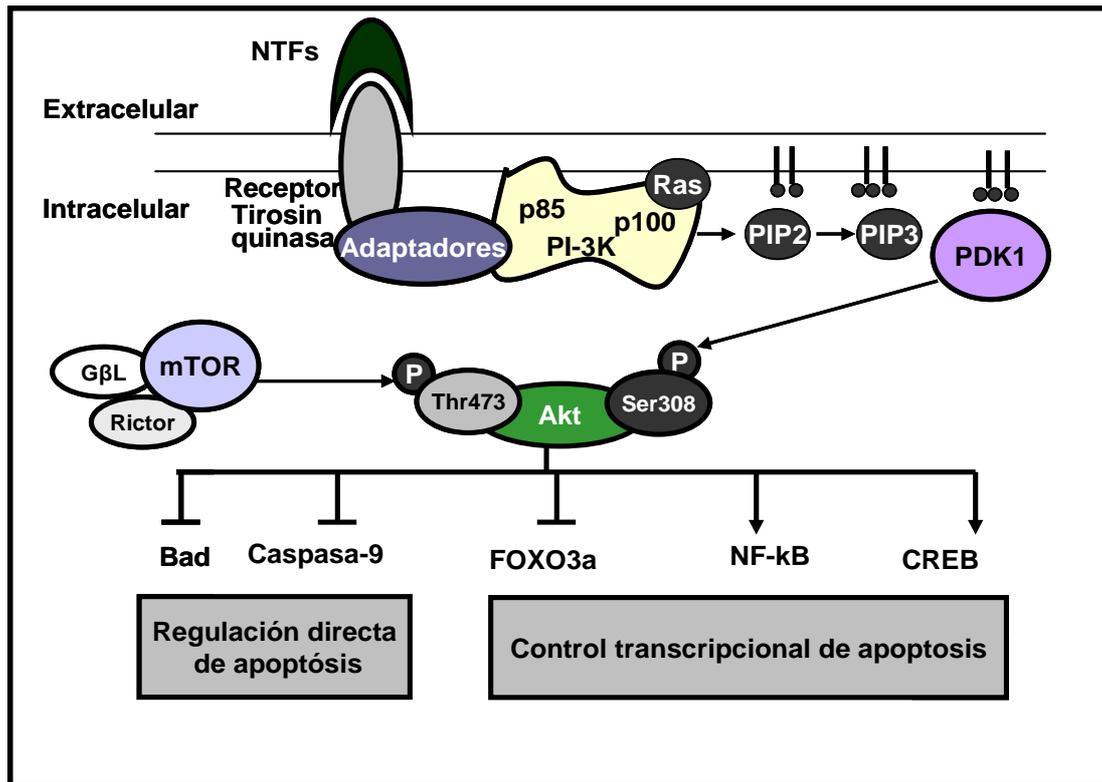


Figura 10. Componentes de la vía de señalización neuronal PI 3-quinasa.

La figura muestra la señalización desde el NTF hasta los targets de PI3K: PDK-1, Akt. Modificado de (Rodgers and Theibert, 2002).

- **Caspasa 9:** La fosforilación de caspasa 9 por Akt inhibe su función proapoptótica (Cardone et al., 1998);
- **CREB:** la fosforilación de CREB por Akt induce la expresión de genes anti-apoptóticos como es el Bcl-2 (Du and Montminy, 1998);
- **IKKβ:** La fosforilación de IKKβ por Akt provoca una liberación del factor de transcripción NF-κB de su inhibidor y consecuentemente su translocación en el núcleo activando la expresión de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-x_L (Ozes et al., 1999; Madrid et al., 2000)).

El efecto de la vía PI3-K/Akt sobre la supervivencia se ha observado en varias poblaciones neuronales, incluyendo las MNs (Dolcet et al., 1999; Soler et al., 1999; Nishimune et al., 2000), neuronas corticales (Hetman et al., 1999), neuronas simpáticas (Creedon et al., 1997) y neuronas del hipocampo (Righi et al., 2000). Por otro lado, se han relacionado los cambios en el patrón de la fosforilación de Akt con diversas patologías neuronales como son la isquemia cerebral o lesión de los axones de las MNs (Jin et al., 2000; Sakurai et al., 2001), así como con enfermedades neurodegenerativas como ELA (Wagey et

al., 1998; Humbert et al., 2002; Li et al., 2003a) y Alzheimer (Zubenko et al., 1999; Lee et al., 2009).

A parte de la implicación de la vía PI3K/Akt en la supervivencia neuronal, se ha descrito también su implicación en fenómenos de diferenciación como la elongación neurítica y arborización axonal (revisado en (Markus et al., 2002; Dijkhuizen and Ghosh, 2005)).

4.2 Vía de señalización Ras /MAPK

La vía de señalización Ras/MAPK promueve la supervivencia neuronal como respuesta a la señalización iniciada por diversos NTFs. La unión de los NTFs con sus receptores específicos induce la activación de una proteína con actividad GTP-asa llamada Ras. Por su parte Ras se une de una forma específica a las quinasas Raf induciendo su co-localización en la membrana (revisado en (Chong et al., 2003)). Seguidamente, Raf activa a las quinasas MEK1 y 2, que fosforilan por su parte ERK1 y ERK2 (revisado en (Kolch, 2005)). Una vez fosforilada, ERK se acumula en el núcleo dónde regula la transcripción de varios genes mediante la activación de diversos factores de transcripción como CREB, c-Myc, Elk1, ect. (Chen et al., 1992; Lenormand et al., 1993; Frebel and Wiese, 2006) (Figura 11). Los análisis realizados en la línea celular PC12 donde MAPK estaba inhibida demostraron un bloqueo completo de la expresión de Bcl-2 inducidos por NGF confirmando que Bcl-2 es una de las diana transcripcional para la vía Ras/MAPK y demostrando una regulación directa de esta vía en el control de la apoptosis (Liu et al., 1999).

Existe una estrecha relación entre las vías de señalización PI3-K/Akt y Ras/MAPK, puesto que en algunos tipos neuronas la activación de ambas vías regula la transcripción génica mediante los mismos factores de transcripción, como es en el caso de CREB en neuronas estríatales (Du and Montminy, 1998; Perkinton et al., 2002; Ha and Redmond, 2008). Además, tanto PI3-K/Akt como Ras/MAPK participan en la fosforilación de la proteína pro-apoptótica Bad (Bonni et al., 1999).

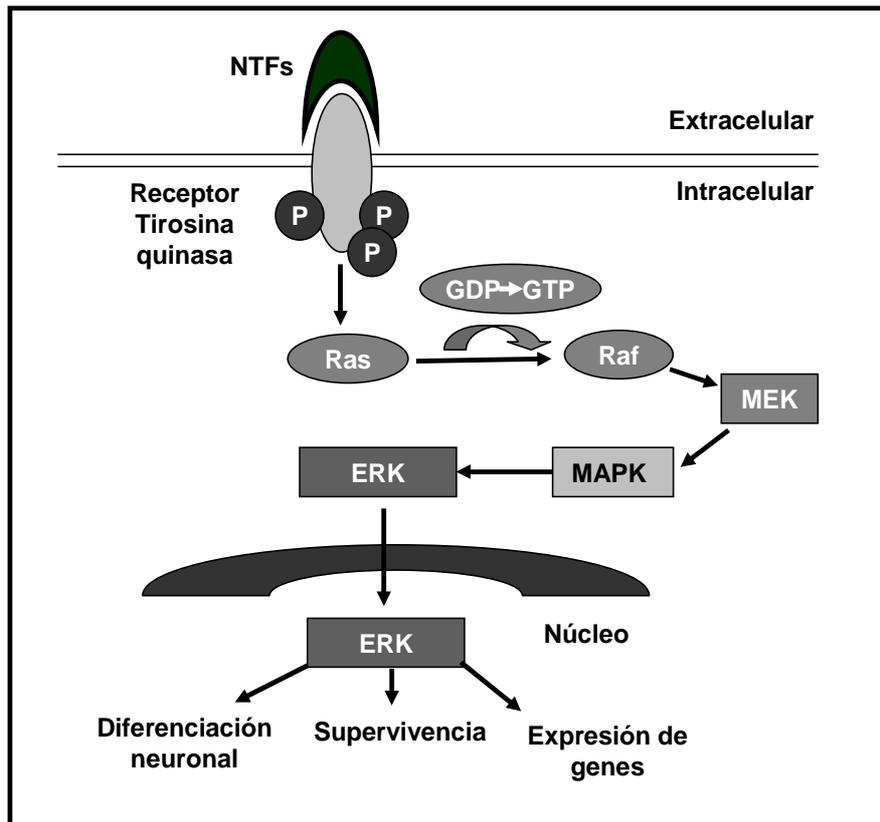


Figura 11. Esquema de la vía de señalización Ras/MAPK.

5. Nuclear Factor-kappaB (NF- κ B)

El factor de transcripción nuclear kappaB (NF- κ B) fue descubierto en 1986 en el laboratorio de D. Baltimore. Observaron que actuaba como modulador de la transcripción de la cadena ligera (*light chain*) de las inmunoglobulinas en los linfocitos B (Sen and Baltimore, 1986). Estudios posteriores demostraron que NF- κ B es un factor de transcripción nuclear dimérico de expresión ubicua implicado en la regulación de diversos procesos celulares como inflamación, adhesión, proliferación, diferenciación, apoptosis y oncogénesis (revisado en (Karin and Lin, 2002)).

5.1 Familia de factores de transcripción NF- κ B

NF- κ B es un dímero constituido por proteínas de la familia Rel. Los miembros de esta familia son los encargados de activar la transcripción de los genes diana de la vía. En mamíferos, NF- κ B está constituida por 5 miembros: RelA (p65), RelB, c-Rel, NF- κ B1 (p50) y NF- κ B2 (p52) (Figura 12 y Figura 13), las que pueden clasificarse en dos subfamilias:

1. **Subfamilia I:** incluye los miembros con dominio TAD (*del inglés transcription activation domain*): **RelA**, **c-Rel** y **RelB**, que son sintetizados en su forma madura (Figura 12).
2. **Subfamilia II:** incluye los miembros sin dominio TAD **NF- κ B1 (p50)** y **NF- κ B2 (p52)**: p50 y p52 son los productos maduros generados a partir de los precursores p105 y p100 (Figura 13).

Referente a su estructura todos los miembros de la familia NF- κ B presentan un dominio N-terminal común llamado RHD (*del inglés Rel homology domain*). Este dominio está formado por 300 aminoácidos y es responsable de la dimerización entre los distintos miembros de la familia NF- κ B (Hoffmann et al., 2006), de la asociación con el inhibidor I κ B, de la unión con los motivos κ B del DNA y, también en este dominio, es donde se encuentran las secuencias de localización nuclear llamada NLS (*del inglés Nuclear Localization Sequence*) (Baeuerle and Henkel, 1994). Los miembros de la subfamilia I: RelA (p65), c-Rel, y RelB presentan un dominio de activación transcripcional llamado TAD, en la región C-terminal. El dominio TAD es necesario para la regulación positiva de la expresión génica (revisado en (Hayden and Ghosh, 2008)). Aunque las funciones de los dominios RHD y TAD son muy distintas, ambos dominios pueden “sufrir” modificaciones *post-transduccionales* que pueden afectar la activación transcripcional de NF- κ B así como su unión con el DNA (revisado en (Hayden and Ghosh, 2008)).

En la mayoría de las células, las proteínas de la familia NF- κ B se encuentran en el citosol en forma inactiva, formando homo- y/o heterodímeros. El heterodímero RelA/p50 la forma más abundante en las células de los mamíferos (revisado en (Ghosh and Karin, 2002)). En respuesta a varios estímulos, entre los cuales en el SN podemos destacar los NTFs, el estrés oxidativo, la inflamación, etc., se puede inducir la translocación nuclear de NF- κ B. Una vez en el núcleo los dímeros NF- κ B se unen a los motivos κ B (GGGRNNYYCC, donde R representa bases purínicas, Y representa bases pirimidínicas y N representa cualquier base) dentro de los promotores de los genes diana regulando su transcripción mediante la unión de co-activadores o co-represores (revisado en (Mémet, 2006; Hayden and Ghosh, 2008)).

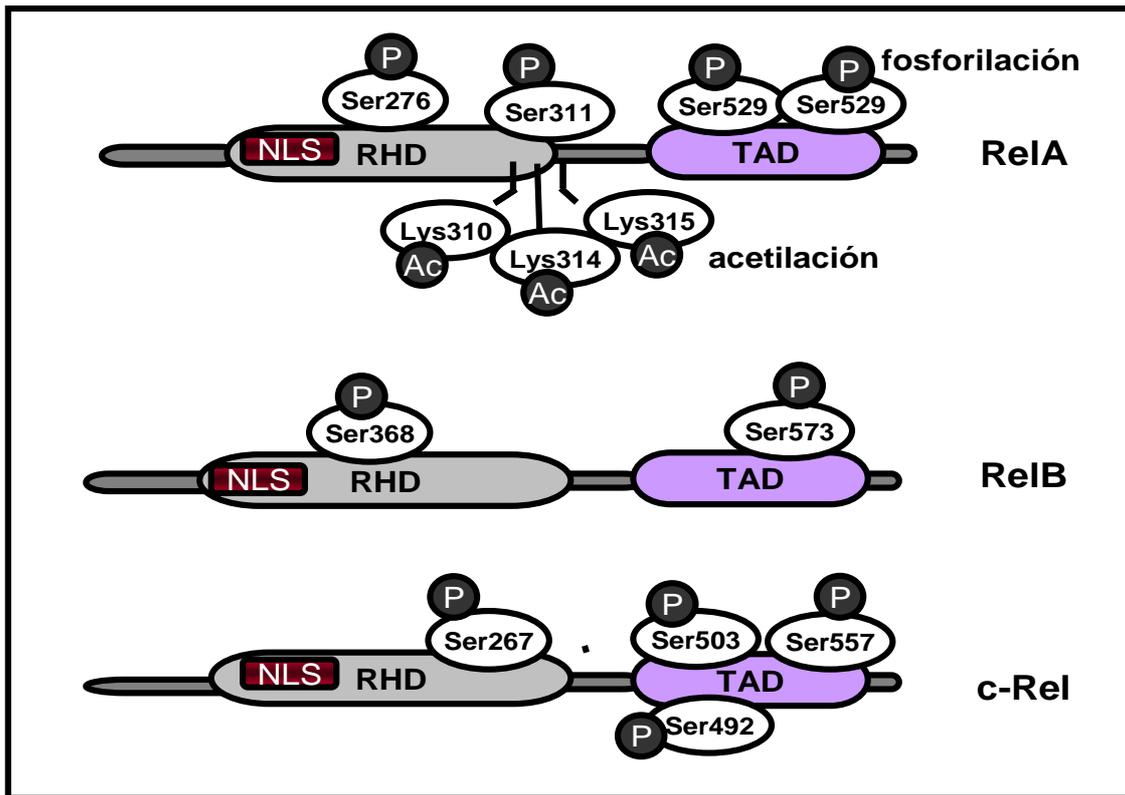


Figura 12. Esquema de los miembros de la sub-familia I de NF-κB. Modificado de (Hayden and Ghosh, 2004, 2008).

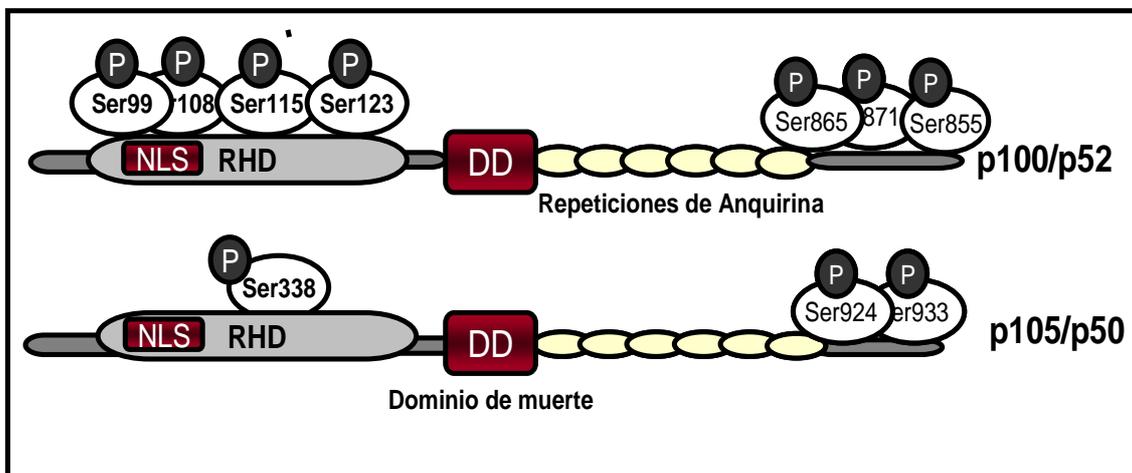


Figura 13. Esquema de los miembros de la sub-familia II de NF-κB. Modificado de (Hayden and Ghosh, 2004, 2008).

En ausencia de los estímulos activadores de la vía NF-κB, los homodímeros de p50 y/o p52 están unidos a los motivos κB en los promotores de genes diana bloqueando su modificación. La activación de la vía, promueve el desplazamiento de los p50/p50 y p52/p52, dando lugar a la unión de los dímeros NF-κB con dominio TAD (RelA, RelB o c-Rel) activando o reprimiendo la expresión de genes diana (revisado en (Ghosh et al., 1998)).

5.2 Inhibidores de NF- κ B (I κ B)

En la mayoría de los tipos celulares los dímeros de NF- κ B se encuentran predominantemente retenidos en el citosol formando un complejo con proteínas inhibidoras de la familia I κ B. Por lo tanto, estas proteínas mantienen la vía NF- κ B inactiva. No obstante, en respuesta a diferentes estímulos los dímeros NF- κ B del citosol son liberados de su inhibidor y se translocan al núcleo donde regularán la transcripción de genes específicos (revisado en (Perkins, 2006)).

En mamíferos se han descrito seis isoformas de la proteína inhibidora I κ B: I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , I κ B γ , I κ B δ , y Bcl-3 (Figura 14). Todas ellas tienen en común su estructura tridimensional y se distinguen por el número de repeticiones de los dominios de anquirina responsables de la interacción con el dímero de NF- κ B (Baeuerle, 1998). La unión de las proteínas I κ B con los dímeros NF- κ B, oculta una de las dos secuencias NLS, por ello, el dímero debe primero disociarse del inhibidor I κ B para alcanzar su destino nuclear. El proceso de separación de I κ B requiere su fosforilación. Una vez fosforiladas, las proteínas I κ B son ubiquitinizadas y degradadas a través del proteasoma (revisado en (Ghosh et al., 1998)).

Las I κ B α e I κ B β son las isoformas de la proteína inhibidora I κ B que se encuentran prácticamente en todos los tipos celulares y que por ello regulan la mayor parte de los efectos de NF- κ B.

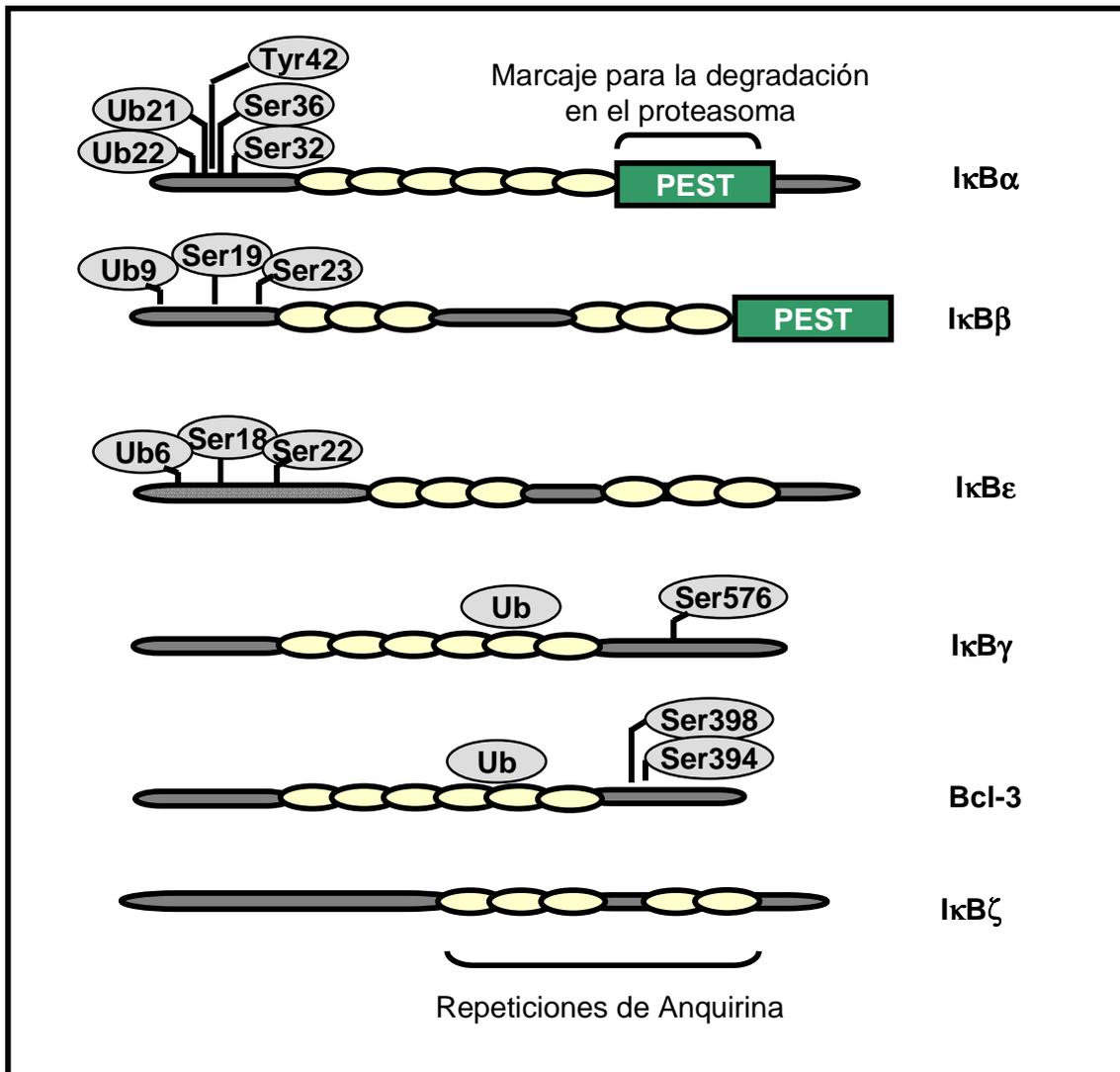


Figura 14. Esquema de los miembros de la familia IκB.
Modificado de (Hayden and Ghosh, 2004, 2008).

La **IκBα** es la isoforma que presenta la cinética de degradación más rápida de las proteínas IκB. En su extremo N-terminal, se encuentran los residuos susceptibles de fosforilación y también se sitúan los dominios de la proteína que enmascaran las señales de localización nuclear de NF-κB (Luque and Gélina, 1998). Tras el estímulo activador de la vía NF-κB, IκBα es fosforilada en los residuos Ser32 y Ser36 por un complejo de serina-treonina quinasas llamado IKKs (IκB quinasas), que conlleva la liberación del dímero NF-κB

Una vez fosforilado, IκBα se poliubiquitina en los residuos de lisina 21 y 22, y se degrada en el proteosoma 26S (Chen et al., 1995; Scherer et al., 1995; DiDonato et al., 1996; Hayden and Ghosh, 2004) (Figura 15). Sin

embargo, la ausencia de I κ B α después de su degradación en el proteasoma es transitoria ya que la activación de NF- κ B induce de forma rápida la transcripción *de novo* del inhibidor al unirse al motivo κ B presente en su promotor. Por ejemplo, en células PC12, 1h después de la degradación de I κ B α aparecen nuevamente niveles detectables de esta proteína (Bui et al., 2001a). Dentro del núcleo I κ B α puede unir los dímeros NF- κ B disociando el factor del DNA y gracias a la presencia de las secuencias de exportación nuclear (NES) puede remover las formas activas de NF- κ B del núcleo al citosol, convergiéndolas en formas inactivas (Tam et al., 2000). Esto sugiere que I κ B α , impide una activación desmesurada de la vía NF- κ B puesto que es uno de los primeros genes que se transcriben tras la entrada de NF- κ B al núcleo.

Sin embargo, I κ B α puede separarse de NF- κ B al ser fosforilado el residuo Tyr42 (Bui et al., 2001a; Takada et al., 2003; Gallagher et al., 2007a). Esta fosforilación induce la separación del inhibidor I κ B α de NF- κ B pero no su degradación en el proteasoma como ocurre en respuesta a la fosforilación de los residuos de serina. La activación de la vía NF- κ B de esta segunda forma no implica la disminución de los niveles del inhibidor y su re-síntesis consecutiva en las primeras dos horas tras la activación de la vía (Imbert et al., 1996a).

Los **p105** y **p100** presentan también repeticiones de dominios anquirina en su extremo C-terminal por lo que pueden considerarse tanto como proteínas inhibidoras así como factores de transcripción (revisado en (Ghosh et al., 1998)).

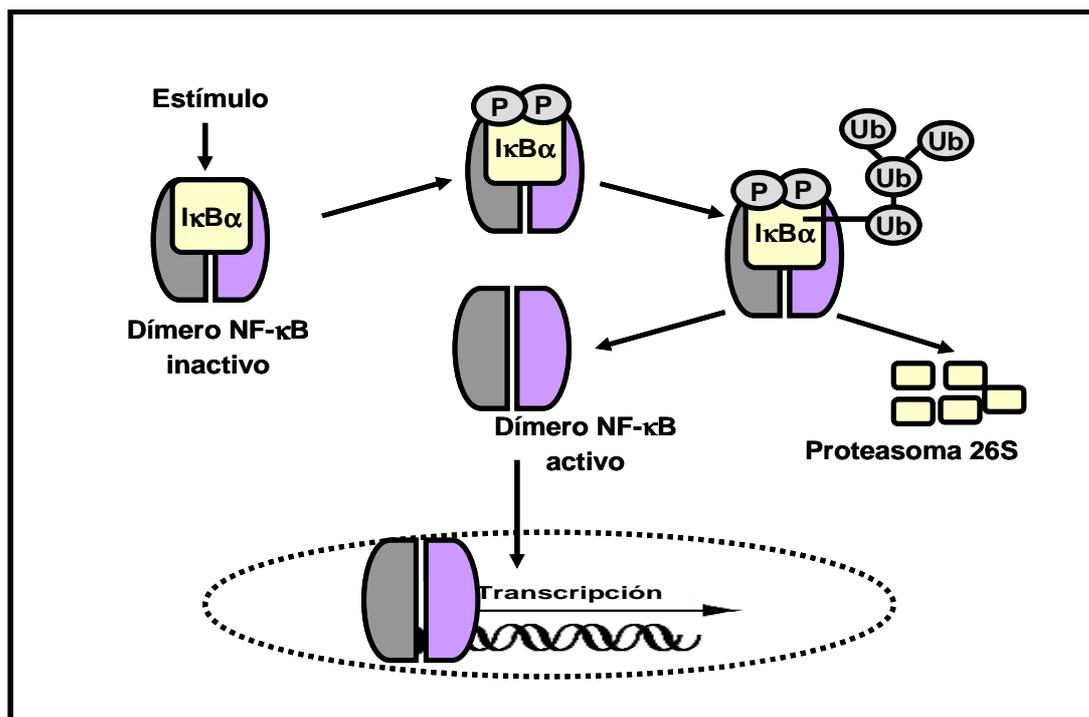


Figura 15. Esquema de activación de la vía NF-κB mediante la liberación del dímero NF-κB del inhibidor IκB.

5.3 IκB quinzasas (IKKs)

La fosforilación del inhibidor IκB en respuesta a distintos estímulos, requiere la activación catalítica de unas serina-treonina quinzasas llamadas IκB quinzasas (IKKs). El complejo IKK está constituido por 3 subunidades: dos con dominio quinasa, IKKα e IKKβ, y una subunidad reguladora, NEMO (IKKγ) (Figura 16). Las quinzasas IKKα e IKKβ contienen tres dominios: un dominio quinasa, un dominio *helix-loop-helix* y un dominio de *leucine zipper* (Woronicz et al., 1997; Zandi et al., 1997; Häcker and Karin, 2006). Su dominio catalítico muestra un 65% de homología, a pesar de ello las dos quinzasas difieren significativamente en sus funciones. El dominio *helix-loop-helix* es responsable de la unión de IKKα e IKKβ con NEMO y está implicado en la modulación de su actividad quinasa (May et al., 2000). A través del dominio *leucine zipper* las IKKα e IKKβ interactúan formando homo- o heterodímeros, siendo la catálisis inducida por los heterodímeros más eficientes que los homodímeros (Huynh et al., 2000).

Los mecanismos exactos por los cuales se activan las IKKs son todavía desconocidos, sin embargo, se conoce que para su activación necesitan estar fosforiladas en dos residuos de serina que se encuentran en el *loop* de

activación (las Ser 177 y 181 para IKK β , y las Ser 176 y 180 para IKK α) (Schomer-Miller et al., 2006).

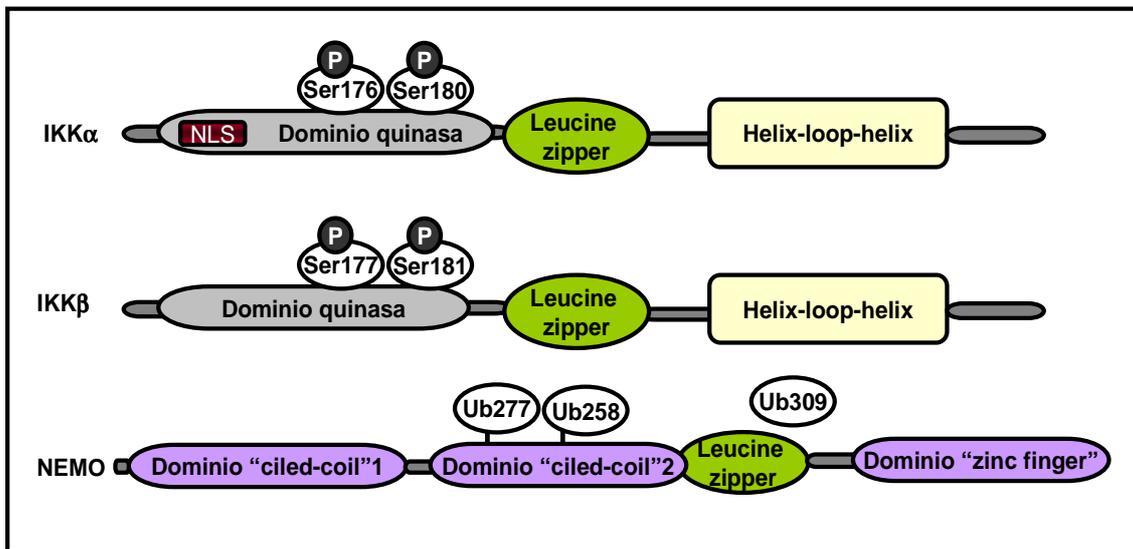


Figura 16. Esquema de los miembros del complejo IKKs. Modificado de (Hayden and Ghosh, 2004, 2008).

Las IKKs tienen diferente distribución celular, mientras IKK β e IKK α están localizadas en el citosol, solamente IKK α , gracias a su secuencia NLS en el dominio quinasa, está localizada en el núcleo (Yamamoto et al., 2003; Scotto d'Abusco et al., 2010). Esto sugiere que IKK α podría tener una función nuclear adicional en la activación de NF- κ B.

5.4 Ratones knockout para distintos miembros de la vía NF- κ B

Los ratones *knockout* para los distintos genes componentes de la activación de la vía NF- κ B, permiten estudiar la implicación de cada uno de ellos en los procesos fisiológicos de diferentes tipos celulares (Tabla 2).

RelA^{-/-} : Los ratones *knockout* para RelA mueren durante su desarrollo embrionario (E15-16) por apoptosis masiva del hígado (Beg et al., 1995a). Estudios realizados con estos ratones determinaron la importancia de RelA en la respuesta a los linfocitos de los antígenos mediada por citoquinas Prendes (Prendes et al., 2003). En el SN, la falta de RelA disminuye la supervivencia de las neuronas sensoriales en respuesta a NGF (Hamanoue et al., 1999); así

como afecta la mielinización de las células de Schwann *in vitro* (Nickols et al., 2003) y promueve la pérdida de crecimiento axonal en las neuronas corticales en E15 (Sole et al., 2004).

RelB^{-/-} : Los ratones *knockout* para RelB no muestran defectos durante su desarrollo embrionario (Weih et al., 1995). Sin embargo, en el adulto manifiestan defectos en la estructura secundaria de los órganos linfoides y una anomalía en la hematopoyesis a lo largo de su vida (Yilmaz et al., 2003).

c-Rel^{-/-} : Los ratones *knockout* para c-Rel^{-/-} no manifiestan defectos en su desarrollo. La transcripción de c-Rel se detecta tarde en el desarrollo embrionario de ratón, con un patrón de expresión similar a la aparición y diversificación de las células hematopoyéticas. Se observan defectos en la proliferación de los linfocitos; la inmunidad humoral y la expresión de la IL-2, IL-6; la producción de óxido nítrico, así como defectos en ciclo celular (Köntgen et al., 1995; Grumont et al., 1998; Deenick et al., 2010). En el SN la falta de c-Rel provoca defectos en la supervivencia neuronal y la plasticidad sináptica relacionada con los procesos de aprendizaje (Pizzi et al., 2005; Ahn et al., 2008)

p50^{-/-} : Los ratones *knockout* para p50 se desarrollan normal, aunque muestran cambios en la función del sistema inmune relacionados con el bloqueo del ciclo celular de los linfocitos B y con un aumento de la apoptosis mediada por los mitógenos (Sha et al., 1995b; Grumont et al., 1998). A nivel SNC, estos ratones manifiestan cambios patológicos en el hipocampo, así como activación de caspasas y muerte apoptótica en la glía y en las neuronas (Lu et al., 2006). Los ratones *knockout* para p50 muestran incremento en el daño neuronal en respuesta a excitotoxicidad (Yu et al., 1999), así como un aumento en la apoptosis en las neuronas estriatales en modelos de enfermedad de Huntington (Yu et al., 2000).

p52^{-/-} : Los ratones deficientes para p52 presentan un desarrollo normal. Sin embargo, se observan defectos en la arquitectura de los ganglios linfáticos y en la respuesta de las células T (Franzoso et al., 1998; Beinke and Ley, 2004).

IKK α ^{-/-} Los ratones *knockout* para IKK α mueren poco después de nacer por anomalías en la piel y en el esqueleto, causadas por el bloqueo de la diferenciación de los queratinocitos (Li et al., 1999b). Estudios más detallados demostraron que la desactivación de la secuencia NLS en el dominio quinasa de IKK α inhibe la diferenciación, indicando la función básica de IKK α en los queratinocitos (Sil et al., 2004).

IKK β ^{-/-} : Los ratones *knockout* para IKK β mueren por apoptosis hepática masiva en E12.5-13.5. Muestran una sensibilidad a TNF α y en la supervivencia condicional de las células B y una reducción de la activación de RelA en las células hepáticas (Li et al., 1999a; Li et al., 2003b).

IKK γ ^{-/-} : Los ratones IKK γ ^{-/-} mueren durante la embriogénesis, en E10-11, por apoptosis hepática inducida por la estimulación con TNF α (Rudolph et al., 2000). Defectos en estos ratones se han detectado en el desarrollo de las células B inmaduras (Kim et al., 2003).

Tabla 2 Fenotipos de ratones *knockout* para la familia Rel y IKKs.

Ratón <i>knockout</i>	Fenotipo/Alteraciones	Referencia
RelA	Muerte embrionaria en E15-16; sensibilidad a TNF α y muerte apoptótica de hepatocitos, macrófagos y fibroblastos	Beg et al, 1996; Hamanoue et al, 1999
RelB	Múltiples lesiones patológicas; eliminación de células T; defectos en el desarrollo de los órganos linfocitos secundarios	Weih et al, 1995; Yilmaz et al, 2003; Freyschmidt, E. J. et al, 2007
c-Rel	Defectos en: la proliferación de linfocitos, la inmunidad humoral y la expresión de la IL-2; bloqueo del ciclo celular en G ₀ ; resistencia a la artritis; la supervivencia neuronal; la formación de la plasticidad sináptica	Köntgen, F. et al, 1995; Grumont, R. J. et al, 1998;; Pizzi et al, 2002; Ahn et al, 2008; Deenick et al, 2010
p50	Defectos en la respuesta inmune, resistencia a la artritis; degeneración neuronal; irregularidades del sueño	Sha et al, 1995; Grumont et al, 1998; Yu et al, 2000; Lu ZY et al, 2006;
p52	Desarrollo normal, anomalía en el desarrollo de los ganglios linfáticos; defectos en la respuesta de las células T	Franzoso et al, 1998; Beinke and Ley, 2004
IKKα	Mueren al día después de nacer; bloqueo en la diferenciación de los queratinocitos; defectos esqueléticos y epidérmicos	Hu et al, 1999; Takeda et al, 1999; Li et al, 1999
IKKβ	Muerte embrionaria en E12.5-13.5; apoptosis hepática; sensibilidad a TNF α ; supervivencia condicional de las células B	Li et al, 1999; Li et al, 2003
NEMO	Muerte embrionaria en E10-13; apoptosis hepática; fallos en el desarrollo de las células T y B; aumento en la apoptosis de las células B	Rudolph D et al, 2000; Kim et al, 2003

Para poder evaluar la implicación de cada uno de los distintos dímeros NF- κ B en diversos procesos fisiológicos se han diseñado ratones doble *knockout*. Algunos de ellos se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Fenotipo de ratones doble *knockout* para distintos miembros de la vía NF- κ B

Ratones doble <i>knockout</i>	Fenotipo/Alteraciones	Referencia
IKKα/β	Muerte embrionaria E12.5; sensibilidad al TNF α ; defectos en el tubo neural.	Li et al, 2000
p50/p52	Retraso del crecimiento y anomalías craneofacial; graves defectos en el desarrollo del órganos linfoides secundarios.	Franzoso et al, 1997; Lo et al, 2006
c-Rel/p50	Defectos en el sistema inmune más graves que en los mutantes individuales de cada proteína.	Pohl et al, 2002
RelB/p50	Fenotipo parecido a los ratones <i>knockout</i> para RelB.	Weih et al, 1997
RelA/p50	Mueren al estado embrionario E13 ; defectos en el desarrollo de las células B.	Horwitz et al, 1997
RelA/c-Rel	Mueren al ~ E13; reducción en los números de las células B y las monocitos; aumentos en las granulocitos; inhibiendo el ciclo celular de células T.	Grossmann et al, 2000

5.5 Señalización por la vía NF- κ B

Se han descrito tres mecanismos distintos de activación de la vía NF- κ B: la vía canónica, la no-canónica y la atípica. Los dos primeros se caracterizan por ser IKK-dependientes, mientras que la forma atípica es IKK-independiente. La activación de estas tres vías responde a estímulos distintos lo que conlleva la translocación nuclear de diferentes dímeros de la familia NF- κ B

5.5.1 Vía canónica de activación de NF- κ B

La vía canónica (clásica) es la forma más común de activación de la NF- κ B en todos los tipos celulares. Está relacionada con la activación de dímeros compuestos por RelA o c-Rel y p50. La forma de NF- κ B más abundante en las células de mamíferos es RelA/p50. Basicamente, la vía canónica se activa en respuesta a citoquinas pro-inflamatorias como TNF α , IL-1; a los NTFs; a la privación de glucosa; al estrés oxidativo y etc. (revisado en (Hayden and Ghosh, 2004)). La activación de esta vía depende de la fosforilación de las quinasas IKK α e IKK β en los residuos de Ser181 y Ser180, respectivamente. El complejo IKK activo fosforila I κ B α en las Ser32 y Ser36 marcándolas así para su poliubiquitinación y posterior degradación en el proteasoma 26S. Por otro lado, la activación de IKK α e IKK β provoca la fosforilación de p105, el cual, tras un procesamiento proteolítico da lugar a la forma madura p50 (revisado en (Perkins, 2007)). Una vez liberado de su inhibidor, la NLS de RelA queda expuesta, lo que conlleva su translocación nuclear donde desarrolla su función transcripcional uniéndose a los motivos κ B en el DNA (Figura 17), activando la expresión de genes determinados entre los cuales están: *Bcl-2*, *Bcl-x_L*, *Bax*, *IAPs*, *Bim*, *Mn-SOD*, *I κ B α* (ver Tabla 5).

Las dos quinasas IKK α e IKK β no tienen la misma importancia en la activación de la vía canónica de NF- κ B. La IKK β se ha descrito como la quinasa predominante en la fosforilación del I κ B α y del p105 (revisado en Hayden and Ghosh 2004). En los ratones *knockout* para IKK β se observa una inhibición de la degradación de I κ B α y de la activación de RelA (Li et al., 2003b). Además, estos ratones, muestran un fenotipo similar a los ratones *knockout* para RelA, sugiriendo un efecto principal de IKK β en la activación de

la vía canónica de NF- κ B (Beg et al., 1995b; Li et al., 1999a). Sin embargo, otros estudios demuestran que la activación de IKK α es necesaria para la expresión génica mediante la vía canónica de NF- κ B (Solt et al., 2007).

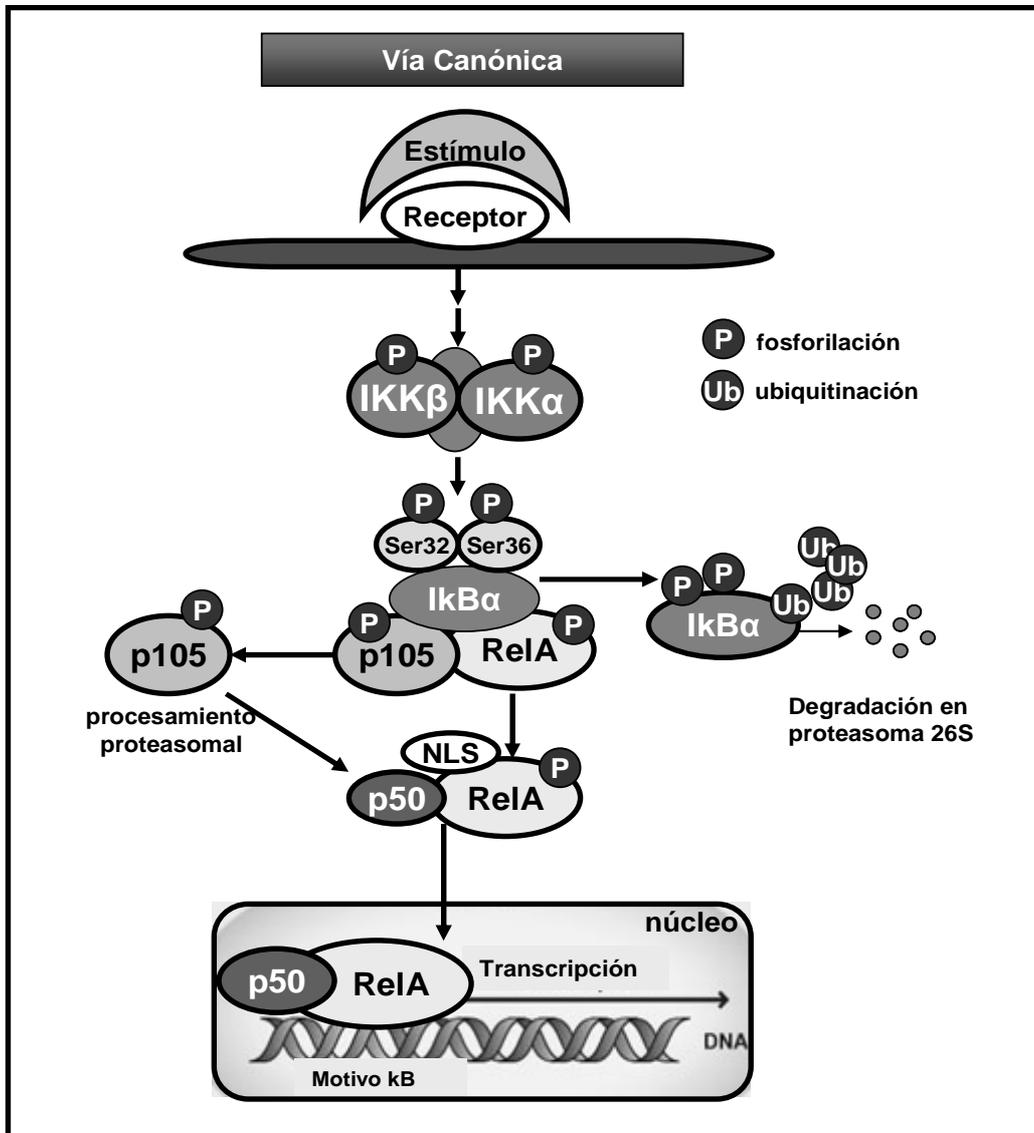


Figura 17. Activación de la vía canónica de NF- κ B.

5.5.1 Vía no-canónica de activación de NF- κ B

La vía no-canónica, también conocida como **I κ B independiente**, se caracteriza por la activación del heterodímero RelB/p52. Generalmente la activación de esta vía está relacionada con un número limitado de estímulos que incluyen la limfotoxina B, el ligando de CD40, y el factor de la activación de las células B (Camandola and Mattson, 2007). La activación de la vía no-canónica de NF- κ B depende de la activación de homodímeros IKK α a través de

una quinasa llamada NIK (*NF- κ B-inducing kinase*) (revisado en (Häcker and Karin, 2006; Scheidereit, 2006; Sun, 2011) (Figura 18).

La activación de NIK lleva a cabo la fosforilación IKK α la cual por su parte es la responsable de la fosforilación de p100, que tras un procesamiento en el proteasoma da lugar a la forma activa, p52 (Senftleben et al., 2001; Xiao et al., 2004; Liang et al., 2006). La forma madura- p52 se une a RelB provocando su translocación nuclear y la respuesta génica.

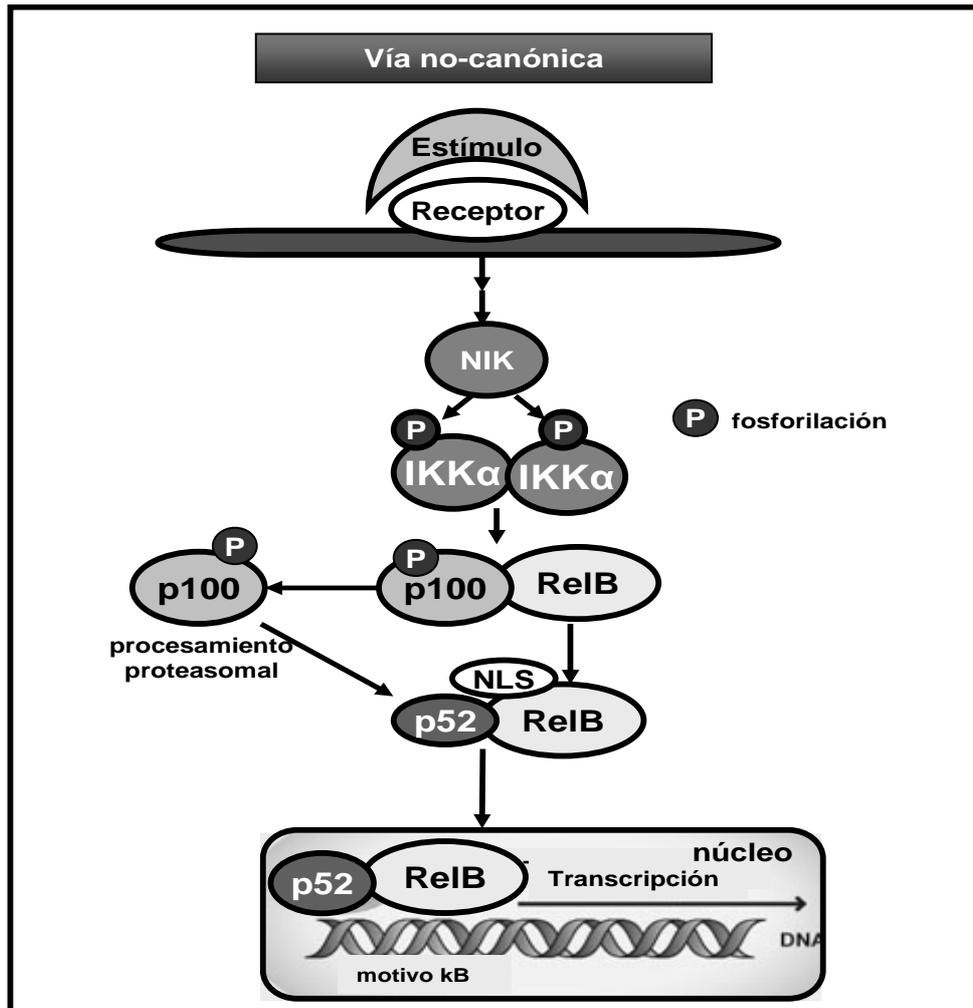


Figura 18. Activación de la vía no-canónica de NF- κ B.

Puesto que la degradación de I κ B α y el corte de p100 implican diferentes poblaciones de dímeros NF- κ B, la vía canónica y la no-canónica de NF- κ B participan en la regulación transcripcional de diferentes genes. Para la vía no-canónica son por ejemplo, *Cox-2*, *ciclina D*, *Mn-SOD* y *Bcl-x_L* (Jacque et al., 2005; Zhang et al., 2007; Holley et al., 2010).

5.5.2 Vía atípica de activación de NF- κ B

La activación de esta vía está relacionada con la regulación IKK independiente de NF- κ B y está caracterizada por la fosforilación de I κ B α en Tyr 42 y con la activación de RelA/p50 (Bender et al., 1998; Kato et al., 2003). Diversos estímulos provocan la activación de la vía atípica en el SN entre los cuales están: los NTFs, el peróxido o la eritropoetina (Bui et al., 2001a; Takada et al., 2003; Gallagher et al., 2007a). Una vez fosforilado, I κ B α se separa del heterodímero RelA/p50, permitiendo que el complejo NF- κ B entre en el núcleo y active la expresión de diversos genes entre los cuales está *Bcl-x_L* (Bui et al., 2001b) (Figura 19).

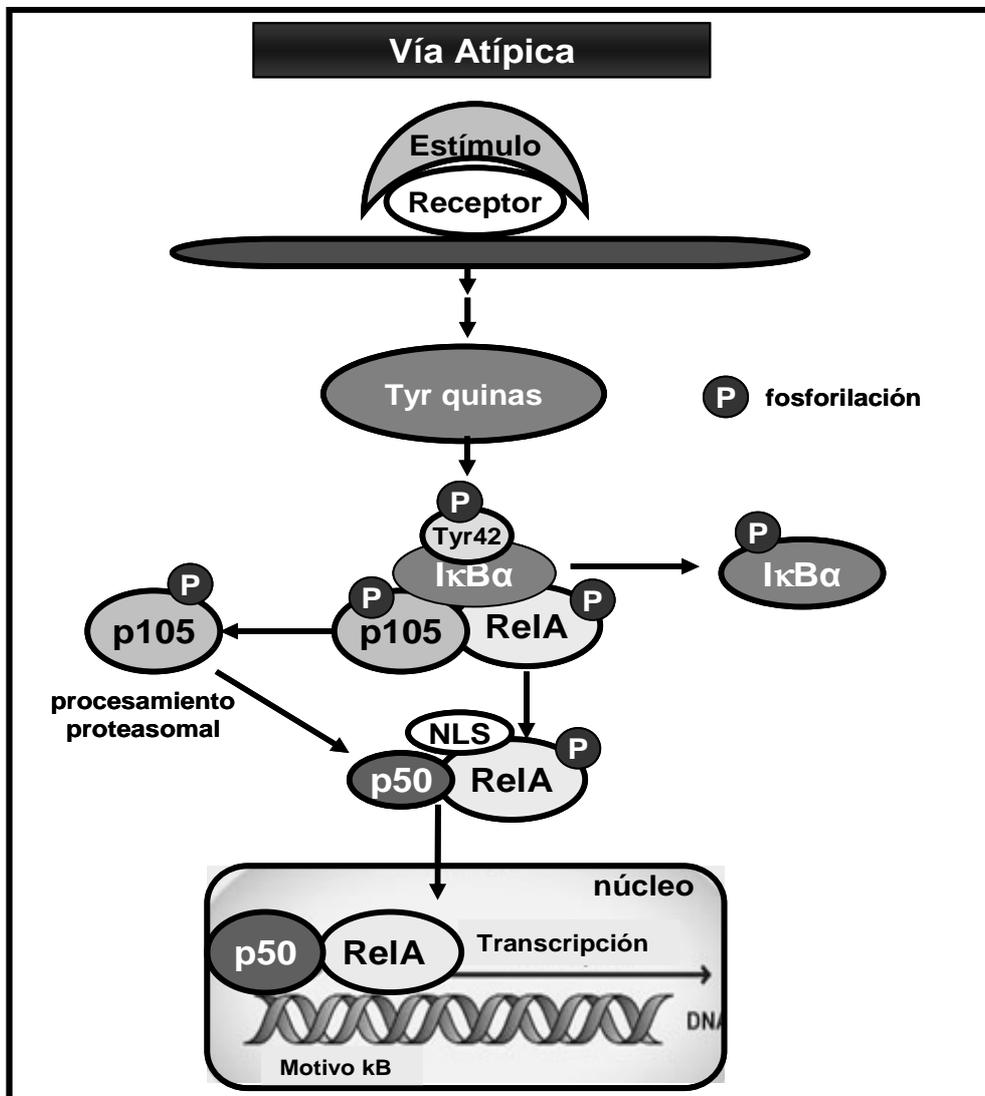


Figura 19. Activación de la vía atípica de NF- κ B.

5.6 Regulación de la actividad transcripcional de NF- κ B mediante modificaciones post-traduccionales de RelA

Existen varios pasos, además de la degradación de I κ B α , que son necesarios para la activación completa de la expresión génica mediada por la vía NF- κ B. Se han descrito varias modificaciones post-traduccionales de RelA que modulan la actividad de NF- κ B. Estas modificaciones pueden estar inducidas directamente por los componentes de la vía o por distintas vías de señalización (revisado en (Hayden and Ghosh, 2008)). **RelA** puede estar **fosforilada** en diferentes residuos de sus dominios RHD (Ser 276 y Ser311) y TAD (Ser526 y Ser536), y puede estar **acetilada** en las Lys310, Lys314 y Lys315 aumentando su activación en respuesta a distintos estímulos (Figura 20).

- **Fosforilación de RelA**

Cuando el complejo RelA/p50 se libera del inhibidor I κ B α , RelA puede estar fosforilada en la **Ser276** a través de las quinazas PKA, MSK1 y MSK2 (*mitogen- and stress-activated protein kinase*) lo que promueve la interacción de RelA con los co-activadores transcripcionales CBP (*del inglés, CREB binding protein*) y p300 (Zhong et al., 1998). La activación de estas quinazas depende de la vía ERK/MAPK en respuesta a varios estímulos, como por ejemplo TNF α ((Vermeulen et al., 2003).

Por otro lado, la fosforilación en la **Ser311** está relacionada con la activación de la vía PKC ξ . La inhibición de PKC ξ reduce los niveles de fosforilación en la Ser311 de RelA, afectando la interacción entre CBP y RelA, y como consecuencia la activación transcripcional de la vía NF- κ B (Duran et al., 2003).

Las IKKs no solamente modulan la activación de la vía NF- κ B mediante la fosforilación del inhibidor I κ B α , si no que también participan en la regulación de la actividad transcripcional de NF- κ B fosforilando RelA en la **Ser536** (Sakurai et al., 2003; Perkins, 2006). Se ha demostrado que en respuesta a citoquinas, IKK β es necesaria para la liberación de NF- κ B de I κ B α y para la fosforilación de RelA. Sin embargo, IKK α es necesaria solamente para la

fosforilación y activación de RelA (Sizemore et al., 2002; Gutierrez et al., 2008a).

La fosforilación de RelA en la **Ser529** está mediada por la quinasa CKII en respuesta a la estimulación con IL-1 o TNF α , no obstante no está claro como esta fosforilación afecta la transcripción génica mediada por NF- κ B (Wang et al., 2000).

- **Acetilación de RelA**

La acetilación de RelA en la **Lys310**, probablemente a través de CBP/p300 y HATs (histona acetilasas), ocurre en el núcleo (revisado en (Chen and Greene, 2004). En fibroblastos en cultivo, se ha demostrado que para que se produzca la acetilación de RelA, esta debe estar fosforilada en la(s) Ser536 y/o Ser276 (Chen et al., 2005b).

Estudios recientes han demostrado que la acetilización de RelA en las **Lys314 y Lys315** mediada por la histona acétilasa p300, aumenta la actividad transcripcional de NF- κ B (Rothgiesser et al., 2010).

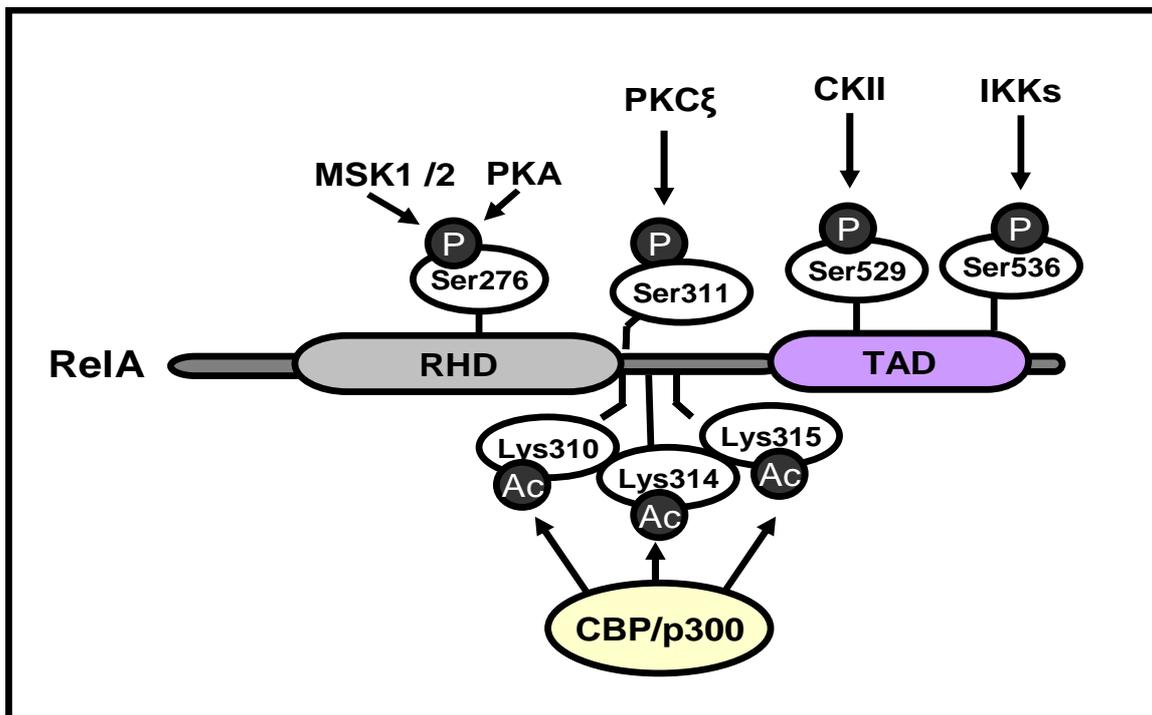


Figura 20. Modificaciones post-transduccionales de la proteína RelA.

En resumen se puede decir que la fosforilación de RelA en los residuos de: Ser529, Ser536, Ser276 o Ser 311, así como su acetilación en Lys310 aumentan la activación completa de RelA facilitando su unión con los co-

activadores CBP/p300. Por otro lado, RelA compete directamente con otros factores de transcripción como p53 y CREB para unirse a CBP/p300 (revisado en (Webster and Perkins, 1999); (Huang et al., 2007a)). Estudios recientes han demostrado que IKK α fosforila CBP en respuesta a citoquinas, promoviendo su unión con RelA a la vez que disminuye la interacción de p53 con CBP (Huang et al., 2007a). Por otro lado, la activación de GSK β inactiva CREB interrumpiendo su unión con CBP favoreciendo la unión de RelA con CBPs (Martin et al., 2005).

5.7 NF- κ B en el sistema nervioso (SN)

A principios de los años 90 varios estudios demostraron la presencia de heterodímeros RelA/p50 en los astrocitos (Sparacio et al., 1992), las células de Schwann (Carter et al., 1996) y la microglia (Nakajima and Kohsaka, 1998), así como en neuronas de varias regiones del SN, incluyendo córtex, hipocampo y cerebelo (Kaltschmidt et al., 1994). Estas observaciones sugerían que la vía NF- κ B participa en procesos fisiológicos del SN. Además, heterodímeros RelA/p50 se encuentran en los terminales sinápticos (Meberg et al., 1996), sugiriendo una función de NF- κ B como transmisor de la señal retrogrado (desde las sinapsis hasta el núcleo) (revisado en (Kaltschmidt and Kaltschmidt 2009)); (Meberg et al., 1996; Meffert et al., 2003; Kaltschmidt and Kaltschmidt, 2009).

5.7.1 Activadores de la vía NF- κ B en el SN

Una gama amplia de factores regulan la activación de NF- κ B. En la Tabla 4 se presentan algunos activadores específicos de la vía descritos en diferentes tipos celulares del SN. La activación de NF- κ B por cada uno de estos factores induce una respuesta fisiológica determinada. Por ejemplo, la activación de NF- κ B mediada por NTFs, neurotransmisores y calcio, promueve la supervivencia neuronal, crecimiento neurítico y regeneración axonal en varios modelos experimentales *in vivo* e *in vitro*, tanto en el SN maduro como durante desarrollo (revisado en (Cui and Harvey, 2000; Bhakar et al., 2002; Mémet, 2006)).

La inhibición de la vía NF- κ B en neuronas corticales, neuronas hipocámpales y neuronas sensoriales reduce la viabilidad neuronal (Maggirwar et al., 1998b; Middleton et al., 2000; Bhakar et al., 2002) demostrado también la implicación de la vía NF- κ B en la regulación de los procesos de mielinización en células Schwann y en oligodendrocitos (revisado en (Mattson, 2003); (Yoon et al., 2008)).

Tabla 4. Moléculas activadoras de NF- κ B en el sistema nervioso. Modificado de (Kaltschmidt et al., 2005).

Moléculas activadoras	Tipo celular	Referencia
Glutamato	Neuronas	Guerrini, Blasi and Denis-Donini 1995
Kainato	Neuronas	Kaltschmidt et al. 1995
NMDA	Neuronas	Lipsky et al. 2001
TNF α	Neuronas, Astrocitos, Microglía Neuroblastoma	Drew et al. 1993 Sparacio et al. 1992 Lee et al. 2000
IL-1	Neuronas Glia	O'Neill and Kaltschmidt 1997 Grilli et al. 1996
Amiloid β	Neuronas Astrocitos Microglía	Behl et al. 1994 Kaltschmidt et al. 1997 Bonaiuto et al. 1997)
Estrés oxidativo	Neuronas	Shou, Li et al. 2002
No-A β amiloid	Neuronas	Tanaka et al. 2002
Calcio intracelular	Neuronas	Lilienbaum and Israël 2003
H ₂ O ₂	Neuronas Oligodendrocitos	Kaltschmidt et al. 1999 Vollgraf, Wegner and Richter-Landsberg 1999
NGF	Neuronas Oligodendrocitos Células Schwann	Wood 1995 Yoon et al. 1998 Carter et al. 1996
CNTF	Neuronas	Gallagher, Gutierrez et al. 2007
BDNF	Microglía Neuronas	Nakajima and Kohsaka 1998 Burke and Bothwell 2003
NT-3	Neuronas	Burke and Bothwell 2003
NT-4/5	Neuronas	Burke and Bothwell 2003

5.7.2 Genes diana de NF- κ B y su función en el SN

La activación de la vía NF- κ B regula varios procesos fisiológicos mediante el control transcripcional de diferentes genes (Gupta et al., 2010). Estudios independientes realizados durante los últimos 20 años, han propuesto NF- κ B como una de las vías más importantes en el control de la supervivencia neuronal.

Esta regulación está basada en la capacidad de NF- κ B de controlar (activar o inhibir) la transcripción de varios genes pro- y anti-apoptóticos modulando la muerte celular (Tamatani et al., 1999; Burstein and Duckett, 2003). Respecto los **anti-apoptóticos** los más estudiados son los miembros de la familia Bcl-2. Los promotores de Bcl-2, Bcl-x_L y Bfl-1/A1 tienen sitio de unión con NF- κ B (Zong et al., 1999; Bui et al., 2001a; Bhakar et al., 2002). Otras proteínas, implicadas en la función anti-apoptótica de NF- κ B son las IAPs (Chu et al., 1997). Se ha demostrado que la activación de la vía NF- κ B regula positivamente la expresión génica de cIAP (Chu et al., 1997; Baud and Karin, 2001). La activación de NF- κ B participa también, en la regulación transcripcional de TRAF1 y TRAF2 (*del inglés TNFR-associate factor*) (Baud (Baud and Karin, 2001). Las proteínas adaptadoras TRAF1 y TRAF2 interactúan con IAPs promoviendo la función anti-apoptótica de la señalización por TNF α . Por otro lado, en respuesta a TNF α , TRAF1 y TRAF2 son capaces de fosforilar las IKKs, llevando a cabo la activación de la vía (revisado en (Hayden et al., 2006); (Häcker and Karin, 2006)). Otros estudios han demostrado que la vía NF- κ B puede controlar la apoptosis a través de regulación de la expresión de genes anti-apoptóticos que actúan en la mitocondria. Una de ellas es la enzima mitocondrial Mn-SOD (Maehara et al., 2000; Sompol et al., 2006). Se ha demostrado que NF- κ B protege las células SH-SY5H de la lesión neuronal al activar la expresión de Mn-SOD. La activación de la vía NF- κ B participa en el control de la expresión génica de otra enzima entre cuales esta Cu/Zn-SOD (Rojo et al., 2004).

La activación de la vía NF- κ B puede provocar apoptosis en el SN (Kaltschmidt et al., 2000b; Kaltschmidt et al., 2002a; Pizzi et al., 2002). La activación de la vía en respuesta a estrés oxidativo o la activación del receptor

NMDA, así como y en respuesta a estímulos apoptóticos, promueve la apoptosis aumentando la expresión génica de las proteínas **pro-apoptóticas** como Bax y Bcl-xs en neuronas corticales (Shou et al., 2002). En condiciones patológicas como la isquemia cerebral se ha observado que RelA aumenta la expresión de *Bim* y *Noxa* causando apoptosis (Inta et al., 2006a). La vía NF- κ B en condiciones patológicas, como la isquemia cerebral, puede inducir apoptosis mediante la activación génica de factores de transcripción como p53 y c-Myc (Qin et al., 1999). La activación de estos factores de transcripción está relacionada con la expresión de genes pro-apoptóticos como Bim y Bax. Bajo control transcripcional de NF- κ B se encuentra la iNOS (*del inglés, nitric oxide synthase*) (Xie et al., 1994). Su función es producir óxido nítrico (NO). La implicación del NO en la apoptosis es un tema de debate. Mientras que unos autores relacionan su producción con la supervivencia, otros lo proponen como un agente pro-apoptótico (Julius et al., 2008). En varios trabajos se ha demostrado la implicación de los reguladores de ciclo celular en la apoptosis. Uno de los genes diana de NF- κ B relacionados con el ciclo celular es el ciclina D1. Estudios realizados con cultivos de neuronas estriadas y corticales han indicado la implicación de ciclina D en la apoptosis neuronal (Liang et al., 2007; Rao et al., 2007).

En el SN, la vía NF- κ B también controla la expresión génica de las moléculas adhesivas como NCAM (*del inglés, neuronal cell adhesion molecule*) (Simpson and Morris, 2000); los NTFs como BDNF (Saha et al., 2006), el receptor NMDA (Furukawa and Mattson, 1998), Cox-2 (Ciclooxigenasa 2) (Kaltschmidt et al., 2002b); los factores de transcripción como Stat5a (Hinz et al., 2002); I κ B α (Bui, Livolsi et al. 2001) y β APP (*del inglés, beta-amyloid precursor protein*), (Song and Lahiri, 1998) entre otras.

Se puede encontrar más información sobre los genes diana de NF- κ B en: nf-kb.org.

Tabla 5. Genes diana de NF- κ B.

Genes diana	Función	Referencia
Bcl-2	anti- apoptótica	Tamatani, Che et al. 1999
Bcl-x	anti- apoptótica	Tamatani, Che et al. 1999
Bcl-xL	anti- apoptótica	Bui, Livolsi et al. 2001
Bfl-1/A1	anti- apoptótica	Zong, Edelstein et al. 1999
c-FLIP	anti- apoptótica	Baud and Karin 2001
IAPs	anti- apoptótica	Chu, McKinsey et al. 1997
TRAF1	anti- apoptótica	Baud and Karin 2001
TRAF2	anti- apoptótica	Baud and Karin 2001
Bax	pro- apoptótica	Shou, Li et al. 2002
Bcl-xs	pro- apoptótica	Shou, Li et al. 2002
Bim	pro- apoptótica	Inta, Paxian et al
Noxa	pro- apoptótica	Inta, Paxian et al
p53	Factor de transcripción	Qin, Chen et al. 1999
C-Myc	Factor de transcripción	Qin, Chen et al. 1999
Cu/Zn-SOD	Enzima anti-oxidante	Rojo, Salinas et al. 2004
iNOS	Síntesis de oxido nítrico	Xie, Kashiwabara et al. 1994
Mn-SOD	Enzima anti-oxidante	Sompol, Xu et al. 2006
Cox-2	Enzima responsable para la inflamación	Kaltschmidt, Linker et al. 2002
I κ Ba	Inhibidor de NF- κ B	Bui, Livolsi et al. 2001
BDNF	NTF	Saha, Liu et al. 2006
NMDA	Homeostasis de calcio	Furukawa and Mattson 1998
β APP	Precursor del péptido β -amiloide	Song and Lahiri 1998
NCAM	Moléculas adhesivas neuronales	Simpson and Morris 2000
Cyclina D1	Regulador de ciclo celular	Liang, Wang et al. 2007

5.7.3 Función de NF- κ B en el SN durante el desarrollo y en el adulto

NF- κ B regula la expresión de genes implicados en distintos procesos fisiológicos. En el SN la vía regula principalmente la supervivencia neuronal, el crecimiento neurítico y la plasticidad sináptica.

- **Control de la apoptosis**

Durante la embriogénesis se detecta actividad transcripcional de NF- κ B en SNC, concretamente en la médula espinal y en los núcleos del rombo encéfalo a partir del día E12.5 (Schmidt-Ullrich et al., 1996). La inhibición de diferentes miembros de la vía NF- κ B causa muerte *in utero* en diferentes etapas del desarrollo embrionario.

El fenotipo inducido por la supresión completa de la vía NF- κ B en ratones doble *knockout* para IKK α e IKK β , presentan defectos en el cierre del tubo neural a E12.5 debido a una apoptosis neuroepitelial masiva (Li et al., 2000). En la médula espinal y en las DRG la apoptosis aumenta, pero no se han visto defectos de diferenciación neuronal (Li et al., 2000). También se detecta un aumento de la muerte apoptótica en las neuronas dependientes de citoquinas como las sensoriales y las del ganglio nudoso del ratón *knockout* para RelA, entre el día 12 y 14 del desarrollo embrionario (Hamanoue et al., 1999). Por otro lado, los ratones *knockout* para p50 no presentan defectos en el desarrollo embrionario (Lu et al., 2006). Sin embargo, las neuronas del hipocampo de estos ratones adultos, son más vulnerables frente a condiciones de excitotoxicidad e infarto cerebral comparado con los ratones *wild-type* (Sha et al., 1995a; Yu et al., 1999; Li et al., 2008).

- **Implicación en el crecimiento neurítico**

La activación de NF- κ B durante el desarrollo del SN es fundamental para la regulación del crecimiento neuronal. Estudios realizados en diferentes modelos neuronales como por ejemplo línea celular PC12 (Azoitei et al., 2005); en las neuronas sensoriales (Gutierrez et al., 2005; Gallagher et al., 2007a; Gutierrez et al., 2008a) y las neuronas de hipocampo (Sanchez-Ponce et al., 2010), han demostrado que bloqueando la vía NF- κ B se afecta la longitud y la arborización neurítica mediada por distintos NTFs.

- **Implicación de la vía NF- κ B en la plasticidad sináptica**

NF- κ B juega un papel importante en la señalización sináptica y el aprendizaje. Estudios independientes demostraron que RelA, c-Rel y TNFR1 participan en la formación de la memoria de largo plazo (Mattson, 2005). En estos procesos NF- κ B coopera con otros factores de transcripción y vías de

señalización. Se ha demostrado que la vía NF- κ B controla la plasticidad sináptica mediante la regulación de la subunidad catalítica de PKA y la fosforilación de CREB (Kaltschmidt et al., 2006).

5.8 Implicación de la vía NF- κ B en la patología neurológica

5.8.1 NF- κ B y enfermedades neurodegenerativas

Muchas de las vías de transducción de señal que regulan la supervivencia neuronal durante el desarrollo y el crecimiento del SNC se han relacionado con la evolución de diversas enfermedades neurodegenerativas. La vía NF- κ B es una de ellas. Diversos estudios involucran una alteración en la activación de la vía NF- κ B en las enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, Huntington y Esclerosis Lateral Amiotrófica, así como en situaciones de lesión e isquemia (revisado en (Mémet, 2006). No obstante, mientras unos autores proponen, que la activación de la vía NF- κ B ejerce una función neuroprotectora en las enfermedades neurodegenerativas, (Barkett and Gilmore, 1999; Cardoso and Oliveira, 2003; Fridmacher et al., 2003; Smith et al., 2009), otros indican que sería una de las causas de la muerte neuronal (revisado en (Mémet, 2006); (Meunier et al., 2007; Julius et al., 2008)).

Referente a la implicación de la vía en la evolución de la **enfermedad de Alzheimer (EA)**, análisis de muestras de cerebro de pacientes, obtenidas post-mortem, muestran incrementos en la activación de la vía en comparación con individuos sanos (Kaltschmidt et al., 1999). Corroborando estas observaciones también se detecta un incremento de la actividad NF- κ B en muestras de cerebro del ratón mutante para la proteína APP (*del inglés amyloid precursor protein*) Tg2576 modelo de EA, donde la actividad de la vía se ha relacionado con apoptosis en las neuronas del hipocampo (Niu et al., 2010). Dos estudios independientes han propuesto la implicación de la vía NF- κ B en la producción del oligómero A β 42, lo que sugiere la posibilidad que la desregulación de la vía NF- κ B en neuronas podría provocar un incremento en la producción del péptido A β (Valerio et al., 2006; Buggia-Prevot et al., 2008). Estudios más detallados han demostrado que precisamente la inhibición de la actividad de NF- κ B en microglia y no en neuronas, bloquea la neurotoxicidad inducida por A β (Chen et

al., 2005a). En base a la capacidad de la vía NF- κ B de bloquear la activación de caspasas se ha propuesto en la terapia de la EA la inducción selectiva de la vía NF- κ B como una diana terapéutica (Cardoso and Oliveira, 2003).

Existen evidencias que la NF- κ B también puede participar en el desarrollo de la **enfermedad de Parkinson (EP)**, aunque su implicación en las neuronas dopaminérgicas es controvertida. Mientras que unos autores demuestran la activación de la vía NF- κ B, como una de las causas de la apoptosis inducida por la dopamina (Panet et al., 2001), otros proponen la función neuroprotectora de NF- κ B, relacionando la activación de la vía con la inhibición de la apoptosis causada por la auto-oxidación de la dopamina (Lee et al., 2001)

Aunque no se ha estudiado ampliamente, NF- κ B también puede participar en la **enfermedad de Huntington (EH)**. Ratones deficientes de p50 demuestran un incremento en la pérdida de neuronas estriatales y consecuentemente, disfunción motora (Yu et al., 2000). Además, en células de mamíferos se ha demostrado que la huntingtina (Htt) humana co-inmunoprecipita con p50, pero no con p105 (Takano and Gusella, 2002). Por otra parte, NF- κ B puede contribuir con la neurodegeneración inducida por la Htt mutada (Khoshnan et al., 2004; Khoshnan et al., 2009a). En estos estudios se ha observado que la inhibición de IKK γ o IKK β , o bloqueando la degradación del inhibidor I κ B α , disminuye la toxicidad inducida por Htt y promueve la supervivencia neuronal. En estos estudios se propone el efecto antagonista de las IKKs en la EH, donde la sobre-expresión de IKK α y la inhibición de IKK β protege las neuronas de la muerte inducida por la Htt mutada (Khoshnan, Ko et al. 2009).

Efecto indirecto de la vía NF- κ B se ha demostrado en las enfermedades neurodegenerativas de las MNs. Se han observado incrementos de la activación de la vía NF- κ B en células gliales de la médula espinal en pacientes de **Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA)**, curiosamente este incremento no se detecta en las MNs (Migheli et al., 1997; Pyo et al., 2010). Estudios realizados con ratones mutantes de ELA han puesto de manifiesto que la inducción farmacológica de la vía NF- κ B protege las neuronas de estos ratones bloqueando la apoptosis (Ryu et al., 2005; Del Signore et al., 2009), mientras

que otros autores proponen un efecto beneficio sobre la enfermedad el uso de inhibidores farmacológicos de la vía NF- κ B en la médula espinal de los ratones mutantes de ELA (Xu et al., 2006).

5.8.2 NF- κ B y lesión neuronal

La activación de NF- κ B ha sido observada en respuesta a la lesión neuronal en situaciones de isquemia y trauma en el cerebro y la médula espinal (Xu et al., 2005). Los análisis de modelos experimentales de con infarto cerebral y lesión, revelan que la vía NF- κ B puede modular la degeneración y recuperación neuronal. En este sentido, se asocia el incremento de la activación de NF- κ B en respuesta a la lesión con el daño neuronal. Por ejemplo, en el caso del infarto cerebrovascular la delección del gen p50 así como la inhibición de IKK β , reduce el daño celular en cultivos primarios de neuronas (Nurmi et al., 2004). En la isquemia cerebral el uso de inhibidores de la vía NF- κ B tuvo un efecto positivo sobre la supervivencia de las neuronas (Schwaninger et al., 2006).

En este contexto, diferentes estudios demuestran acciones opuestas en respuesta a la activación de la vía NF- κ B en el SN. Mientras que unos estudios apoyan una función pro-supervivencia, otros relacionan la activación de la vía con un incremento de muerte neuronal. Para explicar la causa de estos efectos antagónicos se han propuesto varias hipótesis, entre ellas:

- **El modelo de la homeóstasis en la activación de la vía** (Hardingham and Bading, 2003). Los niveles demasiado bajos, como niveles demasiado altos de activación de la vía NF- κ B mantenidos durante un largo periodo de tiempo (de semanas a meses), causarían muerte neuronal (revisado en (Mattson and Camandola, 2001)). Se describió que RelA en condiciones fisiológicas promueve la supervivencia activando la transcripción de genes anti-apoptóticos, mediante su unión con co-activadores histona acetilasas (HAC). El mantenimiento de la activación “fisiológica” de NF- κ B depende de la expresión de las proteínas de la familia I κ B que son las responsables para la desactivación de la vía después de cada estímulo. Sin embargo, en condiciones patológicas se observa una desregulación en la activación de la

vía NF- κ B la cual resulta en la interacción de RelA con co-represores histona deacetilasas (HDAC1 y HDAC2) regulando negativamente la expresión de genes anti-apoptóticos (Figura 21) (Kaltschmidt et al., 2000a; Ashburner et al., 2001; Kaltschmidt et al., 2005).

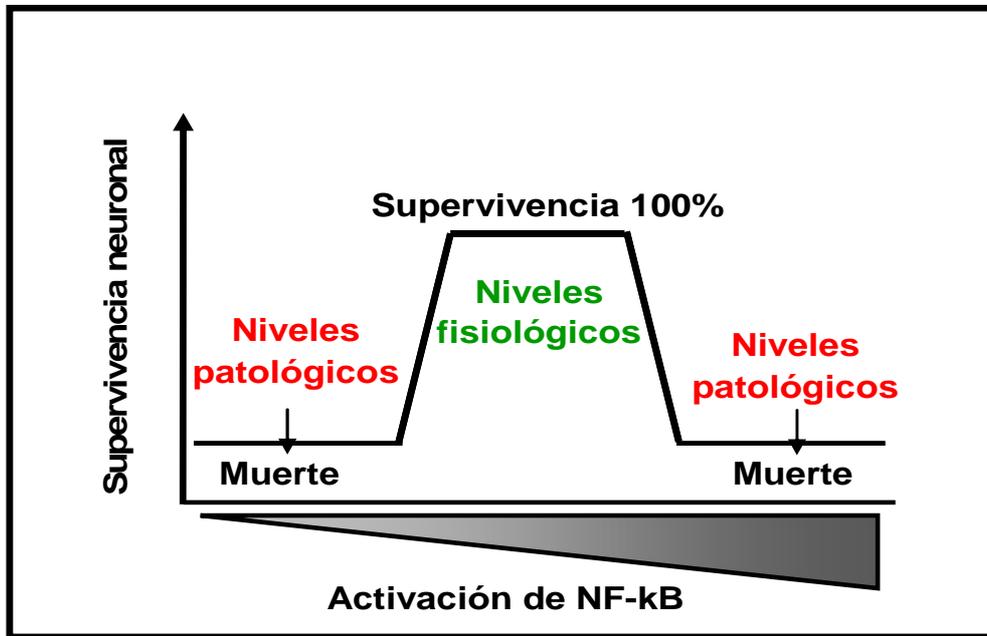


Figura 21. Modelo de homeostasis de la activación de la vía NF- κ B. Modificado de (Kaltschmidt et al., 2005).

- Otra posible explicación de los efectos opuestos de NF- κ B en el SNC es que **la activación de la vía en respuesta a TNF α favorece la supervivencia en neuronas, mientras que la inducción de la vía en células gliales promueve la muerte neuronal** (Mattson and Meffert, 2006a). Así, un mismo estímulo genera respuestas opuestas al activar la vía en diferentes tipos celulares del SN. Tanto astrocitos como neuronas producen TNF α y expresan sus receptores TNFR. No obstante, las células gliales expresan el receptor TNFR1 mientras las neuronas expresan TNFR2. La unión de TNF α a ambos receptores activa la vía NF- κ B, pero la activación de TNFR1 en células gliales induce la producción del NO lo que conlleva a la muerte neuronal, mientras que la activación de TNFR2 en neuronas aumenta la expresión de genes anti-apoptóticos. Esta hipótesis se apoya por estudios realizados en los últimos años que han puesto en relevancia la toxicidad de TNF α en neuronas sólo en presencia de glia (Taylor et al., 2005; Mir et al., 2008; Tolosa et al., 2011). En estos estudios se ha demostrado que la microglía, los macrófagos y los

astrocitos actúan como productores de citoquinas pro-inflamatorias, radicales libres y excitotoxinas en respuesta a la activación de NF- κ B mediada por TNF α promoviendo de esta manera la muerte de las neuronas (Figura 22). Además, la inhibición de la vía únicamente en astrocitos y no en neuronas, las protege de la muerte en modelos de lesión neuronal (Meunier et al., 2007). En base a estas observaciones se ha propuesto el uso de inhibidores de la vía NF- κ B específicos para glía como posible terapia en enfermedades neurodegenerativas como la ELA (revisado en (Camandola and Mattson, 2007)) y el Alzheimer (He et al., 2007).

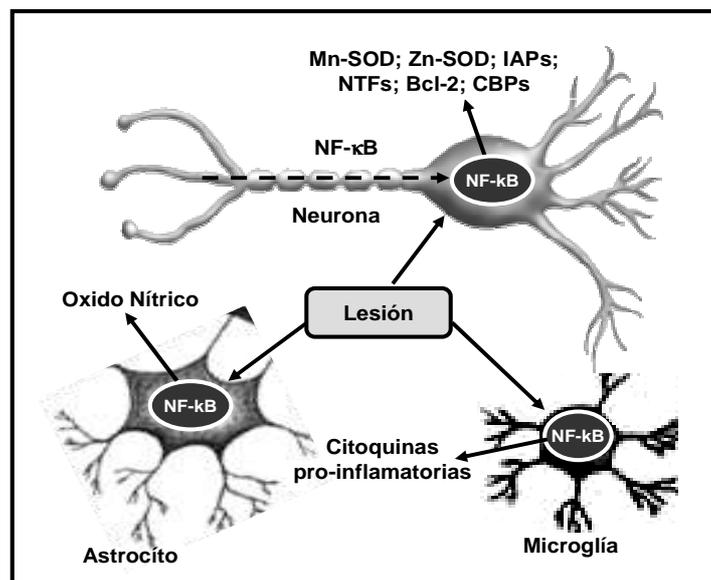


Figura 22. La implicación de la vía NF- κ B en la señalización entre las neuronas y las células gliales.

La activación de la vía NF- κ B en neuronas promueve la supervivencia y plasticidad sináptica a través de la inducción de proteínas anti-apoptóticas, enzimas anti-oxidantes, NTFs y co-activadores (CBPs). Por otro lado la activación de NF- κ B en células gliales induce la producción de neurotoxinas incluyendo citoquinas pro-inflamatorias y óxido nítrico. Modificado de (Mattson and Camandola, 2001).

6. La Atrofia Muscular Espinal

La Atrofia Muscular Espinal, AME (*del inglés Spina Muscular Atrophy, SMA*) es una enfermedad neuromuscular hereditaria caracterizada por la degeneración de las MNs del asta anterior de la médula espinal. Los síntomas ocasionados son debilidad proximal simétrica y atrofia muscular progresiva. La AME está causada por la mutación o ausencia de la copia telomérica del gen *SMN1* (*del inglés Survival Motor Neuron 1*) localizado en el cromosoma 5q13. Además del gen *SMN1*, en la parte centromérica de este cromosoma, está

localizada otra copia del gen- *SMN2*. El gen *SMN1* es esencial para la producción de una proteína funcional, SMN, mientras que, *SMN2* transcribe mayoritariamente una proteína inestable que se degrada rápidamente y únicamente el 10% de los transcritos codifican para la proteína SMN completa (Burnett et al., 2009). Los afectados de AME poseen por lo menos una copia de la forma centromérica del gen *SMN2*. El número de las copias de *SMN2* es variable. En los pacientes de AME esta variación determina la gravedad de la enfermedad. Cuantas más copias de *SMN2* hay, los síntomas son menos graves. Los pacientes con la forma más grave de la enfermedad, AME tipo I tienen 1 o 2 copias del gen *SMN2*; los pacientes con tipo II tienen 3 copias de *SMN2*; y la mayoría de los pacientes con AME tipo III tiene 3 o 4 copias de *SMN2* (Feldkötter et al., 2002). La incidencia de esta enfermedad es aproximadamente 1 de cada 6.000 nacimientos, constituyendo uno de los trastornos autosómicos recesivos letales más frecuente en la infancia y el segundo trastorno neuromuscular más frecuente después de la fibrosis quística (Pearn, 1980).

6.1 Clasificación de AME

Debido al grado de severidad, la edad de aparición de los síntomas y la evolución de la enfermedad, la AME se clasifica en cuatro grupos (Russman, 2007):

- **AME tipo I (Enfermedad de *Werdnig-Hoffmann*)**

El tipo I de AME es el más grave. Los primeros síntomas aparecen entre el momento del nacimiento y antes del sexto mes post-natal. Los niños nunca serán capaces de sentarse sin ayuda y manifiestan una gran disminución en los movimientos y en el tono muscular. Los afectados mueren antes de los dos años debido a fallos respiratorios causados por la disminución en la actividad de los músculos intercostales;

- **AME tipo II**

Los síntomas aparecen entre los 6 y 24 meses de edad. Los enfermos no pueden caminar debida a una escoliosis por la debilidad muscular. La evolución y supervivencia depende de muchos factores aunque estos enfermos pocas veces llegan a la adolescencia;

- **AME tipo III (Enfermedad de *Kugelberg-Welander*)**

Los síntomas comienzan a manifestarse después de los 18-24 meses hasta la adolescencia y cursan con menor gravedad respecto a AME tipo I y II. No afecta la esperanza de vida a los enfermos;

- **AME tipo IV**

Este tipo AME aparece en adultos, durante la segunda o tercera década de vida. Se caracteriza por una evolución de la enfermedad lenta y no afecta la esperanza de vida.

6.2 Genética molecular de AME

6.2.1 La región (locus) AME

En el año 1990 se descubrió el gen responsable de la enfermedad AME (SMN) está localizado en el cromosoma 5 en el región q11.2-13.3 (Melki et al., 1990). Se han identificado cuatro genes en esta región:

- **SMN** (Lefebvre et al., 1995);
- **NAIP** (del inglés, *Neural Apoptosis Inhibitory Protein*) (Roy et al., 1995);
- **p44**, codifica para una subunidad del factor de transcripción basal TFIIH (Carter et al., 1997);
- **SERF1** (del inglés, *Small EDRK-Rich Factor*) con una función aún desconocida (Scharf et al., 1998).

En el genoma humano y en primates estos cuatro genes están duplicados presentando una copia telomérica y otra centromérica (Schmalbruch, H. & G. Haase 2001).



En los enfermos de AME se pueden detectar mutaciones de cada uno de estos genes, pero la AME está causada por la delección, mutación o conversión genética de la copia telomérica del gen *SMN1*.

6.2.2 Los genes *SMN1* y *SMN2*

La secuencias de los genes *SMN1* y *SMN2* presenta 9 exones. La diferencia esencial entre los dos genes es un nucleótido del exón 7 (posición +6, codón 280) que en *SMN2* cambia de C a T. Este cambio causa un defecto en el *splicing* del exón 7 promoviendo que el gen *SMN2* transcribe mayoritariamente un mRNA que produce una proteína inestable que se degrada rápidamente. Solo el 10% de los transcritos producen la proteína *SMN* completamente funcional, FL-*SMN* (*del inglés, full-length SMN*) (Burnett et al., 2009) (Figura 23).

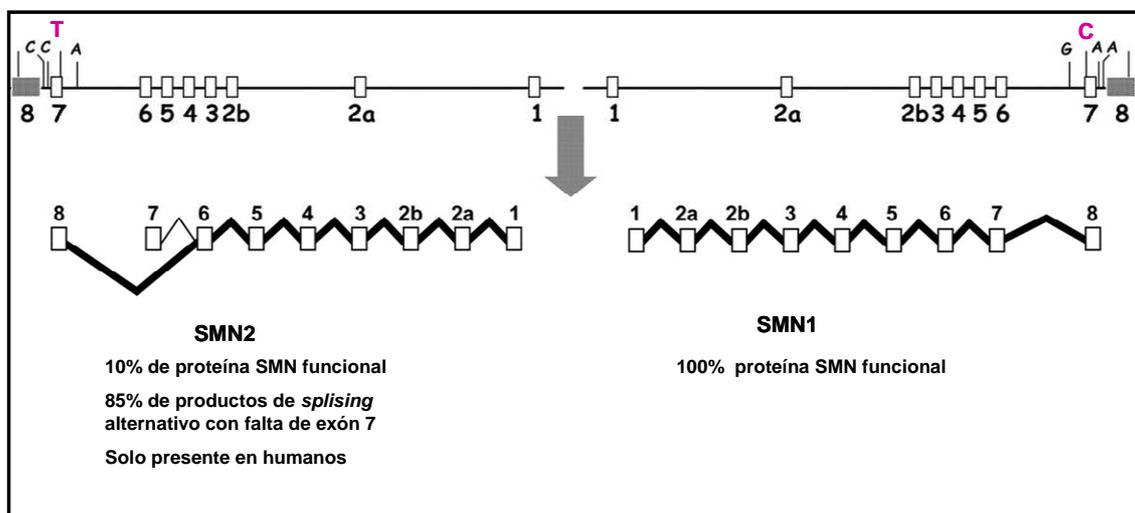


Figura 23. Esquema del locus humano de AME. Modificado de (Lorson et al., 2010).

Existen dos teorías que explican como un simple cambio de C a T afecta el *splicing* en el gen *SMN2*. Cartegni y Krainer propusieron la hipótesis que el cambio de C a T en el exón 7 de *SMN2* interrumpe la unión de *splicing factor* ASF/SF2 en el ESE (*del inglés, exonic splicing enhancer*) promueve la exclusión del exón 7 y causando la transcripción al solo 10% del FL-*SMN* (Cartegni and Krainer, 2002). Un año después Kashima y Mandey, propusieron la idea que el cambio de C a T en el exón 7 de *SMN2* promueve la unión del represor de *splicing* hnRNP A1 (*del inglés, heterogeneous nuclear ribonucleoproteins, hnRNA*) al ESS (*del inglés, exonic splicing silencer*) reprimiendo de esta forma la inclusión de exón 7 durante el *splicing* (Kashima and Manley, 2003) (Figura 23). Por otro lado, la transcripción de *SMN2* produce 10% de FL-*SMN* a través de la unión de *splicing factor* Htra2- β 1 con hnRNP-G y Srp30 a ESE en el exón7 de *SMN2*.

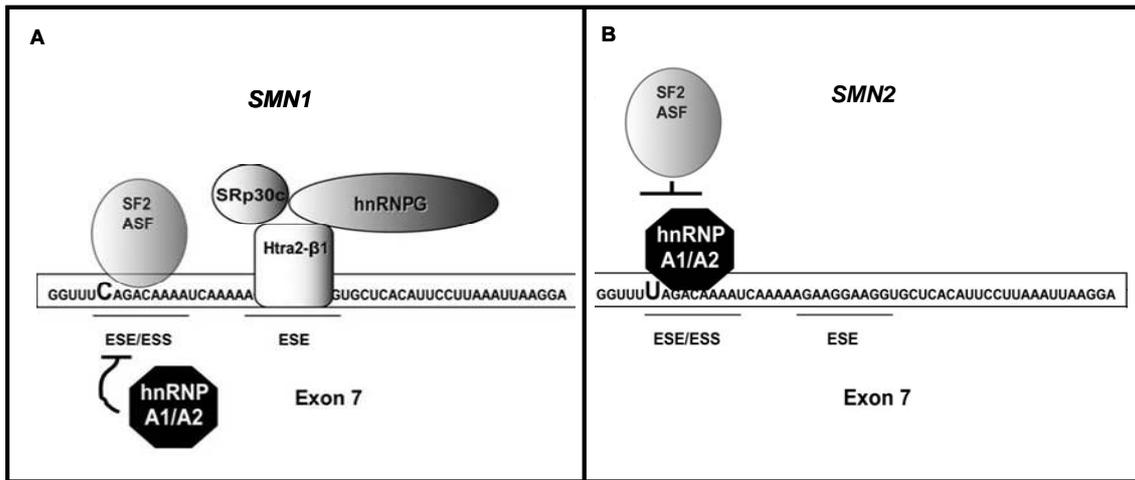


Figura 24. Splicing del exón 7 en los genes *SMN1* y *SMN2*.

A) La C en la posición 6 del exón 7 en el gen *SMN1*- ESE (*exonic splicing enhancer*) es reconocida por el factor de *splicing* SF2/ASF que promueve la inclusión del exón 7. Por otro lado, Htra2-β1 con heterogeneos hnRNP-G (nuclear ribonucleoprotein-G) y Srp30c también se unen a otro ESE promoviendo la inclusión del exón 7. B) Los cambio de C a U en el exón 7 del *SMN2* favorecen la unión del factor de splicing hnRNP A1 con el ESS (*exonic splicing silencer*) causando la excluyendo el exón 7. Modificado de (Sumner, 2007).

6.2.3 Expresión de los genes *SMN1* y *SMN2*

Existe una cierta identidad entre las secuencias de los promotores de los genes *SMN1* y *SMN2* (Boda et al., 2004). Esta identidad sugiere un control transcripcional parecido para los dos genes. En el promotor de *SMN* se han determinado sitios de unión a factores de transcripción relacionados con los procesos de supervivencia y diferenciación neuronal. Entre ellos están:

- AP-2 (Mitchell et al., 1991);
- E2F-1 (Dupont et al., 1998) ;
- GATA-2 (Meng et al., 1999) ;
- Stat5a (Cheng-Hung Ting, 2007);
- c-Fos, c-Jun, con lugar de unión de AP-1 en el promotor de *SMN*;
- CREB mediante su unión con CRE (*del inglés, cAMP-Responsive Element*) (Majumder et al., 2004a);
- IRF-1 a través de su unión con la secuencia ISRE/IRF-E (Interferon Stimulated Response Elements/ Interferon Regulatory Factors binding motif) (Baron-Delage et al., 2000);
- Elk-1 (Demir et al., 2011).

6.2.4 La proteína SMN

La SMN es una proteína de expresión ubicua con un peso molecular de 38 kDa sin homólogos conocidos. SMN está presente tanto en el citoplasma como en el núcleo. En el núcleo, se concentra en las estructuras puntuada llamadas "*Gems*" o Cuerpos de Cajal (Singh et al., 2006). En las células de los individuos sanos se observan de 2 a 8 Cuerpos de Cajal, mientras que en las células o tejidos de los pacientes con AME su cantidad se correlaciona inversamente con la severidad de la enfermedad. En los pacientes de AME tipo I se observan pocos o ningún Cuerpo de Cajal (Patrizi et al., 1999). La proteína SMN esta distribuida no solamente en el núcleo si no también en los axones de las neuronas (Setola et al., 2007) así como en el cono de crecimiento de las MNs (Zhang et al., 2006) donde presenta una patrón granular.

SMN es una proteína multidominio con 4 regiones: la región rica en lisina (***K-rich domain***); un motivo ***Tudor***, una región rica en prolina (***P-rich domain***) y una caja tirosina-glicina (***tyrosine-glycine (YG)-box***). La localización y la función de cada uno de estos dominios esta indicada en la Tabla 6.

El exón 7 se ha asociado con una secuencia putativa responsable de la retención citoplasmática de la proteína SMN (Lefebvre et al., 2002; Zhang et al., 2003).

Tabla 6. Estructura de la proteína SMN y sus dominuos.

DOMINIO	LOCALIZACIÓN	FUNCIÓN	Ref.
Región rica en lisina (<i>K-rich domain</i>)	Exón2	Dominio conservado de unión con el RNA	Lorson and Androphy 1998
Motivo <i>Tudor</i>	Exón 3	Media la interacción de SMN con los motivos de arginina-glicina de diversas proteínas entre las cuales están coilina y proteínas Sm	Meister, Eggert et al. 2002
Caja tirosina-glicina (<i>tyrosine-glycine (YG)-box</i>)	Exón 4 y 5	Esta implicada en la interacción SMN-SMN y en responsable para la localización en los <i>Cuerpos de Cajal</i>	Lorson and Androphy 1998
Región rica en prolinas (<i>P-rich domain</i>)	Exón 6	Media la asociación con profilina, proteína de unión a actina	Giesemann, Rathke-Hartlieb et al. 1999

6.2.4.1 Funciones de la proteína SMN

La proteína SMN está expresada en todos los tipos de células lo que sugiere una función común en las diferentes células y tejidos. Por otro lado la falta de SMN afecta especialmente las MNs indicando una función específica

en este tipo celular. Las funciones de la proteína SMN pueden ser divididas en dos grupos: funciones generales y específicos (Figura 25).

Función general:

- Está implicada en el ensamblaje de U snRNP (*del inglés, small nuclear RiboNucleoProtein*). La proteína SMN junto con las Geminas 2-8, las proteínas Sm y otros factores formar parte del complejo involucrado en el ensamblaje de U snRNP. En el citosol snRNA (*small nuclear RNA*) se unen al complejo SMN asociado con los anillos hepteméricos de proteínas Sm formando partículas snRNP activas (Pellizzoni et al., 1998). Tras su formación, snRNP junto con SMN entra en el núcleo y se localiza en los Cuerpos de Cajal donde las snRNPs maduran (Figura 25A) (Otter et al., 2007);
- Participa directamente en el *splicing* del pre-mRNA. La función de SMN en este proceso está relacionada con la regeneración de U snRNP tras el *splicing* del pre-mRNA (Figura 25B) (Pellizzoni et al., 1998);
- SMN puede funcionar como modulador de la apoptosis. Observaciones en MNs de AME en estado embrionario mostraron una desregulación de las proteínas involucradas en la apoptosis- Bcl-2 y Bcl-x_L (Soler-Botija et al., 2003);
- La proteína SMN puede funcionar como factor de transcripción al asociarse con RNA helicasa A y RNA polimerasa II (Figura 25C) (Pellizzoni et al., 2001; Eggert et al., 2006).

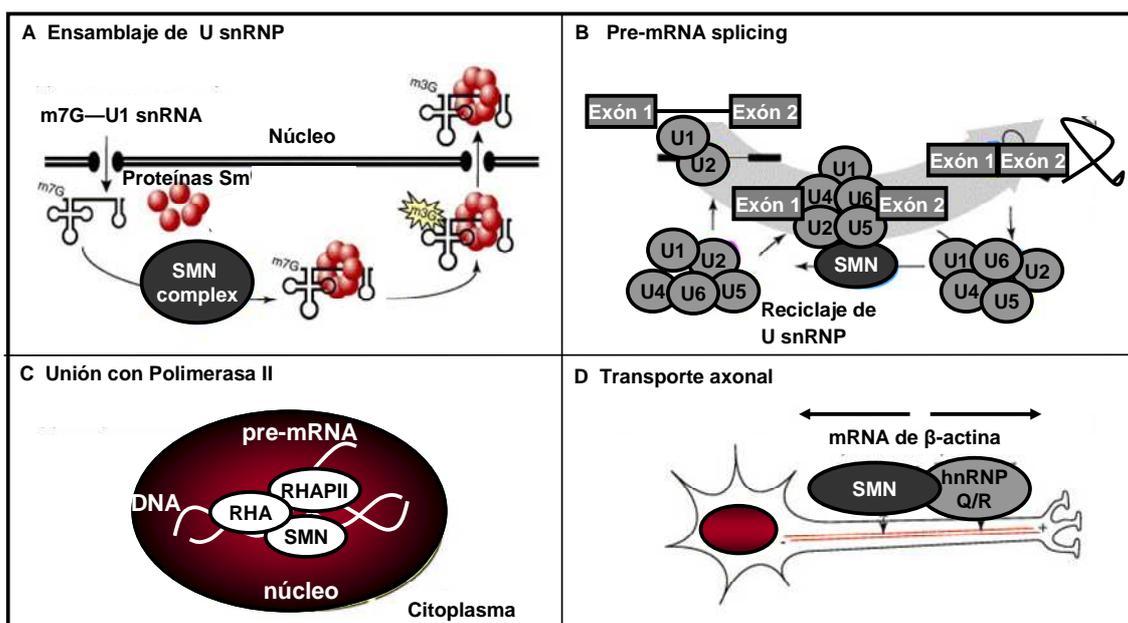


Figura 25. Funciones de la proteína SMN.

A) Función de SMN en el ensamblaje de U snRNPs. Pre-snRNA se transporta al citoplasma donde se une al complejo de SMN y anillos heptaméricos de Sm. El complejo SMN con el snRNPs ensamblado se transporta al núcleo donde maduran las snRNPs. B) Participación de SMN junto con U snRNP en el pre-mRNA splicing. C) SMN interactúa con la RNA helicasa (RHA) y estimula la transcripción mediante RNA polimerasa II (RNAPII). D) SMN se une a hnRNPs R/Q de mRNA de β actina modulando su transporte axonal. Modificado de (Eggert et al., 2006).

Función específica en las neuronas

Una de las funciones específicas de la proteína SMN en las neuronas está relacionada con el transporte de mRNAs de β -actina en un complejo que contiene hnRNP-Q/R y ZBPs (Rossoll and Bassell, 2009; Glinka et al., 2010). SMN interactúa con la proteína hnRNP R, la cual se une al mRNA de β -actina. Otros estudios han demostrado la interacción directa entre SMN y profilina II, que es un factor específico neuronal requerido para la polimerización de la β actina (Figura 25D) (Sharma et al., 2005).

6.4 Causas de AME

Basándose en la afectación selectiva de las MNs y del tejido muscular esquelético se han definido dos hipótesis en las cuales se propone la posible causa de la enfermedad (Monani, 2005). La primera considera que la AME es una consecuencia directa del defecto en la biogénesis de los snRNPs y en un *splicing* incorrecto de los pre-mRNA, mientras que la segunda teoría, está basada en la función específica de SMN en el transporte de mRNA axonal.

Los estudios que apoyan la primera hipótesis muestran una alteración a nivel de snRNAs y defectos en el *splicing* relacionado con la reducción preferencial de snRNP U11 en la médula espinal, en los tejidos deficientes de AME en el ratón (Zhang et al., 2008b). Además, se ha demostrado una correlación entre la capacidad de la proteína SMN de ensamblar los snRNPs y el fenotipo en modelos animales de la enfermedad (Gabanella et al., 2007; Workman et al., 2009).

Según la otra hipótesis, la causa de AME estaría debida a la interrupción del transporte anterogrado y retrogrado de mRNA de β -actina por los niveles bajos de SMN (McWhorter et al., 2003; Carrel et al., 2006).

Las dos hipótesis podrían tener una explicación común si se considera que niveles bajos de SMN producirían una reducción en el ensamblaje de

snRNP causando una disminución del *splicing* de un gen específico y crucial con una función relacionada con el transporte de mRNA a la sinapsis en las MNs (Burghes and Beattie, 2009).

6.5 Genes y proteínas modificadoras del fenotipo de la AME

El gen candidato modificador de la AME más conocido es el gen **SMN2**. Como ya se ha descrito anteriormente, el número de copias de este gen influye en el fenotipo de la enfermedad. No obstante, se han observado casos de hermanos con el mismo número de copias de *SMN2*, pero con distinta sintomatología (DiDonato et al., 1996; Coover et al., 1997), lo que sugiere la participación de otras proteínas en la enfermedad.

Los análisis de los pacientes con AME tipo I demostraron que en 50% de los casos se observa una delección de la proteína **NAIP** y sólo en el 10% en tipo III y IV. Los estudios realizados sobre la función de la proteína NAIP demostraron un efecto anti-apoptótico de esta proteína en las MNs (Liston et al., 1996).

Por otro lado, la implicación de la proteína SMN en la regulación de la dinámica de β -actina en células neuronales sugiere que los genes codificadores para proteínas reguladoras del transporte de β -actina, como Profilina II y Plastina 3, pueden modificar la severidad de la enfermedad (Rossoll et al., 2003).

Se han descubierto varias proteínas que interactúan directamente o a través de las Gems con la proteína SMN. Todavía no se conoce bien la implicación funcional de estas interacciones, pero se sugiere que todas ellas podrían funcionar como modificadoras del fenotipo. Algunas de ellas están presentadas en la siguiente tabla.

Tabla 7. Proteínas que interactúan con SMN o con el complejo SMN.

PROTEÍNA	FUNCIÓN	REFERENCIAS
Bcl-2	anti.-apoptótica	Sato, Eguchi et al. 2000
Coilina	Biogénesis de las snRNPs	Pellizzoni, Kataoka et al. 1998
E2	Activador de la transcripción	Strasswimmer, Lorson et al. 1999
FBP	Regulación de la transcripción y estabilidad del mRNA	Williams, Hamilton et al. 2000
Fgf-2	Factor de crecimiento celular	Claus, Doring et al. 2003
Fibrilarin	Procesamiento de pre-rRNA o metilación	Pellizzoni, Baccon et al. 2001
GAR1	Acoplamiento y metabolismo de los snoRNPs	Pellizzoni, Baccon et al. 2001
Geminas 2-7	Varias	Liu and Dreyfuss 1996; Pellizzoni, Baccon et al. 2002
hnRNP Q	Transporte y <i>splicing</i> de mRNA	Rossoll, Kröning et al. 2002
hnRNP R	Transporte y <i>splicing</i> de mRNA	Rossoll, Kröning et al. 2002
hnRNP U	Transporte de mRNA	Pellizzoni, Baccon et al. 2002
LSm4	Unión a RNA	Brahms, Meheus et al. 2001
Myb-binding protein 1 ^a	Desconocida	Fuller, Man et al. 2010
Profilina	Proteína de unión a actina	Giesemann, Rathke-Hartlieb et al. 1999)
RHA	RNA helicasa	Pellizzoni, Charroux et al. 2001
RNA polimerasa II	Transcripción de DNA a RNA	Pellizzoni, Charroux et al. 2001
Sm	Unión a RNA	Friesen and Dreyfuss 2000
SMN	Varias	Liu et al. 1996
ZPR1	Participa en el transporte de los hnRNPs	Gangwani, Mikrut et al. 2001

6.6 Posibles terapias para la AME

Para la obtención de una terapia eficaz para la AME se han empleado diferentes estrategias:

- Incremento de la proteína FL-SMN mediante el gen *SMN2*. Para ello, se ha propuesto estimular la actividad del promotor del gen *SMN2* con el fin de aumentar los niveles de inclusión del exón 7 en el mRNA transcrito a partir del gen *SMN2*. Se han identificado factores y componentes químicos que pueden ser útiles para ambas estrategias, la supresión de la exclusión del exón 7 del gen *SMN2* o aumentar la expresión del gen *SMN2* (Tabla 8).

Tabla 8 Fármacos usados para aumentar a los niveles de la proteína SMN funcional.

Fármaco	Efecto	Referencia
Acido vaproico	Aumenta los niveles de la proteína completa SMN	Brichta, Hofmann et al. 2003
Aclarubicin	Aumenta los niveles de la proteína completa SMN	Andreassi, Jarecki et al. 2001
cAMP	Aumentan la expresión del <i>SMN</i>	Majumder, Varadharaj et al. 2000
Fenilbutirato	Aumentan la expresión del <i>SMN</i>	Andreassi, Angelozzi et al. 2000
Fenilbutirato sódico	Incrementa la mRNA del <i>SMN</i>	Brahe, Vitali et al. 2005
Htra-2-beta	Estimula el <i>splicing</i> aumentando la expresión del producto completo de SMN por <i>SMN2</i>	Hofmann, Lorson et al. 2000
Interferonas	Aumentan la expresión del <i>SMN</i>	Baron-Delage, Abadie et al. 2000
Pseudocantharidin	Estimula la incorporación del exón 7 en pre-mRNA de SMN	Zhang, Kelemen et al. 2011
Trichostatina A	Aumentan la expresión del <i>SMN</i>	Avila, Burnett et al. 2007
Vanadato sodico	Aumenta el <i>splicing</i> endógeno de <i>SMN2</i>	Zhang, Lorson et al. 2001
Riluzole	Mejora la supervivencia sin afectar la expresión de <i>Smn</i>	Haddad, Cifuentes-Diaz et al. 2003

- La terapia génica para la producción de una copia extra del gen *SMN1* funcional o de cDNA de SMN en las MNs. Para introducir el gen *SMN1* en la médula espinal *in vivo* se ha propuesto utilizar vectores lentivirales (Azzouz et al., 2004). Otros estudios independientes demostraron mediante una transducción de las MNs con virus del tipo Adenovirus que sobre-expresa el gen *SMN2* humano en un modelo murino de AME, un aumento significativo en la elongación de la vida de estos ratones de 5-10 días hasta 210 días (Foust et al., 2008; Gavrulina et al., 2008).

- Células madre Las células madre pueden diferenciarse a MNs *in vitro* (Wichterle et al., 2002), y que estas células diferenciadas al inyectarse en modelos murinos consiguen establecer conexiones, crean sinapsis y forman uniones neuro-musculares funcionales (Deshpande et al., 2006). Una ventaja de esta opción es que permite el trasplante a los pacientes sin generar problemas de autoinmunidad (Dimos et al., 2008).

OBJETIVOS

I. Estudio de la implicación de la vía NF- κ B en la supervivencia de las motoneuronas (MNs) mediada por los factores neurotróficos (NTFs).

1.1 Examinar la habilidad de los NTFs para activar la vía NF- κ B analizando los niveles de la fosforilación de I κ B quinasa y la translocación nuclear de RelA.

1.2 Analizar los efectos de la interferencia de las I κ B quinasas sobre la supervivencia de las MNs inducida por los NTFs.

1.3 Determinar la implicación de la vía canónica y la vía no-canónica de NF- κ B en la supervivencia de las MNs.

1.4 Examinar la implicación de las proteínas de la familia Bcl-2 en la muerte de las MNs inducida por el bloqueo de la vía canónica de NF- κ B.

1.5 Caracterizar los efectos de la sobre-expresión de Bcl-x_L y la inhibición del Bax en la muerte inducida por el bloqueo de la vía canónica de NF- κ B.

1.6 Analizar las proteínas reguladoras y reguladas por la vía canónica de NF- κ B.

II. Estudio de los cambios morfológicos y de la supervivencia en un modelo *in vitro* de Atrofia Muscular Espinal (AME).

2.1 Estudiar el efecto de la reducción de la proteína SMN en las motoneuronas de ratón en cultivo.

2.2 Analizar los efectos de la sobre-expresión de Bcl-x_L sobre los cambios en la supervivencia y degeneración neurítica en el modelo *in vitro* de AME.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivos celulares

1.1 Líneas celulares:

HEK293T

La línea celular HEK293T (*del inglés Human Embryonic Kidney*) proviene de células humanas de epitelio renal embrionario, las cuales han sido transformadas con el gen E1A de adenovirus que además expresa el antígeno T de SV40, permitiendo una replicación episomal de plásmidos que contienen la región promotora SV40. Se utilizó para la producción de partículas lentivirales tras una transfección con plásmidos determinados (descritos en la parte Generación de vectores lentivirales en Materiales y Métodos)

Medio: DMEM (Gibco, Invitrogen) suplementado con 10% de suero bovino fetal (Gibco) inactivado a 55° C y 20 µg/ml de penicilina/estreptomicina (Gibco).

Mantenimiento: En placas de p100 dividiéndolas cada 2-3 días en dilución 1:10. Las células se incuban a 37° C, en atmosfera de 95% de aire y 5% de CO₂.

NSC34

NSC-34 es una línea celular híbrida, producida por la fusión de células embrionarias de médula espinal de ratón y neuroblastoma de ratón. Se observan dos poblaciones celulares: pequeñas células no diferenciadas multinucleares con capacidad de dividirse y células alargadas. En el presente estudio, la línea celular NSC34 se usó como un modelo adecuado para determinar la transfección y transducción lentiviral. Su origen medular permite extrapolar los resultados obtenidos para siguientes estudios realizados en cultivos primarios de MNs

Medio: DMEM, 10% suero bovino fetal inactivado a 55° C, 20µg/ml de penicilina/estreptomicina y L-Gultamina en concentración 2 mM.

Mantenimiento: Las células NSC34 se mantienen en placas p100. La división se realizó cada 2-3 días, a una dilución 1:3-1:4, dependiendo de la velocidad de crecimiento. La incubación se efectúa en incubadores con 5% de CO₂ a 37° C.

Congelación y descongelación de líneas celulares

Las células (NSC34 o HEK293T) de una placa confluyente (contiene aproximadamente $8-9 \times 10^6$ células) se despegan usando 1-2 ml de medio de cultivo. Se centrifugaron a 130g durante 5min y se aspira el medio. El *pellet* se resuspende en 1 ml de medio de congelación (90%HI-FBS y 10% de DMSO (Sigma)). Para conseguir un proceso de congelación lento primero las células se congelan a -80° C durante 24 h y seguidamente se almacenan en N_2 líquido.

Las células congeladas se descongelan directamente a 37° C. Una vez descongeladas, se pasan a un tubo nuevo añadiéndoles medio basal hasta un volumen final de 10ml y se centrifugan 5 min a 130 g. El *pellet* se resuspende en medio de cultivo. Las células se cultivan en placas de p100 en estufas de incubación con atmósfera de CO_2 controlada.

1.2 Cultivo primario de motoneuronas de ratón

1.2.1 Preparación de placas para el cultivo primario de MNs con sustratos de adhesión celular.

Poli-DL-Ornitina/Laminina

Una solución *stock* de 10 mg/ml de poli-DL-ornitina (Sigma) se disuelve en tampón bórico-borato a una concentración de trabajo de 35 μ g/ml. Las placas de cultivo se cubren con un volumen adecuado durante 4 h a temperatura ambiente. Se lavan con H_2O y seguidamente se prepara una solución de 3.8 μ g/ml de Laminina (Gibco) en medio L15 con la que se cubren las placas, dejándolas un mínimo de 2 h a 37° C.

1.2.2 Medios de cultivo y soluciones.

Para aislar y cultivar las MN se usan las siguientes soluciones y medio.

Tabla 9. Medios de cultivo primario y preparación.

Solución/Medio	Preparación
GHEBS: pH7.4	<ul style="list-style-type: none"> •137 mM NaCl •2.6 mM KCl •25 mM glucosa •25 mM Hepes •100 µg/ml Estreptomina •100 µl/ml de penicilina
Tampón bórico-borato pH 8.3	<ul style="list-style-type: none"> •Tetraborato de sodio •150 mM Acido bórico
L15 completo (L15c)	<ul style="list-style-type: none"> •Medio L15 • D-glucosa 18mM •NaHCO₃ •100 /ml Estreptomina •100µl/ml de penicilina
NBMc	<ul style="list-style-type: none"> •Medio neurobasal •2% B27 • 2% HI-HS •125 nM L-glutamina •50 µM β-mercaptoethanol
BSA 4%	<ul style="list-style-type: none"> •BSA (Sigma) 7.5% •Medio L15
NBMc+NTFs (cóctel de NTFs)	<ul style="list-style-type: none"> •NBMc •CNTF, GDNF y BDNF 10 ng/ml

1.2.3 Obtención de MNs de ratón. Disección

El cultivo primario de MNs se realiza a partir de embriones de ratón de 12.5 días (E12.5). En esta etapa del desarrollo las MNs son más grandes y menos densas que el resto de células de la médula espinal y son fácilmente aislables. Los pasos seguidos para la obtención de las MNs de la médula espinal son los siguientes:

El primer paso consiste en extraer los embriones de la placenta y colocarlos en una placa con una solución salina, GHEBS. Seguidamente cortamos la cabeza de cada embrión, sujetando el tronco con la ayuda de unas mini-agujas sobre una placa de silicona con GHEBS y fijamos el resto del embrión con la parte ventral hacia abajo. Se deseca la piel y los vertebrales. Las MNs están localizadas en la parte ventral por lo que la parte dorsal de la médula espinal se corta y descarta a una profundidad de 1mm aproximadamente. Una vez extraída la médula espinal se separan las meninges, de esta forma se previene la presencia de otros tipos celulares en el

cultivo purificado. Cada medula se corta en 3-4 fragmentos de tamaño de 2-3 mm, los fragmentos de 4 médulas se colocan en un tubo de fondo cónico con GHEBS (Figura 26).



Figura 26. Extracción de médula espinal de embrión de ratón de E12.5.

1.2.4 Purificación

El proceso de purificación empieza con el lavado de los fragmentos de la médula espinal con GHEBS. Posteriormente se realiza una disociación enzimática con tripsina al 0.025% (Sigma) en medio GHEBS durante 9 min a 37° C. Con una pipeta Pasteur se recoge el tejido y se coloca en otro tubo con 100 μ l de BSA al 4%, 800 μ l de medio L15c y 100 μ l DNAsa (Boehringer Mannheim, 1 mg/ml) se agita durante 2 min. Tras este proceso, se realiza la primera disociación mecánica pasando los trozos de tejido de la médula espinal a través de una punta de pipeta de 1 ml. Los trozos se incuban durante 2 min a temperatura ambiente para que precipiten, el sobrenadante donde las células disociadas permanecen en suspensión se recoge y se coloca en un tubo nuevo. Los trozos de tejido de médula espinal no disociados se les añade 100 μ l de BSA al 4%, 900 μ l de medio L15c y 20 μ l DNAsa y se realiza una segunda disociación mecánica pasándolos a través de una punta de pipeta de 1ml. El sobrenadante obtenido fue colocado en el tubo que contiene el “primer” sobrenadante. A las células disociadas se añaden 4 ml de BSA al 4% y se centrifuga durante 5 min a 140 g. El *pellet* se resuspende en 1 ml de L15c, pasando 4 veces a través de la punta de pipeta con filtro. El proceso de purificación de las MNs del resto de células que contienen la médula termina con un gradiente de densidad de Optiprep (Axis-Shield) al 12.5% en GHEBS, centrifugando durante 10 min a 520 g. Después de esta centrifugación se obtiene una banda que corresponde a las MNs, se recoge con la pipeta y las células obtenidas se disponen en un tubo nuevo (Figura 27).

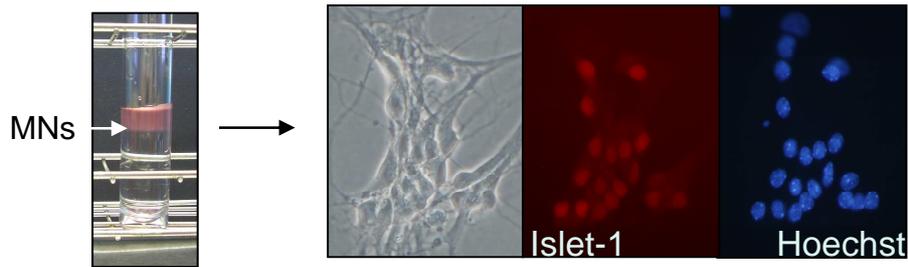


Figura 27. Obtención de MNs de médula espinal de ratón de E12.5 tras un gradiente de densidad Optiprep. Fotos de contraste de fase a MNs e inmunofluorescencia (Islet 1/2 y Hoechst) para evaluar la eficacia de la purificación.

Las MNs se siembran en placas de cultivo previamente tratadas con poli-DL-ornitina e incubadas con laminina en medio L15.

Las células se siembran en medio NBMc+NTFs y se mantienen aproximadamente 15 días en cultivo.

Para eliminar la división de células mitóticas se añade Aphidicolina al medio de cultivo (2 μ g/ml; Sigma).

Con el fin de evaluar la eficacia de la purificación se usan anticuerpos contra los factores de transcripción Islet 1/2 que expresan únicamente las MNs y Hoechst para localización nuclear (Figura 27).

2. Generación de vectores lentivirales de interferencia y sobre-expresión de proteínas. Transducción lentiviral

2.1 Técnica de interferencia

El RNA de interferencia (RNAi) es una técnica usada para interferir el mRNA inactivando de esta manera la expresión de genes dianas. Se han descrito varias clases de moléculas pequeñas de RNA que desencadenan el proceso de silenciamiento por interferencia, los más ampliamente conocidos son los RNA de interferencia pequeños (siRNA). Estas moléculas tienen un tamaño de 21 a 25 nucleótidos y son producidas a partir de precursores de RNA de doble cadena que pueden variar de tamaño y origen (Figura 28). Estos precursores son procesados por miembros de la familia de enzimas que degradan RNA, conocidas como la familia de la RNAsa tipo III. En particular, la enzima que degrada los precursores de doble cadena RNA hasta siRNA se conoce como *Dicer*. Los siRNA resultantes son incorporados a un complejo

denominado RISC (*del inglés, RNA-induced silencing complex*). Este complejo está compuesto por numerosas proteínas. La incorporación del siRNA al RISC está acoplada a la separación de las dos cadenas en cadenas sencillas, sólo una de las cuales, conocida como cadena guía, se mantiene asociada al complejo y sirve para identificar el mRNA con la secuencia complementaria. Cuando las moléculas de mRNA complementarias son encontradas, la interacción entre el siRNA y este mRNA desemboca en el corte del mRNA y su posterior degradación (Hannon and Rossi, 2004).

En el presente estudio hemos utilizado vectores lentivirales donde están introducidas las secuencias que forman un shRNA (small hairpin RNA) para bloquear la expresión de diferentes componentes de la vía NF- κ B, la proteína SMN y Bax en cultivos primarios de MNs.

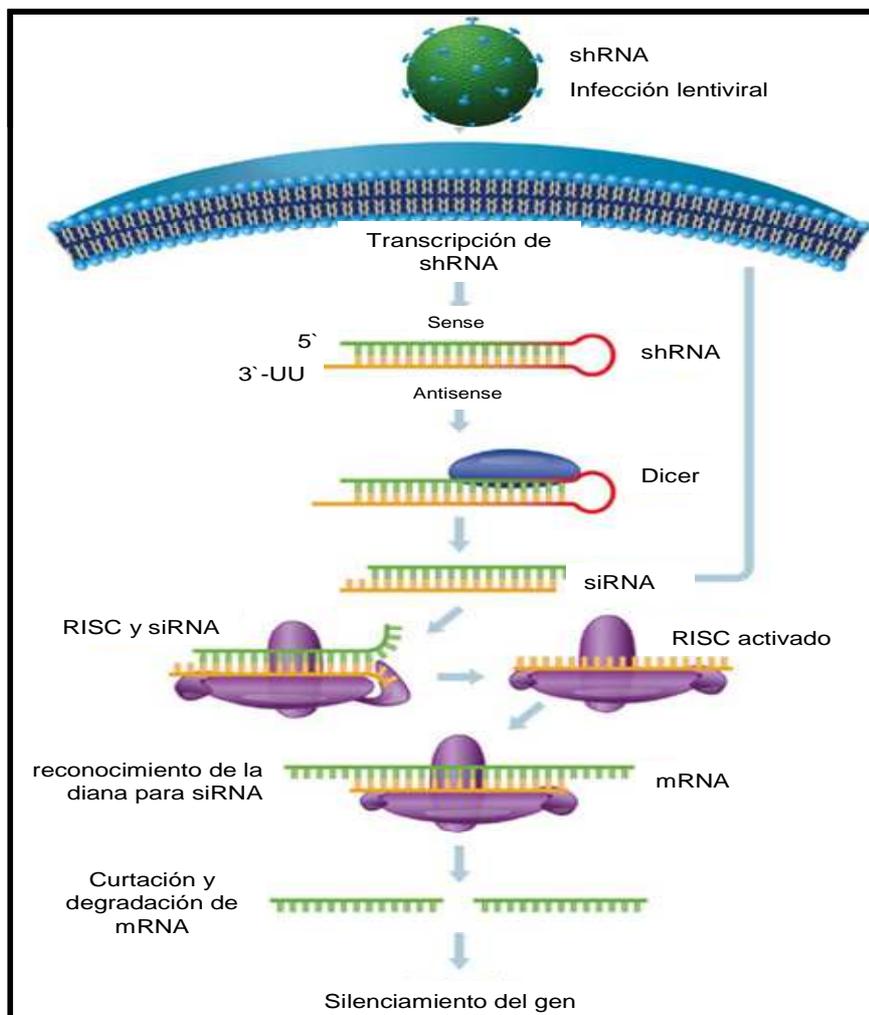


Figura 28. Silenciamiento genético a través de shRNA. Modificado de (Hannon and Rossi, 2004).

2.2 Vectores Lentivirales

Los vectores lentivirales permiten la integración del DNA plasmídico en el genoma de las células que infectan, por ello tienen la ventaja de conseguir una expresión a largo plazo.

El sistema de producción lentiviral está dividido en tres vectores diferentes:

- pM2G: Vector que codifica para la cápside del virus. La proteína vírica procede del virus estomatitis vesicular, permitiendo la infección de una amplia variedad de tejidos y líneas celulares.
- psPAX2: Es el vector que contiene todas las proteínas necesarias para el empaquetamiento del virus. Tiene un promotor muy potente CAG que dará lugar a una alta transcripción de los genes de empaquetamiento, entre los cuales son las proteínas necesarias para la transactivación (TAT), la proteína necesaria para la regulación de transporte y el procesamiento de RNA (Rev) y la proteína para la transcriptasa reversa.
- Vector lentiviral que contiene la secuencia diseñada de DNA que se desea transferir en la célula diana y la secuencia para la expresión de la proteína fluorescente GFP (*del inglés, Green Fluorescent Protein*) en los vectores pLVTHM y pWPI y el GFP Venus en vector FSV

En el presente estudio se han utilizado distintos vectores para el clonaje de las secuencias de interferencia de diversas proteínas. En el vector **FSV** (cedido por el Dr. Mario Encinas) se clonaron las secuencias de RNA para el silenciamiento de los genes: IKK α , IKK β , RelA, RelB y Bax. Para silenciar el gen Smn fue usado el vector **pLVTHM**. Para el clonaje en este vector, primero la secuencia de RNA de interferencia se introduce en el vector **pSUPER. retro.puro** seguido de un protocolo de ligación y transformación. Seguidamente, el promotor H1 con el casete shRNA fue sub-clonado en **pLVTHM**).

A continuación se muestra el resumen de las secuencias shRNA diseñadas para silenciar mRNA de diferentes proteínas y los vectores lentivirales en los cuales están clonadas.

Tabla 10. Vectores lentivirales, la secuencia de RNA de interferencia clonada y procedimiento.

Vector	RNA de interferencia	Secuencia	Procedencia
FSV	IKK α	5'-CAGGCTCTTTTCAGGGCAT-3'	Dr. M.Encinas
FSV	IKK β 1	5'-GCTGCACATTTGAATCTGTAT-3'	Dr. M.Encinas
FSV	IKK β 2	5'-GCTCTTAGATACCTTCATGAA-3'	Dr. M.Encinas
FSV	RelA (p65)	5'-AGATCTTGAGCTCGGCAGTG-3'	Dr.X.Dolcet
FSV	RelB	5'-GCATGCGCTTCCGCTACGAGT-3'	Dr.X.Dolcet
pSUPER pLTVHM	SMN1	5'- TGACAAGTGTCTGCTGTT -3'	Dra.A.Garcerá
pSUPER pLTVHM	SMN2	5'- AGTAAAGCACACAGCAAGT -3'	Dra. A.Garcerá
FSV	Bax	5'-GCAGCTGACATGTTTGCTGAT-3'	Dr. M.Encinas

Seguidamente se muestra una lista de los plásmidos usados su promotor y origen.

Tabla 11. Vectores lentivirales y sus promotores

Vector	Promotor	Observación
pLVTHM	H1	Trono Lab
psPAX2	CMV	Trono Lab
pM2G	CMV	Trono Lab
pcDNA3	CMV	Invitrogen
pSUPER. retro	H1	OligoENgine
FSV	CMV	Trono Lab
pWPI	CMV	Nadlini 1996, Zufferey 1998

Finalmente, mostramos una tabla con las enzimas de restricción usadas para cada plásmido.

Tabla 12. Vectores lentivirales y las enzimas específicas de restricción.

Vector	Enzimas de restricción	
FSV	BamH1	Age1
pLVTHM	Cla1	EcoR1
pSUPER	Hind II	Bg I

Para la sobre-expresión de la proteína Bcl-x_L la secuencia del cDNA de Bcl-x_L se ha expresado en el vector **pWPI** (procesado en el laboratorio de Dr.J.Comella).

2.3 Transformación de bacterias

Las células de *E. coli* fueron transformadas con el fin de amplificar los plásmidos de interés. Para ello se usaron células competentes procedentes de la cepa DH5 α .

Las células competentes se descongelaron en hielo. Se añadió 200 ng del DNA plasmídico (con resistencia a la ampicilina) en 200 μ l de células competentes, aproximadamente 1×10^6 células. La suspensión celular se mantuvo en hielo durante 10 min. Después de este tiempo se efectuó un choque térmico a 42° C durante 2 min. Las células se enfriaron en hielo durante 1 min, y se añadió 1 ml de LB sin antibiótico. Tras una incubación de 1 h a 37° C, se efectuó otra centrifugación de 2 min a 5000 rpm. Una parte del sobrenadante fue retirada y el resto fue resuspendido con el *pellet* y sembrado en una placa de LB con ampicilina (Medio LB, Agar 20g/L y ampicilina 50 μ g/ml).

Para la obtención de DNA plasmídico a gran escala se usó el *Kit Qiagen plasmid purification* (Qiagen).

2.4 Producción de partículas lentivirales

Para poder analizar las funciones de las diferentes proteínas en el nuestro modelo, hemos establecido un sistema lentiviral para la expresión de shRNA con el fin silenciar específicamente mRNA de proteínas determinadas.

Preparación de placas de colágeno

El colágeno (Sigma) se usa a una concentración de trabajo de 100 μ g/ml con acético 200 μ M. Se pone el volumen adecuado en cada placa de p100 y se deja toda la noche a temperatura ambiente. Una vez secas las placas se pueden guardar a 4° C durante 15 días.

Transfección de las células HEK293T

Para la producción de partículas lentivirales con secuencias incorporadas de shRNA o de sobre-expresión, se usó la línea celular HEK293T. Las células HEK293T se transfectan con los plásmidos de envoltura (pM2G), empaquetador (pPAX), y el plásmido con la secuencia de shRNA o de la secuencia de sobre-expresión, usando polietilenimina (PEI, Sigma). La PEI es un agente polimérico que facilita la entrada de los plásmidos en las células y promueve la llegada del DNA al núcleo. La concentración final de PEI que se usó para transfectar fue 10 μM (de una concentración *stock* 200 μM a pH 5.6).

La transfección de las células HEK293T se realizó a través del siguiente protocolo:

1. Las células HEK293T se siembran en placas p100 pre-tratadas con colágeno (1.7×10^6 células por placa).
2. 15 horas después las células se lavaron con Optimem (Gibco) y se transfectan con: 20 μg de vector lentiviral que contiene la secuencia de shRNA o la de sobre-expresión (FSV, pLVTHM, FCIV, pcDNA3), 13 μg de pPAX y 7 μg de pM2G y se añadió 1500 μl de Optimem. Por otro lado, se prepara una solución de 1260 μl de Optimem y 240 μl de PEI (350 μM , pH 5.6).
3. Se añade el PEI diluido sobre la solución que contiene los vectores lentivirales gota a gota y se incuba durante 10 min a temperatura ambiente.
4. Durante este tiempo las placas se lavan con 5ml de Optimem para eliminar el suero.
5. Tras el tiempo de incubación se aspira el medio Optimem y se añade la mezcla de transfección.
6. Finalmente, se añaden a las placas 4 ml de medio Optimem.
7. Tras una incubación de 1 hora a 37° C y 5% CO₂, el medio se cambia por medio DMEM+10% FBS y nuevamente las células se incuban a 37° C y 5% CO₂ durante 72h.
8. Tras este tiempo, el medio se recoge, se centrifuga, se filtra, se alikota y se guarda -80°C. Posteriormente titulamos las partículas virales.

2.5 Titulación lentiviral

Es importante que la cantidad de las partículas virales producidas por HEK293T y usadas para la transducción de cada célula sea siempre la misma para cada experimento. Por ello, después de cada nueva producción de virus, se lleva a cabo una titulación basada en las unidades de células transducidas por 1 ml de medio de virus.

Para la titulación se siembran 20.000 células HEK293T por pocillo en tres pocillos por cada medio de virus para titular. Dos horas después, en cada uno de los tres pocillos se añaden 50, 100 y 150 μ l de medio con virus. Tras 72 h se realizan fotografías utilizando un microscopio invertido (Olympus Optical) para poder valorar las células GFP positivas respecto al número total de células. De esta manera se permite calcular el número de las partículas lentivirales en 1 ml de medio.

Por otro lado, hemos utilizado inmuno-ensayo enzimático desarrollado para la detección y cuantificación de la proteína que forma parte del envoltorio interno del lentivirus HIV-1 p24, *QuikTiter Lentivirus Quantification Kit* (HIV p24 ELISA, Cell Biolab). Las dos formas de cuantificación mostraron resultados similares. A base de cual hemos calculado para cada transducción aproximadamente 10 partículas virales por cada célula independientemente del tipo de transducción (interferencia o sobre-expresión).

2.5 Transducción lentiviral

En placas de 4 pocillos se sembraron 15.000 o 70.000 células por pocillo, dependiendo del tipo de experimento, en presencia de NTFs. Cuatro horas después, el medio de cultivo fue cambiado con medio conteniendo partículas virales en una relación del número de células en cultivo respecto al número de unidades virales de 1/10 durante 20 horas. Después de 72 h se pudo realizar una estimación de la eficiencia de la infección visualizando el porcentaje de células GFP positivas.

3. Ensayos de supervivencia neuronal

Los experimentos de supervivencia se realizaron llevando a cabo siempre tres repeticiones por cada condición. Cada uno de los experimentos se

realiza mínimamente tres veces, por tanto, tendremos de cada condición un mínimo de 9 n que proviene de tres experimentos distintos.

3.1 MNs no transducidas

Dependiendo del tipo experimento, las MNs se cultivan en placas de 4 pocillos en presencia o ausencia de cóctel de NTFs (BDNF, GDNF, CNTF a una concentración 10ng/ml) durante 4 h. Después de este tiempo las células se lavan con NBM y se les añaden los diferentes tratamientos (especificados en los Resultados). La supervivencia se evaluó a tiempos determinados para cada experimento. Al inicio de cada ensayo, considerado como tiempo 0, se toman fotografías con el microscopio invertido de contraste de fase en 4 campos centrales de cada pocillo. Después se establecen diferentes periodos de análisis para cada experimento donde en cada periodo se hacen fotografías de los mismos campos determinados en el momento inicial. Los valores obtenidos se presentan como porcentaje de supervivencia respecto al día 0 ($t=0$) (Figura 29). Como control positivo se usaron las células tratadas con NTFs y como negativos se tomaron los valores obtenidos en las células no tratadas con NTFs. Los resultados se expresaron como porcentaje de MNs contadas al final del tratamiento, respecto a las células contadas inicialmente en el mismo campo.

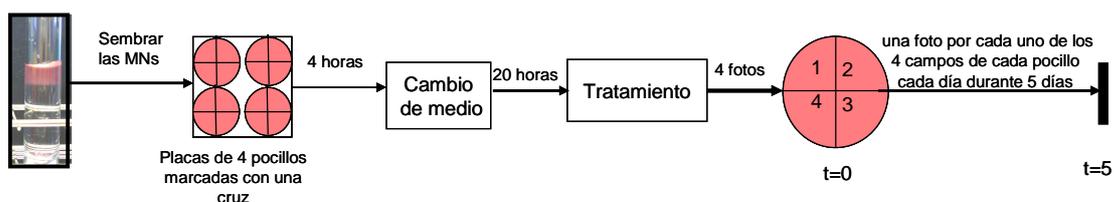


Figura 29. Esquema de ensayos de supervivencia de las MNs tratadas y no tratadas con NTFs y diversos tipos inhibidores (mirar Resultados).

3.2 MNs transducidas con lentivirus.

Se siembran 15.000 MNs por pocillo. Después de 4 horas, las células fueron transducidas con medio conteniendo partículas lentivirales de sobre-expresión y/o interferencia, en presencia de NTFs. Tras veinte horas de incubación, el medio fue cambiado con medio NBMc+NTFs y se realizó el primer recuento: 4 fotos con el microscopio invertido de contraste de fase a los cuatro campos marcados de cada pocillo por cada condición y por triplicado.

Este primer recuento se consideró como el tiempo 0. Después del tiempo inicial se establecen diferentes periodos de análisis para cada experimento (mirar Resultados) donde en cada periodo determinado se hacen fotografías de los mismos campos determinados en el momento inicial (Figura 30).

Para los experimentos de evaluación de cada factor neurotrófico por separado (BDNF o GDNF o CNTF), las células fueron sembradas, transducidas y mantenidas únicamente en presencia del NTFs en el medio NBMc. Los controles fueron transducidos y mantenidos con el cóctel de NTFs+NBMc durante un tiempo determinado (indicado en los Resultados).

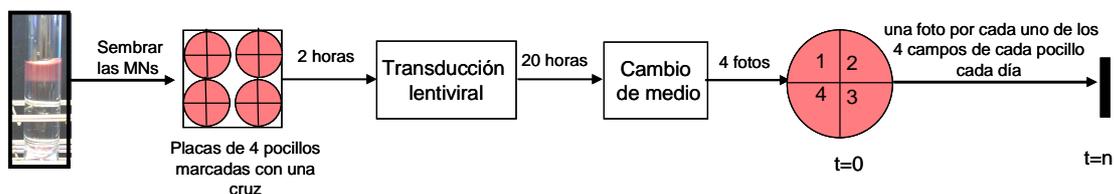


Figura 30. Esquema de ensayos de supervivencia de las MNs transducidas con lentivirus.

La duración de cada experimento está indicada en los resultados. El valor de supervivencia se expresó como porcentaje de MNs presentes en el cultivo respecto de número de células contadas al inicio del experimento en el mismo campo.

4. Inhibidores

En el presente estudio hemos utilizado tres tipos inhibidores para ensayos de supervivencia y *western blot* (WB): el Inhibidor de la activación de la vía NF- κ B (SN50; Calbiochem) y su control inactivo (SN50M; Calbiochem); el inhibidor del proteasoma (MG132; Calbiochem) y el inhibidor de la activación de PI3-K (LY294002; Tocris Bioscience).

4.1 El Inhibidor de la vía NF- κ B (SN50) y su control (SN50M)

SN50 y SN50M se usaron en concentraciones de 20 μ M para los ensayos de supervivencia. Las MNs fueron tratadas con SN50 o SN50M en presencia de cóctel de NTFs y contadas (tiempo 0). Tras 72h se efectuó el

segundo recuento a las MNs (ver Materiales y Métodos-“Ensayos de supervivencia neuronal”).

4.2 El inhibidor de PI3K (LY 292004)

El LY 292004 fue usado en concentración de 25 μ M para experimentos de supervivencia y WB. Para los ensayos de supervivencia las MNs se sembraron en presencia de 25 μ M LY294002 y presencia o ausencia de NTFs. Los datos del porcentaje de células vivas se analizaron a 72h después del inicio del tratamiento respecto al primer recuento (tiempo 0) (ver Materiales y Métodos-“Ensayos de supervivencia neuronal”). Para los experimentos de WB, las MNs se sembraron en presencia de NTFs durante 4 horas, tras este tiempo se privaron de NTFs toda la noche. Al día siguiente las células se pre-trataron durante 45 min y después se estimularon durante 10 min con y sin 25 μ M LY294002 en presencia o ausencia de NTFs.

4.3 El inhibidor del proteasoma (MG-132)

El inhibidor de la regulación de la degradación de proteínas intracelulares MG-132 (revisado en (Ciechanover, 1994)) fue usado para bloquear la degradación proteasomal de I κ B α (inhibidor de la vía NF- κ B). Las MNs fueron pre-tratadas durante 30 min con MG-132. Tras este tiempo se estimularon a 30, 45 y 60 min con NTFs en presencia del inhibidor. El extracto proteico de estas células fue analizado mediante WB.

5. Inmunofluorescencia

Una vez finalizado el tratamiento, las células fueron lavadas con PBS1x y fijadas con paraformaldehído al 4% durante 10 min. A continuación las células se lavaron 3 veces con PBS 1x y nuevamente se fijaron en metanol absoluto a -20°C, finalmente se lavaron con PBS 1x. Se bloquearon 1 h con 4% de BSA diluido en PBS 1x y 0.5% de Triton X-100. Los anticuerpos primarios fueron diluidos en PBS 1x a una dilución adecuada para cada caso, se dejaron incubando durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se efectuaron tres lavados con PBS1x, seguidamente las células se incubaron con anticuerpo secundario, durante 1 h a temperatura ambiente.

Los experimentos de inmunofluorescencia siempre se realizaron con un control de anticuerpo secundario (muestras incubadas únicamente con anticuerpo secundario).

5.1 Valoración de la apoptosis neuronal - Hoechst 33258

La bis-benzimida (Hoechst 33258) es un colorante que tiñe núcleos celulares y permite detectar aquellos núcleos que tienen morfología apoptótica caracterizada por condensación o fragmentación nuclear (Figura 31). Para estos experimentos se sembraron 15.000 MNs por pozo y se mantuvieron en cultivo en presencia o ausencia de NTFs según las diferentes condiciones establecidas. Tras 15 horas de tratamiento, las células se lavaron con PBS 1x y se fijaron (descrito en el apartado anterior). En los experimentos con MNs transducidas con lentivirus la fijación se efectuó al quinto día, tras la transducción lentiviral. Después de estar fijadas los cultivos se tiñeron con bis-benzimida a una concentración de 20 µg/ml durante 45 min. Por último, las células se lavaron 3 veces con PBS1x. El porcentaje de muerte se evaluó contando aquellas células con un núcleo apoptótico respecto al total de células contadas y se realizaron tres repeticiones por cada una de las condiciones. Se realizaron mínimamente tres experimentos por cada tratamiento.



Figura 31. Núcleos con morfología apoptótica comparado con el núcleo con morfología sana.

5.2 Translocación nuclear de RelA (p65)

Las MNs fueron sembradas (15.000 células por pozo) sobre cubres de cristal en placas de p35. Las MNs se cultivan en presencia o ausencia de NTFs durante 24 h. Tras este tiempo las células se fijan con paraformaldehído al 4% y metanol absoluto. Se realizó una incubación de 30 min con la solución de bloqueo al 4% BSA diluido en PBS1x y 0.5% de Triton X-100, seguida de una incubación con el anticuerpo primario anti-RelA (1:100) toda la noche. Al día siguiente las células se lavaron 3 veces con PBS 1x y se incubaron con un

anticuerpo secundario *anti-rabbit* conjugado con sondas fluorescentes Alexa Fluor 488 (1:1000; Invitrogen) durante 1 h y posteriormente se efectuaron 3 lavados con PBS 1x. Finalmente, tras una tinción con Hoechst 33258, como indicador nuclear, los cubres fueron montados con Mowiol. La localización subcelular (citoplásmica o nuclear) de RelA fue analizado bajo un microscopio Confocal Olympus (con un objetivo de aceite de inmersión de 60x). En el caso de analizar de la localización celular de RelA en las MNs transducidas con shRNA para silenciar diferentes genes las células se fijaron al quinto día después de la transducción lentiviral.

Los resultados de la translocación nuclear de RelA se expresaron como porcentaje de las células con proteína RelA en el núcleo respecto al número total de células. De cada tratamiento se realizaron mínimamente tres experimentos, cuando por cada experimento se realizaron siempre tres o más repeticiones por condición.

6. Análisis morfométrico de la degeneración neurítica

Con el fin de determinar de los niveles de degeneración neurítica en los cultivos primarios de MNs transducidas con shSmn₂, las células se sembraron a una densidad de 5.000 MNs/cm² en NBMc+NTFs durante 4 horas. Tras este tiempo el medio fue cambiado con medio que contenía las partículas lentivirales de shSmn₂ o control, vector vacío (EV). Veinte horas después, el medio fue cambiado nuevamente con NBMc+NTFs. Obtuvimos imágenes de contraste de fase en el microscopio invertido con el objetivo 40x a diferentes tiempos: 3, 6, 9 y 12 días después de la transducción lentiviral

El análisis de las imágenes se realizó a través de programa *Image_J*. El primer paso consiste en generar una cuadrícula (línea de área =4298) y en cada campo se contaron las neuritas totales y cuales de ellas mostraron una morfología degenerativa. Se consideraron degenerantes aquellas neuritas que mostraban cambios degenerativos en sus neuritas denominados “*swelling*” y “*blebbing*” (Press and Milbrandt, 2008).

Se analizaron un mínimo de 10 campos por imagen (30-50 neuritas) de 6 imágenes por cada pocillo. Se contaron 3 pocillos por cada condición de tres experimentos independientes.

7. Técnicas bioquímicas

7.1 Extracción de proteínas y preparación de las muestras

El análisis de la expresión o fosforilación de proteínas, se realizó sembrando a 70.000 células por pozo, realizando los siguientes protocolos:

- En los experimentos para la valoración de los niveles de fosforilación las células se sembraron en un medio NBMc+NTFs, después de 4 horas fueron deprivadas de NTFs durante toda la noche. La estimulación se llevo a cabo al día siguiente (más especificado en los Resultados);
- Para los experimentos en los cuales se usaron diferentes inhibidores (LY294002 o MG132) las células se sembraron en un medio NBMc+NTFs, después de 4 horas fueron deprivadas de NTFs durante toda la noche. Tras este tiempo fueron pre-tratadas durante 45 min con el inhibidor y después tratadas con diferentes condiciones en presencia del inhibidor (más especificado en los Resultados);
- En el caso de los experimentos para la evaluación de la expresión de diferentes proteínas tras una transducción lentiviral las células se sembraron en NBMc+NTFs y tras cuatro horas se trataron con medios se cambia con el medio que contiene partículas lentivirales para distintas proteínas (ver Materiales y Métodos 2.2). Después de 20 h el medio se cambia por medio NBMc+NTFs. A determinados tiempos específicos de cada experimento, las células se lavan 3x PBS 1x (pH 7.2) y se recogen (en los Resultados esta indicado el tiempo de recogida dependiendo de cada experimento).

Los extractos proteicos de estas células fueron analizada mediante WB en condiciones desnaturalizantes, las muestras se recogieron con tampón de lisis que contiene dodecilsulfato sódico 2% (SDS). Las muestras se preparaban de manera que tuvieran el mismo volumen y cantidad de proteína (aproximadamente 20µg). A cada muestra fue añadido tampón de carga 5x (10%SDS, 250mM Tris pH 6.8, 50% glicerol, 720 mM β-mercaptoetanol y azul de bromofenol). Las muestras se hirvieron durante 5 min y por ultimo se centrifugaron 30 s.

7.2 Electroforesis, transferencia y bloqueo

Las proteínas fueron resueltas mediante electroforesis en geles de poli-acrilamida con SDS, utilizando un porcentaje de acrilamida del 8%. El proceso fue seguido de una electro-transferencia de las proteínas del gel a membranas de PVDF (Inmobilon-P, Millipore) utilizando el sistema semiseco para transferir.

Una vez terminada la transferencia, las membranas fueron bloqueadas durante dos horas con TBS-T (TBS 1x y 0.01% de detergente Tween 20 de Sigma) con un 5% de leche en polvo desnatada (Nestle).

7.3 Inmunoblot

Después del bloqueo, las membranas se lavaron 3 veces con TBST 1x y se incubaron con el anticuerpo primario indicado, toda la noche a 4°C y al día siguiente 2h a temperatura ambiente (Tabla 13).

Tras esta incubación, las membranas fueron lavadas 3 veces con TBS-T y nuevamente incubadas durante 1h con el anticuerpo secundario adecuado en solución de bloqueo (Tabla 14).

7.4 Eliminación del anticuerpo de la membrana (Stripping)

Los anticuerpos de la primera inmunodetección fueron eliminados de la membrana mediante una incubación con 62.5 mM Tris pH 6.8, 2% SDS y 100 mM β -mercaptoetanol durante 30 min a 50° C. A continuación fue reiniciado el proceso de bloqueo e inmuno detección.

7.5 Revelado de la señal

Los anticuerpos secundarios están conjugados con la peroxidada y se detectan mediante una reacción quimioluminiscente con los reactivos ECL-Advance (Amersham, Biosciences) o Super Signal (Pierce, Rockford, IL, USA).

El análisis densitométrico de las bandas detectadas fue llevado a cabo con el software Quantity One (Bio Rad, Hercules, CA, EUA).

Tabla 13. Anticuerpos primarios.

Anticuerpo	Dilución	Casa comercial
anti-IKK α	1:1.000	Calbiochem
anti- IKK β	1:1.000	Calbiochem
anti-fosfo IKK α /IKK β	1:1.000	Cell Signaling Technology
anti-NF-kappaB RelA	1:1.000	Cell Signaling
anti-fosfo-Ser.536 RelA	1:500	Cell Signaling
anti-IkB α	1:1.000	Santa Cruz
anti-fosfoSer32-IkB α	1:500	Cell Signaling Technology
anti-p100/p52	1:1.000	Cell Signaling Technology
anti-fosfoThr42-IkB α	1:500	Abcam
anti-Bcl-xL	1:5.000	BD Transduction Laboratories
anti-Bax	1:1000	Cell Signaling Technology
anti-Cleaved Caspase 3	1:1000	Cell Signaling Technology
anti- α Tubulin	1:50.000	Sigma
anti-fosfoSer473AKT	1:2.000	Cell Signaling
anti-AKT	1:5.000	Santa Cruz
anti-ERK1/2	1:1.000	BD Biosciences Pharmmingen
anti-fosfoERK	1:1.000	Cell Signaling
anti SMN	1:5.000	BD Transduction Laboratories
anti Bim EL	1:1.000	Sterssge
anti CREB	1:1.000	Cell Signaling
Anti-fosfo- Ser133 CREB	1:1000	Cell Signaling

Tabla 14. Anticuerpos secundarios.

Anticuerpo	Dilución	Casa comercial
Anti-mouse IgG-HRT	1:10.000	Sigma
Anti-rabbit IgG-HRT	1:10.000	Amersam
Anti-goat IgG-HRT	1:10.000	Sigma

8. Estadística

Los datos de cada experimento fueron procesados con el programa MiniTab 15 y se expresaron como la media \pm SEM. Todos los datos de tres o más experimentos independientes con $n \geq 3$ para cada condición de cada experimento se analizaron mediante:

- ANOVA de un único factor para determinar diferencias de supervivencia o degeneración neurítica entre grupos para la variable construcción de transducción lentiviral a cada punto temporal. Cuando el test de ANOVA era significativo (valores de p inferiores de 0.05), se realizaban comparaciones múltiple con el *test de Bonferroni*.
- ANOVA de dos factores usado como variable dependientes supervivencia y la condición tratamiento como fármacos o con construcción de transducción lentiviral. Se ha incluido el termino de interacción en el modelo y si era estadísticamente significativo (valores de p inferiores de 0.05) concluimos que hay efecto entre los efectos de un factor respecto el otro factor.

RESULTADOS

**The Canonical Nuclear Factor- κ B Pathway Regulates
Cell Survival in a Developmental Model of Spinal Cord
Motoneurons**

Stefka Mincheva, Ana Garcera, Myriam Gou-Fabregas,
Mario Encinas, Xavier Dolcet and Rosa M Soler

Journal of Neuroscience, 2011

DOI:10.1523/JNeurosci.0206-11.2011

I. Estudio de la implicación de la vía NF- κ B en la supervivencia de las MNs mediada por los NTFs

Activación de las vías PI3-K/Akt y ERK/MAPK

En el presente trabajo hemos utilizado un cultivo primario de MNs, aisladas de embriones de ratón de 12.5 días. Como se describió en la introducción, en este estado embrionario, las MNs están diferenciadas pero, aún no se ha iniciado el segundo periodo de la PCD. La mayoría de MNs inician la PCD coincidiendo con la adquisición de la dependencia neurotrófica. Con el objetivo de analizar como los NTFs actúan en nuestro modelo hemos analizado la implicación del cóctel de NTFs (CNTF+BDNF+GDNF a concentración 10ng/ml) en la supervivencia de las MNs y su papel en la activación de diferentes vías de señalización intracelular (Figura 32A).

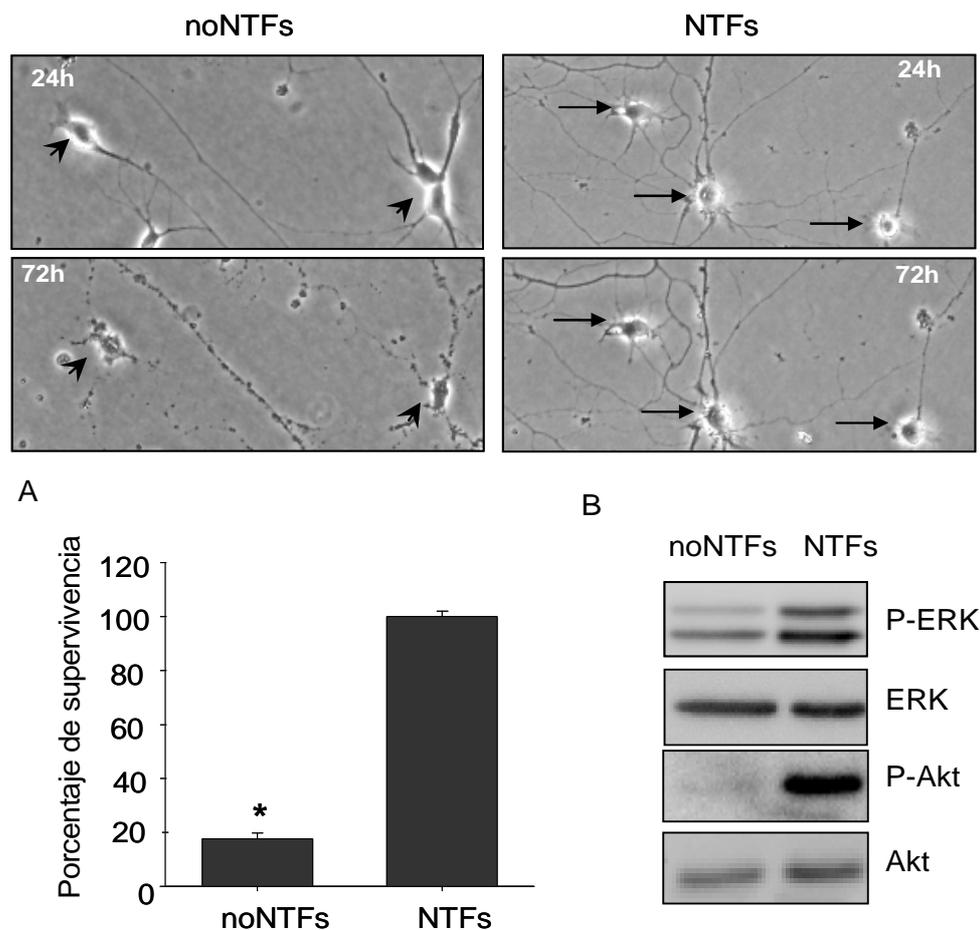


Figura 32. Efectos de los NTFs sobre la supervivencia de las MNs.

Imágenes representativas de contraste de fase de MNs cultivadas en presencia (derecha) y ausencia (izquierda) del cóctel de NTFs (10ng/ml de CNTF, GDNF y BDNF) tras 24 y 72h en cultivo. A) La gráfica representa el porcentaje de supervivencia de las MNs tratadas y no tratadas con cóctel de NTFs durante 72 h (ver Materiales y Métodos). Los valores de la gráfica

representan el porcentaje de supervivencia celular de nueve pozos para cada condición de tres experimentos independientes \pm SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas usando *one-way ANOVA test* y Bonferroni's *post-hoc* múltiple comparación (*, $p < 0.05$). B) *Western blot (WB)* de extracto proteico de MNs estimuladas y no estimuladas con NTFs durante 10 min comprobados con anticuerpo específico: p-Ser473-Akt y Akt total después de *striping* o con p-ERK y ERK total después de *striping*.

Se ha demostrado que la mezcla de todos estos factores, y no cada factor por separado, permiten la supervivencia de la mayoría de las MNs. El cóctel de NTFs activa las vías PI3-K/Akt y ERK/MAPK en las MNs (Figura 32B).

Activación de la vía NF- κ B

Los NTFs pueden activar otras vías de señalización tanto a través de las rutas ya discutidas como independientemente de ellas. Una de las vías candidatas es la vía de señalización NF- κ B. La NF- κ B ha sido estudiada más profundamente en el sistema inmune donde esta implicada en la regulación de genes involucrados en la respuesta inmune, en la respuesta inflamatoria y en la supervivencia y proliferación celular (Liang et al., 2004). En los últimos 10 años se ha dado mayor importancia en la implicación de la vía NF- κ B en los procesos fisiológicos del SN donde su activación esta relacionada con la regulación de la supervivencia y muerte neuronal, mielinización, plasticidad sináptica y crecimiento axonal (Sole et al., 2004; Gutierrez et al., 2005; Mémet, 2006; Gallagher et al., 2007a; Gutierrez et al., 2008a).

En el presente estudio hemos determinado la función de la vía NF- κ B en la supervivencia de las MNs en desarrollo mediada por los NTFs. Para ello, en primer lugar se ha analizado el efecto del cóctel de NTFs sobre la fosforilación de las quinasas (IKKs): IKK α e IKK β . Las IKKs son unas serina-treonina quinasas cuya fosforilación en los residuos de la Ser180 en el caso de IKK α y de la Ser181 en IKK β promueve la señalización por la vía NF- κ B (Schomer-Miller et al., 2006). Con este fin las MNs fueron purificadas y cultivadas en medio NBM suplementado con NTFs durante tres horas. Tras este tiempo fueron lavadas tres veces con NBM y privadas de NTFs durante toda la noche para conseguir niveles basales de fosforilación. Posteriormente se estimularon 10 min con cóctel de NTFs. Mediante WB se analizaron los cambios de la fosforilación usando anticuerpos específicos contra IKK fosforilado o contra la proteína IKK total. Se detectaron cambios significativos

en los niveles de fosforilación en las MNs tratadas con NTFs. Los niveles de fosforilación de IKK (2.8 ± 0.4) en estos cultivos fueron tres veces más altos respecto a las neuronas no tratadas (0.6 ± 0.36) (Figura 33).

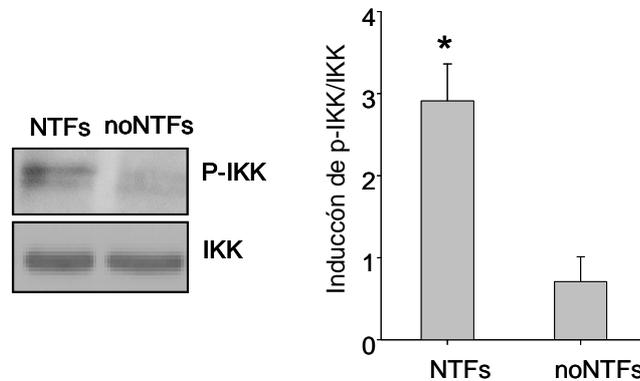


Figura 33. Efecto de los factores neurotróficos sobre la fosforilación de IκB quinasas (IKKs).

Los lisados de MNs estimuladas, o no estimuladas durante 10 min con NTFs fueron analizados mediante WB con anticuerpos contra p-IKK e IKK. La grafica en representa la inducción de las proteínas IKKs (fosfo IKK respecto a IKK total) de tres experimentos independientes \pm SEM.

Estudios previos de nuestro grupo demostraron que cada NTF por separado (CNTF, BDNF o GDNF) confiere un porcentaje de supervivencia distinto, ninguno de los cuales alcanza los niveles de supervivencia inducida por el cóctel de NTFs. Teniendo en cuenta esto, se valoró la implicación de cada NTF en la fosforilación de las IKKs (Figura 34). Se demostró que los tres NTFs: CNTF, BDNF y GDNF son capaz de fosforilar las IKKs y que los valores de la inducción de las IKK son más altos en las MNs tratadas con coctel de NTFs comparado con el efecto sobre la inducción de cada NTF por separado. Aunque todos los factores son capaces de fosforilar las IKKs, la estimulación con BDNF induce la mayor fosforilación comparado con los demás factores.

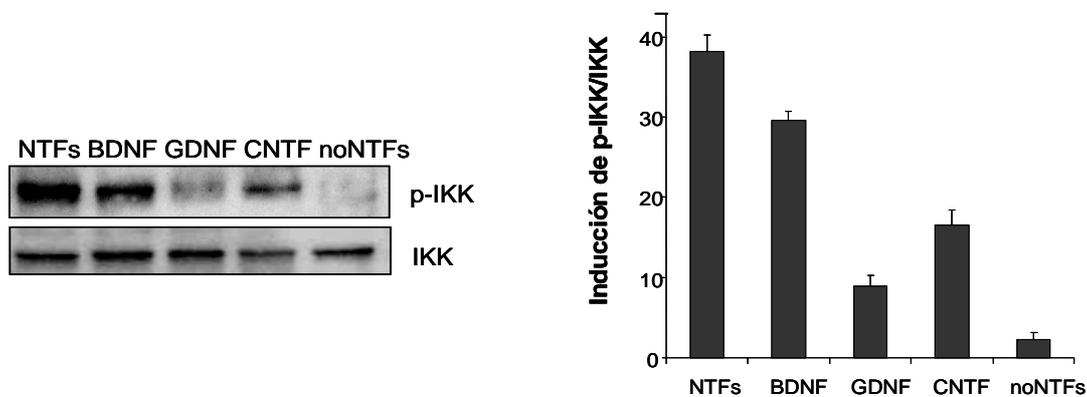


Figura 34. Fosforilación de IKKs por diferentes factores neurotróficos en el cultivo primario de MNs.

Las MNs se trataron durante 10 min con cóctel de NTFs o BDNF (10ng/ml) o GDNF (10ng/ml) o CNTF (10ng/ml) o células no tratadas. El extracto proteico de estas células se analizó

mediante WB utilizando anticuerpos contra p-IKK e IKK total como control de carga. La gráfica representa la inducción de las proteínas IKKs (fosfo-IKK respecto IKK total) de tres experimentos independientes \pm SEM.

Para profundizar en el estudio de la implicación de los NTFs en la activación de la vía NF- κ B se analizaron los niveles de translocación nuclear de RelA en células tratadas o no tratadas con NTFs. El miembro de la familia NF- κ B- RelA junto con p50 representa la forma heterodimérica del factor de transcripción NF- κ B más abundante en las células de los mamíferos. El control de la expresión genética controlada por el heterodímero RelA/p50 depende solo de la presencia de la proteína RelA en el núcleo (Hayden and Ghosh, 2008). La localización nuclear y citoplasmática de RelA fue determinada a través de inmunofluorescencia en cultivos primarios de MNs tratadas o no tratadas con NTFs usando un anticuerpo específico contra la proteína RelA (Figura 35). Como control de localización nuclear se realizó una tinción con Hoechst. Las MNs fueron cultivadas en presencia o ausencia de NTFs, como esta indicado en los Materiales y Métodos. Los cambios en los niveles de RelA localizado en el núcleo se observaron tras 24h de estimulación (Figura 35). Las MNs tratadas con NTFs presentaron el 85% de RelA localizado en el núcleo, mientras que los niveles de RelA en el núcleo de las MNs cultivadas sin NTFs no superaban el 20%. Estos resultados, junto con la fosforilación de IKKs proponen la habilidad del coctel de NTFs de activar la vía NF- κ B.

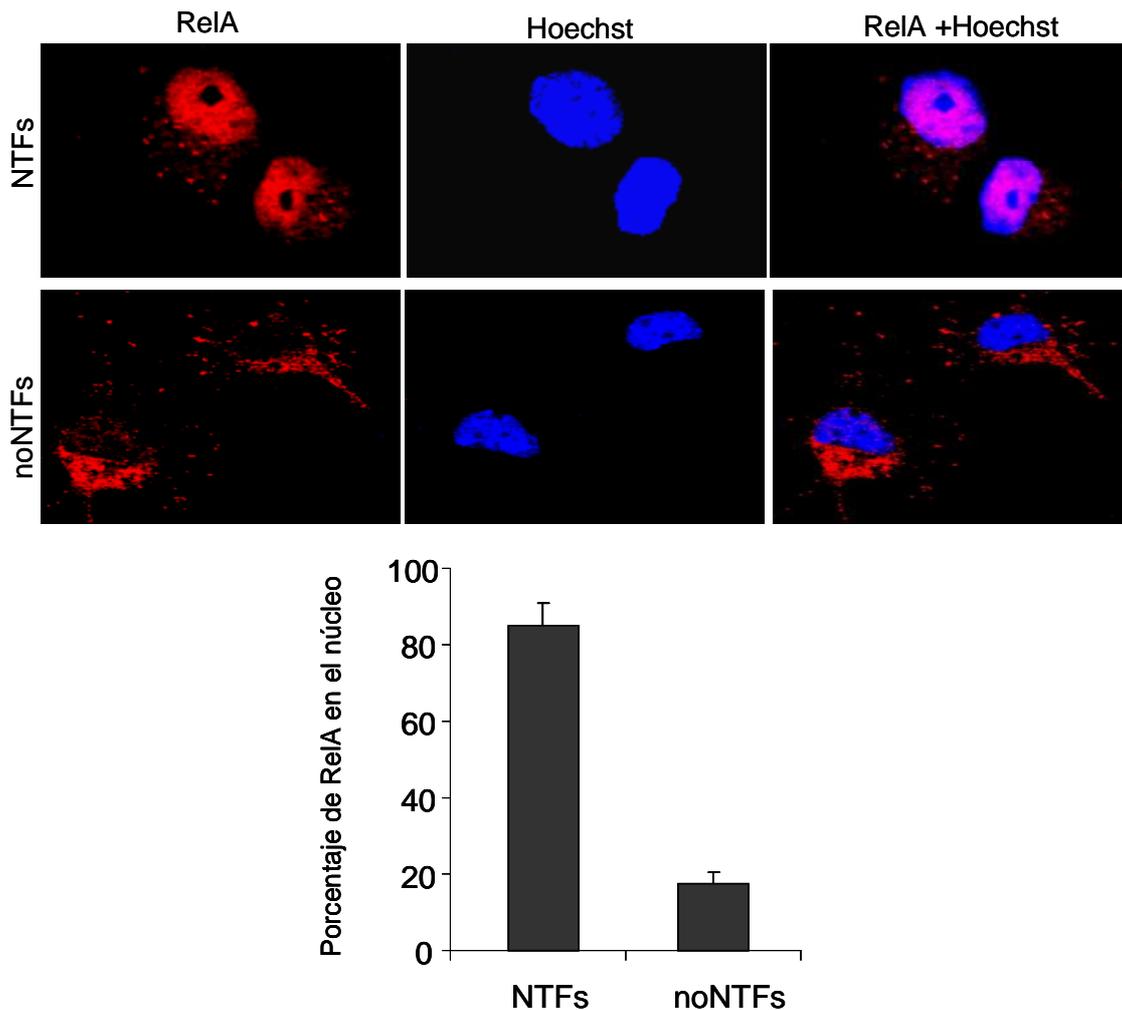


Figura 35. Efecto de los NTFs sobre la translocación nuclear de RelA.

Imágenes de microscopía Confocal representativas de MNs cultivadas en presencia o ausencia de NTFs: RelA (rojo), Hoechst tinción nuclear (azul) y RelA +Hoechst. Tras 24h fueron fijadas e incubadas con el anticuerpo contra RelA. La gráfica representa el porcentaje de células con RelA en el núcleo respecto al todas las células evaluadas.

Los NTFs activan la vía canónica de NF- κ B en las MNs en desarrollo

Existen tres vías de activación de NF- κ B en el SN: la vía canónica, la vía no-canónica y la vía atípica. La activación de la vía canónica esta relacionada con la fosforilación de las IKK α e IKK β promoviendo la fosforilación de I κ B α en Ser32/36 llevando a cabo su separación de heterodímero RelA/p50, su degradación en el proteasoma 26S y la translocación del RelA/p50 al núcleo (Hayden and Ghosh, 2008). Por otro lado, la activación de la vía no-canónica de NF- κ B depende únicamente de la fosforilación de IKK α promoviendo el corte de p100 a p52 y la translocación del heterodímero RelB/p52 al núcleo (Senftleben et al., 2001; Xiao et al., 2004; Liang et al., 2006). A diferencia de

las primeras dos vías, la forma atípica de activación de la vía NF- κ B ocurre de manera independiente de las IKKs y esta relacionada con la fosforilación de I κ B α en Tyr 42 y la translocación del RelA/p50 al núcleo (Imbert et al., 1996b; Takada et al., 2003). Con el fin de determinar cual de las tres (o las tres) formas está activada por los NTFs en las MNs primero hemos analizado los niveles endógenos de la proteína I κ B α en las MNs estimuladas con cóctel de NTFs durante 60 min. Mediante WB hemos observado una disminución en los niveles de proteína I κ B α tras 30 min de la estimulación con NTFs, y una recuperación a los 60 min. La disminución de los niveles endógenos de I κ B α a tiempo más temprano de 2 h es uno de los indicadores de la activación de la vía canónica de NF- κ B mediante una degradación de I κ B α en el proteasoma 26S (Figura 36A) (Imbert et al., 1996a). La recuperación de los niveles de I κ B α en las MNs tratadas con NTFs observados una hora después de la estimulación con NTFs demuestran la activación de la vía canónica de NF- κ B, puesto que uno de los primeros genes que se transcriben después de la activación de la vía canónica de NF- κ B es la proteína I κ B α .

Para confirmar la habilidad del cóctel de NTFs de activar la vía canónica de NF- κ B, hemos analizado los niveles de fosforilación de I κ B α en Ser32/36 usando el inhibidor de proteasoma MG-132. El bloqueo la degradación de I κ B α mediante el tratamiento con MG-132 nos permitió analizar los niveles de fosforilación en las Ser32/36 sin que ocurriese degradación de I κ B α (Figura 36B). Las MNs fueron pretratadas durante 30 min con MG-132 a una concentración 5 μ M. Tras este tiempo, el cultivo fue estimulado con cóctel de NTFs durante 1 h. Mediante WB se analizaron los niveles de fosforilación de I κ B α en Ser32/36 a 0, 30, 45 y 60 min. El extracto proteico recogido a tiempo 0 representa las células no estimuladas. Por otro lado, hemos analizado los niveles de fosforilación de Tyr42 en presencia y ausencia de NTFs, en este caso no observamos cambios en los niveles de fosforilación de las células tratadas, ni en las no tratadas con NTFs (Figura 36 C).

Durante la activación de la vía canónica de NF- κ B, la fosforilación de IKK β promueve no solamente la fosforilación del I κ B α , si no también la fosforilación de RelA en Ser536 (Yang et al., 2003; Jeong et al., 2005). Mediante WB hemos analizado los niveles de fosforilación de RelA en Ser536

en las MNs estimuladas y en las no estimuladas con NTFs. Después de 20 min detectamos un aumento importante en los niveles de fosforilación de Ser536 RelA en las MNs estimuladas con NTFs, respecto a las no estimuladas. Todas estas observaciones nos permiten concluir que los NTFs promueven la activación de la vía canónica de NF- κ B en las MNs (Figura 36D).

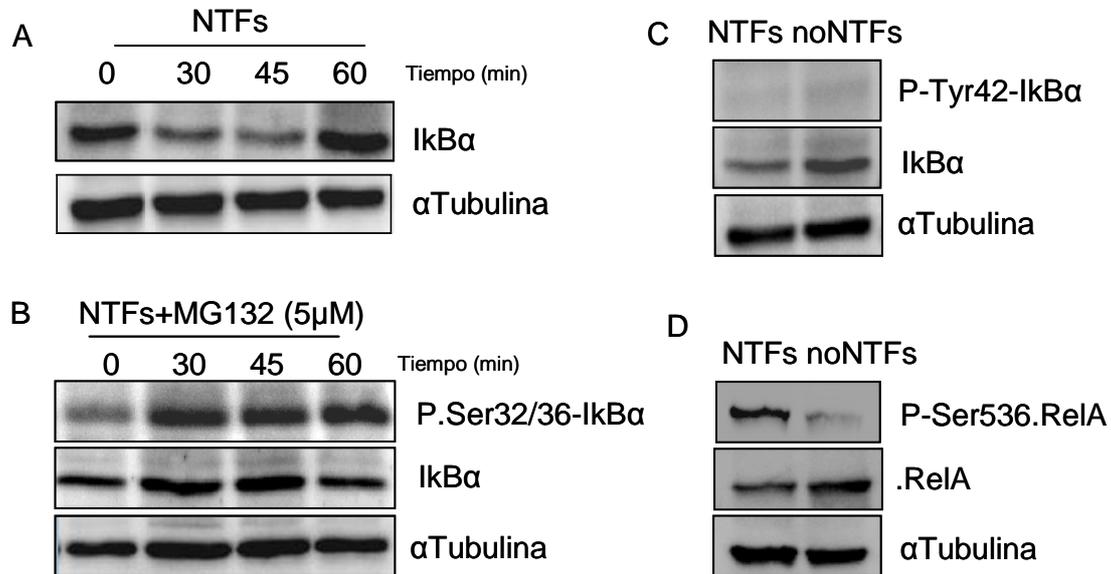


Figura 36. El cóctel de NTFs causa fosforilación en los residuos de Ser32 y Ser36, y no en la Tyr42 de IκBα.

A) Análisis WB de la expresión de IκBα total. Las MNs fueron estimuladas con cóctel de NTFs durante 30, 45 y 60 min (0 min son células no estimuladas) 24h después de sembrar. B) Análisis WB de fosfo-Ser 32/36-IκBα y IκBα total del extracto proteico de MNs pre-tratadas con MG-132 durante 30 min antes de la estimulación con NTFs (0, 30, 45 y 60 min). C) Análisis WB de fosfo-Tyr42- IκBα y IκBα total del extracto proteico de MNs estimuladas o no estimuladas durante 20 min con NTFs. D) Análisis WB de fosfo-Ser 536-RelA y RelA total. El extracto proteico de MNs tratadas o no tratadas con cóctel de NTFs durante 30 min fue comprobado con anticuerpos específicos para fosfo-Tyr42- IκBα, IκBα total fosfo-Ser536-RelA y RelA. Como control de carga fue usado el anticuerpo contra α-Tubulina.

La inhibición farmacológica de la vía NF- κ B bloquea la supervivencia de las MNs inducida por el cóctel de NTFs

Con el fin de analizar la función de la vía NF- κ B en las MNs en desarrollo, hemos inhibido la unión del heterodímero RelA/p50 con el motivo de κ B unión con DNA, mediante un inhibidor específico de NF- κ B- SN50 y su control inactivo, SN50M (Lin et al., 1995). Las MNs fueron aisladas y sembradas en presencia de NTFs. Tres horas después, el cultivo fue tratado con 20 μ M de SN50 o SN50M, en presencia del cóctel de NTFs. En este momento se realizó el primer recuento celular, calculado como momento 0.

Tras 72h, el análisis del porcentaje de la supervivencia de estas neuronas demostró una disminución significativa en las MNs tratadas con SN50 ($10.25 \pm 4.8\%$) comparado con el Control (MNs tratadas con SN50M; $81.3 \pm 8.38\%$) (Figura 37).

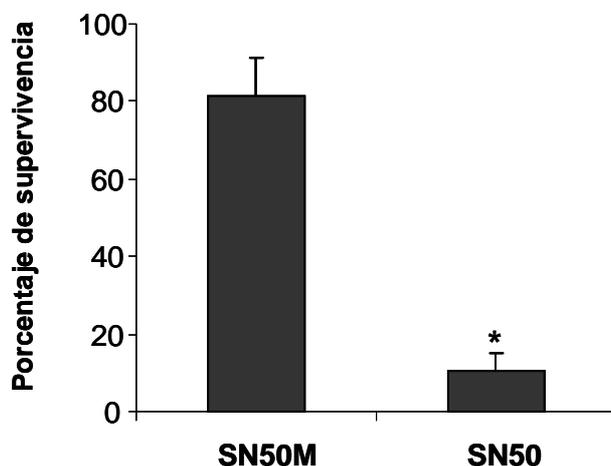


Figura 37. La inhibición de la vía NF- κ B causa muerte a las MNs en presencia de NTFs. Las MNs fueron tratadas con SN50 o SN50M e incubadas en presencia de NTFs durante 72h. El porcentaje de la supervivencia se midió como esta descrito en Materiales y Métodos. Los valores del gráfico representan el porcentaje de supervivencia de nueve pozos por cada condición, procedentes de tres experimentos independientes \pm SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas usando *one-way ANOVA test* y Bonferroni's *post-hoc* múltiple comparación (*, $p < 0.001$).

Transducción de la línea celular neuronal NSC34 con lentivirus conteniendo shRNA contra IKK α o IKK β

Para determinar la implicación de las IKK en la activación de la vía NF- κ B a través de NTFs y su habilidad de controlar la supervivencia neuronal fueron diseñados RNA para la interferencia IKK α o IKK β (shIKK α o shIKK β).

Con el fin de evaluar la eficiencia de la transducción y la disminución de las proteínas IKK α o IKK β utilizamos la línea celular NSC34. NSC34 es una línea celular obtenida por la fusión de células embrionarias de la médula espinal de ratón y de neuroblastoma de ratón. Su origen neuronal las hace un buen modelo para estudios en los que se requiere un elevado número de células. Las células NSC34 fueron transducidas con shIKK α o shIKK β o Control (vector vacío, FSV) con una cantidad de partículas virales adecuada (ver Materiales y Métodos). Veinte horas después de la infección, el medio conteniendo partículas virales fue cambiado con medio DMEM+10%FBS. La

eficiencia de la transducción se visualizó 72 h después del tratamiento, fue observado un mayor número de células GFP positivas lo cual significa una alta expresión del plásmido de interferencia (Figura 38). La valoración de la inhibición de las proteínas IKK α o IKK β se realizó cinco días después de la transducción, mediante WB usando anticuerpos específicos contra IKK α o IKK β . Se observó una disminución importante en los niveles de las dichas proteínas en las células *knockdown* para IKK α o IKK β respecto al Control.

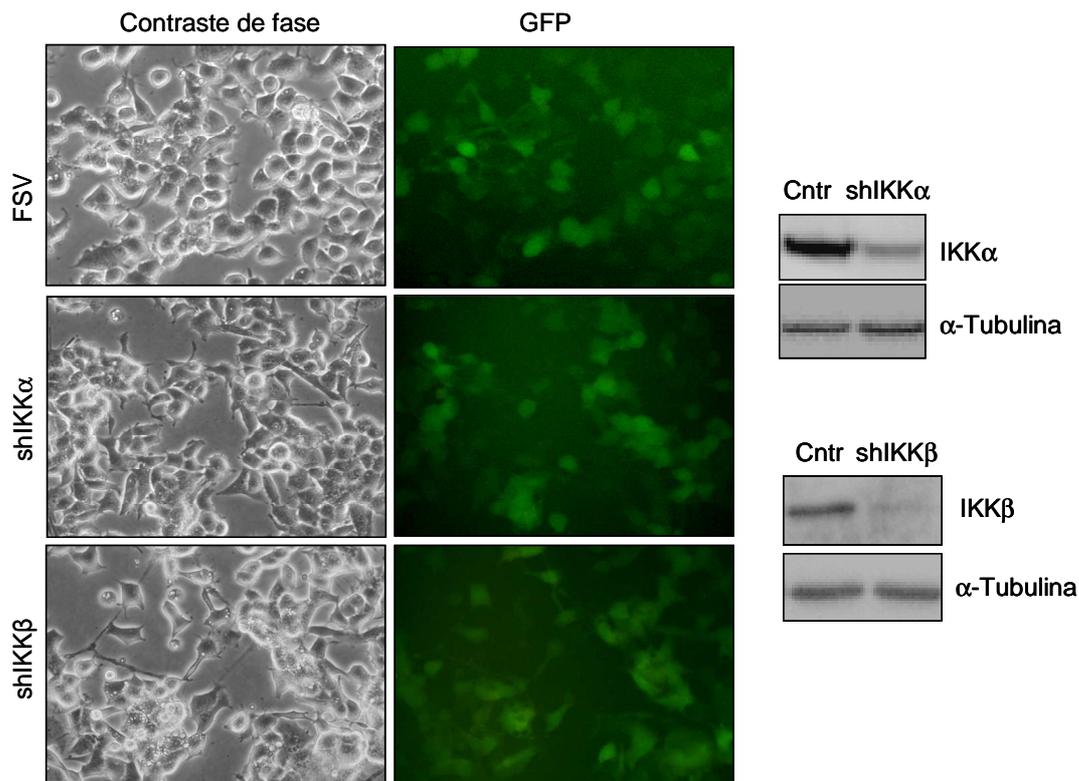


Figura 38. Disminución de las proteínas IKK α o IKK β en células NSC34.

A) Imágenes representativas de contraste de fase (izquierda) y fluorescencia GFP (derecha) de células NSC34 tras 72h transducidas con shIKK α o shIKK β o Control (vector vacío (FSV)). Cinco días después de la transfección, los lisados de estas células fueron recogidos y comprobados por WB con anticuerpo frente a IKK α o IKK β . Como Control de carga fue usado el anticuerpo contra α -Tubulina.

Efecto de la disminución de las proteínas IKK α e IKK β en la supervivencia inducida por NTFs en un cultivo primario de MNs

Puesto que los NTFs promueven la fosforilación de IKK α e IKK β en las MNs, decidimos analizar el efecto individual de cada una de estas quinasas en la supervivencia de las MNs. Por ello las MNs fueron transducidas con shRNA

diseñadas para IKK α o IKK β y los efectos sobre la supervivencia valorados tras un curso temporal de seis días.

• **IKK β**

Con el objetivo de analizar la implicación de IKK β en la supervivencia de las neuronas fueron diseñadas dos RNA de interferencia que tienen como diana dos lugares diferentes en la secuencia de IKK β de ratón (shIKK β 1 y shIKK β 2). Las MNs fueron transducidas con shIKK β 1 o shIKK β 2. Como Control se usaron células transducidas con el vector vacío (FSV;Ctrl). Durante todo el experimento las células fueron mantenidas en presencia de NTFs. La eficiencia de la transducción se valoró tras 72 h (Figura 39A). En este momento, aproximadamente el 90% de las MNs expresaron la proteína fluorescente GFP.

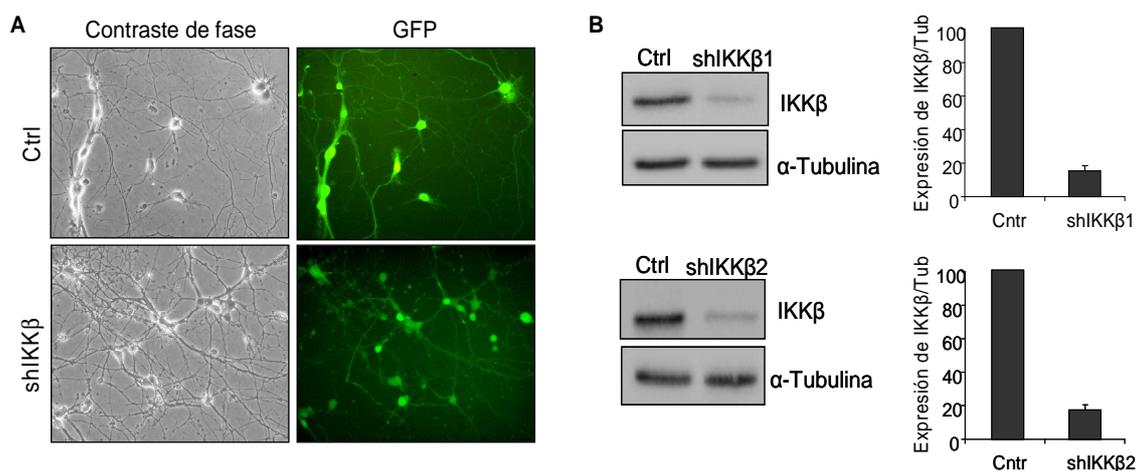


Figura 39. Transducción lentiviral de MNs con shIKK β 1 o shIKK β 2.

A) Imágenes representativas de contraste de fase y fluorescencia (GFP) de MNs 72h después de la transducción con lentivirus conteniendo shIKK β o Control (Vector vacío; Ctrl). B) Lisado proteico de MNs transducidas 5 días con shIKK β 1 o shIKK β 2 o Ctrl fueron analizados tras WB con anticuerpo contra la proteína IKK β . Como Control de carga se usó α Tubulina. La gráfica representa el porcentaje del nivel de proteína IKK β en células transducidas con shIKK β 1 o shIKK β 2 o Ctrl de tres experimentos independientes.

La disminución en los niveles de proteína IKK β fueron detectados cinco días después de la transducción mediante WB usando un anticuerpo específico. Se observó una reducción del 80% en los niveles endógenos de la proteína IKK β en las células transducidas con shIKK β 1 o shIKK β 2 respecto al Control (Figura 39B).

Con el fin de analizar la implicación de la proteína IKK β en la supervivencia de las MNs inducida por NTFs, las MNs se transdujeron los cultivos con shIKK β 1 o shIKK β 2 o Control durante 20 h en presencia de NTFs.

Tras este tiempo el medio fue cambiado por NBMc suplementado con cóctel de NTFs (y se efectuó el primer recuento calculado como “momento 0”). Los cambios en la supervivencia se evaluaron mediante un curso temporal de seis días (ver Materiales y Métodos). Las primeras diferencias significativas entre las células transducidas con shIKK β 1 o shIKK β 2 y el Control se observaron al quinto día después de la transducción cuando el porcentaje de la supervivencia de la células *knockdown* de IKK β se reducía al 30% respecto al primer recuento (100%), mientras que los controles tuvieron niveles cercanos al 90%. Los niveles de la supervivencia en las MNs transducidas con shIKK β siguieron bajando hasta el sexto día (final del curso temporal), cuando en el cultivo no sobrevivieron más del 10%.

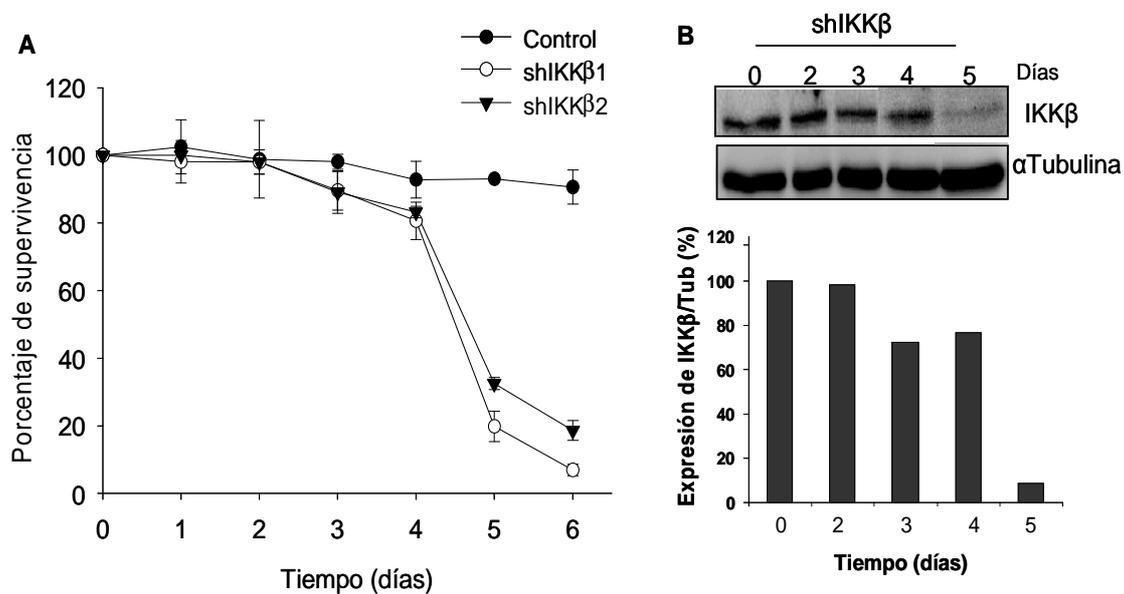


Figura 40. Efecto de la disminución de los niveles de proteína IKK β en la supervivencia de las MNs mediada por NTFs.

A) Curso temporal del porcentaje de supervivencia neuronal. Las MNs fueron transducidas con shIKK β 1 o shIKK β 2 o Control durante 20h y mantenidas durante 6 días en presencia de NTFs. El porcentaje de la supervivencia se midió como se describió en Materiales y Métodos. Los valores del gráfico representan el porcentaje de supervivencia de nueve pozos por cada condición procedentes de tres experimentos independientes \pm SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas usando *one-way ANOVA test* y Bonferroni's *post-hoc* múltiple comparación (*, $p < 0.001$). B) WB de MNs transducidas con shIKK α durante 0, 2, 3, 4 y 5 días. Los lisados proteicos de estas células fueron analizados mediante inmunoblot usando un anticuerpo específico contra la proteína IKK β . Como Control de carga se usó α -Tubulina

Mediante WB usando un anticuerpo específico contra la proteína IKK β hemos analizado los niveles de expresión IKK β durante los cinco días posteriores a la transducción con shIKK β . Los resultados obtenidos

demonstraron una disminución importante en la expresión de IKK β a partir del cuarto día después de la infección con shIKK β (Figura 40B).

• **IKK α**

Por otra parte estudiamos la implicación de la proteína IKK α en la supervivencia de las MNs inducida por NTFs. IKK α forma parte del complejo de IKKs que participa en la activación tanto en la vía canónica, como en la vía no-canónica de NF- κ B (Liang et al., 2006). Las MNs se transdujeron con shIKK α durante 20h. Tras este tiempo, el medio fue cambiado. Tres días después de la transducción se detectó que el 99% de las células eran GFP positivas (Figura 41A). Cinco días después de la infección con shIKK α se observó mediante análisis WB una disminución significativa de la expresión de IKK α (Figura 41B).

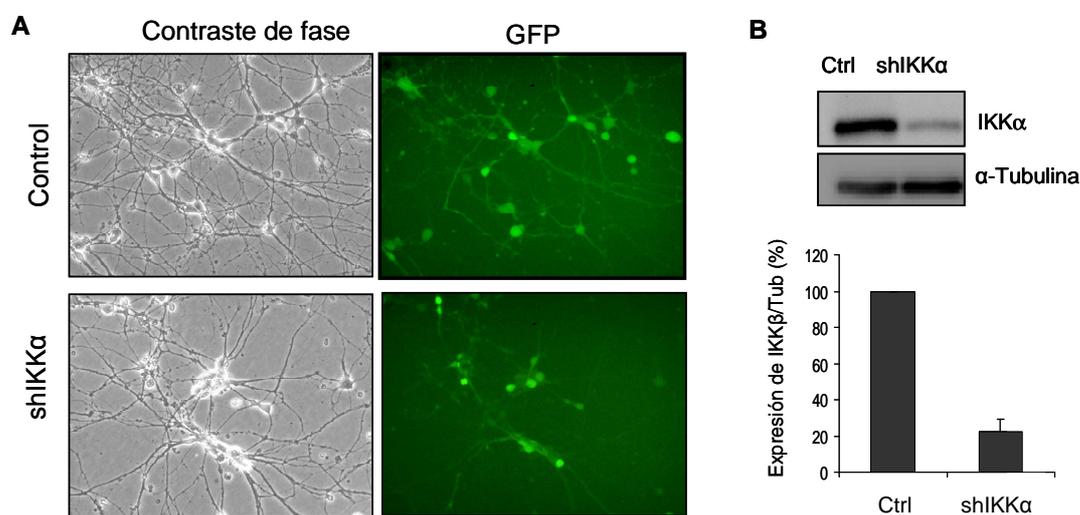


Figura 41. Transducción lentiviral de MNs con shIKK α .

A) Imágenes representativas de contraste de fase y GFP, 72h después de la transducción de las MNs con lentivirus conteniendo shIKK α o Control. B) El lisado proteico de MNs transducidas 5 días con IKK α o Ctrl se analizó mediante WB con un anticuerpo específico contra la proteína IKK α . Como Control de carga se usó α -Tubulina. La gráfica en A representa el porcentaje de nivel de proteína IKK α en células transducidas con shIKK α o Ctrl de tres experimentos independientes \pm SEM.

Con el fin de determinar la implicación de IKK α en la supervivencia de las MNs mediada por los NTFs, el cultivo fue transducido durante 20h con shIKK α o Control. Tras este tiempo el medio fue cambiado y se efectuó el primer recuento considerado como tiempo 0. Los cambios en la supervivencia se estudiaron mediante un curso temporal de seis días (Figura 42A). Las primeras diferencias significativas entre las MNs *knockdown* para IKK α (72 \pm 3.2%) y el Control (93 \pm 5.2%) se detectaron al tercer día. Al mismo tiempo, mediante WB se observó una disminución del 70% a los niveles de expresión

de la proteína IKK α en las MNs *knockdown* para IKK α comparado con las MNs recogidas al momento del cambiar el medio de virus (tiempo 0) (Figura 42B). A partir de este tiempo, las diferencias entre el Control y las células transducidas con shIKK α seguían aumentando hasta el sexto día (final del curso temporal) cuando los niveles de la supervivencia en las células con shIKK α llegaron al 20% respecto al primer recuento. Durante todo el curso temporal en los cultivos Control, la supervivencia solo disminuyó un 20% comparado con el primer recuento (tiempo 0).

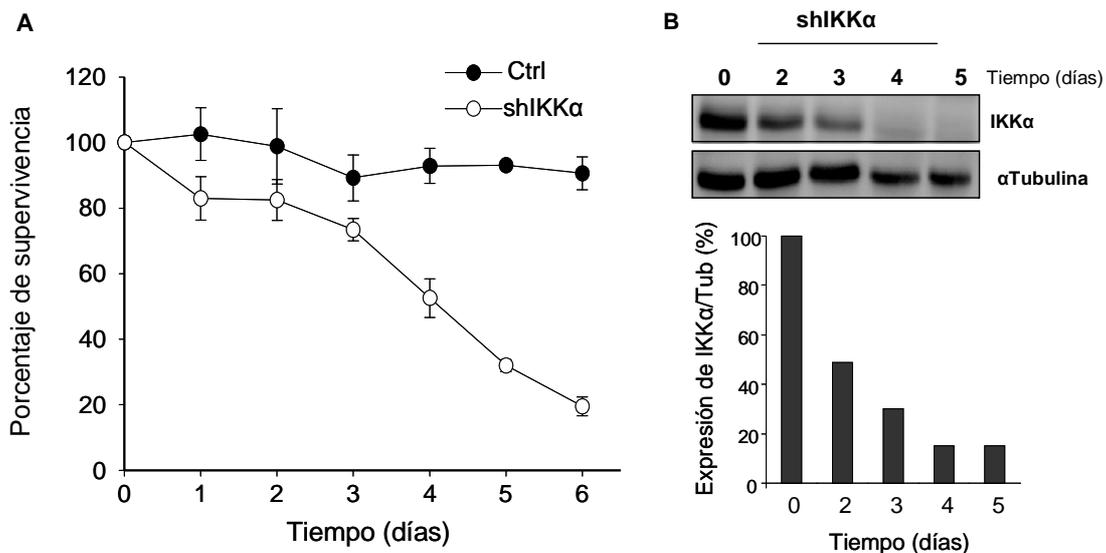


Figura 42. Efecto de disminución de los niveles de proteína IKK α en la supervivencia de MNs mediada por NTFs.

A) Porcentaje de supervivencia con shIKK α o Ctrl (vector vacío, FSV) durante 20h y mantenidas durante 6 días en presencia de NTFs. El porcentaje de la supervivencia se analizó tal como esta descrito en Materiales y Métodos. Los valores del gráfico representan el porcentaje de supervivencia de nueve pozos por cada condición, repartidos en tres experimentos independientes \pm SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas usando *one-way ANOVA test* y Bonferroni's *post-hoc* múltiple comparación (*, $p < 0.001$). B) Análisis WB de MNs transducidas con shIKK α durante 0, 2, 3, 4 y 5 días. Los lisados proteicos de estas células fueron analizados mediante inmunoblot usando un anticuerpo específico contra la proteína IKK α . Como Control de carga se usó α -Tubulina.

Efectos de la inhibición de las vías canónica y no canónica de NF- κ B sobre la supervivencia de las MNs inducida por los NTFs

La activación de la vía NF- κ B a través de IKKs puede estar dividida en dos formas distintas: la vía canónica y la vía no-canónica, independientes una de la otra. La vía canónica esta relacionada con la fosforilación del complejo IKK α /IKK β y la translocación nuclear del heterodímero RelA/p50 (Perkins,

2006), mientras que en la activación de la vía no-canónica participa solamente IKK α como homodímero provocando el procesamiento de p100 a p52 y consecutivamente la translocación del heterodímero RelB/p52 al núcleo (Xiao et al., 2004). Del complejo de las proteínas que intervienen en la vía canónica y la no-canónica, solo RelA y RelB son activadores de la transcripción génica (Hayden, 2008).

Con el objetivo de determinar la implicación de cada una de las dos vías en la supervivencia de las MNs mediada por los NTFs se han diseñado dos RNA de interferencia contra las proteínas RelA (shRelA) y RelB (shRelB) (ver Materiales y Métodos).

- **Implicación de la vía canónica en la supervivencia de las MNs**

Primero fue analizado el efecto de la reducción de la proteína RelA, en la supervivencia de las MNs. Para ello, las MNs fueron transducidas con shRelA o FSV y mantenidas en presencia de NTFs durante 20h. Tras este tiempo el medio conteniendo partículas virales fue cambiado con NBMc+NTFs. Mediante WB se observaron los cambios en los niveles de expresión de la proteína RelA en las MNs transducidas con shRelA a diferentes tiempos *post*-transducción (0, 3, 4 y 5 días) (Figura 43A). Los cambios en la supervivencia en las neuronas transducidas con shRelA o Control fueron detectados tras un curso temporal de 6 días. Las primeras diferencias significativas entre las MNs *knockdown* para RelA y el Control (FSV) se detectaron al tercer día después de la transducción. En las MNs transducidas con shRelA se observó una disminución en la supervivencia del 50% respecto al primer recuento, mientras que al mismo tiempo los controles mantuvieron los niveles de supervivencia cercanos al 80%. Hasta el final del curso temporal (sexto día), el análisis de la supervivencia demostró una disminución lineal en los cultivos *knockdown* para shRelA respecto al tiempo 0 (Figura 43A) llegando al 100% de mortalidad al sexto día. En cambio, los niveles de supervivencia en el Control se mantuvo cerca del 80% durante todo el análisis (Figura 43B). Estos resultados demuestran claramente la implicación de la vía canónica de NF- κ B en la supervivencia de las MNs mediada por los NTFs.

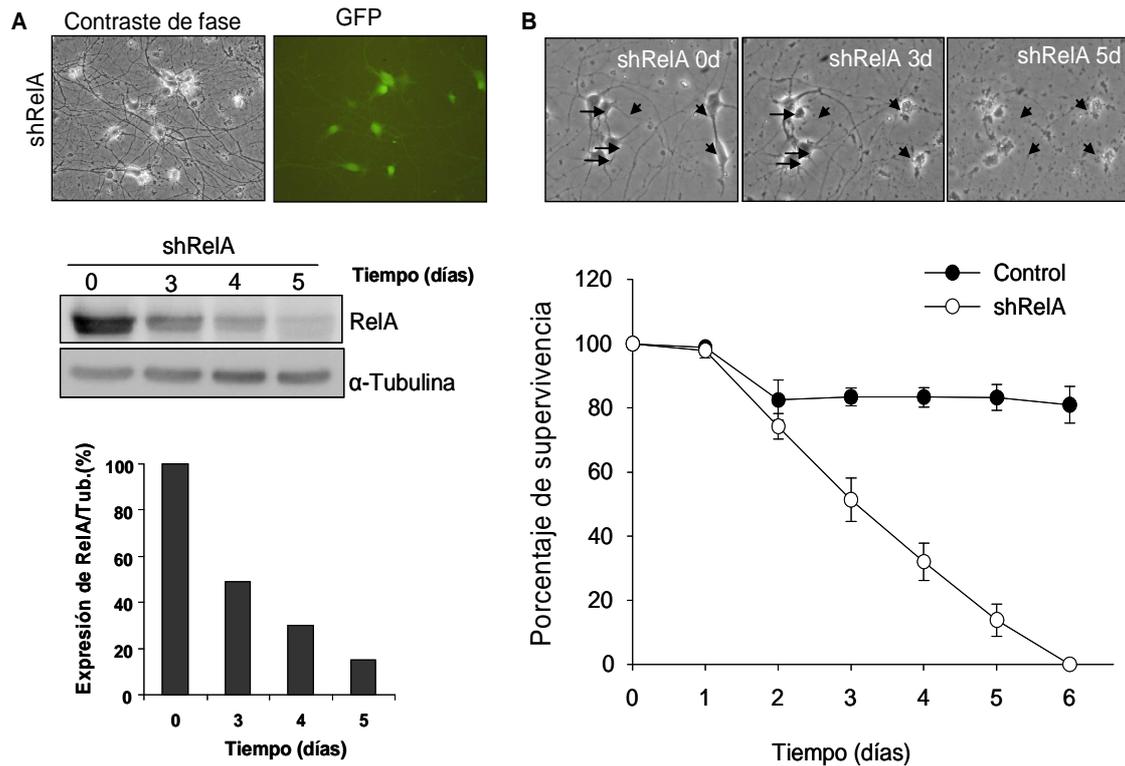


Figura 43. RelA knockdown reduce la supervivencia de las MNs mediada por los NTFs.

A) Imágenes microscópicas representativas de contraste de fase y fluorescencia (GFP) en el mismo campo microscopio de MNs transducidas con shRelA durante 3 días. Análisis de *Western blot* de los niveles de proteína tras un curso temporal de 0, 3, 4 o 5 días de transducción con shRelA. Los extractos proteicos se recogieron a diferentes días y fueron analizados usando el anticuerpo contra la proteína RelA. Como Control de carga se usó el α Tubulina. La grafica en A representa el porcentaje de nivel de proteína RelA en células transducidas con shRelA o Control de tres experimentos independientes. B) Imágenes representativas del mismo campo del microscopio a diferentes días después de la transducción de las MNs con shRelA. La grafica en la B indica el porcentaje de MNs vivas a diferentes tiempos tras la transducción con shRelA o Control. Los valores en el grafico representan el porcentaje de células vivas en nueve pozos de cada condición para tres experimentos independientes \pm SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas usando *one-way ANOVA test* y Bonferroni's *post-hoc* múltiple comparación (*, $p < 0.001$).

Con el objeto de profundizar en el estudio de la implicación de RelA en la supervivencia de las MNs analizamos como la disminución de la proteína RelA afecta la supervivencia inducida por cada uno de los NTFs. Las MNs fueron aisladas, transducidas y mantenidas en presencia del cóctel de NTFs, o sólo en CNTF, BDNF o GDNF (Figura 44). Al tercer día después de la transducción el análisis de la supervivencia demostró una disminución significativa en la supervivencia de las MNs transducidas con shRelA y tratadas con NTFs juntos o separado, comparando con sus respectivos Controles (MNs transducidos con el vector vacío) (Figura 44). Los resultados obtenidos nos permiten sugerir que

la proteína RelA y consecuentemente la vía canónica de NF- κ B esta implicada en la supervivencia de las MNs mediada por cada uno de los NTFs.

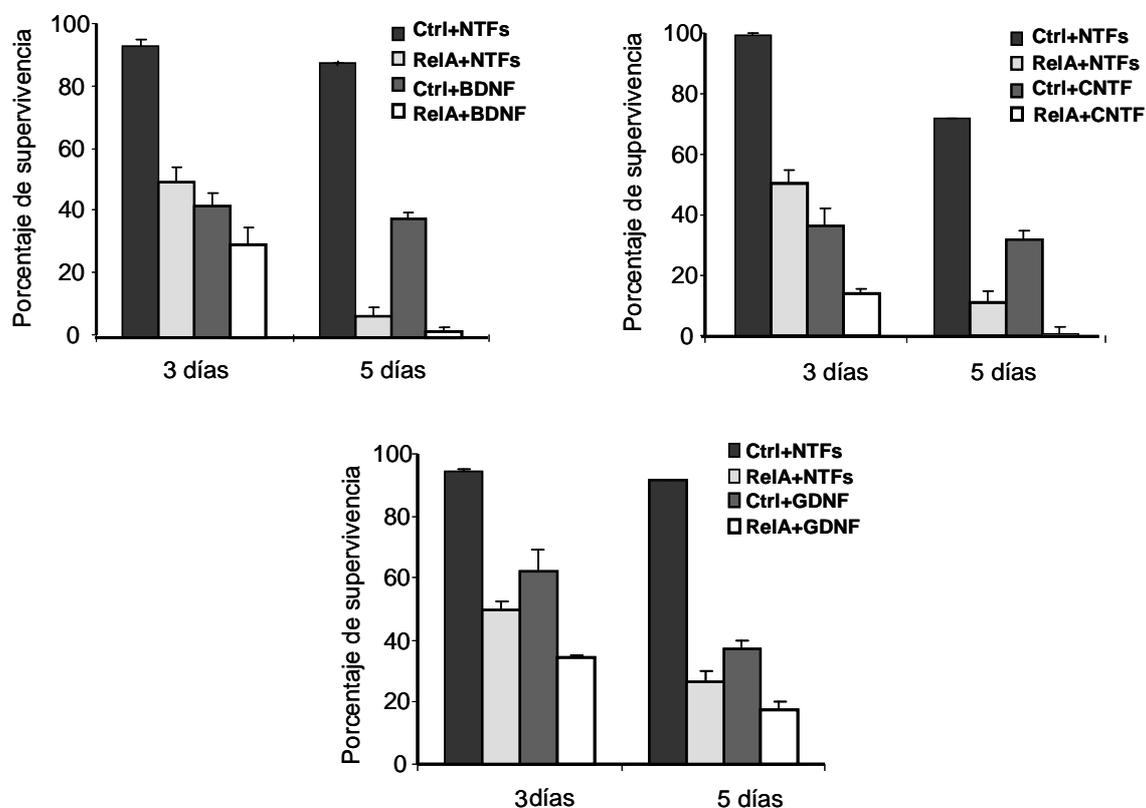


Figura 44. Implicación de shRelA en la supervivencia inducida por BDNF, CNTF o GDNF. La gráfica indica el porcentaje de MNs vivas a diferentes tiempos de transducción con shRelA o Control tratadas con BDNF o GDNF o CNTF o NTFs (ver Materiales y Métodos),

• **Implicación de la vía no-canónica en la supervivencia de las MNs**

Por otro lado hemos analizado la implicación de la vía no-canónica de NF- κ B en la supervivencia de las MNs. Primero hemos analizado la habilidad del coctel de NTFs para activar la vía no-canónica. Mediante WB hemos determinado los niveles del procesamiento de p100 a p52 en las MNs estimuladas y no estimuladas con NTFs. El extracto proteico de MNs estimuladas y no estimuladas con NTFs durante 30 min se analizó mediante WB, usando un anticuerpo específico contra p100 y p52 en las MNs estimuladas con NTFs hemos observado niveles detectables de p52, sin embargo en las células no estimuladas p52 fue indetectable. Este resultado indica la activación de la vía no canónica de NF- κ B.

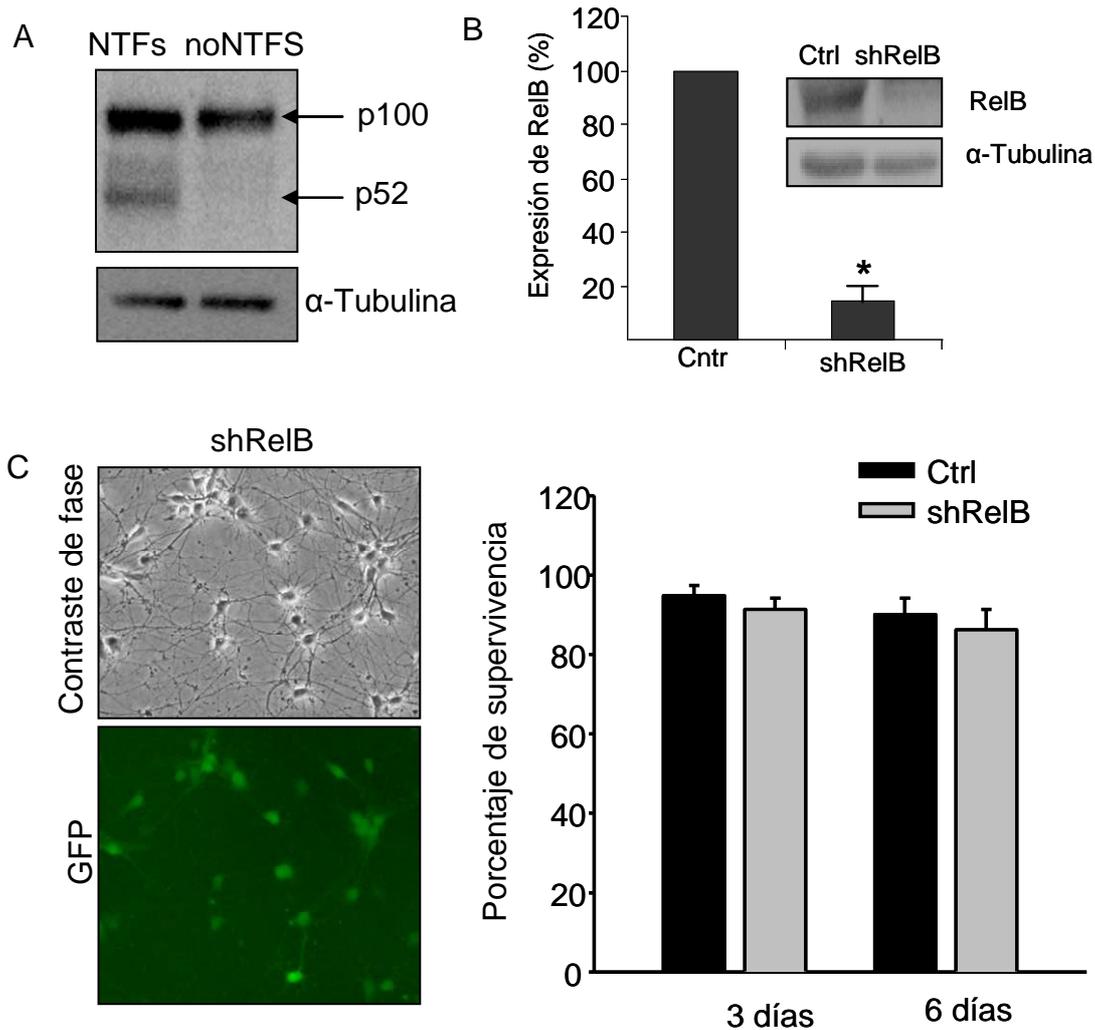


Figura 45. La vía no-canónica no está implicada en la supervivencia de las MNs inducida por los NTFs

A) WB análisis del procesamiento de p100 a p52. El extracto proteico de las MNs tratadas o no tratadas con NTFs durante 20 min fue analizado con un anticuerpo específico para p100 y p52

B) El extracto proteico total de células (shRelB o Control) fue recogido al quinto día después de la transducción. Mediante WB se comprobó con un anticuerpo específico contra RelB. Como Control de carga fue usado el α Tubulina. La gráfica representa el porcentaje en los niveles de proteína RelB en células transducidas con shRelB o Ctrl de dos experimentos independientes \pm SEM.

C) Imágenes representativa en contraste de fase y GFP de MNs transducidas durante cinco días con shRelB) El porcentaje de supervivencia MN a 3 y 6 días tras la transducción con shRelB o Control (ver Materiales y Métodos). Los valores en el gráfico representan el porcentaje de células vivas en nueve pozos por cada condición en tres experimentos independientes \pm SEM.

Después de determinar la habilidad de los NTFs de activar la vía no-canónica de NF- κ B, el segundo paso fue analizar la implicación de esta vía en la supervivencia neuronal. Por ello hemos diseñado RNA de interferencia contra la proteína RelB (Figura 45). Tras 72h de la transducción de las MNs con shRelB o Control se observó un alto porcentaje (aproximadamente el 100%) de células fluorescentes (GFP positivas) (Figura 45A). Cinco días

después mediante WB usando un anticuerpo específico contra RelB, se detectó una disminución del 85% de los niveles de proteína RelB en las células *knockdown* para RelB respecto al Control (Figura 45A). Los resultados obtenidos no demostraron ninguna diferencia entre los valores de supervivencia inducida por NTFs de las MNs *knockdown* para RelB y el Control (Figura 45B). Como se observa en la gráfica, el porcentaje de células vivas tanto en células *knockdown* para RelB, como en las células transducidas con vector vacío se mantuvieron cerca del 90% durante 6 días. Por lo cual, podemos concluir que aunque la vía no-canónica de NF- κ B se activa por los NTFs en las MNs, su activación no interviene en la supervivencia de las MNs.

La disminución de IKK β e IKK α afecta la translocación de RelA al núcleo

Con el objetivo de analizar el efecto de la disminución a las proteínas IKK β , IKK α o RelB sobre la localización celular de p65, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia (ver Materiales y Métodos) (Fig.13). Las MNs fueron transducidas con shIKK β , shIKK α , shRelB o Control durante 20h en presencia de NTFs. Cinco días después de la transducción, las MNs se fijaron (como esta descrito en los Materiales y Métodos) y se estudió la localización celular de RelA en estas células. Mediante inmunofluorescencia usando un anticuerpo específico contra la proteína RelA y tinción con Hoechst para localización nuclear, fueron determinados los niveles del RelA al núcleo (Figura 46). El análisis del porcentaje de RelA al núcleo en las MNs *knockdown* para IKK α o IKK β demostró una disminución importante en el porcentaje de RelA nuclear en las MNs *knockdown* para IKK β (24%) y en las MNs *knockdown* para IKK α (65%) en presencia de NTFs, respecto al cultivo Control (85%). Sin embargo, cambios significativos en el porcentaje de la localización nuclear de RelA en las MNs *knockdown* para RelB (82%) respecto al Control, no fueron detectados (Figura 46B).

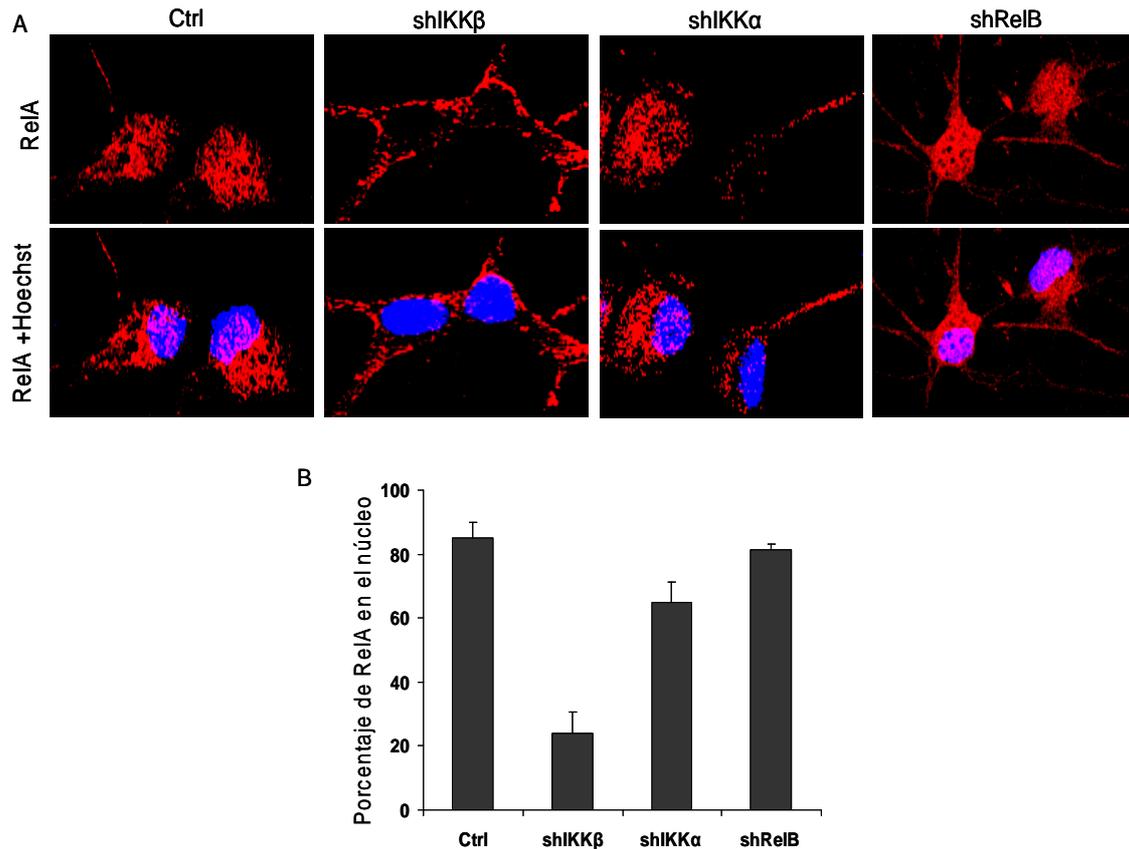


Figura 46. Translocación nuclear de RelA en MNs knockdown de IKK α o IKK β

A) Imágenes de la microscopía Confocal representativas de localización nuclear de RelA en MNs transducidas con shIKK α o shIKK β o Control (Vector vacío). En color rojo se representa la localización de la proteína RelA y en azul Hoechst para localizar los núcleos. Las MNs fueron plantadas, transducidas con Control o IKK α o IKK β o RelB y mantenidas en NTFs durante 5 días. Tras este tiempo se fijaron e incubaron con anticuerpo contra RelA (ver Materiales y Métodos). La gráfica en B representa el porcentaje de la proteína RelA en el núcleo en las MNs transducidas con Control o IKK α o IKK β o RelB durante cinco días.

La inhibición de la vía canónica de NF- κ B causa muerte celular apoptótica

En distintos modelos neuronales, se ha demostrado que una de las causas de la muerte apoptótica es la privación trófica. En el Control de este proceso participan distintas vías de señalización, entre las cuales está la vía NF- κ B (Piccioli et al., 2001). En estudios previos realizados por nuestro grupo se describió que la privación de NTFs aumenta la activación de la caspasa 3, causando apoptosis en las MNs (Soler et al. 1999, Dolcet 2001). Por otro lado, la muerte celular apoptótica se observa en los ratones *knockout* para RelA, IKK α o IKK β sugiriendo la implicación de la vía NF- κ B en este proceso (Beg et al., 1995b; Li et al., 1999b; Li et al., 1999a).

Con el objetivo de determinar la implicación de la vía NF- κ B en el Control de la apoptosis en las MNs, hemos analizado los niveles de los núcleos apoptóticos y la activación de caspasa 3 en las MNs con niveles bajos de las proteínas IKK α o IKK β o RelA (Figura 47). Las MNs fueron transducidas con shIKK β o IKK α o RelA o el Control durante 20 h. Cinco días después mediante WB evaluamos los niveles de caspasa 3 activa en estas MNs (Figura 47A). Los resultados obtenidos en el análisis por WB mostraron un aumento significativo en la activación del fragmento específico de caspasa 3 activa en las MNs con niveles bajos de proteínas IKK β o IKK α o RelA respecto al Control.

Por otra parte, fue usado otro indicador de la apoptosis contando núcleos con morfología apoptótica (Materiales y Métodos) usando la tinción Hoechst 33258. Las MNs transducidas con shIKK β o shIKK α o shRelA fueron fijadas al quinto día tras la transducción y teñidos con Hoechst 33258. Se contaron los núcleos con morfología apoptótica (Figura 47C). Alrededor de un 50% de las células presentan esta morfología nuclear en los cultivos *knockdown* para IKK β . También se observó un aumento significativo en el número de los núcleos apoptóticos en las MNs transducidas con shIKK α ($13 \pm 3.9\%$) y en las MNs transducidas con shRelA ($25.7 \pm 3.3\%$). Sin embargo, el porcentaje de los núcleos apoptóticos en las MNs Control se mantuvo cerca del 4%. Por otro lado, como control de este experimento, se usaron MNs deprivadas de NTFs los cuales también mostraron un aumento en el porcentaje del núcleos apoptóticos ($55 \pm 3\%$) comparado con los cultivos suplementados con NTFs ($7 \pm 1.2\%$). Estos resultados demuestran que en las MNs, la disminución en los niveles de distintas proteínas asociadas con la activación de la vía canónica de NF- κ B, provoca muerte apoptótica en presencia de NTFs.

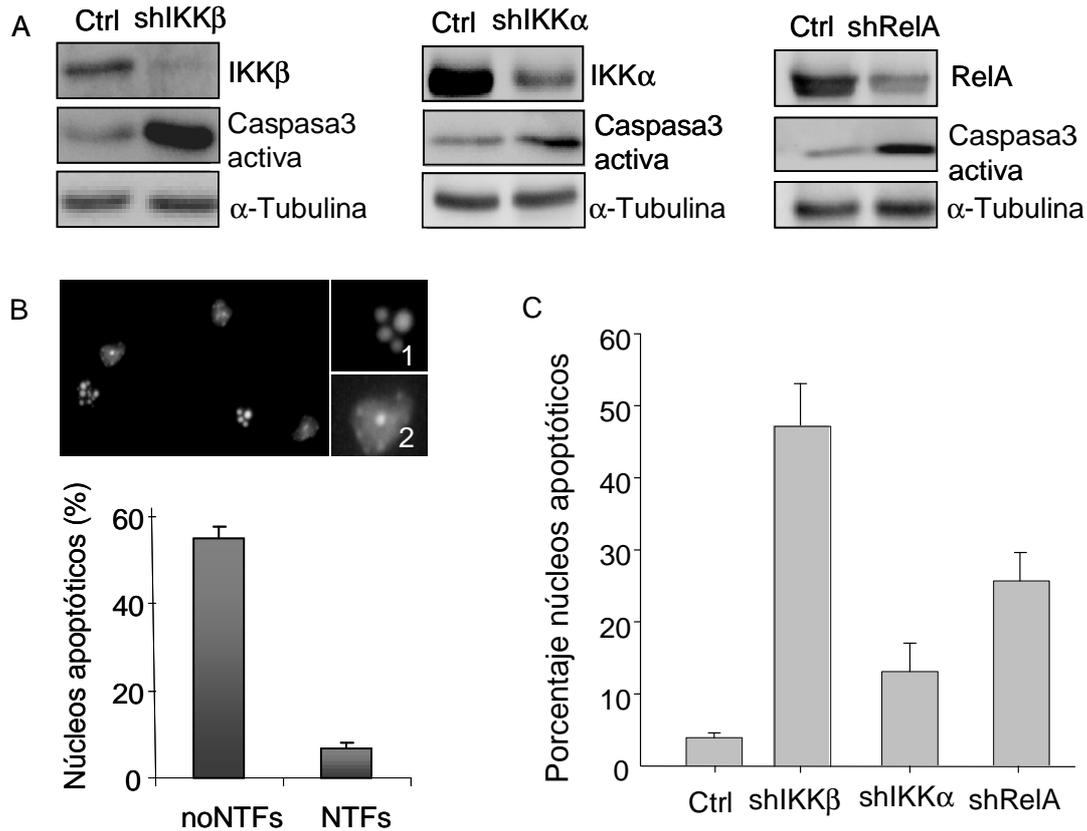


Figura 47. La disminución de los niveles de las proteínas IKKα o IKKβ o RelA causa muerte celular apoptótica.

A) Las MNs fueron transducidas con shIKKα o shIKKβ o shRelA o Control y mantenidas en presencia de NTFs. Tras cinco días se obtuvo el lisado proteico total de estas células y se analizó mediante WB usando anticuerpos contra: caspasa-3 activa; IKKα o IKKβ o RelA como Control de transducción, y αTubulina usado como control de carga. B) Imágenes representativas de núcleos teñidos con Hoechst: 1) núcleo con morfología apoptótico; 2) núcleo sano. La gráfica en B representa el porcentaje de núcleos apoptóticos en MNs tratadas o no-tratadas con NTFs durante 24h. C) Porcentaje de núcleos apoptóticos en MNs transducidas con shIKKα o shIKKβ o shRelA o Control durante 5 días en presencia de NTFs. Los valores de la gráfica representan el porcentaje de núcleos apoptóticos de cada condición de seis pozos de tres experimentos independientes ± SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas usando *one-way ANOVA test* y Bonferroni's *post-hoc* múltiple comparación (*, $p < 0.05$) respecto al Control.

Implicación de la vía NF-κB en la expresión de las proteínas pro- y anti-apoptóticas

Estudios en diferentes modelos neuronales han demostrado la implicación de la vía NF-κB en el control de la apoptosis mediante la regulación genética de las proteínas pro- y anti-apoptóticas. Se procedió a analizar proteínas relacionadas con la apoptosis neuronal en MNs donde se disminuyen los niveles de las proteínas IKKα, IKKβ o RelA. Por ello se analizó los niveles de expresión de tres proteínas: dos pro-apoptótica Bax y Bim_{EL}, y una anti-

apoptótica Bcl-x_L (Figura 48). Las MNs se transdujeron durante 20 h con shIKK β o shRelA o Cotel. Tras este tiempo el medio fue cambiado, y las MNs se mantuvieron durante cinco días en presencia de NTFs. El extracto proteico de estas MNs fue analizado mediante WB usando anticuerpos específicos contra las proteínas: Bax (Figura 48A), Bim (Figura 48B) o Bcl-x_L (Figura 48C). En las células transducidas con shIKK β o shRelA los resultados obtenidos mostraron cambios significativos en la expresión de la proteína Bim_{E_L}, pero no en la expresión de las proteínas Bcl-x_L y Bax (Figura 48).

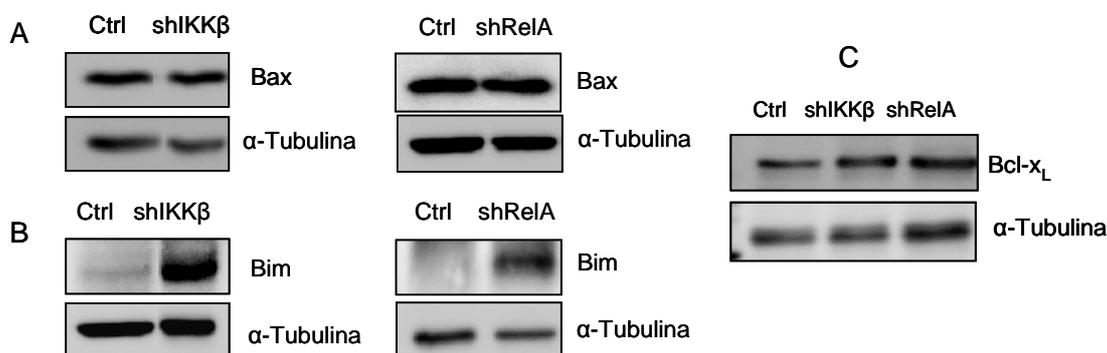


Figura 48. La disminución a los niveles de las proteínas IKK β o RelA o IKK α afecta la expresión de la proteína Bim, pero no de Bcl-x_L ni de Bax.

Imágenes representativas de WB de MNs transducidas con shRNA contra IKK β o RelA o Control. Cinco días después de la transducción el extracto proteico de estas células y se analizó con anticuerpo contra las proteínas A) Bax, B) Bim_{E_L} y C) Bcl-x_L. Como control de carga se usó α -Tubulina.

La proteína Bim es una de las proteínas de la familia BCL-2 con un dominio (*BH3-only*). Su implicación en la apoptosis contribuye con la activación directa de las proteínas pro-apoptóticas Bax y Bak y la salida de citocromo C desde la mitocondria (Kuwana et al., 2005; Willis et al., 2007; Zhang et al., 2008a).

Efectos de la sobre-expresión de Bcl-x_L sobre la muerte inducida por la inhibición de IKK α , IKK β o RelA en las MNs

En distintos modelos neuronales se ha demostrado el efecto de supervivencia por la sobre-expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-x_L (Kane et al., 1995) o para la inhibición de la proteína pro-apoptótica Bax en los procesos de apoptosis (Deshmukh and Johnson, 1998).

Así se decidió analizar el efecto de estos procesos en las MNs con la vía NF- κ B bloqueada. Las MNs *knockdown* para IKK β o IKK α o RelA o Control fueron co-transducidas con un vector de sobre-expresión de Bcl-x_L humano (h Bcl-x_L) (Gozzelino et al. 2008) o únicamente transducidas con shIKK β o shIKK α o shRelA o Control (Figura 49, Figura 50). Los efectos de la sobre-expresión de la proteína Bcl-x_L sobre la supervivencia se analizaron al tercer y el quinto día (Figura 50A). Los valores del gráfico están presentados como el porcentaje de la supervivencia respecto al tiempo 0. Mediante WB se detectó un aumento significativo en la expresión de Bcl-x_L, 3 días después de la transducción (Figura 50A).

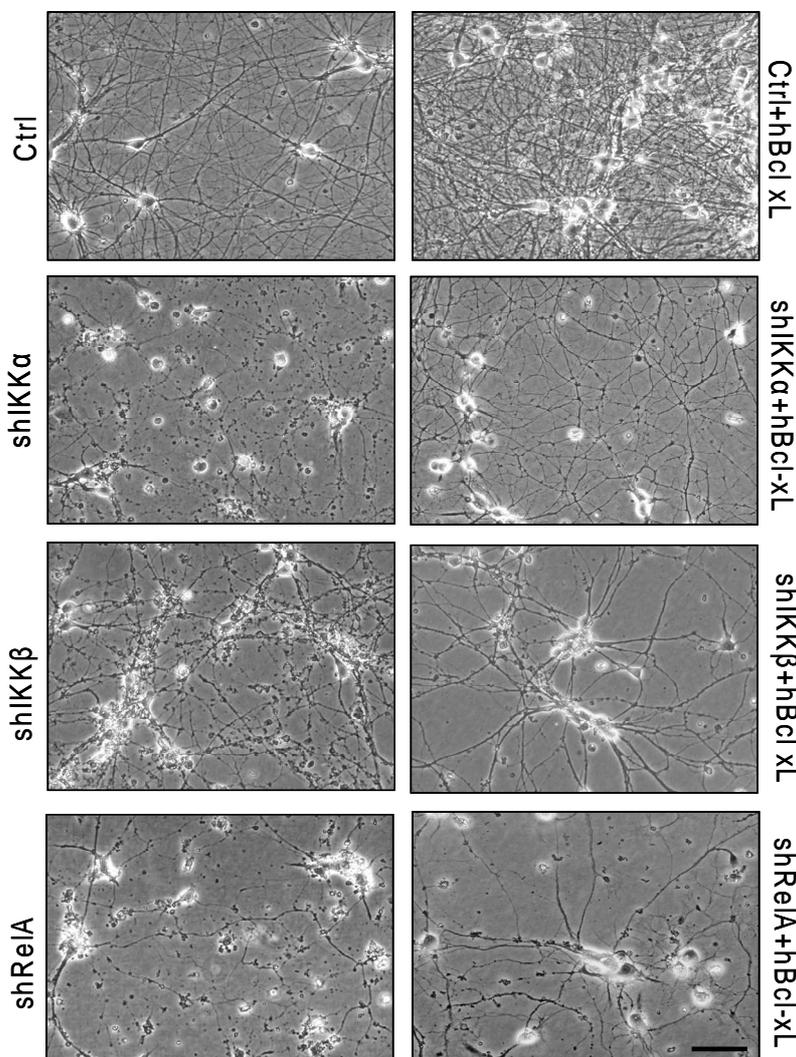


Figura 49. Efecto de la sobre-expresión de Bcl-x_L en MNs *knockdown* para IKK α o IKK β RelA.

Imágenes representativas de contraste de fase de MNs transducidas durante 5 días con Bcl-x_L más shIKK α o shIKK β o shRelA o Control; o sólo shIKK α o shIKK β o shRelA o Control. Barra 20 μ m.

Como se puede observar en la Figura 50B la sobre-expresión de la proteína hBcl-x_L rescata significativamente de la muerte inducida por la inhibición de las proteínas IKKα o IKKβ o RelA en las MNs. Se observaron diferencias significativas (al día tres) en el porcentaje de supervivencia entre las MNs co-transducidas con hBcl-x_L y shIKKα (98.67±8.62) y las MNs solo transducidas con shIKKα (73.32±3.4), así como, en las MNs co-transducidas con hBcl-x_L y shRelA (70.7±8.86) respecto a las MNs transducidas sólo con shRelA (45.44±7.3).

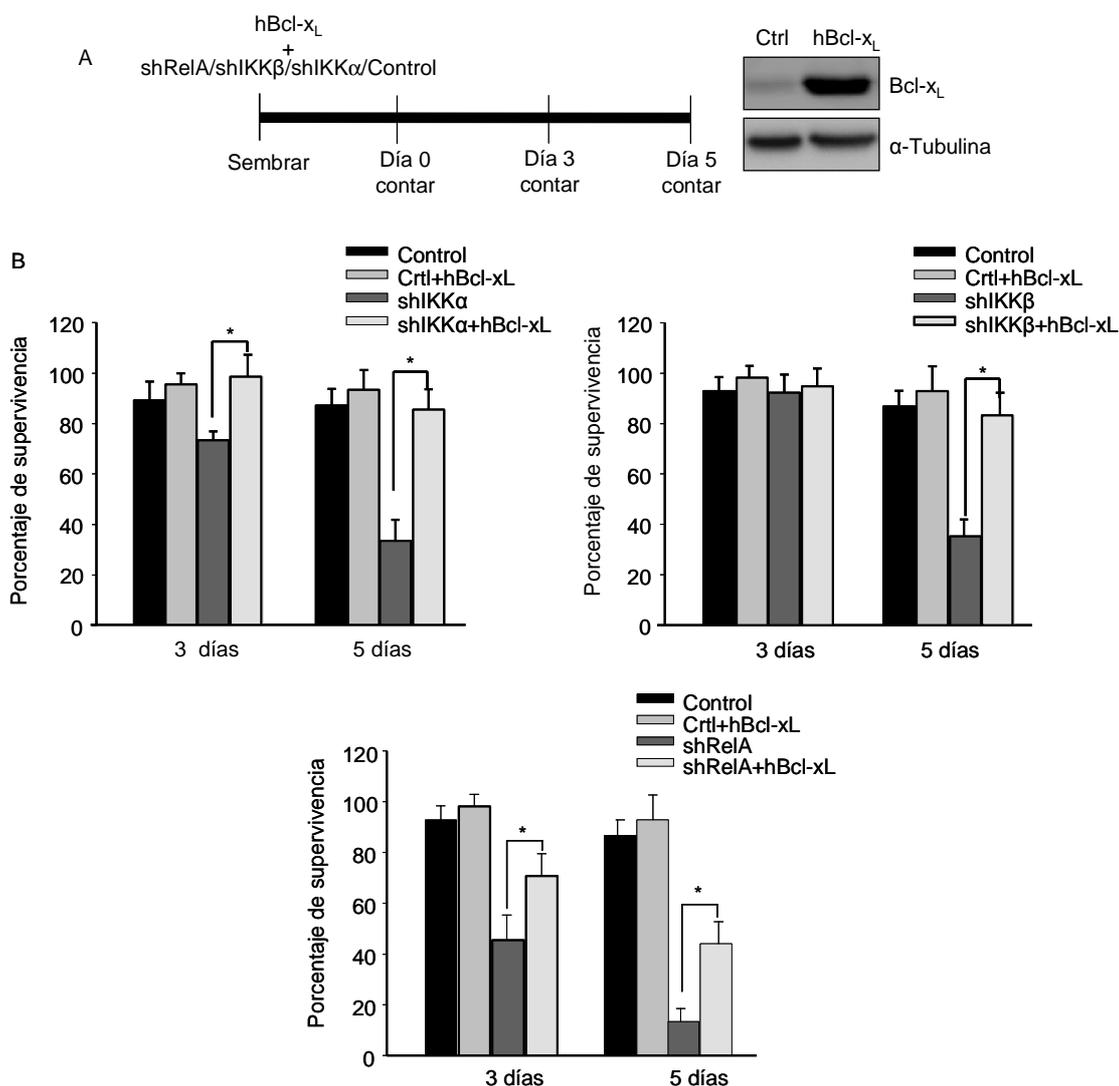


Figura 50. La sobre-expresión de Bcl-x_L protege las MNs de la muerte inducida por la disminución de las proteínas IKKβ o IKKα o RelA.

A) El diagrama indica los tiempos de evolución de la supervivencia en las MNs co-transducidas con hBcl-x_L más shIKKα o shIKKβ o shRelA o Control o solo con shIKKα o shIKKβ o shRelA o Control. El WB muestra la sobre-expresión de proteína hBcl-x_L 3 días después de la transducción. El extracto proteico fue comprobado con anti-cuerpo contra Bcl-x_L. Como control de carga fue usado αTubulina. Las gráficas en (B) representan el porcentaje de supervivencia neuronal. El porcentaje de la supervivencia se midió como esta descrito en Materiales y

Métodos. Los valores del gráfico representan el porcentaje de supervivencia en nueve pozos por cada condición repartidos en tres experimentos independientes \pm SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas usando *one-way ANOVA test* y Bonferroni's *post-hoc* múltiple comparación (*, $p < 0.001$).

Al quinto día después de la transducción los resultados obtenidos demostraron que la sobre-expresión de hBcl-x_L es capaz de rescatar las MNs de la muerte tanto las MNs *knockdown* para IKK α o IKK β , como y las MNs *knockdown* para RelA.

Debido a que la sobre-expresión de Bcl-x_L puede rescatar de la muerte inducida por la supresión de los NTFs, se disidió estudiar la relación entre los NTFs y la expresión de hBcl-x_L. Las MNs fueron cultivadas en presencia o ausencia de NTFs durante diferentes tiempos (0, 24, 48 y 72 h). El extracto proteico de estas células se analizó con anticuerpo contra la proteína Bcl-x_L. Se observó un aumento en la expresión de la proteína Bcl-x_L en las MNs tratadas con NTFs respecto a las no tratadas (Figura 51A).

Finalmente, se analizó el efecto de Bcl-x_L, sobre la expresión de las proteínas IKK α o IKK β o RelA en MNs transducidas con shRNA. Los resultados obtenidos mediante *WB* demostraron claramente que la sobre-expresión de Bcl-x_L no afecta la disminución de IKK β o IKK α o RelA (Figura 51B).

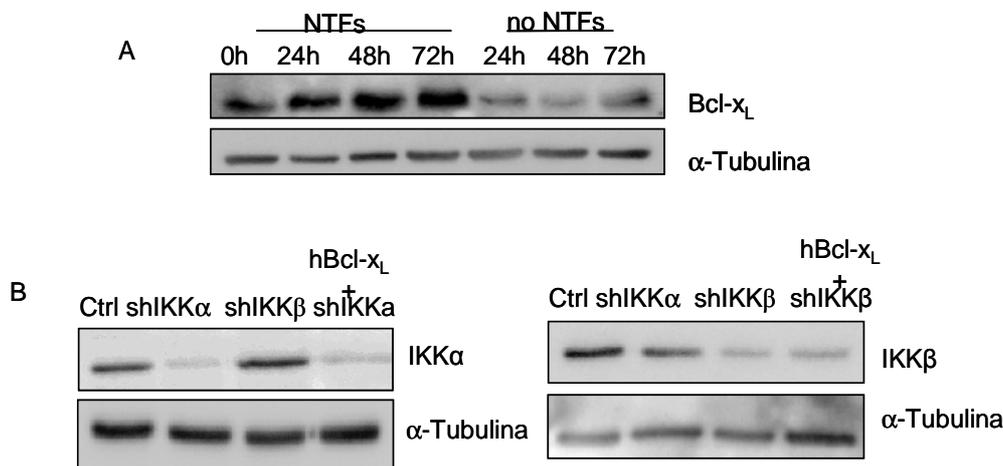


Figura 51. Efectos de los NTFs sobre la expresión de Bcl-x_L.

A) Imágenes representativas de WB en MNs tratadas o deprivadas de NTFs. El extracto total proteico de MNs fue recogido a diferentes tiempos (0, 24, 48 y 72h) y comprobado con anticuerpo contra Bcl-x_L. Como control de carga se usó α -Tubulina. B) Imágenes representativas de WB de MNs transducidas durante cinco días con shIKK α o shIKK β o co-transducidas con shIKK α +hBcl-x_L o shIKK β +hBcl-x_L. El lisado total de proteína se comprobó con anticuerpos específicos contra shIKK α o shIKK β . Como control de carga se usó α -Tubulina.

Efectos de la inhibición de Bax sobre la muerte inducida por la inhibición de IKK β o RelA en las MNs

La muerte celular apoptótica mediada por Bim esta relacionada la translocación mitocondrial del Bax, la interrupción de su interacción con Bcl-x_L y consecuentemente la oligomerización de Bax induciendo la salida de citocromo C de la mitocondria (Wei et al., 2001b). Con el fin de bloquear la apoptosis observada en las MNs *knockdown* para IKK β o RelA, las MNs fueron transducidas con shBax durante 3 días. Este tiempo fue suficiente para que los niveles endógenos de Bax disminuyeran (Figura 52A). Tras este tiempo, las MNs *knockdown* para Bax fueron co-transducidas con shIKK β o shRelA o Control (vector vacío), como controles se usaron MNs transducidas con shIKK β o shRelA o transducidas con el vector vacío.

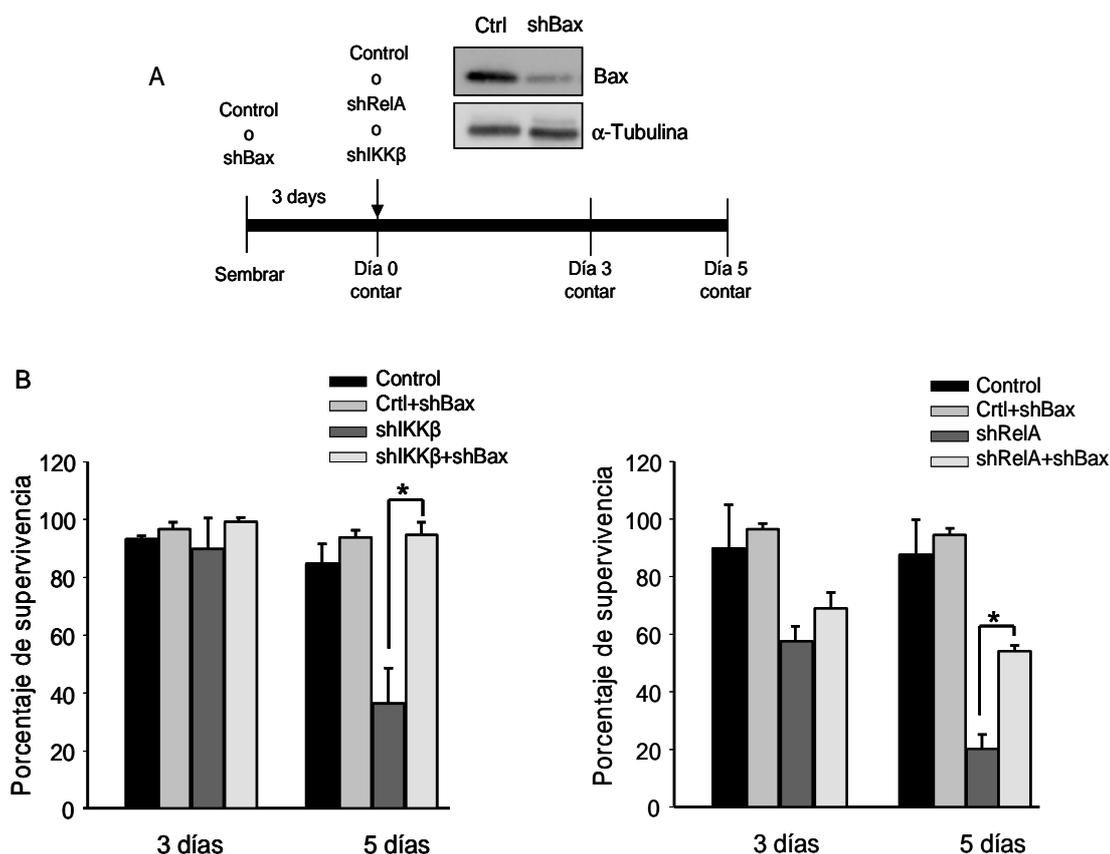


Figura 52. La disminución a los niveles endógenos de Bax protege a las MNs de la muerte inducida por la reducción a los niveles de proteína IKK β o RelA.

A) El diagrama indica la transducción de las MNs durante tres días con shBax y los tiempos de evolución de la supervivencia. Tras este tiempo, las células fueron co-transducidas con shIKK β o shRelA o Control o solo shIKK β o shRelA o Control. El análisis de WB muestra la disminución de la proteína Bax 3 días después de la transducción. El extracto proteico se comprobó con un anti-cuerpo contra la proteína Bax. Como control de carga se usó α -Tubulina. Las gráficas en (B) representan el porcentaje de supervivencia neuronal. El porcentaje de la supervivencia se midió como esta descrito en Materiales y Métodos. Los valores del gráfico representan el

porcentaje de supervivencia de nueve pozos por cada condición repartidos en tres experimentos independientes \pm SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas usando *one-way ANOVA test* y Bonferroni's *post-hoc* múltiple comparación (*, $p < 0.001$).

El porcentaje de la supervivencia se midió a los 3 y 5 días después de la transducción (Figura 52B). Los resultados obtenidos mostraron diferencias significativas entre las MNs co-transducidas con shBax+shIKK β ($94 \pm 4.5\%$) respecto a las MNs *knockdown* para IKK β ($36.1 \pm 12.2\%$), y las MNs co-transducidas con shBax+shRelA ($53.6 \pm 1.8\%$) respecto a las MNs *knockdown* para RelA ($10 \pm 7.79\%$).

Todos estos resultados sugieren la implicación de la mitocondria en la muerte de las MNs inducida por el bloqueo de la vía canónica de NF- κ B.

La implicación de la vía PI3-K/Akt en la fosforilación de las IKKs

Existen diferentes vías de señalización relacionadas con la activación de la vía NF- κ B en el SN. Una de las candidatas es la vía PI3-K/Akt. Se ha descrito que la activación directamente Akt por PI3-K puede fosforilar y activar la IKKs, llevando a cabo la activación de NF- κ (Ozes et al., 1999; Romashkova and Makarov, 1999). La vía PI3-K/Akt está implicada en la supervivencia neuronal y controla la activación de distintas vías de señalización. La serin-treonin quinasa Akt se activa a partir de productos de lipídicos de PI3-K y puede regular la supervivencia en las neuronas inhibiendo la apoptosis (Cardone et al., 1998; Bonni et al., 1999). Con el objetivo de estudiar el efecto de la activación de Akt por PI3-K sobre la inducción de IKKs por NTFs hemos usado el inhibidor específico de PI3-K.

Las MNs se incubaron en presencia o ausencia de NTFs con o sin 25 μ M LY294002 durante 5 días. Los cambios en la supervivencia fueron detectados al tercer y quinto días. Al tercer día se observaron cambios significativos entre las MNs tratadas con o sin 25 μ M LY294002, en presencia de NTFs (Figura 53A). Al quinto día después de empezar el tratamiento, los valores de supervivencia de las MNs tratadas con LY294002 llegaron aproximadamente al 20%, se observaron valores similares en las MNs no tratadas con NTFs en presencia o ausencia de 25 μ M LY294002. Estos

resultados confirmaron la implicación de la vía PI3-K/Akt en la supervivencia de las MNs mediada por NTFs (Figura 53A).

Hemos analizado la implicación de la vía PI3-K/Akt en la activación de las IKKs. Tras una noche de privación, las MNs fueron incubadas con LY294002 durante 45 min y estimuladas durante 10 min con o sin el cóctel de NTFs. Como controles de este experimento se usaron MNs estimuladas o no estimuladas con NTFs. Mediante WB hemos observado una disminución en la fosforilación de las proteínas IKKs en las MNs tratadas con 25 μ M LY294002+NTFs respecto a los controles (LY294002+ sin NTFs o privadas de NTFs). Estos resultados proponen a la vía PI3K/Akt como un posible activador de la vía NF- κ B en las MNs.

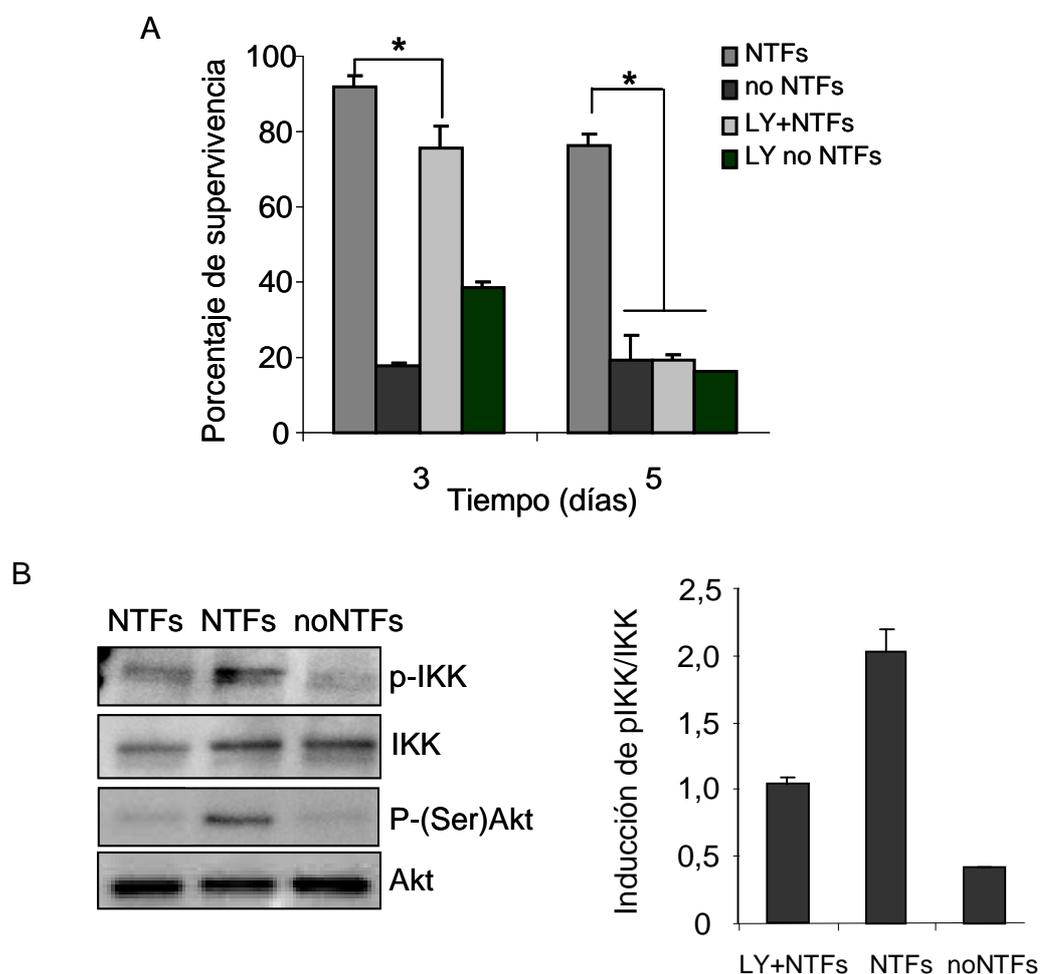


Figura 53. Implicación de la vía PI3-K/Akt en la supervivencia y en la fosforilación de las IKKs mediadas por NTFs.

A) El porcentaje de supervivencia de MNs tratadas con y sin 25 μ M LY294002 en presencia y ausencia de NTFs. Las MNs fueron tratadas con 25 μ M LY294002 y estimuladas con NTFs durante 5 días (ver Materiales y Métodos). El porcentaje de la supervivencia se midió como esta descrito en Materiales y Métodos. Los valores del gráfico representan el porcentaje de supervivencia de nueve pozos por cada condición repartidos en tres experimentos

independientes \pm SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas usando *one-way ANOVA test* y Bonferroni's *post-hoc* múltiple comparación (*, $p < 0.001$). B) Análisis WB de MNs tratadas con: 25 μ M LY294002+NTFs, con NTFs, sin NTFs. El lisado proteico de MNs tratadas o no con 25 μ M LY294002 45 min, estimuladas con NTFs o sin NTFs durante 10 min., fue comprobado con anticuerpos contra p-IKK e IKK y p-Akt (Ser473) y Akt total. La gráfica en B representa la inducción de las proteínas IKKs (fosfo-IKK respecto a IKK total) de tres experimentos independientes \pm SEM.

La disminución a los niveles de la proteína RelA en las MNs afecta a la expresión de las proteínas Smn y CREB

En el presente estudio hemos analizado la implicación de la vía NF- κ B, en concreto la proteína RelA, en el control de la expresión de la proteína Smn (*del inglés, Survival Motor Neuron*). La falta de proteína Smn esta relacionada con una enfermedad neuro-degenerativa hereditaria llamada Atrofia Muscular Espinal (AME). Esta enfermedad se caracteriza por una pérdida específica de las MNs de las astas ventrales de la médula espinal. Con el fin de analizar si la inhibición de la vía canónica de NF- κ B afecta la expresión de esta proteína hemos transducido las MNs con shRelA o Control en presencia de NTFs. Después de 4 días, mediante WB usando un anticuerpo específico contra Smn detectamos una disminución significativa ($62 \pm 3.6\%$) de los niveles endógenos de la proteína Smn en las MNs *knockdown* para RelA comparado con el Control (100%) (Figura 54A).

El factor de transcripción CREB (*del inglés, cAMP response element-binding*) se une a las secuencias específicas de DNA llamadas CRE (*cAMP response elements*). La fosforilación de CREB induce su unión al promotor del *SMN* regulando su expresión (Majumder et al., 2004a). Puesto que en las MNs transducidas con shRNA contra la proteína RelA se observa una disminución en los niveles endógenos de Smn, hemos decidido analizar los niveles de fosforilación y los niveles endógenos de CREB en las MNs transducidas con RelA o Control. Las MNs fueron transducidas con shRelA o vector vacío (Cntr) durante cuatro días. Tras este tiempo se obtuvo el extracto proteico de estas células y mediante WB usando anticuerpos específicos, fueron analizados los niveles la proteína CREB fosforilado y CREB total. Los resultados obtenidos demostraron cambios significativos en la expresión y la fosforilación del CREB. En las células transducidas con shRelA se observó una disminución significativa de los niveles de la proteína CREB ($18 \pm 9.3\%$) respecto al Control

(100%) (Figura 54B). Todos estos resultados conjuntamente sugieren una interacción entre CREB y Smn y la vía NF- κ B.

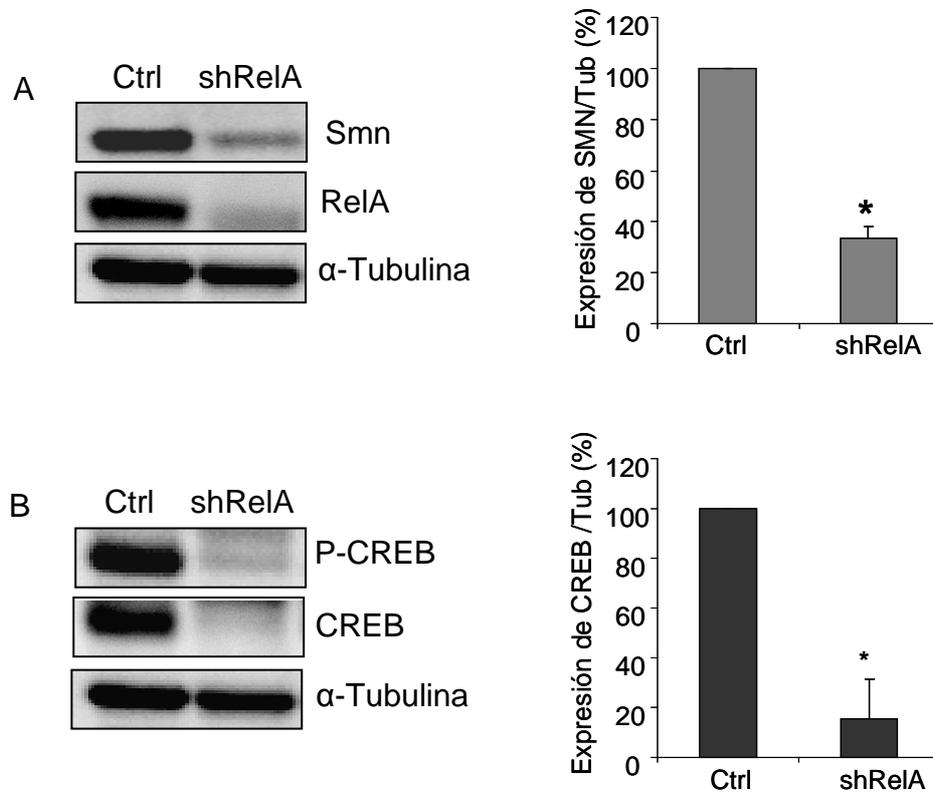


Figura 54. La shRelA causa reducción de los niveles de proteínas Smn y CREB.

A) Imágenes representativas de WB de MNs transducidas con shRelA durante 4 días. El extracto proteico de MNs transducidas con shRelA o Control fue analizado con un anticuerpo contra(A) las proteínas Smn y RelA y contra (B) p-CREB y CREB. Como control de carga fue usada la α -Tubulina, Las gráficas en A y B representa el porcentaje de nivel de proteína Smn (A) y CREB (B) en células transducidas con shRelA o Ctrl de tres experimentos independientes \pm SEM.

RESULTADOS

**A new model to study spinal muscular atrophy: Neurite
degeneration and cell death is counteracted by Bcl-X_L
Overexpression in motoneurons**

Ana Garcerá, Stefka Mincheva, Myriam Gou-Fabregas,
Victor Caraballo-Miralles, Jeronia Llado, Joan Comella and
Rosa M. Soler

Neurobiology of Disease, 2011

DOI: 10.1016/j.nbd.2011.02.003

II. Estudio de los cambios morfológicos y de la supervivencia celular en un modelo *in vitro* de Atrofia Muscular Espinal (AME)

La AME es una enfermedad neurodegenerativa hereditaria caracterizada por la afectación de las MNs de las astas ventrales de la médula espinal. Esta enfermedad está relacionada con la pérdida de la copia del gen cetromérico *SMN1* y como consecuencia, la disminución de la proteína funcional Smn.

En nuestro grupo hemos establecido un modelo *in vitro* de AME en un cultivo primario de MNs para poder analizar los efectos causados por la ausencia de la proteína Smn en estas células. En las MNs la proteína Smn se expresa tanto en el citoplasma como en el núcleo donde en este último se concentra en las estructuras punteadas llamadas Cuerpos de Cajal (Singh et al., 2006). En estudios previos de nuestro laboratorio se ha demostrado la expresión de la proteína Smn en MNs y se ha determinado la distribución granular de la proteína en el citoplasma, núcleo y en las neuritas de las MNs (Figura 55B).

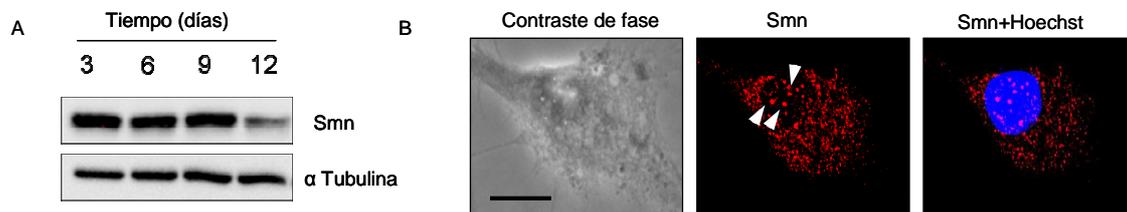


Figura 55. Expresión y distribución de la proteína SMN en cultivo primario de MNs

A) Imágenes representativas de WB de MNs cultivadas durante 3, 6, 9, o 12 días. El extracto proteico fue comprobado con anti-cuerpos contra SMN y α -Tubulina. B) Imágenes representativas microscopio contraste de fase o Confocal inmunofluorescencia anti-Smn, Hoechst y SMN+Hoechst de MNs cultivadas durante 5 días. Escala de barra, 10 μ m.

Diseño y establecimiento de un modelo de AME a partir de un cultivo primario de motoneuronas de ratón

Con el objetivo de establecer un modelo *in vitro* de AME, se generaron dos shRNA que tienen como diana dos lugares distintos en la secuencia de Smn: en el ratón (shSmn₁) y en ratón y rata (shSmn₂). Las MNs fueron aisladas de embriones de ratón de E12.5 y mantenidas en presencia de NTFs durante tres horas (ver Materiales y Métodos). Posteriormente fueron

transducidas con shSmn₁ o shSmn₂ o EV durante 20h. Tras este tiempo el medio fue cambiado con NBMc+NTFs. A partir de 72h de la transducción se observó un alto porcentaje de células GFP positivas (~99%) (Figura 56A). La eficiencia de la transducción de los dos shRNA se comprobó mediante WB al quinto día post-transduccional. Se observó una reducción de los niveles de la proteína Smn en shSmn₁ del ~70% y shSmn₂ del ~60% respecto al EV control (Figura 56B). Puesto que la gravedad de la enfermedad AME depende de la cantidad de proteína Smn funcional para los próximos análisis hemos decidido usar shSmn₂ debido a su mayor capacidad de disminuir los niveles de la proteína Smn en ratón.

El siguiente paso en el establecimiento del modelo *in vitro* de AME fue determinar los niveles de la proteína Smn en las MNs transducidas con shSmn₂ tras un largo periodo de tiempo (12 días) (Figura 56C). Los resultados obtenidos mostraron que los niveles bajos de proteína Smn en las MNs transducidas con shSmn₂ se mantienen a lo largo del tiempo en cultivo.

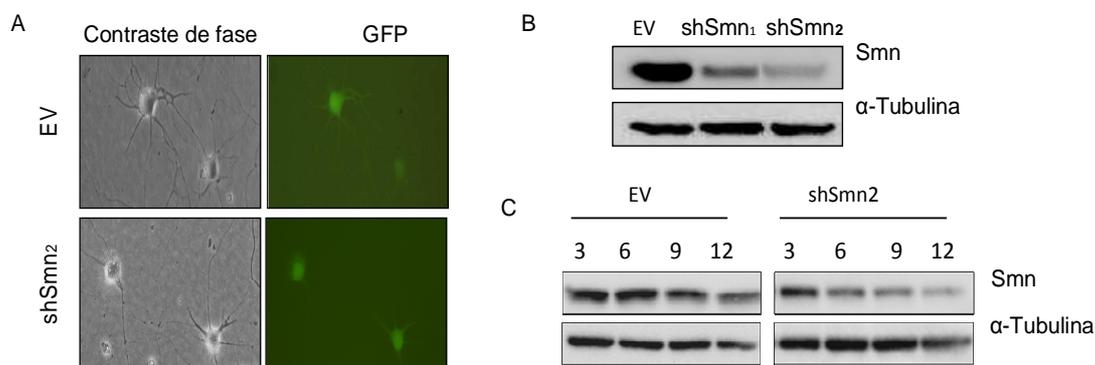


Figura 56. Efectos de la transducción con shSMN en los niveles endógenos de Smn.

A) Imágenes representativas de contraste de fase y fluorescencia (GFP) a las MNs transducidas con shSmn₂ o EV (vector vacío) durante 3 días. B) Análisis WB de extracto proteico de MNs transducidas con shSmn₁ o shSmn₂ o EV control durante 5 días analizadas con ant-SMN y α -Tubulina, usada como control de carga

Efecto de la disminución de la proteína Smn sobre las MNs

Estudios realizados sobre ratones knockout de Smn demostraron defectos en la inervación de las MNs probablemente debida a la degeneración axonal (McGovern et al., 2008a). Estudios previos en el nuestro grupo demostraron tras un curso temporal de 12 días cambios significativos en la morfología neurítica de las MNs transducidas con shSmn₂ (Figura 57B). Los

análisis de la degeneración neurítica se efectuaron a través de fotografías de microscopio de contraste de fase del mismo campo de cada placa a diferentes días (3, 6, 9 y 12) después de la transducción. La degeneración neurítica se ha presentado como porcentaje del número de neuritas con “*swelling*” respecto al tiempo 0 (Press and Milbrandt, 2008). Los resultados obtenidos demostraron cambios significativos en la degeneración neurítica al noveno día después de la transducción de las MNs con shSmn₂ (31.1±2.3%) respecto al EV control (vector vacío). (18.5± 1.6%). A partir de 12 días, la degeneración neurítica en las MNs *knockdown* para Smn llegó al 55% mientras que las MNs transducidas con EV tuvieron valores cerca del 30%.

Por otro lado ha sido evaluada la supervivencia de las MNs *knockdown* para Smn (Figura 57C). Estos experimentos han sido efectuados en los mismos campos de cada placa de cada condición al 0, 3, 6, 9 y 12 días después de la transducción con shSmn₂ o EV control (vector vacío) donde el tiempo 0 se ha considerado como el 100% de la supervivencia. Diferencias significativas en el porcentaje de supervivencia entre las MNs *knockdown* para Smn y EV control se detectaron a partir del 9 día *post-transducción*. A los 12 días la supervivencia de las MNs con niveles bajos de Smn disminuye un 80% respecto al tiempo 0, mientras que las MNs transducidas con al EV control se observa solamente un 20% de muerte celular.

Nuestras observaciones junto con datos bibliográficos demostraron una respuesta similar de las MNs a la disminución a los niveles de la proteína Smn (McGovern et al., 2008). Por este motivo, hemos propuesto nuestro modelo *in vitro* de AME para estudiar los diferentes mecanismos moleculares implicados en la enfermedad y analizar los efectos de posibles candidatos terapéuticos.

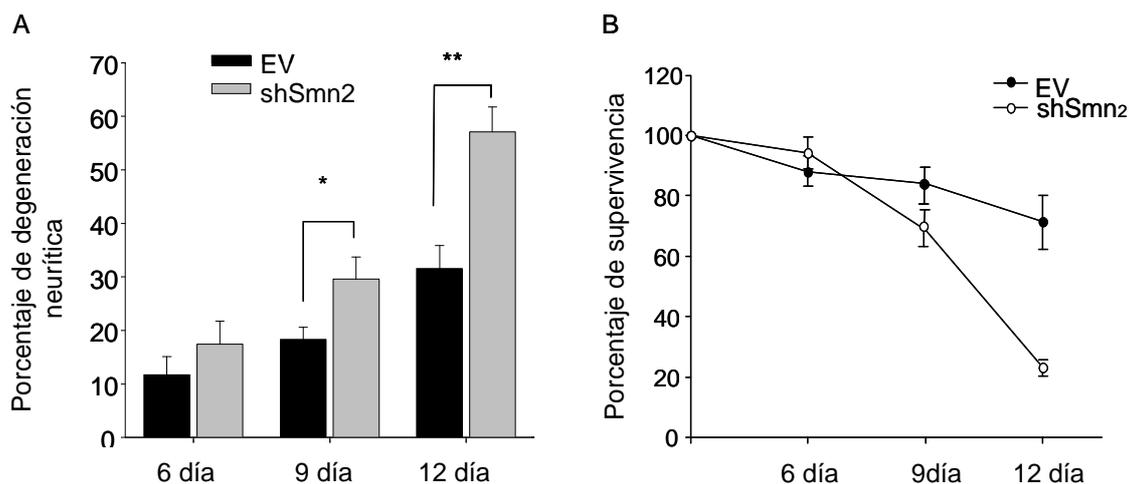


Figura 57. La disminución de los niveles de la proteína Smn causa degeneración neurítica y muerte neuronal.

A) Representa el porcentaje de las neuritas degeneradas a 6, 9 y 12 días post-transducción. La gráfica en B) representa el porcentaje de supervivencia de las MNs transducidas durante 6, 9 y 12 días con shSmn₂ o EV control. Los valores en las gráficas representan el porcentaje de supervivencia de doce pozos por cada condición repartidos en tres experimentos independientes \pm SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas usando *one-way ANOVA test* y Bonferroni's *post-hoc* múltiple comparación (**, $p < 0.05$; *, $p < 0.001$).

Análisis de los efectos de la sobre-expresión de hBcl-x_L sobre la degeneración neurítica y supervivencia neuronal en el modelo *in vitro* de AME.

Como hemos descrito anteriormente, la proteína anti-apoptótica Bcl-x_L tiene una función neuro-protectora en los procesos de muerte apoptótica inducidas durante el desarrollo. Por otro lado, también se ha demostrado la implicación de esta proteína en la plasticidad sináptica (Jonas, 2006). Estudios recientes proponen a la proteína Bcl-x_L como un posible neuroprotector en la AME (Tsai et al., 2008). Con el objetivo de analizar el efecto de la sobre-expresión de la proteína Bcl-x_L humana (h Bcl-x_L) en nuestro modelo *in vitro* de AME, primero determinamos su efecto en la degeneración neurítica. Las MNs se transducieron con shSmn₂ o EV control, o co-transducidas con hBcl-x_L y shSmn₂ o hBcl-x_L e EV control. Seis días después, analizamos mediante WB los niveles de expresión de Bcl-x_L en las MNs *knockdown* para Smn donde detectamos un aumento significativo en los niveles de la expresión de la proteína Bcl-x_L (Figura 58A). Los efectos de sobre-expresión de Bcl-x_L sobre la degeneración neurítica causada por la disminución a los niveles de Smn se analizaron a los 6 y 12 días después de la transducción (Figura 58 B y C). Los

resultados obtenidos mostraron a los 12 días una disminución importante del porcentaje de degeneración neurítica de las MNs co-transducidas con Bcl-x_L+shSmn₂ comparado con las MNs *knockdown* para Smn₂.

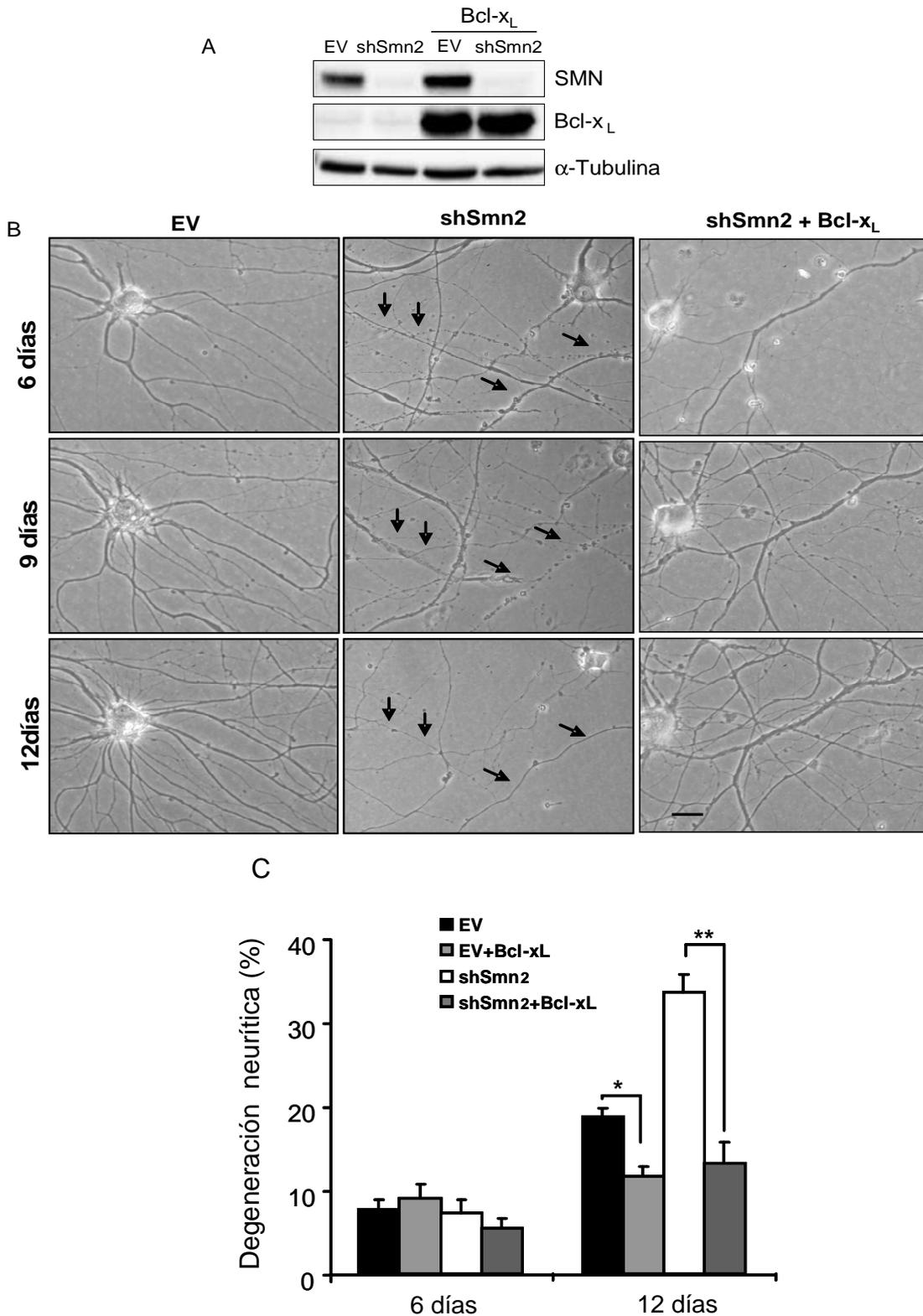


Figura 58. Efectos de la sobre-expresión de Bcl-x_L sobre la degeneración neurítica en las MNs *knockdown* para SMN.

Las MNs fueron transducidas con shSMN₂ o EV, o co-transducidas con hBcl-x_L+ shSMN₂ o hBcl-x_L+EV y se mantuvieron en presencia de NTFs. A) El extracto proteico de células transducidas fue analizado mediante WB con anticuerpos contra Bcl-x_L o SMN. Las membranas se reprobaron con un anticuerpo contra la α-Tubulina usado como control de carga. (B) Imágenes representativas del mismo campo microscópico de MNs de 6, 9, y 12 días después de la transducción con shSMN₂ o co-transducidas con hBcl-x_L+ shSMN₂. Las flechas indican las neuritas degeneradas. Barra 30µm). La gráfica en (C) representa el porcentaje de neuritas degeneradas por campo microscópico para cada condición (9 pocillos por 3 experimentos independientes) ± SEM.

Por otro lado, se ha analizado el efecto de la sobre-expresión de Bcl-x_L en la muerte neuronal inducida por la disminución a los niveles de proteína Smn. A los 12 días *post*-transducción observamos que la sobre-expresado de Bcl-x_L protege a las MNs de la muerte inducida por la disminución a los niveles de Smn (Figura 59). Al mismo tiempo en las MNs co-transducidas con hBcl-x_L+EV la supervivencia de las MNs es superior comparado con el EV control.

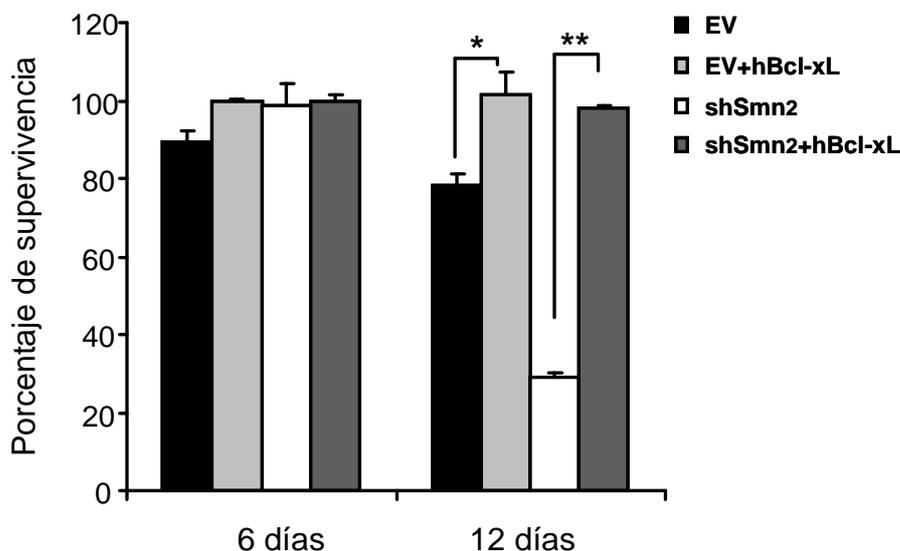


Figura 59. La sobre-expresión de Bcl-x_L protege las MNs de la muerte inducida por la disminución a los niveles de la proteína Smn.

Las MNs fueron transducidas con shSmn₂ o EV control, o co-transducidas con hBcl-x_L+shSmn₂ o hBcl-x_L+EV y mantenidas en presencia de NTFs. La gráfica representa el porcentaje de células vivas donde los valores significan el porcentaje de células que sobreviven por cada condición de 9 pocillos de 3 experimentos independientes ± SEM. Los *asteriscos* indican diferencias significativas determinados usando test ANOVA (*p<0.05, y **p<0.0001).

Así, podemos concluir que la recuperación de la degeneración neurítica y la muerte neuronal observadas en las MNs *knockdown* para Smn por la sobre-expresión de la proteína Bcl-x_L confirman el papel importante de la proteína Bcl-x_L en los procesos de la muerte neuronal inducida tanto durante el desarrollo embrionario como en las enfermedades neurodegenerativas.

La disminución de la proteína Smn no afecta la expresión de las proteínas CREB y RelA

En el presente estudio hemos mostrado por primera vez una interacción entre la vía NF- κ B y los niveles endógenos de la proteína Smn. Como se ha descrito en la primera parte de los resultados, en las MNs *knockdown* para RelA se observaba una disminución importante de los niveles de las proteínas Smn y CREB. Basándonos en estos resultados, nos propusimos conocer si la disminución de Smn en las MNs causa cambios en la expresión de las proteínas CREB y RelA. Las MNs fueron transducidas con shSmn₂ o EV control durante 20 h. Tras este tiempo, el medio fue cambiado por NBMc+NTFs en el cual, las células se cultivaron durante 3 y 12 días. El extracto proteico de estas células fue analizado mediante WB usando anti-cuerpos contra RelA y CREB. Los resultados obtenidos no demostraron ningún cambio en la expresión de la proteína RelA (Figura 60A) ni de la proteína CREB (Figura 60B) en las MNs *knockdown* para Smn.

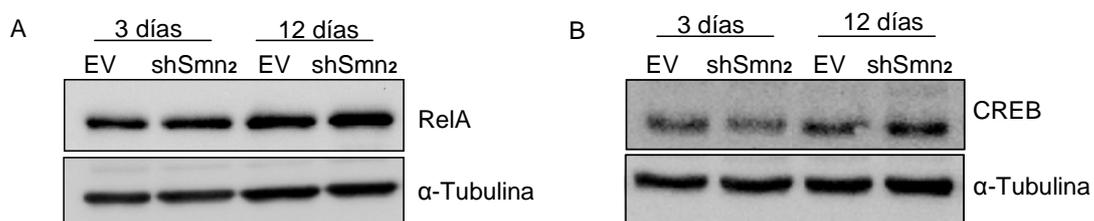


Figura 60. La disminución a los niveles de proteína Smn no afecta los niveles endógenos de RelA y CREB.

Análisis WB de extracto proteico de las MNs transducidas con shSMN₂ o EV control durante 3 y 12 días con anti-RelA (A) y anti-CREB (B). Como control de carga se usó α -Tubulina.

DISCUSIÓN

El trabajo que se presenta muestra como el cóctel de NTFs regula la supervivencia de las MNs a través de activación de la vía NF- κ B, así como la implicación de diferentes proteínas en el control de la muerte neuronal inducida por la inhibición de esta vía.

Activación de la vía NF- κ B por el cóctel de NTFs en un modelo de MNs en desarrollo

NF- κ B es un factor de transcripción dimérico, de expresión ubicua. Está implicado en la regulación de diversos procesos fisiológicos como la inflamación, la proliferación, la diferenciación y la apoptosis (revisado en (Karin and Lin, 2002)).

El inicio de la dependencia trófica de las MNs de la médula espinal de los ratones embrionarios (E12.5), también conocida como segundo periodo de PCD, coincide con las primeras observaciones de la activación de la vía NF- κ B (Schmidt-Ullrich et al. 1996; (Yeo and Gautier, 2004)). Durante este período las MNs que no logran alcanzar los NTFs mueren mayoritariamente por apoptosis, sin embargo, las que llegan a estos NTFs sobreviven. Puesto que los mecanismos intracelulares relacionados con el control de este proceso de supervivencia y muerte no están completamente descifrados, hemos dedicado el presente estudio a analizar la implicación de la vía NF- κ B en la supervivencia de las MNs mediada por los NTFs.

Los NTFs son un grupo de factores de crecimiento secretados, los cuales regulan muchos aspectos del desarrollo neuronal, incluyendo la represión de la muerte, el crecimiento neurítico, así como la supervivencia (revisado en (Gould and Enomoto, 2009)). Una amplia gama de NTFs participan en la supervivencia de las MNs durante el desarrollo (Henderson et al., 1998). Diferentes familias de NTFs promueven la supervivencia de determinadas subpoblaciones de las MNs (Gould and Enomoto, 2009). Estudios previos realizados por nuestro grupo han demostrado que el cóctel de NTFs constituido por CNTF, BDNF y GDNF, permite mantener las MNs *in vitro* en las máximas condiciones de supervivencia y diferenciación. El efecto fisiológico de estos factores se debe a su unión con los receptores específicos de la membrana de las neuronas, promoviendo una serie de señales que llevan

a cabo la activación de distintas vías de señalización y factores de transcripción, entre ellas la vía NF- κ B.

En ausencia de estímulos, el dímero NF- κ B se encuentra secuestrado en el citoplasma asociado con su inhibidor I κ B α . Después de un estímulo (ver Tabla 4) se activa un complejo de serina-treonina quinasas llamado IKKs, responsable de la activación de la vía. El complejo IKKs está constituido por tres subunidades: IKK α , IKK β e IKK γ . Solamente IKK α e IKK β tienen actividad quinasa. La fosforilación de IKK β en los residuos de Ser177 y Ser181, así como, la fosforilación de IKK α en los residuos de Ser176 y Ser180 (Schomer-Miller et al., 2006), promueven la liberación del dímero NF- κ B de su inhibidor I κ B α y, como consecuencia, tiene lugar su translocación al núcleo donde efectúa su función de factor de transcripción modulando la expresión génica (revisado en (Hayden and Ghosh, 2004)). En las células de mamíferos, NF- κ B es una combinación dimérica entre los cinco miembros de la familia NF- κ B (RelA, RelB, c-Rel, p50 y p52). En el SNC su forma más representativa es el heterodímero RelA/p50.

En el presente estudio hemos demostrado la habilidad de los NTFs de activar la vía NF- κ B en las MNs. Los niveles de fosforilación del complejo IKK están aumentados significativamente en las MNs tratadas con NTFs cuando los comparamos con las MNs no tratadas. Esta fosforilación conlleva la translocación nuclear de RelA (revisado en (Perkins, 2007)). Mediante inmunofluorescencia hemos demostrado que RelA se localiza predominantemente en el núcleo de las MNs cultivadas en presencia de NTFs (85% RelA nuclear), mientras que en ausencia de NTFs su localización es predominantemente citoplásmica (24% RelA nuclear).

Estudios realizados en laboratorios independientes, han demostrado que la estimulación con CNTF de las neuronas sensoriales (Middleton et al., 2000), con BDNF de las neuronas sensoriales (Gutierrez et al., 2005), así como con GDNF de los astrocitos, promueven la activación de la vía NF- κ B (Kaltschmidt et al., 2005; Chu et al., 2008). Puesto que el cóctel de NTFs usado en nuestro estudio contiene CNTF, BDNF y GDNF hemos estudiado la habilidad individual de cada uno de ellos para activar el complejo IKK. Las células estimuladas

independientemente con BDNF o GDNF o CNTF muestran fosforilación del complejo IKK, demostrando la participación de cada uno de los factores en la activación de la vía.

La estimulación de las MNs con el cóctel de NTFs activa la vía canónica y la vía no-canónica de NF- κ B

Existen varias formas de activación de la vía NF- κ B. En el SNC las más conocidas son las vías: canónica, no-canónica y atípica, entre las cuales, la forma más estudiada es la vía canónica. La activación de esta vía consiste en la activación de las quinasas IKK α /IKK β , la fosforilación y separación del inhibidor I κ B α del complejo RelA/p50, y la translocación nuclear de este complejo. A diferencia de la vía canónica, en la activación de la vía no-canónica participan únicamente homodímeros de la quinasa IKK α (revisado en (Scheidereit, 2006)). Otra diferencia entre las dos vías la encontramos a nivel del dímero NF- κ B activado. En la vía no canónica es el heterodímero RelB/p52. A pesar de que la activación de la vía canónica y la no-canónica depende de las IKKs, la activación de la vía atípica de NF- κ B es totalmente independiente de las IKKs (Kato et al., 2003). Sin embargo, existe un punto en común a nivel dímero NF- κ B de la vía atípica y la vía canónica. Las dos vías activan el mismo heterodímero RelA/p50, aunque la respuesta a su activación es distinta. Para la translocación y activación de RelA/p50 se requiere la fosforilación del inhibidor que en ambas vías esta constituido por I κ B α . Sin embargo, se ha observado que esta fosforilación tiene lugar en residuos distintos según sea la vía canónica o atípica. En la activación de la vía canónica se fosforilan los residuos de Ser32/36 y en la activación de la vía atípica se fosforila la Tyr42. La fosforilación en Ser32/36 promueve la ubiquitinización del inhibidor y su degradación en el proteasoma 26S. Sin embargo, la fosforilación en Tyr42 separa el inhibidor sin su degradación inmediata en el proteasoma (Bui et al., 2001a; Takada et al., 2003). A diferencia de las otras vías, en la no-canónica, la proteína p100 es la que actúa como inhibidor, y su procesamiento en el proteasoma conduce a la formación del producto maduro p52.

Existen ciertas evidencias que permiten diferenciar las vías canónica y atípica basándose en el inicio de la degradación de la proteína I κ B α tras la

activación. Los cambios en los niveles endógenos de I κ B α durante la primera hora después de la activación de la vía canónica de NF- κ B, han demostrado la disminución de los niveles de I κ B α a los 30 min y una recuperación de los niveles una hora después (Brown et al., 1995; Traenckner et al., 1995). Este hecho se debe a la síntesis *de novo* de I κ B α por parte de la célula indicando que la expresión de I κ B α es uno de los primeros productos de la activación de esta vía (Gutierrez et al., 2005; Gutierrez et al., 2008a). En cambio, la activación de la vía atípica de NF- κ B no se relaciona con cambios en los niveles endógenos de I κ B α durante las tres primeras horas después de la activación de la vía. El análisis de los niveles endógenos de I κ B α en las MNs tratadas con NTFs demuestra una disminución importante de esta proteína a los 30 min, seguida de una recuperación de los niveles a los 60 min. De este modo, demostramos la activación de la vía canónica de NF- κ B. Para poder analizar los niveles de fosforilación de I κ B α en la Ser32/36, hemos usado el inhibidor de proteasoma MG-132 que nos permitió mantener los niveles de I κ B α constantes durante una hora. Los resultados obtenidos indicaron un aumento significativo de los niveles de fosforilación de Ser32/36 en las MNs tratadas con NTFs. Para descartar la intervención de la vía atípica realizamos el análisis de los niveles de fosforilación de I κ B α en la Tyr42. En los cultivos tratados y no tratados con NTFs no mostraron niveles detectables de fosforilación en este residuo. Existen evidencias en el SN que demuestran la activación de la vía atípica de NF- κ B en respuesta a NTFs como NGF y CNTF (Bui et al., 2001b; Gallagher et al., 2007a). Sin embargo, nuestros resultados indican activación de la vía canónica, pero no de la atípica, en respuesta de estimulación con NTFs.

Además de la degradación de I κ B α , existen varios pasos que son necesarios para la activación completa de la vía canónica de NF- κ B. Existen modificaciones post-transduccionales de RelA que modulan la actividad de NF- κ B. Por ejemplo, en otros modelos neuronales la fosforilación en la Ser536 de RelA por el complejo IKKs se relaciona con un aumento de la actividad de la vía (Yang et al., 2003; Jeong et al., 2005; Sasaki et al., 2005; Gutierrez et al., 2008a). El análisis de las MNs tratadas con NTFs mostró un aumento

importante en los niveles de fosforilación de RelA en Ser536, reforzando nuestra hipótesis sobre la activación de la vía canónica por los NTFs.

La vía no-canónica de NF- κ B está bien estudiada en el sistema inmune, pero su implicación en el SN es muy poco conocida (Puccetti and Grohmann, 2007; Vallabhapurapu and Karin, 2009). La activación de esta vía promueve la señalización donde está implicada únicamente la quinasa IKK α del complejo IKKs. La fosforilación de IKK α provoca el corte de p100 a p52 (Xiao et al., 2004). Una vez maduro p52 dimeriza con RelB formando el complejo RelB/p52, entra en el núcleo donde promueve la inducción de genes, selectivamente controlados por RelB (Bonizzi et al., 2004). En las MNs, tras una estimulación con NTFs hemos observado el corte de p100 a p52 indicando la activación de la vía no-canónica. En las MNs no tratadas no han sido observado niveles detectables de p52, indicando la activación de la vía no-canónica a través de los NTFs.

Todas estas observaciones nos permitan concluir que en las MNs en desarrollo, el cóctel de NTFs promueve la activación de la vía canónica y no-canónica de NF- κ B.

El bloqueo de la vía NF- κ B causa la muerte de las MNs

Los primeros indicios de que la activación de NF- κ B promueve la supervivencia de las neuronas, provienen de los estudios sobre el desarrollo embrionario de las células del hipocampo (Mattson et al., 1997). Un año después, otros estudios demostraron que la actividad de NF- κ B promueve la supervivencia de las neuronas sensoriales de forma dependiente de NGF (Maggirwar et al., 1998a). En los últimos años se han mostrado diversas evidencias indicando a la vía NF- κ B como regulador de la supervivencia celular, tanto en el SNC como en el SNP (revisado en (Mémet, 2006)). En el presente estudio hemos demostrado por primera vez que la vía NF- κ B es una de las vías principales que controlan la supervivencia de las MNs espinales en un modelo de desarrollo. Análisis de la supervivencia de las MNs tratadas con un inhibidor específico de la vía NF- κ B (SN50), mostraron un aumento significativo de la muerte celular en presencia de NTFs. Por otro lado, la activación de la vía NF- κ B también ha sido relacionada con otras funciones de

las neuronas durante su desarrollo. Un ejemplo de ello es la implicación de la vía sobre el crecimiento neurítico (Gallagher et al., 2007b; Gutierrez et al., 2008b). Estos efectos sobre la supervivencia y diferenciación sugieren una implicación importante de esta vía durante el desarrollo embrionario. Puesto que nuestros resultados preliminares, junto con otras referencias en la literatura (revisado en (Mémet, 2006)) demostraban una regulación de la muerte de las MNs a través de la vía NF- κ B, decidimos profundizar en el estudio analizando la implicación de los diferentes componentes de la vía en la supervivencia de las MNs.

La inhibición de la vía canónica de NF- κ B causa apoptosis en las MNs en presencia de NTFs

Los cinco miembros de la familia NF- κ B en base a su estructura y función, se pueden dividir en dos clases. La primera clase, incluye las proteínas RelA, RelB y c-Rel, que se producen como producto maduro y contienen un dominio de regulación de la transcripción génica. La segunda clase, a la que pertenecen las subunidades p100 y p105, necesitan un procesamiento proteolítico para formar los productos maduros, p52 y p50 (revisado en (Hayden and Ghosh, 2004)). Los miembros de este grupo no pueden activar la transcripción génica, debido a la falta del dominio TAD en su estructura. Las proteínas de las dos clases pueden formar entre ellos homo o heterodímeros, RelA y c-Rel tiene mayor afinidad de unión con p50 y RelB con p52. Sin embargo, en ausencia de estímulos, la modificación génica inducida por la vía NF- κ B está reprimida a través de la unión de los homodímeros p50/p50 y p52/p52 en el motivo κ B de DNA (Zhong et al., 2002). Puesto que en las MNs los NTFs activan la vía canónica y la no-canónica, decidimos analizar cual de las dos vías esta mediando la supervivencia de las MNs en estas condiciones. Por ello establecimos un sistema lentiviral para la expresión de shRNA contra las proteínas IKK α , IKK β RelA y RelB, para bloquear la vía canónica y la no-canónica.

Los análisis de supervivencia de las MNs *knockdown* para IKK α , IKK β o RelA demostraron una reducción significativa de las células que se mantenían vivas a lo largo del tiempo en cultivo. A los 6 días en estas condiciones, los

niveles de supervivencia de estas células eran entre 10-15%, mientras que los controles mantenían el porcentaje de supervivencia cerca del 80%. Cuando analizamos los parámetros indicadores de muerte apoptótica (niveles de caspasa 3 activa y el porcentaje de núcleos con morfología apoptótica) observamos una elevación de los mismos en las MNs *knockdown* para IKK α , IKK β o RelA, demostrando la muerte apoptótica de estas neuronas. De acuerdo con nuestras observaciones, otros estudios realizados con ratones *knockout* para IKK α e IKK β o RelA mostraron la implicación de la vía canónica de NF- κ B en el control de la apoptosis durante el desarrollo del SN. Los ratones *knockout* para IKK α e IKK β muestran incrementos en la muerte por apoptosis en la médula espinal y los DRGs durante el desarrollo (Li et al., 2000). Estos autores postulan que ambas IKKs podrían tener una redundancia genética durante el desarrollo del SN. Además, estudios realizados con ratones *knockout* para RelA, demostraron una muerte progresiva de las neuronas sensoriales entre E12 y E14, debido a su incapacidad para responder a CNTF (Middleton et al., 2000). Los ratones doble knockout para IKK α e IKK β y los ratones *knockout* para RelA, mueren en estado embrionario E12-E16, este hecho sugiere un papel principal de la vía canónica de NF- κ B, no solamente en el control de la muerte durante el desarrollo del SN, si no también en los procesos fisiológicos durante la embriogénesis (Beg et al., 1995b).

El bloqueo de la vía canónica de NF- κ B induce la apoptosis de las MNs. Los niveles de apoptosis en estas condiciones experimentales son similares a los niveles observados en las MNs deprivadas de NTFs. Estas observaciones nos llevan a proponer que la activación de la vía canónica es uno de los mecanismos moleculares mediadores de la supervivencia de las MNs inducida por los NTFs. Aunque los NTFs promueven la activación de las ambas vías la canónica y la no canónica, únicamente la vía canónica está implicada en la supervivencia de las MNs. Los resultados de supervivencia de las MNs transducidas con shRNA para RelB no mostraron cambios significativos respecto a los controles. Estas diferencias observadas entre las dos vías en respuesta del mismo estímulo (NTFs), puede ser debida a la afinidad específica de cada una de ellas sobre el control de la expresión génica (Bonizzi et al., 2004). Los ratones deficientes en las distintas subunidades de la familia NF- κ B,

muestran fenotipos diferentes. Estas diferencias se deben en gran parte a la expresión de genes diana distintos regulados por dímeros determinados (Hoffmann et al., 2003). Sin embargo, los ratones *knockout* para RelB no muestran defectos en su desarrollo embrionario (Weih et al., 1995). Estos datos junto con nuestras observaciones apoyan la hipótesis sobre el control que ejerce en la supervivencia de las MNs en desarrollo la vía canónica de NF- κ B. Adicionalmente, también podemos descartar que el efecto de IKK α en nuestro modelo esté relacionado con su participación en la vía canónica de NF- κ B.

Aunque la supervivencia de las MNs inducida por los NTFs a través de la activación de la vía NF- κ B depende de tanto de IKK α como de IKK β , ciertas evidencias proponen la implicación distinta de las dos quinasas en la activación de la vía canónica (Anest et al., 2003; Israël, 2003; Huang et al., 2007b). Estudios realizados por Li y colaboradores, demostraron que IKK β es la quinasa predominante en la activación de la vía canónica, mientras que IKK α tiene un efecto parcial sobre su activación (Li et al., 1999c). Nuestros resultados demuestran claramente la implicación de las dos quinasas en la supervivencia de las MNs. Sin embargo, la disminución a los niveles de IKK α o IKK β no tiene el mismo efecto sobre la translocación nuclear de RelA. Las MNs *knockdown* para IKK α mostraron niveles más elevados de RelA en el núcleo (65%), comparado con las MNs *knockdown* para IKK β (25%). Se han publicado resultados parecidos en la línea celular MEF, donde la inhibición de IKK β bloquea totalmente la localización nuclear de RelA en respuesta a la estimulación con TNF α , mientras que el bloqueo de la expresión de IKK α afecta parcialmente esta localización (Huang et al., 2007b). Las diferencias entre las IKK α e IKK β en la activación de la vía posiblemente son debidas a la distribución distinta de estas quinasas en la célula. Se ha descrito que IKK β esta localizada exclusivamente en el citosol, mientras que IKK α está distribuida tanto en el citosol como en el núcleo (Yamamoto et al., 2003). La localización de IKK α en el núcleo tiene un efecto adicional en la activación de NF- κ B, y es un efecto distinto al de su acción sobre la fosforilación de I κ B α . La función de IKK α en el núcleo está relacionada con la fosforilación de CBP que favorece su unión con RelA promoviendo la transcripción génica en respuesta a las citoquinas (Huang et al., 2007a). Además, la reducción de la interacción de

RelA con CBP ha sido relacionada con la apoptosis neuronal debida al bloqueo de la vía NF- κ B (Yalcin et al., 2003)

La activación de vía NF- κ B mediada por la fosforilación de las IKK α e IKK β depende de la activación de PI3-K/Akt

En el presente estudio se demuestra que en la fosforilación de las IKKs inducida por los NTFs participa la vía PI3-K/Akt. Los miembros de distintas familias de NTFs son capaces de activar esta vía, entre ellos están: GDNF (Gould et al., 2008), BDNF (Cheng et al., 2003; Nguyen et al., 2009) y CNTF (Dolcet et al., 2001b). Bajo el control de la vía PI3-K/Akt se encuentran diferentes factores de transcripción como CREB, FOXO3a y NF- κ B (Rodgers and Theibert, 2002). La desregulación en la activación de esta vía se ha relacionado con enfermedades neurodegenerativas, entre las cuales está la ELA. Los ratones transgénicos modelo de la ELA, han demostrado una disminución en la activación de Akt relacionada con el incremento de la apoptosis en la médula espinal (Warita et al., 2001). Por otro lado, la activación de Akt a través de PI3-K, ha sido asociada a la supervivencia neuronal a través de la activación de RelA (Madrid et al., 2000). Usando el inhibidor farmacológico de PI3-K (LY294002) hemos determinado la implicación de la vía PI3-K/Akt en la activación de NF- κ B. Los resultados obtenidos indicaron una disminución en la inducción de la fosforilación del complejo IKKs por NTFs. Esto sugiere una interacción entre la activación de las IKKs y la activación de la vía PI3-K/Akt. En base a estas observaciones hemos propuesto que en las MNs en desarrollo la vía PI3-K/Akt es una de las vías inductoras de la activación de la vía NF- κ B en respuesta de estimulación con NTFs.

En resumen, nuestras observaciones nos permiten concluir que la supervivencia de las MNs inducida por los NTFs depende de la vía canónica de NF- κ B a través de la vía PI3-K/Akt. En el citosol, la activación de la vía PI3-K/Akt, provoca la fosforilación de las quinasas IKK α e IKK β . Una vez activas, las IKKs promueven la fosforilación del I κ B α , su separación del dímero NF- κ B (RelA/p50) y su degradación en el proteasoma. Una vez liberado del inhibidor, el dímero se transloca al núcleo promoviendo la activación de varios genes

entre los cuales está I κ B α . Por otro lado la activación de la vía no-canónica por los NTFs no está relacionada con la supervivencia de las MNs en desarrollo (Figura 61).

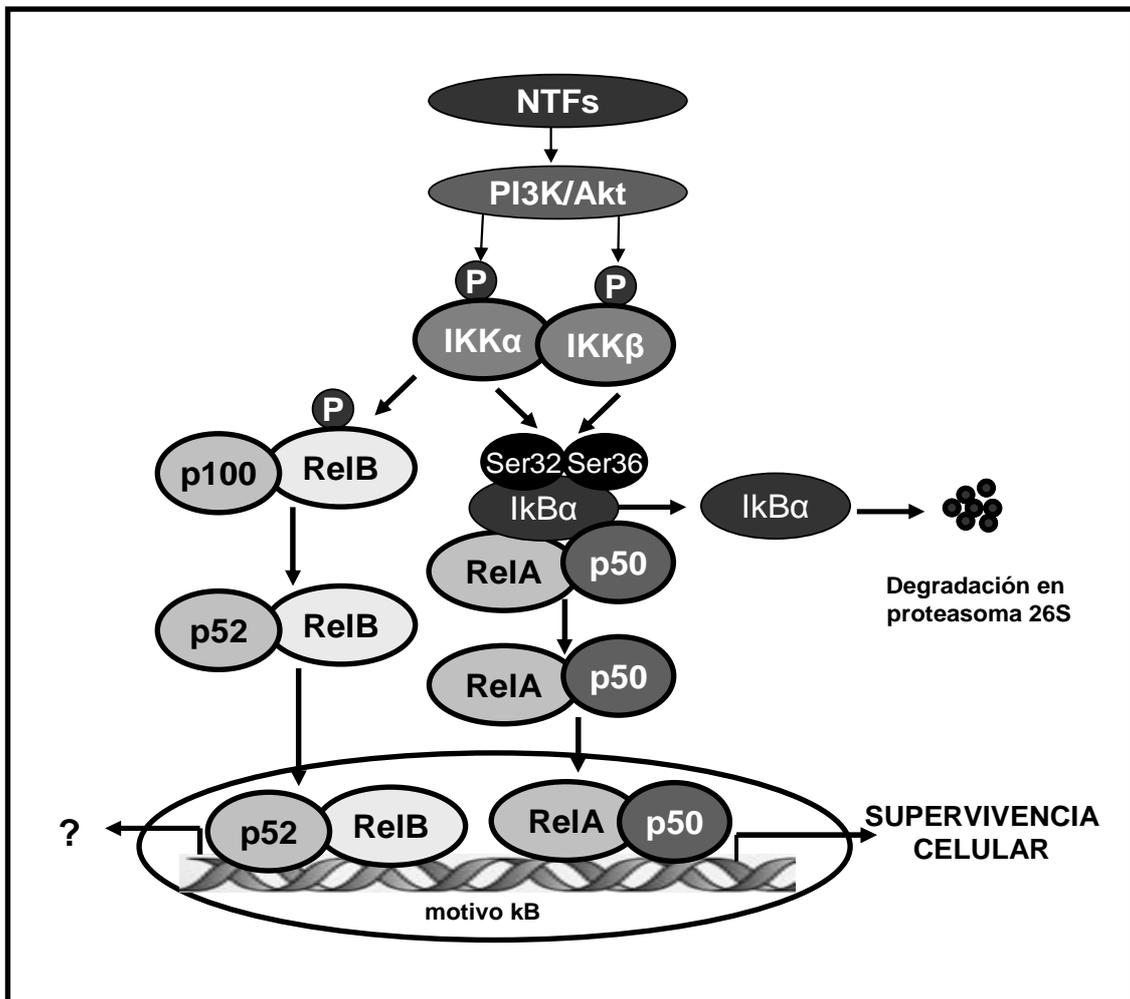


Figura 61. Esquema propuesto de la activación de la vía NF- κ B en las MNs mediante NTFs.

La inhibición de la vía canónica de NF- κ B induce un aumento en los niveles endógenos de la proteína Bim

La implicación de la vía NF- κ B en el control de la apoptosis, esta relacionada con la inducción de los genes diana cuyo producto inhibe algunos aspectos de la maquinaria apoptótica. En varios estudios la activación de esta vía ha sido asociada con el control de la muerte celular a través de la regulación génica de las proteínas pro- y anti-apoptóticas: Bax, Bim, Noxa, Puma, Bcl-x_L, Bcl-2, etc. (Tamatani et al., 1999; Baron-Delage et al.; Bui et al.,

2001a; Shou et al., 2002; Inta et al., 2006). Durante la apoptosis de las neuronas inducida por la deprivación trófica, aumenta la expresión de las proteínas Bax y Bim, y disminuye la expresión de Bcl-x_L. Los niveles de otras proteínas de la familia Bcl-2 se mantienen constantes en estas condiciones (Bad, Bid, Bak, Bcl-2) (Putchá et al., 2002). En base a estas observaciones, analizamos los niveles de las proteínas Bcl-x_L, Bax y Bim en las MNs *knockdown* para IKK α , IKK β y RelA. Durante el desarrollo del SNC la proteína con mayor importancia en el control de la apoptosis es Bcl-x_L (Motoyama et al., 1995). Estudios realizados con líneas celulares (SH-SY5Y y PC12), así como con cultivos primarios (neuronas del hipocampo), han demostrado que la estimulación con NGF o TNF α aumenta la expresión de Bcl-x_L a través de la activación de la vía NF- κ B (Bui et al., 2001). En las MNs, los NTFs también aumentan la expresión de Bcl-x_L. Análisis de estas células tratadas con estos factores demostraron una inducción en la expresión de la proteína Bcl-x_L. Sin embargo, los niveles de la proteína Bcl-x_L en las MNs *knockdown* para IKK α , IKK β o RelA no mostraron cambios significativos, indicando que en nuestro sistema NF- κ B no modula la expresión génica de Bcl-x_L. De acuerdo con nuestros resultados, estudios realizados por Gozzelino y colaboradores, demostraron previamente que la expresión de Bcl-x_L no depende de la activación de la vía NF- κ B (Gozzelino et al., 2008). Por otro lado, existen datos demostrando que las tres formas de activación de la vía NF- κ B no tienen la misma importancia en la regulación de la expresión de Bcl-x_L. Se ha demostrado en neuronas del hipocampo, que la vía atípica, pero no la vía canónica, en respuesta a NGF aumenta la expresión de la proteína Bcl-x_L (Bui et al. 2001). Puesto que en nuestro modelo los NTFs no son capaces de activar la vía atípica, sugiere que la expresión de Bcl-x_L en las MNs no depende de la activación de la vía canónica de NF- κ B. Además otros trabajos realizados en el grupo de Pizzi y colaboradores, propusieron la implicación de distintos dímeros NF- κ B en el control de la expresión génica de Bcl-x_L. Los autores describen en neuronas corticales expuestas a isquemia o A β , que la expresión de Bcl-x_L depende de la translocación de c-Rel, pero no de RelA (Pizzi et al., 2002; Pizzi et al., 2005).

En nuestro modelo hemos observado que el bloqueo de la vía canónica de NF- κ B disminuye la supervivencia hasta niveles parecidos a los observados en las MNs deprivadas de NTFs. Está ampliamente descrito que la deprivación trófica causa muerte apoptótica aumentando la expresión de las proteínas pro-apoptóticas Bim y Bax (Putcha et al., 2002). En modelos de neuronas corticales estas proteínas se postulan como genes diana de NF- κ B (Shou et al., 2002). En este contexto analizamos en las MNs *knockdown* para IKK β o RelA cuales eran los niveles de expresión de estas proteínas. Las MNs en estas condiciones mostraron cambios significativos en los niveles endógenos de la proteína Bim, pero en los niveles de Bax. La función de la proteína Bim en la apoptosis está relacionada con su habilidad de desplazar a Bcl-x_L de la membrana mitocondrial, y promover la translocación de Bax desde el retículo hasta la mitocondria (Zhang et al., 2008). Estudios realizados por Green y colaboradores, demostraron que Bax promueve la apoptosis a través de cambios en su conformación sin que esto implique cambios en sus niveles de expresión (Green and Chipuk, 2008). En este sentido y tras un estímulo apoptótico, Bim provocaría estos cambios en la conformación de Bax que permiten su translocación a la membrana mitocondrial y su oligomerización (Putcha et al., 2001; Er et al., 2006). Esta oligomerización de Bax causa la formación de poros induciendo la salida de citocromo C al citosol, desencadenando los mecanismos moleculares relacionados con la vía intrínseca de apoptosis (revisado en (Westphal et al., 2010)). La proteína pro-apoptótica Bim participa en la neurodegeneración, por ejemplo, el aumento de su expresión ha sido observado en neuronas hipocámpales y corticales en un modelo de rata de la enfermedad de Alzheimer (Biswas et al., 2007) y en neuronas estriatales en un modelo de ratón de la enfermedad de Huntington (García-Martínez et al., 2007; Kong et al., 2009).

En la modulación de la función pro- y anti-apoptótica de la vía NF- κ B existe un control regulable que depende de los activadores de la vía y los dímeros NF- κ B. Por ejemplo, en el modelo de los NTFs la activación de NF- κ B en neuronas provoca supervivencia, mientras que su inducción en condiciones patológicas promueve muerte en las neuronas y supervivencia en las células gliales (revisado en (Mattson and Meffert, 2006)). Por otro lado, la variación en

el “motivo κ B” confiere especificidad para los distintos miembros de la familia NF- κ B. Esto implica la participación determinada de genes específicos controlados por los distintos dímero (Leung et al., 2004). En el modelo de isquemia de las neuronas corticales, la activación de RelA promueve la apoptosis a través de la estimulación de la expresión de Bim y Noxa, mientras que la activación de c-Rel en estas condiciones promueve la expresión de Bcl-x_L confiriendo un efecto neuroprotector (Inta et al.; Pizzi et al., 2002; Inta et al., 2006).

La sobre-expresión de Bcl-x_L o la inhibición de Bax protege a las MNs de la muerte inducida por la falta de las proteínas IKK α , IKK β y RelA

En respuesta a varios estímulos apoptóticos, se observan cambios en la expresión e interacción entre las proteínas pro- y anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 en la activación de la vía intrínseca de la apoptosis (Willis et al., 2007). Se ha descrito que tanto la sobre-expresión de Bcl-x_L, como la inhibición de Bax, promueve la supervivencia de las neuronas en ausencia de NTFs (Deshmukh and Johnson, 1998). Sin embargo, en la activación de la apoptosis inducida por Bim parece ser que podrían intervenir otras proteínas BH3-*only*, ya que la delección de Bim, no es capaz de proteger a las neuronas de este proceso (Putchá et al., 2002). En el presente trabajo demostramos que tanto la sobre-expresión de Bcl-x_L como la inhibición de Bax, rescatan a las MNs de la muerte inducida por el bloqueo de la vía canónica de NF- κ B.

En nuestro modelo, demostramos que tanto la deprivación trófica, como el bloqueo de la vía canónica aumentan la activación de caspasa 3. En el control de la apoptosis que tiene lugar durante el desarrollo del SNC, la proteína Bcl-x_L se ha propuesto como uno de sus inhibidores en base a su capacidad de bloquear la activación de caspasa 3 (Fujita et al., 2000). Los ratones deficientes de Bcl-x_L muestran una muerte apoptótica masiva en neuronas inmaduras durante el desarrollo del SN (Motoyama et al., 1995). En nuestro modelo la sobre-expresión de Bcl-x_L en las MNs *knockdown* para IKK α , IKK β o RelA, rescata significativamente a estas células de la muerte inducida por la inhibición de estas proteínas. Hemos observado que la sobre-expresión de Bcl-x_L en las MNs *knockdown* para IKK α o IKK β rescata de la muerte

aproximadamente el 100% de las neuronas que normalmente morirían, sin embargo, Bcl-x_L en las MNs *knockdown* para RelA, Bcl-x_L no rescató más del 50% de las neuronas que normalmente morirían. Por otro lado, los resultados obtenidos de la inhibición del Bax en las MNs *knockdown* para IKK β o RelA mostraron la misma tendencia. Estas observaciones sugieren que la muerte inducida por la disminución de las proteínas IKK α o IKK β puede ser totalmente rescatada por la sobre-expresión de Bcl-x_L, sin embargo, cuando se inhibe RelA puede indicar la presencia de otra/s proteína/s relacionada/s con esta vía y que no son reguladas por Bcl-x_L (por ejemplo, Noxa).

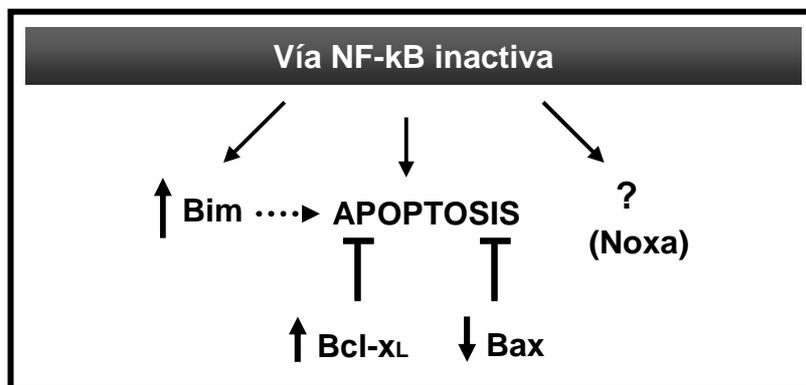


Figura 62. Esquema propuesto del control de la vía NF- κ B en la apoptosis de las MNs.

La inhibición de la vía canónica de NF- κ B en las MNs afecta la expresión de las proteínas Smn y CREB

Nuestros resultados, junto con otras observaciones (revisado en (Mémet, 2006)) demuestran que durante el desarrollo del SNC la activación de la vía NF- κ B a través de los NTFs, protege a las neuronas de la apoptosis. Por otro lado, la activación de la vía NF- κ B ha sido relacionada con el control de los procesos fisiológicos como plasticidad sináptica, memoria, y crecimiento neurítico y mielinización en el SNP (Meffert et al., 2003; Gallagher et al., 2007; Gutierrez et al., 2008; Yoon et al., 2008). Estas evidencias sugieren la importancia de la vía en los diversos procesos del SN en desarrollo y en el adulto. Sin embargo, existen efectos opuestos de la vía NF- κ B en la patología neuronal. Su función neuroprotectora o neurodegenerativa depende del tipo de estímulo y su duración, así como de los dímeros NF- κ B y del tipo celular en el

cual se activa la vía (Kaltschmidt et al., 2002; Pizzi et al., 2002; Mémet, 2006); (revisado en (Mattson and Meffert, 2006b)). Estudios recientes indican la participación de IKK β en la patogénesis de Huntington, sugiriendo la implicación directa de NF- κ B en las enfermedades neurodegenerativas (Khoshnan et al., 2004; Khoshnan et al., 2009). La vía NF- κ B ha sido relacionada también con patologías de las MNs. En los pacientes con ELA, se ha detectado la activación de la vía NF- κ B en los astrocitos de la médula espinal (Migheli et al., 1997; Pyo et al., 2010). Sin embargo, en las MNs de estos pacientes no muestran activación de la misma. Nuestros resultados indican que la activación de NF- κ B en las MNs tiene un efecto protector, mientras que su inhibición produce un efecto de muerte.

En el presente estudio, se demuestra por primera vez que el bloqueo de la vía canónica de NF- κ B afecta la expresión de la proteína Smn. Los análisis de los niveles de proteína Smn en las MNs *knockdown* para RelA, mostraron una disminución significativa de los niveles de esta proteína cuando comparábamos con el control. La reducción de la proteína Smn es la causa principal de la enfermedad neurodegenerativa motora Atrofia Muscular Espinal (AME). Esta enfermedad afecta a las MNs de las astas ventrales de la médula espinal y su gravedad depende de la cantidad de la proteína Smn presente en las células (revisado en (Sumner, 2007)). Nuestras observaciones demuestran una disminución del 65% de los niveles de la proteína FL-Smn en las MNs *knockdown* para RelA. Niveles similares de la proteína Smn han sido detectados en distintos modelos *in vitro* de AME (Acsadi et al., 2009; Garcera et al., 2011). En el control transcripcional de SMN participan varios factores de transcripción, siendo uno de ellos CREB (Majumder et al., 2004b). Estudios realizados por Majumder y colaboradores describieron la implicación de CREB en la regulación molecular de los niveles de Smn. Utilizando ratones mutantes SMN1^{-/-} /SMN2^{+/+} en los que se sobre-expresó CREB, se detectó un aumento de la expresión de FL-Smn, debido al incremento de la actividad transcripcional del promotor del SMN (Majumder et al., 2004b). La función del factor de transcripción CREB está implicado en la regulación de la supervivencia, la plasticidad sináptica y el crecimiento neurítico durante el desarrollo del SNC (Walton and Dragunow, 2000). Por otro lado, también se ha relacionado con

patologías neurodegenerativas: en las neuronas del núcleo estriado del ratón modelo de Huntington hay una pérdida de la función de CREB (Choi et al., 2009). En las MNs *knockdown* para RelA, los análisis de los niveles de proteína CREB y sus niveles de fosforilación indican una disminución significativa de ambos parámetros. Estas observaciones sugieren que la estimulación de la vía canónica de NF- κ B por los NTFs puede modular la expresión de las proteínas CREB y Smn (Figura 63). La disminución de la proteína Smn se ha asociado a la patología de estas neuronas.

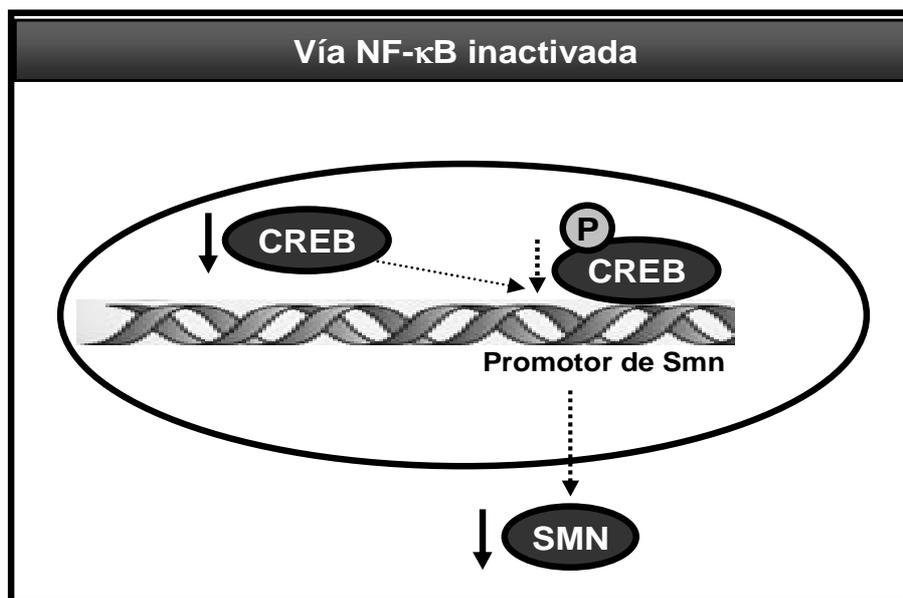


Figura 63. Esquema propuesto de la interacción entre la vía NF- κ B y los niveles de proteína Smn y CREB.

Como conclusión general, nuestros resultados indican que la vía canónica de NF- κ B controla la supervivencia de las MNs en desarrollo mediada por los NTFs y modula la expresión de proteínas relacionadas con la patología de las neuronas y, particularmente de las MNs.

Establecimiento de un modelo *in vitro* de AME

La AME es una enfermedad neurodegenerativa hereditaria, que se caracteriza por la degeneración y la consecuente desaparición de las MNs de las astas ventrales de la médula espinal. La principal causa por la cual la disminución a los niveles de Smn afecta básicamente a las MNs, aun es

desconocida. En nuestro grupo hemos desarrollado un modelo *in vitro* de AME utilizando un cultivo primario de MNs procedentes de embriones de ratón, para poder analizar los mecanismos moleculares y fisiológicos inducidos por la disminución a los niveles de Smn.

Aunque existan varios modelos de ratón de AME (Monani et al., 2000; Jablonka et al., 2006), el número limitado de MNs obtenidas por cada mutante, no es suficiente para diferentes análisis bioquímicos y moleculares. Por este motivo hemos decidido establecer un modelo *in vitro* usando un sistema lentiviral mediante shRNA, para disminuir los niveles endógenos de la proteína SMN. Durante el establecimiento del modelo fueron determinados: la habilidad de la transducción con lentivirus de mantener los niveles bajos de Smn durante un período largo de tiempo (12 días), y sus efectos sobre la degeneración neurítica y la supervivencia neuronal. Los análisis mostraron alteraciones en las prolongaciones neuríticas a los 9 días de la interferencia y finalmente observábamos muerte celular 3 días después (12 días después de la interferencia). Estos resultados demostraron la inducción de la degeneración de las MNs en respuesta a la reducción de los niveles de Smn. Los defectos en los neuritas observados en nuestro modelo, caracterizados como “swelling” y “blebbing”, han sido descritos previamente en pacientes de AME y en modelos murinos, sugiriendo la implicación de estas alteraciones neuríticas en la patogénesis de la enfermedad (McGovern et al., 2008b; Burghes and Beattie, 2009). Estas evidencias permiten proponer a estas alteraciones como una posible diana terapéutica para prevenir y tratar a los enfermos de AME. Sin embargo, estudios realizados en diferentes modelos de AME mostraron cambios en el crecimiento neurítico, pero no en la supervivencia de las MNs (Monani et al., 2000; Jablonka et al., 2006). Aunque estos resultados parecen contradictorios con los nuestros, los autores de estos otros trabajos han analizado los cambios en los niveles de la supervivencia neuronal al día 5 y al día 7 en cultivo. Nuestros resultados tampoco muestran cambios en la supervivencia a estos días. Los cambios significativos se han mostrado a los 9 días, aunque la diferencia mas clara se produce 12 días después de la transducción. Por tanto nuestra conclusión frente a este conjunto de informaciones es que la reducción de Smn a largo plazo produce la muerte de las MNs *in vitro*.

La sobre-expresión de Bcl-x_L protege a las MNs de la degeneración neurítica y de la muerte inducidas por la disminución a los niveles de Smn

Para poder obtener una terapia eficaz de AME se han empleado varias estrategias con el fin de aumentar el nivel de la proteína Smn (Zhang et al 2001; Ting et al., 2007). Sin embargo, existen otras proteínas o fármacos capaces de modificar el fenotipo de la AME sin cambiar significativamente los niveles intracelulares de Smn (Haddad et al., 2003). Por otro lado, debido a que un amplio grupo de proteínas interactúan con SMN (Tabla 7) éstas podrían modificar el fenotipo de AME. Una de ellas es la proteína anti-apoptótica Bcl-2 (Sato et al., 2000). Se sabe que la sobre-expresión de Bcl-2 rescata de la muerte neuronal postnatal. Existe una alta homología entre ella y la proteína Bcl-x_L de la que se ha demostrado que es la responsable de la supervivencia de las neuronas durante el desarrollo embrionario. Puesto que los ratones *knockout* para Smn se mueren *in utero*, este hecho nos podría indicar la implicación de esta proteína en los procesos que afectan a las MNs durante el desarrollo embrionario. De este modo nos propusimos analizar el efecto de la sobre-expresión de la proteína Bcl-x_L en las MNs *knockdown* para Smn. Como hemos demostrado en la primera parte del presente estudio, la expresión de Bcl-x_L depende de los NTFs. En distintos trabajos se ha demostrado que la ausencia de los factores CT-1 o CNTF agravan el fenotipo de la enfermedad (Lesbordes et al., 2003; Simon et al., 2010). Estos resultados sugieren la implicación de los NTFs pueden estar implicados en la fisiopatología de esta enfermedad.

La función neuroprotectora de la proteína Bcl-x_L también ha sido descrita en modelos murinos de ELA y de axotomía (Garrity-Moses et al., 2005; Parsadanian 1998). Nuestros resultados muestran que Bcl-x_L es capaz de rescatar el fenotipo de AME sin afectar los niveles de proteína Smn. Sobre-expresando Bcl-x_L en las MNs *knockdown* para Smn, hemos observado una disminución significativa de la degeneración y la muerte de las neuronas. Resultados similares han sido observados en otros estudios donde también se ha demostrado el efecto beneficioso de la proteína Bcl-x_L en un modelo *in vivo* de AME (Tsai et al. 2008). Por lo tanto, los aspectos relacionados con la terapéutica de AME deben tener en cuenta no solamente los mecanismo

relacionados con el aumento de la proteína Smn, sino también estos mecanismos de protección relacionados con proteínas que afectan de forma directa la supervivencia de las MNs.

La expresión de la proteína Bcl-x_L inhibe la activación de caspasa 3 y promueve la supervivencia de las neuronas post-mitóticas (Fujita et al., 2000). Por otro lado, las alteraciones en la función de las mitocondrias es el evento crítico que promueve la activación de caspasas. Los análisis de la muerte neuronal en nuestro modelo *in vitro* de AME no demostraron activación de caspasa 3, ni aumento del número de núcleos con la morfología de apoptosis (datos no presentados). Por lo cual proponemos el estudio de otros tipos de PCD distintos a la apoptosis clásica, como la autofagia, en las MNs con los niveles bajos de Smn. Existen datos en la bibliografía que relacionan el efecto beneficioso de Bcl-x_L en la supervivencia de las neuronas bloqueando a la vez la apoptosis y la autofagia (Zhou et al., 2011).

En el presente estudio demostramos, por un lado, que el fenotipo de AME puede ser revertido, sin cambiar los niveles de expresión de Smn, a través de sobre-expresión de Bcl-x_L, y por otro lado, proponemos a la vía NF- κ B como una posible diana terapéutica en la AME a través de la modulación de la expresión de Smn.

CONCLUSIONES

1. La estimulación con el cóctel de NTFs activa la vía canónica y la no-canónica de NF- κ B en las MNs.
2. La vía PI3-K/Akt modula la activación de la vía NF- κ B en respuesta a los NTFs.
3. La translocación de RelA depende completamente de IKK β y parcialmente de IKK α .
4. La activación de la vía canónica, pero no la de la no-canónica, induce la supervivencia de las MNs.
5. La inhibición de la vía canónica de NF- κ B causa muerte apoptótica en presencia de NTFs.
6. La sobre-expresión de Bcl-x_L y la inhibición de Bax protegen a las MNs de la muerte inducida por el bloqueo de la vía canónica de NF- κ B.
7. La vía NF- κ B modula la expresión de las proteínas Bim, CREB y Smn en las MNs.
8. La disminución de los niveles de Smn induce degeneración neurítica y muerte de las MNs en un modelo *in vitro* de AME.
9. La sobre-expresión de Bcl-x_L rescata el fenotipo observado en las MNs, modelo *in vitro* de AME, sin modular la expresión de Smn.

PUBLICACIONES
Y
CONGRESOS

1. PUBLICACIONES

Stefka Mincheva, Ana Garcera*, Myriam Gou-Fabregas*, Mario Encinas, Xavier Dolcet, and Rosa M Soler; Canonical nuclear factor-kappa B pathway regulates cell survival in a developmental model of spinal cord motoneurons (2011) *Journal of Neuroscience*, DOI:10.1523/JNeurosci.0206-11.2011

Ana Garcera; **Stefka Mincheva***; Myriam Gou-Fabregas* Victor Caraballo-Miralles; Jerònia Lladó; Joan X Comella and R. Soler; A new model to study Spinal Muscular Atrophy: neurite degeneration and cell death is counteracted by Bcl-xL overexpesion in motoneurons; (2011) *Neurobiology of Disease*, DOI: 10.1016/j.nbd.2011.02.003

Gou-Fabregas, M., A. Garcera, **S. Mincheva**, M. Perez-Garcia, J. Comella & R. Soler; Specific vulnerability of mouse spinal cord motoneurons to membrane depolarization. (2009) *Journal of Neurochem*, 110, 1842-54.

2. CONGRESOS

Congreso: Proceedings of 4th International Workshop “Biological Effects of EMFs”

Autores: M. Kouzmanova, Atanasova G, Atanasov N, **Tasheva S**

Título: Alterations in hemolysis after *in vitro* exposure of human erythrocytes to GSM900 electromagnetic field *p.* 96 – 101,

Tipo de participación: Oral

Lugar y fecha de celebración: Crete, Greece 2006

Congreso: XXX Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular

Autores: **S. Mincheva Tasheva**, Garcerá A, Gou-Fábregas M, Comella JX, Soler RM.

Título: Atrofia muscular espinal: desarrollo de un modelo *in vitro* para el estudio de las funciones de la proteína Smn, T14-19 pag. 188

Tipo de participación: Póster

Lugar y fecha de celebración: Málaga; 2007

Congreso: XXX Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular

Autores: M Gou-Fábregas, Garcerá A, **Mincheva Tasheva S**, Soler RM. *Título:* Implicación de mecanismo excitotóxicos en la muerte de motoneuronas espinales, T14-14 pag. 187

Tipo de participación: Póster

Lugar y fecha de celebración: Málaga; 2007.

Congreso: International symposium on rare disease. Inherited neuromuscular diseases: Translation from pathomechanisms to therapies

Autores: A. Garcerá¹, M. Gou-Fábregas¹, **S. Mincheva Tasheva**¹, J. X. Comella² and R. M. Soler¹.

Título: Effect of Smn knockdown in motoneuron survival

Tipo de participación: Póster

Lugar y fecha de celebración: Valencia, 2008

Congreso: First PhD students symposium: Architecture of life

Autores: **S. Mincheva Tasheva**, Gou-Fábregas M, Garcerá A and Soler RM

Título: Role of NF-κB pathway on developmental motoneuron survival

Tipo de participación: Póster

Lugar de celebración: Barcelona, 2009

Congreso: First PhD students symposium: Architecture of life

Autores: Gou-Fábregas M, Garcerá A, **Mincheva S** and Soler R M

Título: Specific vulnerability of mouse spinal motoneurons to membrane depolarization

Tipo de participación: Póster

Lugar de celebración: Barcelona 2009

Congreso: 7th Forum of European neuroscience.

Autores: **S. Mincheva-Tasheva**, M. Gou-Fábregas, A. Garcerá and R. M. Soler.

Título: Implication of canonical NF-κB pathway in the survival on developmental motoneurons, pag. 152,102.8.

Tipo de participación: Póster

Lugar y fecha de celebración Ámsterdam, 2010.

Congreso: 7th Forum of European neuroscience

Autores: M. Gou-Fábregas, Garcerá A, **Mincheva, S**, Comella JX, and Soler RM.

Título: Calcium influx through voltage-gated calcium channels and calpain activation leads to spinal motoneuron cell death, pag. 152,102.5.

Tipo de participación: Póster

Lugar y fecha de celebración: Ámsterdam, 2010.

Congreso: 7th Forum of European neuroscience

Autores: Garcerá A, Gou Fábregas M, **Mincheva-Tasheva S** and. Soler RM

Título: Survival motoneuron proteina knockdown in a motoneuron culture model induces changes in neurite morphology, pag. 189, 136.9.

Tipo de participación: Póster

Lugar de celebración Ámsterdam 2010.

Congreso: VIII Simposi de Neurobiologia Experimental

Autores: **S. Mincheva-Tasheva** , M. Gou-Fábregas, A. Garcerá and R. M. Soler

Título: Papel de la vía NF-kB en la supervivencia de las motoneuronas mediada por los factores neurotróficos

Tipo de participación: Oral

Lugar y fecha de celebración Barcelona, 2010.

Congreso: VIII Simposi de Neurobiologia Experimental

Autores: Garcerá A, Gou Fábregas M, **Mincheva-Tasheva S** and. Soler RM

Título: La sobreexpresión de Bcl-xL evita la degradación neurítica y la mortalidad celular en un modelo in vitro de la Atrofia Muscular Espinal

Tipo de participación: Oral

Lugar y fecha de celebración Barcelona, 2010.

BIBLIOGRAFÍA

- Acsadi, G., I. Lee, et al. (2009). "Mitochondrial dysfunction in a neural cell model of spinal muscular atrophy." *J Neurosci Res* **87**(12): 2748-2756.
- Adams, J. and S. Cory (1998). "The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival." *Science* **281**(5381): 1322-1326.
- Ahn, H. J., C. M. Hernandez, et al. (2008). "c-Rel, an NF-kappaB family transcription factor, is required for hippocampal long-term synaptic plasticity and memory formation." *Learn Mem* **15**(7): 539-549.
- Airaksinen, M. and M. Saarma (2002). "The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value." *Nat Rev Neurosci* **3**(5): 383-394.
- Alessi, D. R., S. R. James, et al. (1997). "Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha." *Curr Biol* **7**(4): 261-269.
- Alexi, T., C. Borlongan, et al. (2000). "Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases." *Prog Neurobiol* **60**(5): 409-470.
- Andreassi, C., J. Jarecki, et al. (2001). "Aclarubicin treatment restores SMN levels to cells derived from type I spinal muscular atrophy patients." *Hum Mol Genet* **10**(24): 2841-2849.
- Anest, V., J. Hanson, et al. (2003). "A nucleosomal function for IkappaB kinase-alpha in NF-kappaB-dependent gene expression." *Nature* **423**(6940): 659-663.
- Arakawa, Y., M. Sendtner, et al. (1990). "Survival effect of ciliary neurotrophic factor (CNTF) on chick embryonic motoneurons in culture: comparison with other neurotrophic factors and cytokines." *J Neurosci* **10**(11): 3507-3515.
- Ashburner, B. P., S. D. Westerheide, et al. (2001). "The p65 (RelA) subunit of NF-kappaB interacts with the histone deacetylase (HDAC) corepressors." *Mol Cell Biol* **21**(20): 7065-7077.
- Avila, A. M., B. G. Burnett, et al. (2007). "Trichostatin A increases SMN expression and survival in a mouse model of spinal muscular atrophy." *J Clin Invest* **117**(3): 659-671.
- Azoitei, N., T. Wirth, et al. (2005). "Activation of the IkappaB kinase complex is sufficient for neuronal differentiation of PC12 cells." *J Neurochem* **93**(6): 1487-1501.
- Azzouz, M., T. Le, et al. (2004). "Lentivector-mediated SMN replacement in a mouse model of spinal muscular atrophy." *J Clin Invest* **114**(12): 1726-1731.
- Baeuerle, P. (1998). "IkappaB-NF-kappaB structures: at the interface of inflammation control." *Cell* **95**(6): 729-731.
- Baeuerle, P. and T. Henkel (1994). "Function and activation of NF-kappa B in the immune system." *Annu Rev Immunol* **12**: 141-179.
- Barde, Y., D. Edgar, et al. (1982). "Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain." *EMBO J* **1**(5): 549-553.
- Barkett, M. and T. Gilmore (1999). "Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors." *Oncogene* **18**(49): 6910-6924.
- Baron-Delage, S., A. Abadie, et al. (2000). "Interferons and IRF-1 induce expression of the survival motor neuron (SMN) genes." *Mol Med* **6**(11): 957-968.
- Barroga, C. F., J. K. Stevenson, et al. (1995). "Constitutive phosphorylation of Ikappa B alpha by casein kinase II." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(17): 7637-7641.
- Barthélémy, C., C. E. Henderson, et al. (2004). "Foxo3a induces motoneuron death through the Fas pathway in cooperation with JNK." *BMC Neurosci* **5**: 48.

BIBLIOGRAFÍA

- Baud, V. and M. Karin (2001). "Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives." *Trends Cell Biol* **11**(9): 372-377.
- Beg, A. A. and D. Baltimore (1996). "An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death." *Science* **274**(5288): 782-784.
- Beg, A., W. Sha, et al. (1995). "Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B." *Nature* **376**(6536): 167-170.
- Beinke, S. and S. C. Ley (2004). "Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology." *Biochem J* **382**(Pt 2): 393-409.
- Behl, C., J. Davis, et al. (1994). "Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity." *Cell* **77**(6): 817-827.
- Bender, K., M. Göttlicher, et al. (1998). "Sequential DNA damage-independent and -dependent activation of NF-kappaB by UV." *EMBO J* **17**(17): 5170-5181.
- Bennet, M. R., W. G. Gibson, et al. (2002). "Neuronal cell death, nerve growth factor and neurotrophic models: 50 years on." *Auton Neurosci* **95**(1-2): 1-23.
- Bhakar, A., L. Tannis, et al. (2002). "Constitutive nuclear factor-kappa B activity is required for central neuron survival." *J Neurosci* **22**(19): 8466-8475.
- Biswas, S. C., Y. Shi, et al. (2007). "Bim is elevated in Alzheimer's disease neurons and is required for beta-amyloid-induced neuronal apoptosis." *J Neurosci* **27**(4): 893-900.
- Boda, B., C. Mas, et al. (2004). "Survival motor neuron SMN1 and SMN2 gene promoters: identical sequences and differential expression in neurons and non-neuronal cells." *Eur J Hum Genet* **12**(9): 729-737.
- Bonizzi, G., M. Bebien, et al. (2004). "Activation of IKKalpha target genes depends on recognition of specific kappaB binding sites by RelB:p52 dimers." *EMBO J* **23**(21): 4202-4210.
- Bonaiuto, C., P. McDonald, et al. (1997). "Activation of nuclear factor-kappa B by beta-amyloid peptides and interferon-gamma in murine microglia." *J Neuroimmunol* **77**(1): 51-56.
- Bonni, A., A. Brunet, et al. (1999). "Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms." *Science* **286**(5443): 1358-1362.
- Bordet, T., J. C. Lesbordes, et al. (2001). "Protective effects of cardiotrophin-1 adenoviral gene transfer on neuromuscular degeneration in transgenic ALS mice." *Hum Mol Genet* **10**(18): 1925-1933.
- Brahe, C., T. Vitali, et al. (2005). "Phenylbutyrate increases SMN gene expression in spinal muscular atrophy patients." *Eur J Hum Genet* **13**(2): 256-259.
- Bras, M., B. Queenan, et al. (2005). "Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying." *Biochemistry (Mosc)* **70**(2): 231-239.
- Brichta, L., Y. Hofmann, et al. (2003). "Valproic acid increases the SMN2 protein level: a well-known drug as a potential therapy for spinal muscular atrophy." *Hum Mol Genet* **12**(19): 2481-2489.
- Briscoe, J., A. Pierani, et al. (2000). "A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube." *Cell* **101**(4): 435-445.
- Brown, K., S. Gerstberger, et al. (1995). "Control of I kappa B-alpha proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation." *Science* **267**(5203): 1485-1488.
- Brunet, A., A. Bonni, et al. (1999). "Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor." *Cell* **96**(6): 857-868.

- Brustovetsky, N., J. Dubinsky, et al. (2003). "Two pathways for tBID-induced cytochrome c release from rat brain mitochondria: BAK- versus BAX-dependence." *J Neurochem* **84**(1): 196-207.
- Buggia-Prevot, V., J. Sevalle, et al. (2008). "NFkappaB-dependent control of BACE1 promoter transactivation by Abeta42." *J Biol Chem* **283**(15): 10037-10047.
- Bui, N., A. Livolsi, et al. (2001). "Activation of nuclear factor kappaB and Bcl-x survival gene expression by nerve growth factor requires tyrosine phosphorylation of IkappaBalpha." *J Cell Biol* **152**(4): 753-764.
- Bui, N. T., A. Livolsi, et al. (2001). "Activation of nuclear factor kappaB and Bcl-x survival gene expression by nerve growth factor requires tyrosine phosphorylation of IkappaBalpha." *J Cell Biol* **152**(4): 753-764.
- Burek, M. and R. Oppenheim (1996). "Programmed cell death in the developing nervous system." *Brain Pathol* **6**(4): 427-446.
- Burghes, A. H. and C. E. Beattie (2009). "Spinal muscular atrophy: why do low levels of survival motor neuron protein make motor neurons sick?" *Nat Rev Neurosci* **10**(8): 597-609.
- Burke, M. and M. Bothwell (2003). "p75 neurotrophin receptor mediates neurotrophin activation of NF-kappa B and induction of iNOS expression in P19 neurons." *J Neurobiol* **55**(2): 191-203.
- Burkly, L., C. Hession, et al. (1995). "Expression of relB is required for the development of thymic medulla and dendritic cells." *Nature* **373**(6514): 531-536.
- Burnett, B., E. Muñoz, et al. (2009). "Regulation of SMN protein stability." *Mol Cell Biol* **29**(5): 1107-1115.
- Burstein, E. and C. Duckett (2003). "Dying for NF-kappaB? Control of cell death by transcriptional regulation of the apoptotic machinery." *Curr Opin Cell Biol* **15**(6): 732-737.
- Camandola, S. and M. Mattson (2007). "NF-kappa B as a therapeutic target in neurodegenerative diseases." *Expert Opin Ther Targets* **11**(2): 123-132.
- Campbell, I. K., S. Gerondakis, et al. (2000). "Distinct roles for the NF-kappaB1 (p50) and c-Rel transcription factors in inflammatory arthritis." *J Clin Invest* **105**(12): 1799-1806.
- Cantrell, D. (2001). "Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways." *J Cell Sci* **114**(Pt 8): 1439-1445.
- Cardone, M., N. Roy, et al. (1998). "Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation." *Science* **282**(5392): 1318-1321.
- Cardoso, S. M. and C. R. Oliveira (2003). "Inhibition of NF-kB renders cells more vulnerable to apoptosis induced by amyloid beta peptides." *Free Radic Res* **37**(9): 967-973.
- Carrel, T. L., M. L. McWhorter, et al. (2006). "Survival motor neuron function in motor axons is independent of functions required for small nuclear ribonucleoprotein biogenesis." *J Neurosci* **26**(43): 11014-11022.
- Cartegni, L. and A. R. Krainer (2002). "Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1." *Nat Genet* **30**(4): 377-384.
- Carter, B., C. Kaltschmidt, et al. (1996). "Selective activation of NF-kappa B by nerve growth factor through the neurotrophin receptor p75." *Science* **272**(5261): 542-545.

BIBLIOGRAFÍA

- Carter, T., C. Bönnemann, et al. (1997). "A multicopy transcription-repair gene, BTF2p44, maps to the SMA region and demonstrates SMA associated deletions." Hum Mol Genet **6**(2): 229-236.
- Cayuso, J. and E. Martí (2005). "Morphogens in motion: growth control of the neural tube." J Neurobiol **64**(4): 376-387.
- Chen, J., Y. Zhou, et al. (2005). "SIRT1 protects against microglia-dependent amyloid-beta toxicity through inhibiting NF-kappaB signaling." J Biol Chem **280**(48): 40364-40374.
- Chen, L. and W. Greene (2004). "Shaping the nuclear action of NF-kappaB." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(5): 392-401.
- Chen, L. F., S. A. Williams, et al. (2005). "NF-kappaB RelA phosphorylation regulates RelA acetylation." Mol Cell Biol **25**(18): 7966-7975.
- Chen, R., C. Sarnecki, et al. (1992). "Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases." Mol Cell Biol **12**(3): 915-927.
- Chen, Z., J. Hagler, et al. (1995). "Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway." Genes Dev **9**(13): 1586-1597.
- Cheng, A., S. Wang, et al. (2003). "Calmodulin mediates brain-derived neurotrophic factor cell survival signaling upstream of Akt kinase in embryonic neocortical neurons." J Biol Chem **278**(9): 7591-7599.
- Choi, C. and E. N. Benveniste (2004). "Fas ligand/Fas system in the brain: regulator of immune and apoptotic responses." Brain Res Brain Res Rev **44**(1): 65-81.
- Choi, Y. S., B. Lee, et al. (2009). "CREB is a key regulator of striatal vulnerability in chemical and genetic models of Huntington's disease." Neurobiol Dis **36**(2): 259-268.
- Chong, H., H. Vikis, et al. (2003). "Mechanisms of regulating the Raf kinase family." Cell Signal **15**(5): 463-469.
- Chu, L., W. Wang, et al. (2008). "Ischemic brain cell-derived conditioned medium protects astrocytes against ischemia through GDNF/ERK/NF-kB signaling pathway." Brain Res **1239**: 24-35.
- Chu, Z., T. McKinsey, et al. (1997). "Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF-kappaB control." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(19): 10057-10062.
- Ciechanover, A. (1994). "The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway." Cell **79**(1): 13-21.
- Claus, P., F. Doring, et al. (2003). "Differential intranuclear localization of fibroblast growth factor-2 isoforms and specific interaction with the survival of motoneuron protein." J Biol Chem **278**(1): 479-485.
- Coovert, D., T. Le, et al. (1997). "The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy." Hum Mol Genet **6**(8): 1205-1214.
- Cory, S. and J. Adams (2002). "The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch." Nat Rev Cancer **2**(9): 647-656.
- Creedon, D., M. Tansey, et al. (1997). "Neurturin shares receptors and signal transduction pathways with glial cell line-derived neurotrophic factor in sympathetic neurons." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(13): 7018-7023.
- Cui, Q. and A. Harvey (2000). "CNTF promotes the regrowth of retinal ganglion cell axons into murine peripheral nerve grafts." Neuroreport **11**(18): 3999-4002.
- Dasen, J. and T. Jessell (2009). "Hox networks and the origins of motor neuron diversity." Curr Top Dev Biol **88**: 169-200.

- Datta, S., A. Katsov, et al. (2000). "14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation." *Mol Cell* **6**(1): 41-51.
- Daugas, E., D. Nochy, et al. (2000). "Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis." *FEBS Lett* **476**(3): 118-123.
- Deckwerth, T., J. Elliott, et al. (1996). "BAX is required for neuronal death after trophic factor deprivation and during development." *Neuron* **17**(3): 401-411.
- Deckwerth, T. L., R. M. Easton, et al. (1998). "Placement of the BCL2 family member BAX in the death pathway of sympathetic neurons activated by trophic factor deprivation." *Exp Neurol* **152**(1): 150-162.
- Deenick, E. K., A. R. Elford, et al. (2010). "c-Rel but not NF-kappaB1 is important for T regulatory cell development." *Eur J Immunol* **40**(3): 677-681.
- Degterev, A., M. Boyce, et al. (2003). "A decade of caspases." *Oncogene* **22**(53): 8543-8567.
- Del Signore, S. J., D. J. Amante, et al. (2009). "Combined riluzole and sodium phenylbutyrate therapy in transgenic amyotrophic lateral sclerosis mice." *Amyotroph Lateral Scler* **10**(2): 85-94.
- Demir, O., N. Aysit, et al. (2011). "ETS-domain transcription factor Elk-1 mediates neuronal survival: SMN as a potential target." *Biochim Biophys Acta*.
- Deshmukh, M. and E. J. Johnson "Evidence of a novel event during neuronal death: development of competence-to-die in response to cytoplasmic cytochrome c." *Neuron* **21**(4): 695-705.
- Deshmukh, M. and E. J. Johnson (1998). "Evidence of a novel event during neuronal death: development of competence-to-die in response to cytoplasmic cytochrome c." *Neuron* **21**(4): 695-705.
- Deshpande, D. M., Y. S. Kim, et al. (2006). "Recovery from paralysis in adult rats using embryonic stem cells." *Ann Neurol* **60**(1): 32-44.
- DiDonato, J., F. Mercurio, et al. (1996). "Mapping of the inducible I κ B phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation." *Mol Cell Biol* **16**(4): 1295-1304.
- Dijkhuizen, P. and A. Ghosh (2005). "BDNF regulates primary dendrite formation in cortical neurons via the PI3-kinase and MAP kinase signaling pathways." *J Neurobiol* **62**(2): 278-288.
- Dimos, J. T., K. T. Rodolfa, et al. (2008). "Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons." *Science* **321**(5893): 1218-1221.
- Dolcet, X., J. Egea, et al. (1999). "Activation of phosphatidylinositol 3-kinase, but not extracellular-regulated kinases, is necessary to mediate brain-derived neurotrophic factor-induced motoneuron survival." *J Neurochem* **73**(2): 521-531.
- Dolcet, X., R. Soler, et al. (2001). "Cytokines promote motoneuron survival through the Janus kinase-dependent activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway." *Mol Cell Neurosci* **18**(6): 619-631.
- Dolcet, X., R. M. Soler, et al. (2001). "Cytokines promote motoneuron survival through the Janus kinase-dependent activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway." *Mol Cell Neurosci* **18**(6): 619-631.
- Drew, P., M. Lonergan, et al. (1993). "Regulation of MHC class I and beta 2-microglobulin gene expression in human neuronal cells. Factor binding to conserved cis-acting regulatory sequences correlates with expression of the genes." *J Immunol* **150**(8 Pt 1): 3300-3310.

BIBLIOGRAFÍA

- Du, K. and M. Montminy (1998). "CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB." *J Biol Chem* **273**(49): 32377-32379.
- Du, Y., T. Fischer, et al. (2006). "Distinct effects of p75 in mediating actions of neurotrophins on basal forebrain oligodendrocytes." *Mol Cell Neurosci* **31**(2): 366-375.
- Dupont, E., I. Sansal, et al. (1998). "Developmental pattern of expression of NPDC-1 and its interaction with E2F-1 suggest a role in the control of proliferation and differentiation of neural cells." *J Neurosci Res* **51**(2): 257-267.
- Duran, A., M. T. Diaz-Meco, et al. (2003). "Essential role of RelA Ser311 phosphorylation by zetaPKC in NF-kappaB transcriptional activation." *EMBO J* **22**(15): 3910-3918.
- Edinger, A. L. and C. B. Thompson (2004). "Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy." *Curr Opin Cell Biol* **16**(6): 663-669.
- Eggert, C., A. Chari, et al. (2006). "Spinal muscular atrophy: the RNP connection." *Trends Mol Med* **12**(3): 113-121.
- Egea, J., C. Espinet, et al. (2001). "Neuronal survival induced by neurotrophins requires calmodulin." *J Cell Biol* **154**(3): 585-597.
- Er, E., L. Oliver, et al. (2006). "Mitochondria as the target of the pro-apoptotic protein Bax." *Biochim Biophys Acta* **1757**(9-10): 1301-1311.
- Feldkötter, M., V. Schwarzer, et al. (2002). "Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time lightCycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy." *Am J Hum Genet* **70**(2): 358-368.
- Egea, J., C. Espinet, et al. (2001). "Neuronal survival induced by neurotrophins requires calmodulin." *J Cell Biol* **154**(3): 585-597.
- Feng, Y., J. Fratkin, et al. (2003). "Inhibiting caspase-9 after injury reduces hypoxic ischemic neuronal injury in the cortex in the newborn rat." *Neurosci Lett* **344**(3): 201-204.
- Ferguson, K., J. Kavran, et al. (2000). "Structural basis for discrimination of 3-phosphoinositides by pleckstrin homology domains." *Mol Cell* **6**(2): 373-384.
- Foust, K. D., A. Poirier, et al. (2008). "Neonatal intraperitoneal or intravenous injections of recombinant adeno-associated virus type 8 transduce dorsal root ganglia and lower motor neurons." *Hum Gene Ther* **19**(1): 61-70.
- Franzoso, G., L. Carlson, et al. (1998). "Mice deficient in nuclear factor (NF)-kappa B/p52 present with defects in humoral responses, germinal center reactions, and splenic microarchitecture." *J Exp Med* **187**(2): 147-159.
- Franzoso, G., L. Carlson, et al. (1997). "Requirement for NF-kappaB in osteoclast and B-cell development." *Genes Dev* **11**(24): 3482-3496.
- Frebel, K. and S. Wiese (2006). "Signalling molecules essential for neuronal survival and differentiation." *Biochem Soc Trans* **34**(Pt 6): 1287-1290.
- Fridmacher, V., B. Kaltschmidt, et al. (2003). "Forebrain-specific neuronal inhibition of nuclear factor-kappaB activity leads to loss of neuroprotection." *J Neurosci* **23**(28): 9403-9408.
- Friesen, W. J. and G. Dreyfuss (2000). "Specific sequences of the Sm and Sm-like (Lsm) proteins mediate their interaction with the spinal muscular atrophy disease gene product (SMN)." *J Biol Chem* **275**(34): 26370-26375.
- Fujita, E., K. Urase, et al. (2000). "Detection of caspase-9 activation in the cell death of the Bcl-x-deficient mouse embryo nervous system by cleavage sites-directed antisera." *Brain Res Dev Brain Res* **122**(2): 135-147.
- Fuller, H. R., N. T. Man, et al. (2010). "The SMN interactome includes Myb-binding protein 1a." *J Proteome Res* **9**(1): 556-563.

- Furukawa, K. and M. P. Mattson (1998). "The transcription factor NF-kappaB mediates increases in calcium currents and decreases in NMDA- and AMPA/kainate-induced currents induced by tumor necrosis factor-alpha in hippocampal neurons." *J Neurochem* **70**(5): 1876-1886.
- Gabanella, F., M. E. Butchbach, et al. (2007). "Ribonucleoprotein assembly defects correlate with spinal muscular atrophy severity and preferentially affect a subset of spliceosomal snRNPs." *PLoS One* **2**(9): e921.
- Gallagher, D., H. Gutierrez, et al. (2007). "Nuclear factor-kappaB activation via tyrosine phosphorylation of inhibitor kappaB-alpha is crucial for ciliary neurotrophic factor-promoted neurite growth from developing neurons." *J Neurosci* **27**(36): 9664-9669.
- Gallagher, D., H. Gutierrez, et al. (2007). "Nuclear factor-kappaB activation via tyrosine phosphorylation of inhibitor kappaB-alpha is crucial for ciliary neurotrophic factor-promoted neurite growth from developing neurons." *J Neurosci* **27**(36): 9664-9669.
- Gangwani, L., M. Mikrut, et al. (2001). "Spinal muscular atrophy disrupts the interaction of ZPR1 with the SMN protein." *Nat Cell Biol* **3**(4): 376-383.
- Garcera, A., S. Mincheva, et al. (2011). "A new model to study spinal muscular atrophy: Neurite degeneration and cell death is counteracted by BCL-X(L) Overexpression in motoneurons." *Neurobiol Dis.*
- García-Martínez, J. M., E. Pérez-Navarro, et al. (2007). "BH3-only proteins Bid and Bim(EL) are differentially involved in neuronal dysfunction in mouse models of Huntington's disease." *J Neurosci Res* **85**(12): 2756-2769.
- Garrity-Moses, M. E., Q. Teng, et al. (2005). "Neuroprotective adeno-associated virus Bel-xL gene transfer in models of motor neuron disease." *Muscle Nerve* **32**(6): 734-744.
- Gavrilina, T. O., V. L. McGovern, et al. (2008). "Neuronal SMN expression corrects spinal muscular atrophy in severe SMA mice while muscle-specific SMN expression has no phenotypic effect." *Hum Mol Genet* **17**(8): 1063-1075.
- Giesemann, T., S. Rathke-Hartlieb, et al. (1999). "A role for polyproline motifs in the spinal muscular atrophy protein SMN. Profilins bind to and colocalize with smn in nuclear gems." *J Biol Chem* **274**(53): 37908-37914.
- Ghosh, S. and M. Karin (2002). "Missing pieces in the NF-kappaB puzzle." *Cell* **109** Suppl: S81-96.
- Ghosh, S., M. May, et al. (1998). "NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses." *Annu Rev Immunol* **16**: 225-260.
- Gilley, J., P. Coffey, et al. (2003). "FOXO transcription factors directly activate bim gene expression and promote apoptosis in sympathetic neurons." *J Cell Biol* **162**(4): 613-622.
- Glinka, M., T. Herrmann, et al. (2010). "The heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-R is necessary for axonal beta-actin mRNA translocation in spinal motor neurons." *Hum Mol Genet* **19**(10): 1951-1966.
- Gould, T. and H. Enomoto (2009). "Neurotrophic modulation of motor neuron development." *Neuroscientist* **15**(1): 105-116.
- Gould, T., S. Yonemura, et al. (2008). "The neurotrophic effects of glial cell line-derived neurotrophic factor on spinal motoneurons are restricted to fusimotor subtypes." *J Neurosci* **28**(9): 2131-2146.

BIBLIOGRAFÍA

- Gozzelino, R., C. Sole, et al. (2008). "BCL-XL regulates TNF-alpha-mediated cell death independently of NF-kappaB, FLIP and IAPs." Cell Res **18**(10): 1020-1036.
- Grilli, M., F. Goffi, et al. (1996). "Interleukin-1beta and glutamate activate the NF-kappaB/Rel binding site from the regulatory region of the amyloid precursor protein gene in primary neuronal cultures." J Biol Chem **271**(25): 15002-15007.
- Green, D. R. and J. E. Chipuk (2008). "Apoptosis: Stabbed in the BAX." Nature **455**(7216): 1047-1049.
- Griffiths, G., L. Dubrez, et al. (1999). "Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis." J Cell Biol **144**(5): 903-914.
- Grossmann, M., L. O'Reilly, et al. (2000). "The anti-apoptotic activities of Rel and RelA required during B-cell maturation involve the regulation of Bcl-2 expression." EMBO J **19**(23): 6351-6360.
- Guerrini, L., F. Blasi, et al. (1995). "Synaptic activation of NF-kappa B by glutamate in cerebellar granule neurons in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(20): 9077-9081.
- Grumont, R. J., I. J. Rourke, et al. (1998). "B lymphocytes differentially use the Rel and nuclear factor kappaB1 (NF-kappaB1) transcription factors to regulate cell cycle progression and apoptosis in quiescent and mitogen-activated cells." J Exp Med **187**(5): 663-674.
- Giesemann, T., S. Rathke-Hartlieb, et al. (1999). "A role for polyproline motifs in the spinal muscular atrophy protein SMN. Profilins bind to and colocalize with smn in nuclear gems." J Biol Chem **274**(53): 37908-37914.
- Gupta, S. C., C. Sundaram, et al. (2010). "Inhibiting NF-κB activation by small molecules as a therapeutic strategy." Biochim Biophys Acta **1799**(10-12): 775-787.
- Gutierrez, H., V. Hale, et al. (2005). "NF-kappaB signalling regulates the growth of neural processes in the developing PNS and CNS." Development **132**(7): 1713-1726.
- Gutierrez, H., G. O'Keeffe, et al. (2008). "Nuclear factor kappa B signaling either stimulates or inhibits neurite growth depending on the phosphorylation status of p65/RelA." J Neurosci **28**(33): 8246-8256.
- Gutierrez, H., G. W. O'Keeffe, et al. (2008). "Nuclear factor kappa B signaling either stimulates or inhibits neurite growth depending on the phosphorylation status of p65/RelA." J Neurosci **28**(33): 8246-8256.
- Ha, S. and L. Redmond (2008). "ERK mediates activity dependent neuronal complexity via sustained activity and CREB-mediated signaling." Dev Neurobiol **68**(14): 1565-1579.
- Haddad, H., C. Cifuentes-Diaz, et al. (2003). "Riluzole attenuates spinal muscular atrophy disease progression in a mouse model." Muscle Nerve **28**(4): 432-437.
- Hamanoue, M., G. Middleton, et al. (1999). "p75-mediated NF-kappaB activation enhances the survival response of developing sensory neurons to nerve growth factor." Mol Cell Neurosci **14**(1): 28-40.
- Hannon, G. and J. Rossi (2004). "Unlocking the potential of the human genome with RNA interference." Nature **431**(7006): 371-378.
- Hardingham, G. and H. Bading (2003). "The Yin and Yang of NMDA receptor signalling." Trends Neurosci **26**(2): 81-89.
- Hayden, M. and S. Ghosh (2004). "Signaling to NF-kappaB." Genes Dev **18**(18): 2195-2224.

- Hayden, M. and S. Ghosh (2008). "Shared principles in NF-kappaB signaling." Cell **132**(3): 344-362.
- Hayden, M. S., A. P. West, et al. (2006). "NF-kappaB and the immune response." Oncogene **25**(51): 6758-6780.
- He, P., Z. Zhong, et al. (2007). "Deletion of tumor necrosis factor death receptor inhibits amyloid beta generation and prevents learning and memory deficits in Alzheimer's mice." J Cell Biol **178**(5): 829-841.
- Hefti, F. (1994). "Development of effective therapy for Alzheimer's disease based on neurotrophic factors." Neurobiol Aging **15 Suppl 2**: S193-194.
- Henderson, C., H. Phillips, et al. (1994). "GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle." Science **266**(5187): 1062-1064.
- Henderson, C., Y. Yamamoto, et al. (1998). "Role of neurotrophic factors in motoneuron development." J Physiol Paris **92**(3-4): 279-281.
- Hendry, L. and S. John (2004). "Regulation of STAT signalling by proteolytic processing." Eur J Biochem **271**(23-24): 4613-4620.
- Hetman, M., K. Kanning, et al. (1999). "Neuroprotection by brain-derived neurotrophic factor is mediated by extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase." J Biol Chem **274**(32): 22569-22580.
- Hibi, M., K. Nakajima, et al. (1996). "IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system." J Mol Med **74**(1): 1-12.
- Hinz, M., P. Lemke, et al. (2002). "Nuclear factor kappaB-dependent gene expression profiling of Hodgkin's disease tumor cells, pathogenetic significance, and link to constitutive signal transducer and activator of transcription 5a activity." J Exp Med **196**(5): 605-617.
- Hoffmann, A., T. Leung, et al. (2003). "Genetic analysis of NF-kappaB/Rel transcription factors defines functional specificities." EMBO J **22**(20): 5530-5539.
- Hoffmann, A., G. Natoli, et al. (2006). "Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module." Oncogene **25**(51): 6706-6716.
- Holgado-Madruga, M., D. Moscatello, et al. (1997). "Grb2-associated binder-1 mediates phosphatidylinositol 3-kinase activation and the promotion of cell survival by nerve growth factor." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(23): 12419-12424.
- Holley, A. K., Y. Xu, et al. (2010). "RelB regulates manganese superoxide dismutase gene and resistance to ionizing radiation of prostate cancer cells." Ann N Y Acad Sci **1201**: 129-136.
- Holtmann, B., S. Wiese, et al. (2005). "Triple knock-out of CNTF, LIF, and CT-1 defines cooperative and distinct roles of these neurotrophic factors for motoneuron maintenance and function." J Neurosci **25**(7): 1778-1787.
- Huang, W., T. Ju, et al. (2007). "Phosphorylation of CBP by IKKalpha promotes cell growth by switching the binding preference of CBP from p53 to NF-kappaB." Mol Cell **26**(1): 75-87.
- Humbert, S., E. Bryson, et al. (2002). "The IGF-1/Akt pathway is neuroprotective in Huntington's disease and involves Huntingtin phosphorylation by Akt." Dev Cell **2**(6): 831-837.
- Huynh, Q., H. Boddupalli, et al. (2000). "Characterization of the recombinant IKK1/IKK2 heterodimer. Mechanisms regulating kinase activity." J Biol Chem **275**(34): 25883-25891.
- Häcker, H. and M. Karin (2006). "Regulation and function of IKK and IKK-related kinases." Sci STKE **2006**(357): re13.

BIBLIOGRAFÍA

- Imbert, V., R. Rupec, et al. (1996). "Tyrosine phosphorylation of I kappa B-alpha activates NF-kappa B without proteolytic degradation of I kappa B-alpha." Cell **86**(5): 787-798.
- Inta, I., S. Paxian, et al. (2006). "Bim and Noxa are candidates to mediate the deleterious effect of the NF-kappa B subunit RelA in cerebral ischemia." J Neurosci **26**(50): 12896-12903.
- Israël, A. (2003). "Signal transduction: A regulator branches out." Nature **423**(6940): 596-597.
- Jablonka, S., K. Karle, et al. (2006). "Distinct and overlapping alterations in motor and sensory neurons in a mouse model of spinal muscular atrophy." Hum Mol Genet **15**(3): 511-518.
- Jacque, E., T. Tchenio, et al. (2005). "RelA repression of RelB activity induces selective gene activation downstream of TNF receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(41): 14635-14640.
- Jeong, S. J., C. A. Pise-Masison, et al. (2005). "A novel NF-kappaB pathway involving IKKbeta and p65/RelA Ser-536 phosphorylation results in p53 inhibition in the absence of NF-kappaB transcriptional activity." J Biol Chem **280**(11): 10326-10332.
- Jessell, T. (2000). "Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes." Nat Rev Genet **1**(1): 20-29.
- Jin, K., X. Mao, et al. (2000). "Induction of vascular endothelial growth factor receptors and phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signaling by global cerebral ischemia in the rat." Neuroscience **100**(4): 713-717.
- Jing, S., D. Wen, et al. (1996). "GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF." Cell **85**(7): 1113-1124.
- Jonas, E. (2006). "BCL-xL regulates synaptic plasticity." Mol Interv **6**(4): 208-222.
- Julius, C., M. Heikenwalder, et al. (2008). "Prion propagation in mice lacking central nervous system NF-kappaB signalling." J Gen Virol **89**(Pt 6): 1545-1550.
- Kaltschmidt, B., M. Heinrich, et al. (2002). "Stimulus-dependent activation of NF-kappaB specifies apoptosis or neuroprotection in cerebellar granule cells." Neuromolecular Med **2**(3): 299-309.
- Kaltschmidt, B. and C. Kaltschmidt (2009). "NF-kappaB in the nervous system." Cold Spring Harb Perspect Biol **1**(3): a001271.
- Kaltschmidt, B., M. Uherek, et al. (1997). "Transcription factor NF-kappaB is activated in primary neurons by amyloid beta peptides and in neurons surrounding early plaques from patients with Alzheimer disease." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(6): 2642-2647.
- Kaltschmidt, B., C. Kaltschmidt, et al. (2000). "The pro- or anti-apoptotic function of NF-kappaB is determined by the nature of the apoptotic stimulus." Eur J Biochem **267**(12): 3828-3835.
- Kaltschmidt, B., R. A. Linker, et al. (2002). "Cyclooxygenase-2 is a neuronal target gene of NF-kappaB." BMC Mol Biol **3**: 16.
- Kaltschmidt, B., D. Ndiaye, et al. (2006). "NF-kappaB regulates spatial memory formation and synaptic plasticity through protein kinase A/CREB signaling." Mol Cell Biol **26**(8): 2936-2946.
- Kaltschmidt, B., M. Uherek, et al. (1999). "Inhibition of NF-kappaB potentiates amyloid beta-mediated neuronal apoptosis." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(16): 9409-9414.

- Kaltschmidt, B., D. Widera, et al. (2005). "Signaling via NF-kappaB in the nervous system." Biochim Biophys Acta **1745**(3): 287-299.
- Kaltschmidt, C., B. Kaltschmidt, et al. (1994). "Constitutive NF-kappa B activity in neurons." Mol Cell Biol **14**(6): 3981-3992.
- Kane, D., T. Ord, et al. (1995). "Expression of bcl-2 inhibits necrotic neural cell death." J Neurosci Res **40**(2): 269-275.
- Kaplan, D. and F. Miller (2000). "Neurotrophin signal transduction in the nervous system." Curr Opin Neurobiol **10**(3): 381-391.
- Karin, M. and A. Lin (2002). "NF-kappaB at the crossroads of life and death." Nat Immunol **3**(3): 221-227.
- Kashima, T. and J. L. Manley (2003). "A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy." Nat Genet **34**(4): 460-463.
- Kato, T. J., M. Delhase, et al. (2003). "CK2 Is a C-Terminal IkappaB Kinase Responsible for NF-kappaB Activation during the UV Response." Mol Cell **12**(4): 829-839.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie, et al. (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." Br J Cancer **26**(4): 239-257.
- Khoshnan, A., J. Ko, et al. (2009). "IKKalpha and IKKbeta regulation of DNA damage-induced cleavage of huntingtin." PLoS One **4**(6): e5768.
- Khoshnan, A., J. Ko, et al. (2009). "IKKalpha and IKKbeta regulation of DNA damage-induced cleavage of huntingtin." PLoS One **4**(6): e5768.
- Khoshnan, A., J. Ko, et al. (2004). "Activation of the IkappaB kinase complex and nuclear factor-kappaB contributes to mutant huntingtin neurotoxicity." J Neurosci **24**(37): 7999-8008.
- Kim, R. (2005). "Unknotting the roles of Bcl-2 and Bcl-xL in cell death." Biochem Biophys Res Commun **333**(2): 336-343.
- Kim, S., R. N. La Motte-Mohs, et al. (2003). "The role of nuclear factor-kappaB essential modulator (NEMO) in B cell development and survival." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(3): 1203-1208.
- Klionsky, D. (2004). "Cell biology: regulated self-cannibalism." Nature **431**(7004): 31-32.
- Kolch, W. (2005). "Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(11): 827-837.
- Kong, P. J., M. O. Kil, et al. (2009). "Increased expression of Bim contributes to the potentiation of serum deprivation-induced apoptotic cell death in Huntington's disease knock-in striatal cell line." Neurol Res **31**(1): 77-83.
- Köntgen, F., R. J. Grumont, et al. (1995). "Mice lacking the c-rel proto-oncogene exhibit defects in lymphocyte proliferation, humoral immunity, and interleukin-2 expression." Genes Dev **9**(16): 1965-1977.
- Kordower, J., M. Emborg, et al. (2000). "Neurodegeneration prevented by lentiviral vector delivery of GDNF in primate models of Parkinson's disease." Science **290**(5492): 767-773.
- Korsmeyer, S., M. Wei, et al. (2000). "Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c." Cell Death Differ **7**(12): 1166-1173.
- Krajewski, S., S. Tanaka, et al. (1993). "Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes." Cancer Res **53**(19): 4701-4714.
- Kuida, K., T. Zheng, et al. (1996). "Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice." Nature **384**(6607): 368-372.

BIBLIOGRAFÍA

- Kuwana, T., L. Bouchier-Hayes, et al. (2005). "BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly." *Mol Cell* **17**(4): 525-535.
- Köntgen, F., R. J. Grumont, et al. (1995). "Mice lacking the c-rel proto-oncogene exhibit defects in lymphocyte proliferation, humoral immunity, and interleukin-2 expression." *Genes Dev* **9**(16): 1965-1977.
- Lee, S., T. Zhou, et al. (2000). "Differential regulation and function of Fas expression on glial cells." *J Immunol* **164**(3): 1277-1285.
- Lee, H. J., S. H. Kim, et al. (2001). "Antiapoptotic role of NF-kappaB in the auto-oxidized dopamine-induced apoptosis of PC12 cells." *J Neurochem* **76**(2): 602-609.
- Lee, H. K., P. Kumar, et al. (2009). "The insulin/Akt signaling pathway is targeted by intracellular beta-amyloid." *Mol Biol Cell* **20**(5): 1533-1544.
- Lefebvre, S., P. Burlet, et al. (2002). "A novel association of the SMN protein with two major non-ribosomal nucleolar proteins and its implication in spinal muscular atrophy." *Hum Mol Genet* **11**(9): 1017-1027.
- Lefebvre, S., L. Bürglen, et al. (1995). "Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene." *Cell* **80**(1): 155-165.
- Lenormand, P., G. Pagès, et al. (1993). "MAP kinases: activation, subcellular localization and role in the control of cell proliferation." *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* **28**: 237-244.
- Lesbordes, J. C., C. Cifuentes-Diaz, et al. (2003). "Therapeutic benefits of cardiotrophin-1 gene transfer in a mouse model of spinal muscular atrophy." *Hum Mol Genet* **12**(11): 1233-1239.
- Letai, A., M. Bassik, et al. (2002). "Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics." *Cancer Cell* **2**(3): 183-192.
- Leung, T., A. Hoffmann, et al. (2004). "One nucleotide in a kappaB site can determine cofactor specificity for NF-kappaB dimers." *Cell* **118**(4): 453-464.
- LEVI-MONTALCINI, R. (1964). "THE NERVE GROWTH FACTOR." *Ann N Y Acad Sci* **118**: 149-170.
- Levi-Montalcini, R. and P. Angeletti (1968). "Nerve growth factor." *Physiol Rev* **48**(3): 534-569.
- Li, B., W. Xu, et al. (2003). "VEGF-induced activation of the PI3-K/Akt pathway reduces mutant SOD1-mediated motor neuron cell death." *Brain Res Mol Brain Res* **111**(1-2): 155-164.
- Li, J., B. Lee, et al. (2006). "Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) and NOXA by p53." *J Biol Chem* **281**(11): 7260-7270.
- Li, J., Z. Lu, et al. (2008). "Cell death and proliferation in NF-kappaB p50 knockout mouse after cerebral ischemia." *Brain Res* **1230**: 281-289.
- Li, Q., G. Estepa, et al. (2000). "Complete lack of NF-kappaB activity in IKK1 and IKK2 double-deficient mice: additional defect in neurulation." *Genes Dev* **14**(14): 1729-1733.
- Li, Q., Q. Lu, et al. (1999). "IKK1-deficient mice exhibit abnormal development of skin and skeleton." *Genes Dev* **13**(10): 1322-1328.
- Li, Q., D. Van Antwerp, et al. (1999). "Severe liver degeneration in mice lacking the IkappaB kinase 2 gene." *Science* **284**(5412): 321-325.

- Li, Z. W., W. Chu, et al. (1999). "The IKKbeta subunit of IkappaB kinase (IKK) is essential for nuclear factor kappaB activation and prevention of apoptosis." *J Exp Med* **189**(11): 1839-1845.
- Li, Z. W., S. A. Omori, et al. (2003). "IKK beta is required for peripheral B cell survival and proliferation." *J Immunol* **170**(9): 4630-4637.
- Liang, C., M. Zhang, et al. (2006). "beta-TrCP binding and processing of NF-kappaB2/p100 involve its phosphorylation at serines 866 and 870." *Cell Signal* **18**(8): 1309-1317.
- Liang, Y., Y. Zhou, et al. (2004). "NF-kappaB and its regulation on the immune system." *Cell Mol Immunol* **1**(5): 343-350.
- Liang, Z. Q., X. Wang, et al. (2007). "Nuclear factor-kappaB-dependent cyclin D1 induction and DNA replication associated with N-methyl-D-aspartate receptor-mediated apoptosis in rat striatum." *J Neurosci Res* **85**(6): 1295-1309.
- Lin, L., D. Doherty, et al. (1993). "GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons." *Science* **260**(5111): 1130-1132.
- Lin, Y. Z., S. Y. Yao, et al. (1995). "Inhibition of nuclear translocation of transcription factor NF-kappa B by a synthetic peptide containing a cell membrane-permeable motif and nuclear localization sequence." *J Biol Chem* **270**(24): 14255-14258.
- Lindsten, T., A. Ross, et al. (2000). "The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues." *Mol Cell* **6**(6): 1389-1399.
- Lilienbaum, A. and A. Israël (2003). "From calcium to NF-kappa B signaling pathways in neurons." *Mol Cell Biol* **23**(8): 2680-2698.
- Lipsky, R., K. Xu, et al. (2001). "Nuclear factor kappaB is a critical determinant in N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neuroprotection." *J Neurochem* **78**(2): 254-264.
- Liston, P., N. Roy, et al. (1996). "Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAI1 and a related family of IAP genes." *Nature* **379**(6563): 349-353.
- Liu, R., J. Cai, et al. (2003). "Region-specific and stage-dependent regulation of Olig gene expression and oligodendrogenesis by Nkx6.1 homeodomain transcription factor." *Development* **130**(25): 6221-6231.
- Liu, Q. and G. Dreyfuss (1996). "A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein." *EMBO J* **15**(14): 3555-3565.
- Liu, Y., L. Boxer, et al. (1999). "Activation of the Bcl-2 promoter by nerve growth factor is mediated by the p42/p44 MAPK cascade." *Nucleic Acids Res* **27**(10): 2086-2090.
- Lo, J. C., S. Basak, et al. (2006). "Coordination between NF-kappaB family members p50 and p52 is essential for mediating LTbetaR signals in the development and organization of secondary lymphoid tissues." *Blood* **107**(3): 1048-1055.
- Lorson, C., H. Rindt, et al. (2010). "Spinal muscular atrophy: mechanisms and therapeutic strategies." *Hum Mol Genet* **19**(R1): R111-118.
- Lu, Z., S. Yu, et al. (2006). "Age-related neural degeneration in nuclear-factor kappaB p50 knockout mice." *Neuroscience* **139**(3): 965-978.
- Luque, I. and C. Gélinas (1998). "Distinct domains of IkappaBalpha regulate c-Rel in the cytoplasm and in the nucleus." *Mol Cell Biol* **18**(3): 1213-1224.
- Madrid, L., C. Wang, et al. (2000). "Akt suppresses apoptosis by stimulating the transactivation potential of the RelA/p65 subunit of NF-kappaB." *Mol Cell Biol* **20**(5): 1626-1638.

BIBLIOGRAFÍA

- Maehara, K., T. Hasegawa, et al. (2000). "A NF-kappaB p65 subunit is indispensable for activating manganese superoxide dismutase gene transcription mediated by tumor necrosis factor-alpha." J Cell Biochem **77**(3): 474-486.
- Maggirwar, S., P. Sarmiere, et al. (1998). "Nerve growth factor-dependent activation of NF-kappaB contributes to survival of sympathetic neurons." J Neurosci **18**(24): 10356-10365.
- Maggirwar, S. B., P. D. Sarmiere, et al. (1998). "Nerve growth factor-dependent activation of NF-kappaB contributes to survival of sympathetic neurons." J Neurosci **18**(24): 10356-10365.
- Majumder, S., S. Varadharaj, et al. (2004). "Identification of a novel cyclic AMP-response element (CRE-II) and the role of CREB-1 in the cAMP-induced expression of the survival motor neuron (SMN) gene." J Biol Chem **279**(15): 14803-14811.
- Majumder, S., S. Varadharaj, et al. (2004). "Identification of a novel cyclic AMP-response element (CRE-II) and the role of CREB-1 in the cAMP-induced expression of the survival motor neuron (SMN) gene." J Biol Chem **279**(15): 14803-14811.
- Manabe, Y., I. Nagano, et al. (2002). "Adenovirus-mediated gene transfer of glial cell line-derived neurotrophic factor prevents motor neuron loss of transgenic model mice for amyotrophic lateral sclerosis." Apoptosis **7**(4): 329-334.
- Markus, A., T. Patel, et al. (2002). "Neurotrophic factors and axonal growth." Curr Opin Neurobiol **12**(5): 523-531.
- Marshall, C. (1995). "Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation." Cell **80**(2): 179-185.
- Martin, M., K. Rehani, et al. (2005). "Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3." Nat Immunol **6**(8): 777-784.
- Mattson, M. (2003). "Insulating axons via NF-kappaB." Nat Neurosci **6**(2): 105-106.
- Mattson, M. and S. Camandola (2001). "NF-kappaB in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders." J Clin Invest **107**(3): 247-254.
- Mattson, M., Y. Goodman, et al. (1997). "Activation of NF-kappaB protects hippocampal neurons against oxidative stress-induced apoptosis: evidence for induction of manganese superoxide dismutase and suppression of peroxynitrite production and protein tyrosine nitration." J Neurosci Res **49**(6): 681-697.
- Mattson, M. and M. Meffert (2006). "Roles for NF-kappaB in nerve cell survival, plasticity, and disease." Cell Death Differ **13**(5): 852-860.
- Mattson, M. P. (2005). "NF-kappaB in the survival and plasticity of neurons." Neurochem Res **30**(6-7): 883-893.
- May, M., F. D'Acquisto, et al. (2000). "Selective inhibition of NF-kappaB activation by a peptide that blocks the interaction of NEMO with the IkappaB kinase complex." Science **289**(5484): 1550-1554.
- Maystadt, I., R. Rezsöhazy, et al. (2007). "The nuclear factor kappaB-activator gene PLEKHG5 is mutated in a form of autosomal recessive lower motor neuron disease with childhood onset." Am J Hum Genet **81**(1): 67-76.
- McGovern, V., T. Gavriline, et al. (2008). "Embryonic motor axon development in the severe SMA mouse." Hum Mol Genet **17**(18): 2900-2909.
- McGovern, V. L., T. O. Gavriline, et al. (2008). "Embryonic motor axon development in the severe SMA mouse." Hum Mol Genet **17**(18): 2900-2909.

- McKay, S. E., A. Garner, et al. (1996). "The expression of *trkB* and *p75* and the role of BDNF in the developing neuromuscular system of the chick embryo." Development **122**(2): 715-724.
- McWhorter, M. L., U. R. Monani, et al. (2003). "Knockdown of the survival motor neuron (*Smn*) protein in zebrafish causes defects in motor axon outgrowth and pathfinding." J Cell Biol **162**(5): 919-931.
- Meberg, P., W. Kinney, et al. (1996). "Gene expression of the transcription factor NF-kappa B in hippocampus: regulation by synaptic activity." Brain Res Mol Brain Res **38**(2): 179-190.
- Meffert, M., J. Chang, et al. (2003). "NF-kappa B functions in synaptic signaling and behavior." Nat Neurosci **6**(10): 1072-1078.
- Melki, J., P. Sheth, et al. (1990). "Mapping of acute (type I) spinal muscular atrophy to chromosome 5q12-q14. The French Spinal Muscular Atrophy Investigators." Lancet **336**(8710): 271-273.
- Meng, R., P. Phillips, et al. (1999). "p53-independent increase in E2F-1 expression enhances the cytotoxic effects of etoposide and of adriamycin." Int J Oncol **14**(1): 5-14.
- Meunier, A., A. Latrémolière, et al. (2007). "Lentiviral-mediated targeted NF-kappaB blockade in dorsal spinal cord glia attenuates sciatic nerve injury-induced neuropathic pain in the rat." Mol Ther **15**(4): 687-697.
- Michaelidis, T. M., M. Sendtner, et al. (1996). "Inactivation of *bcl-2* results in progressive degeneration of motoneurons, sympathetic and sensory neurons during early postnatal development." Neuron **17**(1): 75-89.
- Middleton, G., M. Hamanoue, et al. (2000). "Cytokine-induced nuclear factor kappa B activation promotes the survival of developing neurons." J Cell Biol **148**(2): 325-332.
- Migheli, A., R. Piva, et al. (1997). "c-Jun, JNK/SAPK kinases and transcription factor NF-kappa B are selectively activated in astrocytes, but not motor neurons, in amyotrophic lateral sclerosis." J Neuropathol Exp Neurol **56**(12): 1314-1322.
- Mikhailov, V., M. Mikhailova, et al. (2003). "Association of Bax and Bak homooligomers in mitochondria. Bax requirement for Bak reorganization and cytochrome c release." J Biol Chem **278**(7): 5367-5376.
- Miller, F. and D. Kaplan (2001). "Neurotrophin signalling pathways regulating neuronal apoptosis." Cell Mol Life Sci **58**(8): 1045-1053.
- Mir, M., L. Tolosa, et al. (2008). "Complementary roles of tumor necrosis factor alpha and interferon gamma in inducible microglial nitric oxide generation." J Neuroimmunol **204**(1-2): 101-109.
- Meister, G., C. Eggert, et al. (2002). "SMN-mediated assembly of RNPs: a complex story." Trends Cell Biol **12**(10): 472-478.
- Mitchell, P., P. Timmons, et al. (1991). "Transcription factor AP-2 is expressed in neural crest cell lineages during mouse embryogenesis." Genes Dev **5**(1): 105-119.
- Monani, U. R. (2005). "Spinal muscular atrophy: a deficiency in a ubiquitous protein; a motor neuron-specific disease." Neuron **48**(6): 885-896.
- Monani, U. R., D. D. Coover, et al. (2000). "Animal models of spinal muscular atrophy." Hum Mol Genet **9**(16): 2451-2457.
- Motoyama, N., F. Wang, et al. (1995). "Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice." Science **267**(5203): 1506-1510.

BIBLIOGRAFÍA

- Mowla, S., H. Farhadi, et al. (2001). "Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor." *J Biol Chem* **276**(16): 12660-12666.
- Mémet, S. (2006). "NF-kappaB functions in the nervous system: from development to disease." *Biochem Pharmacol* **72**(9): 1180-1195.
- Nakajima, K. and S. Kohsaka (1998). "Functional roles of microglia in the central nervous system." *Hum Cell* **11**(3): 141-155.
- Nguyen, N., S. Lee, et al. (2009). "Neuroprotection by NGF and BDNF against neurotoxin-exerted apoptotic death in neural stem cells are mediated through Trk receptors, activating PI3-kinase and MAPK pathways." *Neurochem Res* **34**(5): 942-951.
- Nickols, J., W. Valentine, et al. (2003). "Activation of the transcription factor NF-kappaB in Schwann cells is required for peripheral myelin formation." *Nat Neurosci* **6**(2): 161-167.
- Nishimune, H., S. Vasseur, et al. (2000). "Reg-2 is a motoneuron neurotrophic factor and a signalling intermediate in the CNTF survival pathway." *Nat Cell Biol* **2**(12): 906-914.
- Niu, Y. L., W. J. Zhang, et al. (2010). "Expression of the apoptosis-related proteins caspase-3 and NF-kappaB in the hippocampus of Tg2576 mice." *Neurosci Bull* **26**(1): 37-46.
- Nixon, R. (2006). "Autophagy in neurodegenerative disease: friend, foe or turncoat?" *Trends Neurosci* **29**(9): 528-535.
- Nurmi, A., P. Lindsberg, et al. (2004). "Nuclear factor-kappaB contributes to infarction after permanent focal ischemia." *Stroke* **35**(4): 987-991.
- Oda, E., R. Ohki, et al. (2000). "Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis." *Science* **288**(5468): 1053-1058.
- O'Neill, L. and C. Kaltschmidt (1997). "NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function." *Trends Neurosci* **20**(6): 252-258.
- Oppenheim, R. (1991). "Cell death during development of the nervous system." *Annu Rev Neurosci* **14**: 453-501.
- Oppenheim, R., S. Wiese, et al. (2001). "Cardiotrophin-1, a muscle-derived cytokine, is required for the survival of subpopulations of developing motoneurons." *J Neurosci* **21**(4): 1283-1291.
- Oppenheim, R. W., K. Blomgren, et al. (2008). "Developing postmitotic mammalian neurons in vivo lacking Apaf-1 undergo programmed cell death by a caspase-independent, nonapoptotic pathway involving autophagy." *J Neurosci* **28**(6): 1490-1497.
- Otter, S., M. Grimmler, et al. (2007). "A comprehensive interaction map of the human survival of motor neuron (SMN) complex." *J Biol Chem* **282**(8): 5825-5833.
- Ozes, O., L. Mayo, et al. (1999). "NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase." *Nature* **401**(6748): 82-85.
- Panet, H., A. Barzilai, et al. (2001). "Activation of nuclear transcription factor kappa B (NF-kappaB) is essential for dopamine-induced apoptosis in PC12 cells." *J Neurochem* **77**(2): 391-398.
- Patapoutian, A. and L. F. Reichardt (2001). "Trk receptors: mediators of neurotrophin action." *Curr Opin Neurobiol* **11**(3): 272-280.
- Patrizi, A., F. Tiziano, et al. (1999). "SMN protein analysis in fibroblast, amniocyte and CVS cultures from spinal muscular atrophy patients and its relevance for diagnosis." *Eur J Hum Genet* **7**(3): 301-309.

- Pearn, J. (1980). "Classification of spinal muscular atrophies." Lancet **1**(8174): 919-922.
- Pellizzoni, L., B. Charroux, et al. (2001). "A functional interaction between the survival motor neuron complex and RNA polymerase II." J Cell Biol **152**(1): 75-85.
- Pellizzoni, L., N. Kataoka, et al. (1998). "A novel function for SMN, the spinal muscular atrophy disease gene product, in pre-mRNA splicing." Cell **95**(5): 615-624.
- Pennica, D., V. Arce, et al. (1996). "Cardiotrophin-1, a cytokine present in embryonic muscle, supports long-term survival of spinal motoneurons." Neuron **17**(1): 63-74.
- Pennica, D., W. Wood, et al. (1996). "Cardiotrophin-1: a multifunctional cytokine that signals via LIF receptor-gp 130 dependent pathways." Cytokine Growth Factor Rev **7**(1): 81-91.
- Perkins, N. (2006). "Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway." Oncogene **25**(51): 6717-6730.
- Perkins, N. D. (2007). "Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(1): 49-62.
- Perkinton, M. S., J. K. Ip, et al. (2002). "Phosphatidylinositol 3-kinase is a central mediator of NMDA receptor signalling to MAP kinase (Erk1/2), Akt/PKB and CREB in striatal neurones." J Neurochem **80**(2): 239-254.
- Petersén A, K. E. Larsen, et al. (2001). "Expanded CAG repeats in exon 1 of the Huntington's disease gene stimulate dopamine-mediated striatal neuron autophagy and degeneration." Hum Mol Genet **10**(12): 1243-1254.
- Piccioli, P., C. Porcile, et al. (2001). "Inhibition of nuclear factor-kappaB activation induces apoptosis in cerebellar granule cells." J Neurosci Res **66**(6): 1064-1073.
- Pizzi, M., F. Goffi, et al. (2002). "Opposing roles for NF-kappa B/Rel factors p65 and c-Rel in the modulation of neuron survival elicited by glutamate and interleukin-1beta." J Biol Chem **277**(23): 20717-20723.
- Pizzi, M., I. Sarnico, et al. (2005). "NF-kappaB factor c-Rel mediates neuroprotection elicited by mGlu5 receptor agonists against amyloid beta-peptide toxicity." Cell Death Differ **12**(7): 761-772.
- Pohl, T., R. Gugasyan, et al. (2002). "The combined absence of NF-kappa B1 and c-Rel reveals that overlapping roles for these transcription factors in the B cell lineage are restricted to the activation and function of mature cells." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(7): 4514-4519.
- Prendes, M., Y. Zheng, et al. (2003). "Regulation of developing B cell survival by RelA-containing NF-kappa B complexes." J Immunol **171**(8): 3963-3969.
- Press, C. and J. Milbrandt (2008). "Nmnat delays axonal degeneration caused by mitochondrial and oxidative stress." J Neurosci **28**(19): 4861-4871.
- Puccetti, P. and U. Grohmann (2007). "IDO and regulatory T cells: a role for reverse signalling and non-canonical NF-kappaB activation." Nat Rev Immunol **7**(10): 817-823.
- Purves, D., W. Snider, et al. (1988). "Trophic regulation of nerve cell morphology and innervation in the autonomic nervous system." Nature **336**(6195): 123-128.
- Putcha, G., K. Moulder, et al. (2001). "Induction of BIM, a proapoptotic BH3-only BCL-2 family member, is critical for neuronal apoptosis." Neuron **29**(3): 615-628.
- Putcha, G. V., C. A. Harris, et al. (2002). "Intrinsic and extrinsic pathway signaling during neuronal apoptosis: lessons from the analysis of mutant mice." J Cell Biol **157**(3): 441-453.

BIBLIOGRAFÍA

- Pyo, J. S., Y. S. Ko, et al. (2010). "Impairment of nuclear factor-kappaB activation increased glutamate excitotoxicity in a motoneuron-neuroblastoma hybrid cell line expressing mutant (G93A) Cu/Zn-superoxide dismutase." J Neurosci Res **88**(11): 2494-2503.
- Qin, Z. H., R. W. Chen, et al. (1999). "Nuclear factor kappaB nuclear translocation upregulates c-Myc and p53 expression during NMDA receptor-mediated apoptosis in rat striatum." J Neurosci **19**(10): 4023-4033.
- Rao, H. V., L. Thirumangalakudi, et al. (2007). "Cyclin D1, cdk4, and Bim are involved in thrombin-induced apoptosis in cultured cortical neurons." J Neurochem **101**(2): 498-505.
- Raoul, C., C. Barthelemy, et al. (2005). "Expression of a dominant negative form of Daxx in vivo rescues motoneurons from Fas (CD95)-induced cell death." J Neurobiol **62**(2): 178-188.
- Rathmell, J. C., C. J. Fox, et al. (2003). "Akt-directed glucose metabolism can prevent Bax conformation change and promote growth factor-independent survival." Mol Cell Biol **23**(20): 7315-7328.
- Reed, J. C. (2006). "Proapoptotic multidomain Bcl-2/Bax-family proteins: mechanisms, physiological roles, and therapeutic opportunities." Cell Death Differ **13**(8): 1378-1386.
- Ricart, K., R. J. J Pearson, et al. (2006). "Interactions between beta-neuregulin and neurotrophins in motor neuron apoptosis." J Neurochem **97**(1): 222-233.
- Righi, M., E. Tongiorgi, et al. (2000). "Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) induces dendritic targeting of BDNF and tyrosine kinase B mRNAs in hippocampal neurons through a phosphatidylinositol-3 kinase-dependent pathway." J Neurosci **20**(9): 3165-3174.
- Rodgers, E. and A. Theibert (2002). "Functions of PI 3-kinase in development of the nervous system." Int J Dev Neurosci **20**(3-5): 187-197.
- Rojo, A. I., M. Salinas, et al. (2004). "Regulation of Cu/Zn-superoxide dismutase expression via the phosphatidylinositol 3 kinase/Akt pathway and nuclear factor-kappaB." J Neurosci **24**(33): 7324-7334.
- Romashkova, J. and S. Makarov (1999). "NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling." Nature **401**(6748): 86-90.
- Rossoll, W. and G. Bassell (2009). "Spinal muscular atrophy and a model for survival of motor neuron protein function in axonal ribonucleoprotein complexes." Results Probl Cell Differ **48**: 289-326.
- Rossoll, W., S. Jablonka, et al. (2003). "Smn, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of beta-actin mRNA in growth cones of motoneurons." J Cell Biol **163**(4): 801-812.
- Rothgiesser, K. M., M. Fey, et al. (2010). "Acetylation of p65 at lysine 314 is important for late NF-kappaB-dependent gene expression." BMC Genomics **11**: 22.
- Roy, N., M. S. Mahadevan, et al. (1995). "The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy." Cell **80**(1): 167-178.
- Rudolph, D., W. Yeh, et al. (2000). "Severe liver degeneration and lack of NF-kappaB activation in NEMO/IKKgamma-deficient mice." Genes Dev **14**(7): 854-862.
- Russman, B. (2007). "Spinal muscular atrophy: clinical classification and disease heterogeneity." J Child Neurol **22**(8): 946-951.
- Ryu, H., K. Smith, et al. (2005). "Sodium phenylbutyrate prolongs survival and regulates expression of anti-apoptotic genes in transgenic amyotrophic lateral sclerosis mice." J Neurochem **93**(5): 1087-1098.

- Saha, R. N., X. Liu, et al. (2006). "Up-regulation of BDNF in astrocytes by TNF-alpha: a case for the neuroprotective role of cytokine." J Neuroimmune Pharmacol **1**(3): 212-222.
- Saha, R., A. Ghosh, et al. (2009). "TNF-alpha preconditioning protects neurons via neuron-specific up-regulation of CREB-binding protein." J Immunol **183**(3):
- Shou, Y., N. Li, et al. (2002). "NF-kappaB-mediated up-regulation of Bcl-X(S) and Bax contributes to cytochrome c release in cyanide-induced apoptosis." J Neurochem **81**(4): 842-852.
- Sakurai, H., S. Suzuki, et al. (2003). "Tumor necrosis factor-alpha-induced IKK phosphorylation of NF-kappaB p65 on serine 536 is mediated through the TRAF2, TRAF5, and TAK1 signaling pathway." J Biol Chem **278**(38): 36916-36923.
- Sakurai, M., T. Hayashi, et al. (2001). "Induction of phosphatidylinositol 3-kinase and serine-threonine kinase-like immunoreactivity in rabbit spinal cord after transient ischemia." Neurosci Lett **302**(1): 17-20.
- Salvesen, G. (1999). "Caspase 8: igniting the death machine." Structure **7**(10): R225-229.
- Salvesen, G. and V. Dixit (1997). "Caspases: intracellular signaling by proteolysis." Cell **91**(4): 443-446.
- Sanchez-Ponce, D., A. Muñoz, et al. (2010). "Casein kinase 2 and microtubules control axon initial segment formation." Mol Cell Neurosci.
- Sarbassov, D. D., D. A. Guertin, et al. (2005). "Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex." Science **307**(5712): 1098-1101.
- Sasaki, C. Y., T. J. Barberi, et al. (2005). "Phosphorylation of RelA/p65 on serine 536 defines an I{kappa}B{alpha}-independent NF- κ B pathway." J Biol Chem **280**(41): 34538-34547.
- Sato, K., Y. Eguchi, et al. (2000). "Regions essential for the interaction between Bcl-2 and SMN, the spinal muscular atrophy disease gene product." Cell Death Differ **7**(4): 374-383.
- Satoh, J., H. Tabunoki, et al. (2009). "Molecular network analysis suggests aberrant CREB-mediated gene regulation in the Alzheimer disease hippocampus." Dis Markers **27**(5): 239-252.
- Scharf, J. M., M. G. Endrizzi, et al. (1998). "Identification of a candidate modifying gene for spinal muscular atrophy by comparative genomics." Nat Genet **20**(1): 83-86.
- Scheidereit, C. (2006). "IkappaB kinase complexes: gateways to NF-kappaB activation and transcription." Oncogene **25**(51): 6685-6705.
- Scherer, D., J. Brockman, et al. (1995). "Signal-induced degradation of I kappa B alpha requires site-specific ubiquitination." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(24): 11259-11263.
- Schmidt-Ullrich, R., S. Mémet, et al. (1996). "NF-kappaB activity in transgenic mice: developmental regulation and tissue specificity." Development **122**(7): 2117-2128.
- Schober, A. and K. Unsicker (2001). "Growth and neurotrophic factors regulating development and maintenance of sympathetic preganglionic neurons." Int Rev Cytol **205**: 37-76.
- Schomer-Miller, B., T. Higashimoto, et al. (2006). "Regulation of IkappaB kinase (IKK) complex by IKKgamma-dependent phosphorylation of the T-loop and C terminus of IKKbeta." J Biol Chem **281**(22): 15268-15276.

BIBLIOGRAFÍA

- Schwaninger, M., I. Inta, et al. (2006). "NF-kappaB signalling in cerebral ischaemia." Biochem Soc Trans **34**(Pt 6): 1291-1294.
- Scotto d'Abusco, A., L. Politi, et al. (2010). "A peptidyl-glucosamine derivative affects IKKalpha kinase activity in human chondrocytes." Arthritis Res Ther **12**(1): R18.
- Segal, R. A. (2003). "Selectivity in neurotrophin signaling: theme and variations." Annu Rev Neurosci **26**: 299-330.
- Sen, R. and D. Baltimore (1986). "Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism." Cell **47**(6): 921-928.
- Sendtner, M., G. Kreutzberg, et al. (1990). "Ciliary neurotrophic factor prevents the degeneration of motor neurons after axotomy." Nature **345**(6274): 440-441.
- Sendtner, M., G. Pei, et al. (2000). "Developmental motoneuron cell death and neurotrophic factors." Cell Tissue Res **301**(1): 71-84.
- Senftleben, U., Y. Cao, et al. (2001). "Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway." Science **293**(5534): 1495-1499.
- Setola, V., M. Terao, et al. (2007). "Axonal-SMN (a-SMN), a protein isoform of the survival motor neuron gene, is specifically involved in axonogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(6): 1959-1964.
- Sha, W., H. Liou, et al. (1995). "Targeted disruption of the p50 subunit of NF-kappa B leads to multifocal defects in immune responses." Cell **80**(2): 321-330.
- Sharma, A., A. Lambrechts, et al. (2005). "A role for complexes of survival of motor neurons (SMN) protein with gemins and profilin in neurite-like cytoplasmic extensions of cultured nerve cells." Exp Cell Res **309**(1): 185-197.
- Shneider, N., M. Brown, et al. (2009). "Gamma motor neurons express distinct genetic markers at birth and require muscle spindle-derived GDNF for postnatal survival." Neural Dev **4**: 42.
- Shou, Y., N. Li, et al. (2002). "NF-kappaB-mediated up-regulation of Bcl-X(S) and Bax contributes to cytochrome c release in cyanide-induced apoptosis." J Neurochem **81**(4): 842-852.
- Sil, A., S. Maeda, et al. (2004). "IkappaB kinase-alpha acts in the epidermis to control skeletal and craniofacial morphogenesis." Nature **428**(6983): 660-664.
- Silos-Santiago, I., A. M. Fagan, et al. (1997). "Severe sensory deficits but normal CNS development in newborn mice lacking TrkB and TrkC tyrosine protein kinase receptors." Eur J Neurosci **9**(10): 2045-2056.
- Simon, C., S. Jablonka, et al. (2010). "Ciliary neurotrophic factor-induced sprouting preserves motor function in a mouse model of mild spinal muscular atrophy." Hum Mol Genet **19**(6): 973-986.
- Simpson, C. S. and B. J. Morris (2000). "Regulation of neuronal cell adhesion molecule expression by NF-kappa B." J Biol Chem **275**(22): 16879-16884.
- Singh, N., N. Singh, et al. (2006). "Splicing of a critical exon of human Survival Motor Neuron is regulated by a unique silencer element located in the last intron." Mol Cell Biol **26**(4): 1333-1346.
- Sizemore, N., N. Lerner, et al. (2002). "Distinct roles of the Ikappa B kinase alpha and beta subunits in liberating nuclear factor kappa B (NF-kappa B) from Ikappa B and in phosphorylating the p65 subunit of NF-kappa B." J Biol Chem **277**(6): 3863-3869.
- Smith, D., C. Tweed, et al. (2009). "Nuclear factor-kappaB activation in axons and Schwann cells in experimental sciatic nerve injury and its role in modulating

- axon regeneration: studies with etanercept." J Neuropathol Exp Neurol **68**(6): 691-700.
- Sole, C., X. Dolcet, et al. (2004). "The death receptor antagonist FAIM promotes neurite outgrowth by a mechanism that depends on ERK and NF-kapp B signaling." J Cell Biol **167**(3): 479-492.
- Soler, R., X. Dolcet, et al. (1999). "Receptors of the glial cell line-derived neurotrophic factor family of neurotrophic factors signal cell survival through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in spinal cord motoneurons." J Neurosci **19**(21): 9160-9169.
- Soler-Botija, C., I. Ferrer, et al. (2003). "Downregulation of Bcl-2 proteins in type I spinal muscular atrophy motor neurons during fetal development." J Neuropathol Exp Neurol **62**(4): 420-426.
- Solt, L., L. Madge, et al. (2007). "Interleukin-1-induced NF-kappaB activation is NEMO-dependent but does not require IKKbeta." J Biol Chem **282**(12): 8724-8733.
- Sompol, P., Y. Xu, et al. (2006). "NF-kappaB-associated MnSOD induction protects against beta-amyloid-induced neuronal apoptosis." J Mol Neurosci **29**(3): 279-288.
- Song, G., G. Ouyang, et al. (2005). "The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival." J Cell Mol Med **9**(1): 59-71.
- Song, W. and D. K. Lahiri (1998). "Molecular cloning of the promoter of the gene encoding the Rhesus monkey beta-amyloid precursor protein: structural characterization and a comparative study with other species." Gene **217**(1-2): 151-164.
- Sparacio, S., Y. Zhang, et al. (1992). "Cytokine regulation of interleukin-6 gene expression in astrocytes involves activation of an NF-kappa B-like nuclear protein." J Neuroimmunol **39**(3): 231-242.
- Strasswimmer, J., C. L. Lorson, et al. (1999). "Identification of survival motor neuron as a transcriptional activator-binding protein." Hum Mol Genet **8**(7): 1219-1226.
- Sumner, C. J. (2007). "Molecular mechanisms of spinal muscular atrophy." J Child Neurol **22**(8): 979-989.
- Sun, S. C. (2011). "Non-canonical NF-κB signaling pathway." Cell Res **21**(1): 71-85.
- Sun, W., T. Gould, et al. (2005). "Phosphorylation of c-Jun in avian and mammalian motoneurons in vivo during programmed cell death: an early reversible event in the apoptotic cascade." J Neurosci **25**(23): 5595-5603.
- Sunters, A., S. Fernández de Mattos, et al. (2003). "FoxO3a transcriptional regulation of Bim controls apoptosis in paclitaxel-treated breast cancer cell lines." J Biol Chem **278**(50): 49795-49805.
- Takada, Y., A. Mukhopadhyay, et al. (2003). "Hydrogen peroxide activates NF-kappa B through tyrosine phosphorylation of I kappa B alpha and serine phosphorylation of p65: evidence for the involvement of I kappa B alpha kinase and Syk protein-tyrosine kinase." J Biol Chem **278**(26): 24233-24241.
- Takano, H. and J. F. Gusella (2002). "The predominantly HEAT-like motif structure of huntingtin and its association and coincident nuclear entry with dorsal, an NF-kB/Rel/dorsal family transcription factor." BMC Neurosci **3**: 15.
- Tam, W. F., L. H. Lee, et al. (2000). "Cytoplasmic sequestration of rel proteins by IkappaBalpha requires CRM1-dependent nuclear export." Mol Cell Biol **20**(6): 2269-2284.

BIBLIOGRAFÍA

- Tamatani, M., Y. H. Che, et al. (1999). "Tumor necrosis factor induces Bcl-2 and Bcl-x expression through NF-kappaB activation in primary hippocampal neurons." *J Biol Chem* **274**(13): 8531-8538.
- Taylor, D., F. Jones, et al. (2005). "Stimulation of microglial metabotropic glutamate receptor mGlu2 triggers tumor necrosis factor alpha-induced neurotoxicity in concert with microglial-derived Fas ligand." *J Neurosci* **25**(11): 2952-2964.
- Tanaka, S., M. Takehashi, et al. (2002). "Generation of reactive oxygen species and activation of NF-kappaB by non-Abeta component of Alzheimer's disease amyloid." *J Neurochem* **82**(2): 305-315.
- Ting, C. H., C. W. Lin, et al. (2007). "Stat5 constitutive activation rescues defects in spinal muscular atrophy." *Hum Mol Genet* **16**(5): 499-514.
- Tolosa, L., V. Caraballo-Miralles, et al. (2011). "TNF- α potentiates glutamate-induced spinal cord motoneuron death via NF- κ B." *Mol Cell Neurosci* **46**(1): 176-186.
- Traenckner, E., H. Pahl, et al. (1995). "Phosphorylation of human I kappa B-alpha on serines 32 and 36 controls I kappa B-alpha proteolysis and NF-kappa B activation in response to diverse stimuli." *EMBO J* **14**(12): 2876-2883.
- Treanor, J., L. Goodman, et al. (1996). "Characterization of a multicomponent receptor for GDNF." *Nature* **382**(6586): 80-83.
- Trupp, M., E. Arenas, et al. (1996). "Functional receptor for GDNF encoded by the c-ret proto-oncogene." *Nature* **381**(6585): 785-789.
- Tsai, L., M. Tsai, et al. (2008). "Restoring Bcl-x(L) levels benefits a mouse model of spinal muscular atrophy." *Neurobiol Dis* **31**(3): 361-367.
- Tsuchida, T., M. Ensini, et al. (1994). "Topographic organization of embryonic motor neurons defined by expression of LIM homeobox genes." *Cell* **79**(6): 957-970.
- Ugolini, G., C. Raoul, et al. (2003). "Fas/tumor necrosis factor receptor death signaling is required for axotomy-induced death of motoneurons in vivo." *J Neurosci* **23**(24): 8526-8531.
- Valerio, A., F. Boroni, et al. (2006). "NF-kappaB pathway: a target for preventing beta-amyloid (A β)-induced neuronal damage and A β 42 production." *Eur J Neurosci* **23**(7): 1711-1720.
- Vallabhapurapu, S. and M. Karin (2009). "Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system." *Annu Rev Immunol* **27**: 693-733.
- Varon, S., M. Manthorpe, et al. (1979). "Cholinergic neuronotrophic factors: I. Survival, neurite outgrowth and choline acetyltransferase activity in monolayer cultures from chick embryo ciliary ganglia." *Brain Res* **173**(1): 29-45.
- Vauzour, D., K. Vafeiadou, et al. (2007). "Activation of pro-survival Akt and ERK1/2 signalling pathways underlie the anti-apoptotic effects of flavanones in cortical neurons." *J Neurochem* **103**(4): 1355-1367.
- Vergara, C. and B. Ramirez (2004). "CNTF, a pleiotropic cytokine: emphasis on its myotrophic role." *Brain Res Brain Res Rev* **47**(1-3): 161-173.
- Vermeulen, L., G. De Wilde, et al. (2003). "Transcriptional activation of the NF-kappaB p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1)." *EMBO J* **22**(6): 1313-1324.
- Vollgraf, U., M. Wegner, et al. (1999). "Activation of AP-1 and nuclear factor-kappaB transcription factors is involved in hydrogen peroxide-induced apoptotic cell death of oligodendrocytes." *J Neurochem* **73**(6): 2501-2509.
- Wagey, R., S. Pelech, et al. (1998). "Phosphatidylinositol 3-kinase: increased activity and protein level in amyotrophic lateral sclerosis." *J Neurochem* **71**(2): 716-722.
- Walensky, L. D. (2006). "BCL-2 in the crosshairs: tipping the balance of life and death." *Cell Death Differ* **13**(8): 1339-1350.

- Walton, M. and I. Dragunow (2000). "Is CREB a key to neuronal survival?" Trends Neurosci **23**(2): 48-53.
- Wang, D., S. Westerheide, et al. (2000). "Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of RelA/p65 on Ser529 is controlled by casein kinase II." J Biol Chem **275**(42): 32592-32597.
- Warita, H., Y. Manabe, et al. (2001). "Early decrease of survival signal-related proteins in spinal motor neurons of presymptomatic transgenic mice with a mutant SOD1 gene." Apoptosis **6**(5): 345-352.
- Webster, G. and N. Perkins (1999). "Transcriptional cross talk between NF-kappaB and p53." Mol Cell Biol **19**(5): 3485-3495.
- Wei, M., W. Zong, et al. (2001). "Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death." Science **292**(5517): 727-730.
- Weih, F., D. Carrasco, et al. (1995). "Multiorgan inflammation and hematopoietic abnormalities in mice with a targeted disruption of RelB, a member of the NF-kappa B/Rel family." Cell **80**(2): 331-340.
- Weston, C., K. Balmanno, et al. (2003). "Activation of ERK1/2 by deltaRaf-1:ER* represses Bim expression independently of the JNK or PI3K pathways." Oncogene **22**(9): 1281-1293.
- Westphal, D., G. Dewson, et al. (2010). "Molecular biology of Bax and Bak activation and action." Biochim Biophys Acta.
- Wichterle, H., I. Lieberam, et al. (2002). "Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons." Cell **110**(3): 385-397.
- Willis, S., J. Fletcher, et al. (2007). "Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak." Science **315**(5813): 856-859.
- Willis, S. N. and J. M. Adams (2005). "Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis." Curr Opin Cell Biol **17**(6): 617-625.
- Wolf, B. and D. Green (1999). "Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases." J Biol Chem **274**(29): 20049-20052.
- Wood, J. N. (1995). "Regulation of NF-kappa B activity in rat dorsal root ganglia and PC12 cells by tumour necrosis factor and nerve growth factor." Neurosci Lett **192**(1): 41-44.
- Worby, C., Q. Vega, et al. (1996). "Glial cell line-derived neurotrophic factor signals through the RET receptor and activates mitogen-activated protein kinase." J Biol Chem **271**(39): 23619-23622.
- Workman, E., L. Saieva, et al. (2009). "A SMN missense mutation complements SMN2 restoring snRNPs and rescuing SMA mice." Hum Mol Genet **18**(12): 2215-2229.
- Woronicz, J., X. Gao, et al. (1997). "IkappaB kinase-beta: NF-kappaB activation and complex formation with IkappaB kinase-alpha and NIK." Science **278**(5339): 866-869.
- Xiao, G., A. Fong, et al. (2004). "Induction of p100 processing by NF-kappaB-inducing kinase involves docking IkappaB kinase alpha (IKKalpha) to p100 and IKKalpha-mediated phosphorylation." J Biol Chem **279**(29): 30099-30105.
- Xie, Q. W., Y. Kashiwabara, et al. (1994). "Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase." J Biol Chem **269**(7): 4705-4708.
- Xu, W., L. Chi, et al. (2005). "Increased production of reactive oxygen species contributes to motor neuron death in a compression mouse model of spinal cord injury." Spinal Cord **43**(4): 204-213.

BIBLIOGRAFÍA

- Xu, Z., S. Chen, et al. (2006). "Neuroprotective effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis." Neurochem Res **31**(10): 1263-1269.
- Yalcin, A., E. Koulich, et al. (2003). "Apoptosis in cerebellar granule neurons is associated with reduced interaction between CREB-binding protein and NF-kappaB." J Neurochem **84**(2): 397-408.
- Yamamoto, Y. and C. Henderson (1999). "Patterns of programmed cell death in populations of developing spinal motoneurons in chicken, mouse, and rat." Dev Biol **214**(1): 60-71.
- Yamamoto, Y., U. Verma, et al. (2003). "Histone H3 phosphorylation by IKK-alpha is critical for cytokine-induced gene expression." Nature **423**(6940): 655-659.
- Yang, F., E. Tang, et al. (2003). "IKK beta plays an essential role in the phosphorylation of RelA/p65 on serine 536 induced by lipopolysaccharide." J Immunol **170**(11): 5630-5635.
- Yeo, W. and J. Gautier (2004). "Early neural cell death: dying to become neurons." Dev Biol **274**(2): 233-244.
- Yilmaz, Z. B., D. S. Weih, et al. (2003). "RelB is required for Peyer's patch development: differential regulation of p52-RelB by lymphotoxin and TNF." EMBO J **22**(1): 121-130.
- Yoon, C., Z. Korade, et al. (2008). "Protein kinase A-induced phosphorylation of the p65 subunit of nuclear factor-kappaB promotes Schwann cell differentiation into a myelinating phenotype." J Neurosci **28**(14): 3738-3746.
- Yoon, S., P. Casaccia-Bonnel, et al. (1998). "Competitive signaling between TrkA and p75 nerve growth factor receptors determines cell survival." J Neurosci **18**(9): 3273-3281.
- Yu, Z., D. Zhou, et al. (1999). "Lack of the p50 subunit of nuclear factor-kappaB increases the vulnerability of hippocampal neurons to excitotoxic injury." J Neurosci **19**(20): 8856-8865.
- Yu, Z., D. Zhou, et al. (2000). "Neuroprotective role for the p50 subunit of NF-kappaB in an experimental model of Huntington's disease." J Mol Neurosci **15**(1): 31-44.
- Zandi, E., D. Rothwarf, et al. (1997). "The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation." Cell **91**(2): 243-252.
- Zhang, H., L. Xing, et al. (2006). "Multiprotein complexes of the survival of motor neuron protein SMN with Gemins traffic to neuronal processes and growth cones of motor neurons." J Neurosci **26**(33): 8622-8632.
- Zhang, H. L., F. Pan, et al. (2003). "Active transport of the survival motor neuron protein and the role of exon-7 in cytoplasmic localization." J Neurosci **23**(16): 6627-6637.
- Zhang, M. L., C. L. Lorson, et al. (2001). "An in vivo reporter system for measuring increased inclusion of exon 7 in SMN2 mRNA: potential therapy of SMA." Gene Ther **8**(20): 1532-1538.
- Zhang, Z., O. Kelemen, et al. (2011). "Synthesis and characterization of pseudocantharidins, novel phosphatase modulators that promote the inclusion of exon 7 into the survival of motoneuron (SMN) pre-mRNA." J Biol Chem.
- Zhang, J., M. A. Warren, et al. (2007). "NFkappaB1/p50 is not required for tumor necrosis factor-stimulated growth of primary mammary epithelial cells: implications for NFkappaB2/p52 and RelB." Endocrinology **148**(1): 268-278.
- Zhang, L., D. Xing, et al. (2008). "Bim(L) displacing Bcl-x(L) promotes Bax translocation during TNFalpha-induced apoptosis." Apoptosis **13**(7): 950-958.

- Zhang, X., J. Chen, et al. (2002). "Intranuclear localization of apoptosis-inducing factor (AIF) and large scale DNA fragmentation after traumatic brain injury in rats and in neuronal cultures exposed to peroxynitrite." *J Neurochem* **82**(1): 181-191.
- Zhang, Z., F. Lotti, et al. (2008). "SMN deficiency causes tissue-specific perturbations in the repertoire of snRNAs and widespread defects in splicing." *Cell* **133**(4): 585-600.
- Zheng, T., S. Hunot, et al. (2000). "Deficiency in caspase-9 or caspase-3 induces compensatory caspase activation." *Nat Med* **6**(11): 1241-1247.
- Zhong, H., M. J. May, et al. (2002). "The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1." *Mol Cell* **9**(3): 625-636.
- Zhong, H., R. Voll, et al. (1998). "Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300." *Mol Cell* **1**(5): 661-671.
- Zhou, F., Y. Yang, et al. (2011). "Bcl-2 and Bcl-xL play important roles in the crosstalk between autophagy and apoptosis." *FEBS J* **278**(3): 403-413.
- Zong, W. X., L. C. Edelstein, et al. (1999). "The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-kappaB that blocks TNFalpha-induced apoptosis." *Genes Dev* **13**(4): 382-387.
- Zubenko, G., J. Stiffler, et al. (1999). "Reductions in brain phosphatidylinositol kinase activities in Alzheimer's disease." *Biol Psychiatry* **45**(6): 731-736.