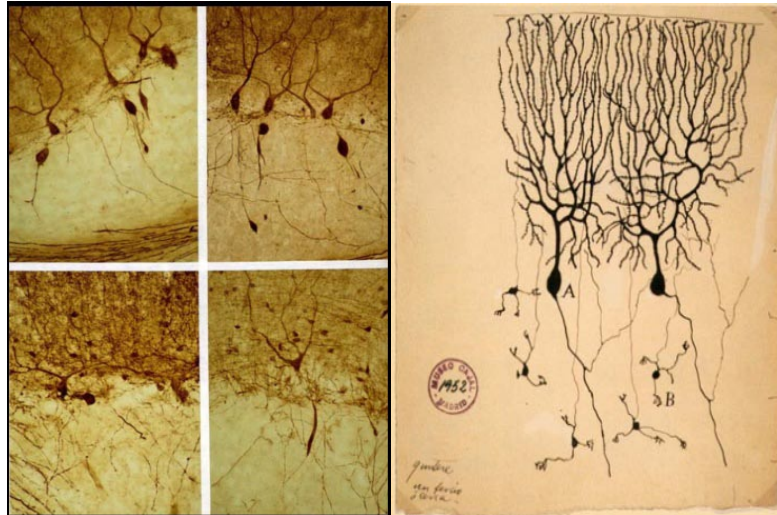


**Resumen de la ponencia en inglés "Ataxia espinocerebelosa tipo 1 (SCA1): nuevas rutas moleculares reguladas por ataxina\_1 que conducen a neurodegeneración" presentada en el Congreso Anual de EUROSCA en Palma de Mallorca, 5 Diciembre 2008.**

**Antoni Matilla Dueñas, Investigador "Miguel Servet" en Neurociencias, Coordinador Investigación Básica en Heredoataxias y Enfermedades Neurodegenerativas, Departamento de Neurociencias y Servicio de Neurología, Instituto de Investigación en Ciencias de la Salud Germans Trias i Pujol (IGTP), Universidad Autónoma de Barcelona, Badalona.**

Los resultados que voy a presentar en esta ponencia son los obtenidos por mi grupo durante el período de financiación por el proyecto EUROSCA de la Comisión Europea desde 2004 hasta la fecha. Estos estudios realizados no hubieran sido posibles sin la financiación generosa recibida de EUROSCA.

La ataxia espinocerebelosa tipo 1 (las siglas en inglés: SCA1) es una ataxia dominante caracterizada por ataxia de la marcha y otros síntomas clínicos variables que incluyen anomalías motoras oculares, síntomas piramidales y extrapiramidales (de entre éstos el más frecuente es la distonía), neuropatía periférica y déficits cognitivos. Estos síntomas neurológicos se producen por una pérdida progresiva de neuronas en el cerebelo, el órgano esencial para coordinar los movimientos del cuerpo, como son los núcleos dentados, las células de Purkinje, las células grano y los pedúnculos cerebelosos medios. También degeneran el tronco cerebral (protuberancia y olivas inferiores) y los núcleos mesencefálicos para los pares de nervios craneales tercero y cuarto. Además, se observa una desmielinización en las columnas posteriores y los tractos espinocerebelosos. SCA1 está causada por la expansión del aminoácido glutamina en la proteína ataxina\_1 (Atxn1) como consecuencia de la expansión del triplete CAG (a partir de 40 repeticiones) en la zona codificante del gen SCA1 localizado en el brazo corto del cromosoma 6. Las primeras neuronas afectadas son las células de Purkinje de la corteza cerebelosa cuya pérdida progresiva se manifiesta en forma de atrofia cerebelosa progresiva que se detecta mediante técnicas de neuroimagen con resonancia magnética en pacientes con la enfermedad.



**Figura 1.** A la derecha, la neurona de Purkinje del cerebelo como la dibujó nuestro Premio Nobel Santiago Ramón y Cajal con las extensas y complejas arborizaciones dendríticas típicas. A la izquierda las neuronas de Purkinje anormales que se observan en la corteza cerebelosa de un paciente con SCA1, con claras pérdidas de arborizaciones dendríticas y deformaciones axonales típicas. Las neuronas de Purkinje conducen la información de salida del cerebelo hacia la corteza motora, al tronco cerebral, al sistema vestibular (posición y equilibrio) y a la médula espinal. La pérdida de estas neuronas impide al cerebelo transmitir la información recibida desde los músculos y órganos sensoriales de postura para ajustar los movimientos ordenados desde la corteza motora, con lo que los músculos de las extremidades no reciben la coordinación necesaria para realizar correctamente el movimiento.

La proteína ataxina\_1 que es responsable de causar SCA1 tiene una amplia distribución celular. Se localiza en el núcleo de las neuronas en los tejidos nerviosos y en el citoplasma en las células de los tejidos periféricos. En las neuronas de Purkinje presenta una distribución en el núcleo y en el citoplasma. Se distinguen dos dominios diferenciados en la proteína. En la región amino terminal se encuentra la secuencia de glutaminas mientras que en la región opuesta, la carboxilo terminal, se identifica el dominio AXH que es un dominio que participa en la interacción con proteínas. Muy cerca de este dominio también se identifica un sitio de fosforilación por la proteína quinasa B, también conocida como proteína quinasa AKT, y un sitio próximo que localiza a la proteína en el núcleo celular.

Hasta la fecha se han generado 4 modelos animales que han servido para investigar los mecanismos patogénicos subyacentes de la enfermedad y que han de servir para probar tratamientos terapéuticos. De todos estos modelos, hablaré de dos por que fueron los primeros y han aportado conocimientos muy relevantes para conocer los mecanismos patofisiológicos de la enfermedad. El primer modelo animal que generamos se hizo en 1995 en Minneapolis en colaboración con nuestro grupo en Houston donde expresamos la forma mutada de la proteína ataxina\_1 humana en las células de Purkinje del cerebelo mediante un promotor específico. Estos ratones mimetizan la enfermedad por desarrollar a las pocas semanas déficits motores y ataxia y degeneración de las neuronas de Purkinje. A nivel neuropatológico observamos que en edades muy tempranas, los ratones empiezan a

manifestar alteraciones morfológicas en las células de Purkinje. Vimos que las arborizaciones dendríticas pierden complejidad y disminuye el número de ramas y espinas proximales. Estos componentes de las neuronas son imprescindibles para recibir la información sináptica. A las pocas semanas, detectamos la presencia de vacuolas en el cuerpo celular de la neurona de Purkinje. Importantemente, estas alteraciones se presentan en los ratones sin ataxia, con lo que concluimos que antes que se detecten síntomas neurológicos se produce disfunción neuronal importante. Más adelante, se observa gliosis (invasión de células gliales) y pérdida de arborización dendrítica en la capa molecular de la corteza cerebelosa donde se distribuyen algunas células de Purkinje heterotópicas. Algunas neuronas a los meses de vida de los ratones, cuando éstos ya manifiestan claramente ataxia, presentan agregados intranucleares que son inmunoreactivos por la presencia de ataxina\_1 y ubiquitina. Finalmente las neuronas se van perdiendo y en fases más avanzadas, encontramos pocas células de Purkinje y una clara atrofia cerebelosa. Estas observaciones con el microscopio nos permitieron detectar claramente dos fases de progresión de la enfermedad: una fase temprana durante los 3 primeros meses de vida caracterizada por la ausencia de ataxia y síntomas neurológicos pero con alteraciones morfológicas neuronales tempranas importantes en el cerebelo (pérdida de dendritas y espinas proximales, vacuolización citoplasmática e invaginaciones de la membrana de la célula de Purkinje) y una fase tardía caracterizada por ataxia y déficits motores, de balance, y de postura acompañadas por pérdida significativa del número de neuronas de Purkinje, atrofia cerebelosa, y presencia de agregados intranucleares. Estos hallazgos creemos también ocurren en pacientes humanos.

Para entender la función biológica de la proteína ataxina\_1, en 1998 generamos en Houston un animal *knockout* para la ataxina\_1, es decir quitamos parte del gen *Sca1* que codifica para la proteína, con lo que estos animales tienen un déficit absoluto de *Atxn1*. Así la función se estudia en este caso por defecto. Estos animales *knockout* se caracterizan por no presentar ataxia ni neurodegeneración, pero manifiestan unos déficits del cerebelo (estructura nerviosa responsable de coordinación motora) y del hipocampo (estructura nerviosa implicada en procesos de aprendizaje a corto término y cognitivos) característicos e importantes, que demuestra que la proteína es necesaria para la correcta función de estas dos estructuras nerviosas. De todos estos resultados, concluimos que la enfermedad está causada por unos efectos de ganancia de función debidos a la expansión de poliglutamina en ataxina\_1, y comprobamos que la pérdida de la función biológica de la proteína ataxina\_1 también contribuye a algunos síntomas neurológicos, principalmente motores y vestibulares, particularmente en las fases tempranas de la enfermedad (durante los primeros 3 meses).

Recientemente, utilizando la técnica de *microarrays* con *chips* de silicio hemos identificado las rutas moleculares que están alteradas en los ratones *knockout* de *Sca1* y que son responsables de los déficits motores. Hemos descubierto que las rutas de señalización molecular mediadas por Wnt, hormonas retinoidea y tiroidea, y dopaminérgica, que todas

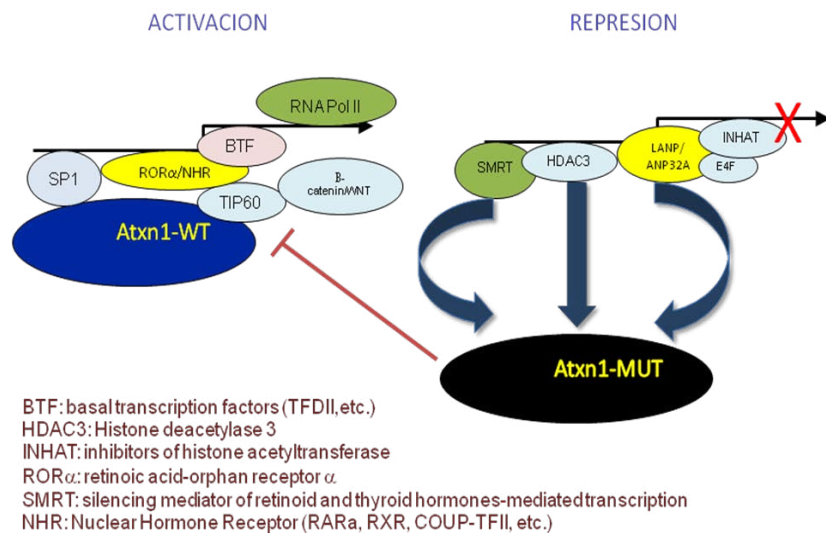
ellas participan en la diferenciación del cerebelo y especificación neuronal en regiones nerviosas responsables de funciones motoras, están reguladas por la ataxina\_1. También comprobamos que estas vías están alteradas en los ratones transgénicos de SCA1, con lo que creemos que la ataxia y los déficits motores que se manifiestan en fases tempranas en SCA1 son debidos al incorrecto funcionamiento de estas rutas moleculares en las neuronas involucradas. Entre las proteínas que se identificaron que están alteradas en los ratones transgénicos y *knockout* de Sca1, nos llamó la atención, por varias razones que explicaré en breve, el receptor de la dopamina Drd2. El receptor Drd2 es imprescindible para el correcto funcionamiento de aquellas neuronas encargadas de realizar correctamente las funciones motoras en el cerebro: tanto las que sintetizan el neurotransmisor dopamina (un neurotransmisor es una molécula que media la comunicación entre neuronas) en el mesencéfalo ventral, como aquellas que reciben y usan la dopamina en los ganglios basales, principalmente. De hecho, alteraciones de este receptor en estas dos regiones nerviosas son responsables de las enfermedades de Parkinson y de Huntington, dos enfermedades clásicas que son debidas a anomalías motoras. Agonistas del Drd2, es decir moléculas/drogas que se unen y activan el receptor Drd2 supliendo el papel que haría el neurotransmisor dopamina, se están usando actualmente con relativo éxito (entre otras drogas), para paliar los déficits motores en estas dos enfermedades. A nosotros nos intrigó que el sistema dopaminérgico, que está muy bien estudiado en los ganglios basales pero que en principio no ha sido descrita su importancia en el cerebelo (que es el órgano nervioso implicado en las ataxias) también estuviera alterado en esta estructura nerviosa. Buscando en la bibliografía nos dimos cuenta que se ha menospreciado la importancia de la dopamina como mediadora de las funciones motoras en el cerebelo, ya que hay evidencias muy recientes que indican que este es el caso, y particularmente pienso que en los años venideros se aportarán nuevos hallazgos de la importancia de la neurotransmisión por dopamina en las funciones biológicas del cerebelo.

La siguiente pregunta científica que nos hicimos fue cómo la proteína ataxina\_1 regula los niveles del receptor dopaminérgico Drd2. Para contestar esta pregunta diseñé unos experimentos con cultivos de neuronas que sintetizan dopamina, es decir que tienen toda la maquinaria celular para orquestar la fabricación de dopamina, en los que pudimos demostrar que ataxina\_1 de hecho regula la fabricación del receptor de la dopamina Drd2. Esto lo hace a través de la región AXH de la ataxina\_1 y lo hace mediante la interacción con el factor de transcripción Sp1 en el gen Drd2. Nos sorprendió observar que la expansión de glutaminas en la Atxn1 (que causa ataxia en pacientes) impide la interacción con Sp1 y también la fabricación del receptor dopaminérgico. Esto lo confirmamos en el cerebelo de ratones transgénicos. Esto claramente demuestra que rutas que están reguladas por ataxina\_1 en el sistema nervioso se ven alteradas por la mutación. En otras palabras, que la función de la ataxina\_1 contribuye a las alteraciones neuronales en SCA1 y por tanto que la enfermedad también es producida por alteraciones de la función de ataxina\_1, y no tan sólo por una simple ganancia de función como se creía hasta entonces. El trabajo ahora es comprobar si proporcionando agonistas de la ruta dopaminérgica Drd2 en pacientes con

SCA1 se pueden aminorar los síntomas neurológicos. Como además del receptor Drd2 también identificamos otros genes y proteínas regulados por ataxina\_1 y pensamos que también pueden contribuir a la enfermedad, acabamos de iniciar un proyecto complejo para identificar exactamente todas estas rutas que están reguladas por ataxina\_1 para hacer una cartografía molecular de las proteínas y genes que pueden estar involucrados en SCA1.

Además de identificar que el sistema dopaminérgico está regulado por Atxn1 y está alterado en SCA1, la interacción de Atxn1 con activadores de la transcripción (Sp1, demostrado por mi grupo en 2007) y con otros activadores y represores de la transcripción, algunos de ellos, no todos, identificados por mi y colaboradores en los últimos 10 años como son Tip60, Lanp/Anp32a, HDAC3 y SMRT nos permite proponer la siguiente hipótesis de cómo la mutación en ataxina\_1 provoca alteraciones en la transcripción de algunos genes que están regulados por los factores Sp1 y hormonas tiroideas y retinoideas. Proponemos que Atxn1 es un co-regulador de la transcripción mediada por Sp1 y receptores nucleares de las hormonas retinoidea y tiroidea, como por ejemplo el receptor órfano del ácido retinoico ROR $\alpha$ , pero no es el único. Mediante la interacción de ataxina\_1 con estos factores activadores de la transcripción se mantiene un estado conformacional de la cromatina (ADN) activo ya que se permite reclutar la maquinaria basal transcripcional y activar la transcripción y fabricación de proteínas. Por el contrario, en los pacientes con SCA1 la ataxina\_1 con una expansión (mutación) del amino ácido glutamina no puede interactuar con Sp1 y otros activadores de la transcripción (o lo hace con mucha menor intensidad), con lo que la activación transcripcional no tiene lugar o está muy disminuida. Esto explicaría por qué detectamos niveles más bajos de Drd2 en ratones transgénicos de SCA1. En ausencia de las hormonas, la cromatina está compacta por la presencia de inhibidores de la acetilación de histonas, y por lo tanto se encuentra en un estado represivo. La transcripción de los genes y por lo tanto la fabricación de proteínas no tiene lugar porque no se puede activar la maquinaria celular adecuada. La proteína mutada secuestra estos factores permitiendo que se pase del estado represivo al activo y desinhibir la transcripción génica. Las consecuencias son nefastas para las neuronas ya que se producen proteínas que no se necesitan cuando no son necesarias, y se dejan de fabricar proteínas cuando son necesarias. Esto hace que las neuronas enfermen, presenten disfunciones y finalmente se mueran. Esta es la hipótesis que nosotros hemos propuesto. Ahora queda mucho trabajo por hacer para evitar que esto suceda.

PROMOTOR DE GEN (p.ej. DRD2): con elementos de unión a SP1 y receptores nucleares de hormonas retinoideas y tiroideas



**Figura 2.** De cómo la ataxina\_1 sana y mutada regula o desregula la transcripción de genes en las neuronas del cerebelo. Hipótesis propuesta por Antoni Matilla Dueñas.

Durante la segunda parte de mi ponencia, hablé sobre una proteína que describí en 1997 por interactuar con ataxina\_1 y estar implicada en SCA1, y en particular expliqué los motivos por los que me interesa mucho esta proteína desde el punto de vista científico. La proteína se llama LANP por las letras abreviadas en inglés de proteína nuclear acídica rica en leucinas. Esta es una proteína que se encuentra casi exclusivamente en el sistema nervioso central, y aquí muy enriquecida en la corteza motora y en las células de Purkinje del cerebelo, regiones nerviosas que están afectadas en SCA1. Además de interactuar con la ataxina\_1 mutada y es “secuestrada” en SCA1, participa en dos procesos claves celulares: inhibe la actividad de defosforilación de la fosfatasa PP2 (por lo que promueve la fosforilación de proteínas afectando las funciones de éstas) y es un componente activo que participa en la inhibición de acetilación de histonas. En otras palabras, Lanp es un represor activo de la transcripción. En el año 2005, descubrí que esta proteína forma parte de una familia de proteínas altamente conservadas durante la evolución (se encuentra en plantas, en invertebrados y vertebrados), hallé varios nuevos miembros y propuse una nueva nomenclatura para la familia de proteínas nucleares acídicas así como la estructura tridimensional de los miembros de esta familia mediante un análisis informático complejo que hice de su secuencia. El hecho de que Lanp sea una proteína que se ha conservado durante la evolución de los organismos y forme una familia de miembros muy similares indica que su función no se ha perdido con el paso de los miles de millones de años que han tenido lugar, por lo que se deduce la importancia de la misma al ser necesaria ya que esta función se ha ido “reforzando” mediante la generación de otros miembros de la familia. Muy recientemente hemos demostrado que si quitamos la proteína de las neuronas alterando su función, las neuronas mueren, por lo que deducimos que es una proteína imprescindible para la correcta supervivencia neuronal. Ahora queremos restablecer la correcta función biológica de Lanp mediante por ejemplo estrategias de transferencia

génica para evitar que la neurona se muera en SCA1. Otra razón por la que me interesa mucho continuar trabajando con Lanp es porque Lanp está implicada en la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas. Pienso que si somos capaces de bloquear la interacción de Lanp con PP2 podemos impedir que en los pacientes de Alzheimer se lleven a cabo los procesos neurodegenerativos. Esto lo vamos a realizar en colaboración con investigadores de la Universidad Autónoma de Barcelona con unos modelos de ratones que presentan la enfermedad de Alzheimer.

En conclusión, quiero poner de relieve la importancia de realizar investigación en ciencia básica y traslacional como la que estoy llevando a cabo. Esta investigación es imprescindible para comprender los procesos que ocurren en el interior de las neuronas y que conducen a los procesos neurodegenerativos en los pacientes con ataxia. Si no sabemos cómo todo esto ocurre a nivel biológico, es muy difícil poder diseñar estrategias terapéuticas para impedirlo. Tengo mucho interés en trasladar todos estos resultados obtenidos de la investigación básica al diseño de nuevas terapias, que sean efectivas y selectivas. Para ello, estamos en proceso de identificar nuevas dianas de interés terapéutico, no sólo para las ataxias sino también para otras enfermedades neurodegenerativas. Los retos que me he marcado para los próximos años incluyen probar en modelos animales algunas de estas terapias para comprobar si son eficaces a la hora de impedir, o al menos, retrasar los procesos moleculares neurodegenerativos. Si esto es así, entonces diseñar y proceder con ensayos clínicos en pacientes.

Para acabar el resumen de mi ponencia, quiero agradecer enormemente al Ministerio Español de Ciencia e Innovación, al Ministerio Español de Sanidad y al Instituto de Salud Carlos III (además de la Comisión Europea por el proyecto EUROSCA) por los fondos que recientemente me han otorgado para continuar todas estas investigaciones en nuestro país. Sin financiación a proyectos científicos es imposible realizar los esfuerzos que estamos haciendo para descifrar cómo se desencadena la ataxia e intentar evitarlo. Aprovecho también desde aquí para insistir a los que realizan las políticas científicas en nuestro país de la necesidad urgente de promocionar e incrementar la financiación pública en ataxias y enfermedades neurodegenerativas. Si bien es cierto que el gasto de los presupuestos Generales del Estado en investigación ha aumentado considerablemente en los últimos años en España, todavía la cantidad asignada no está al nivel ni a la altura que el país necesita y que la Sociedad reclama. Y en esto, las Asociaciones de pacientes podéis y tenéis el derecho de exigir a nuestros gobernantes que inviertan en ciencia. Porque de esta inversión, nos hemos de beneficiar todos.