



**Título:** REGULACIÓN POR ÓXIDO NÍTRICO DE LA EXPRESIÓN EN MEMBRANA DE CANALES DE FUGA DE POTASIO EN MOTONEURONAS: POSIBLE IMPLICACIÓN EN LA SENSIBILIZACIÓN A ESTÍMULOS EXCITOTÓXICOS

**Nombre:** GÓMEZ PÉREZ, LAURA

**Universidad:** Universidad de Cádiz

**Departamento:** BIOMEDICINA, BIOTECNOLOGÍA Y SALUD PÚBLICA

**Fecha de lectura:** 16/07/2012

**Programa de doctorado:** DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD

**Dirección:**

> **Director:** Bernardo Moreno López

**Tribunal:**

> **presidente:** Rosario Osta Pinzolas

> **secretario:** Federico Portillo Pacheco

> **vocal:** ANTONIO CAMPOS CARO

> **vocal:** DAVID GONZÁLEZ FORERO

> **vocal:** Rosa María Soler Tatché

> **vocal:** ANA GARCERÁ TERUEL

> **vocal:** JOSÉ ANTONIO ANDRADES GOMEZ

**Descriptores:**

> NEUROFISIOLOGIA

> NEUROCIENCIAS

**El fichero de tesis** no ha sido incorporado al sistema.

**Resumen:** RESUMEN

La hiperexcitabilidad puede sensibilizar a las neuronas a la excitotoxicidad, principal causa de muerte de las neuronas durante el desarrollo de muchas enfermedades neurodegenerativas, así como tras una lesión en el SNC. Por ello, es importante conocer los mecanismos que regulan la excitabilidad de las neuronas. En este sentido, nuestro grupo ha descrito que la activación persistente (> 4 horas) de la cascada óxido nítrico (NO)/GMPc/proteína kinasa G (PKG), tanto exógena como endógena inducida tras la lesión del nervio hipogloso (nXII), produce un aumento de la excitabilidad de las motoneuronas del núcleo hipogloso (MNHs) mediante la inhibición de las corrientes de fuga de K<sup>+</sup> tipo TASK. La primera parte de este trabajo se ha dirigido a estudiar el mecanismo a través del cual esta vía de señalización inhibe a estas corrientes. Para ello, hemos estudiado mediante western blot la expresión de posibles intermediarios de la vía en el núcleo hipogloso (NH) de rata



neonatal en presencia de un donante de vida media larga de NO (DETA/NO) y de distintos inhibidores de esta vía de señalización. El tratamiento prolongado con DETA/NO no alteró la expresión de las subunidades que conforman el canal (TASK-1 y TASK-3), pero sí aumentó la expresión de la pequeña GTPasa RhoA, así como los niveles de la forma activa de su factor de transcripción ATF-1, de una forma dependiente de GMPc y PKG. Además, DETA/NO también indujo un aumento de los niveles de la proteína S100A10 de una forma dependiente de ROCK, el principal efector de RhoA. S100A10 confiere a las subunidades TASK-1 una señal de localización en retículo endoplásmico (RE). Mediante experimentos de fraccionamiento subcelular en gradiente de sacarosa determinamos, que el tratamiento crónico con DETA/NO producía un aumento de los niveles de la subunidad TASK-1 en las fracciones de ricas en RE en detrimento de aquellas ricas en membrana plasmática por un mecanismo dependiente de ROCK en el NH de rata neonatal. Además, la lesión del nXII de ratas neonatales indujo también un aumento de expresión de S100A10 en el lado lesionado del NH con respecto al no lesionado, que no se produjo cuando los animales se trataron tras la lesión con un inhibidor de la NOS (L-NAME). Así, los resultados obtenidos en esta primera parte de la tesis sugieren que la activación persistente de la vía de señalización NO/GMPc/PKG produce la inhibición de las corrientes TASK al inducir un aumento en la expresión de S100A10 mediado por el sistema RhoA/ROCK. S100A10 confiere a la subunidad TASK-1 una señal de localización en RE, que reduce su tráfico hacia la membrana, y por tanto, inhibe estas corrientes. Este mecanismo parece ser también responsable de la inhibición de las corrientes TASK que acontece tras la lesión axonal in vivo.

La segunda parte de este trabajo, se ha dedicado a la caracterización de la expresión de S100A10 y TASK-1 en la línea celular de motoneuronas NSC-34, con el objetivo de testar a esta línea celular como modelo experimental para el estudio de la vía de señalización NO/S100A10/TASK-1. Estas células podrían ser útiles en el estudio de la regulación de la expresión de S100A10 y TASK-1, que parecen tener algún punto de regulación común en este modelo. La expresión de S100A10 aumentó en las células NSC-34 diferenciadas (NSC-34d) en respuesta al tratamiento con NO, demostrando que el aumento de expresión de S100A10 en el NH en respuesta a NO puede atribuirse a cambios que acontecen, al menos en parte, en las MNHs. Sin embargo, en las NSC-34 indiferenciadas (NSC-34i) el DETA/NO produjo el efecto opuesto, lo que puede ser una característica interesante para el empleo de este modelo en el estudio de los mecanismos que regulan la expresión de esta proteína. A diferencia de lo observado en el NH donde el DETA/NO no alteró los niveles de expresión de TASK-1, en las células NSC-34 el DETA/NO produjo un aumento de la expresión de TASK-1, independientemente del estado de diferenciación de las células.

Nuestra intención era emplear a la línea celular NSC-34 en el estudio de la implicación de la vía NO/S100A10/TASK-1 en la sensibilización de las motoneuronas a la muerte producida por estímulos excitotóxicos, asunto al que dedicamos la tercera parte de esta tesis. Sin embargo, a pesar de haberse descrito que las células NSC-34d son un buen modelo para estudiar la excitotoxicidad mediada por glutamato, estos resultados no pudieron ser reproducidos en nuestro laboratorio. Mediante las técnicas de tinción Ioduro de propidio-Hoechst, TUNEL y MTT determinamos que estas células en nuestras condiciones no eran suficientemente sensibles a glutamato como para abordar los objetivos propuestos en este trabajo de investigación.

Para el estudio de la implicación de la activación de la vía de señalización NO/S100A10/TASK-1 en fenómenos excitotóxicos, usamos como modelo cultivos primarios de motoneuronas espinales de embriones de ratón



(MNEs). La inhibición farmacológica, con anandamida (AEA) o bupivacaína de las corrientes TASK produjo per se una reducción en la supervivencia de las MNEs, y además potenció el efecto tóxico de los estímulos excitotóxicos glutamato y K<sup>+</sup>. Experimentos de supervivencia en presencia de un inhibidor de los CB1, así como en cultivos de MNEs procedentes de ratones *¿knock-out¿* para TASK-1 (TASK-1<sup>-/-</sup>) o TASK-3 (TASK-3<sup>-/-</sup>), demostraron que la AEA a la dosis utilizada (10  $\mu$ M) produce ambos efectos mediante su acción específica inhibitoria sobre las subunidades TASK-1, y no sobre ninguna otra de sus dianas descritas. El isoflurano, inhibidor de los homodímeros TASK-1 también redujo la supervivencia de las MNEs TASK-3<sup>-/-</sup>.

El efecto potenciador que la AEA tiene sobre la toxicidad del K<sup>+</sup> no resulta de la suma de dos mecanismos independientes que comprometen a la viabilidad del cultivo. Por un lado, dosis de AEA que per se no afectan a la supervivencia de las MNEs potencian la toxicidad del K<sup>+</sup>. Por otro lado, la AEA no potencia la toxicidad del K<sup>+</sup> cuando ambos estímulos se aplican simultáneamente, pero sí cuando la AEA se suministra 30 minutos antes que el K<sup>+</sup>. Registros de los cambios intracelulares de los niveles de Ca<sup>2+</sup> demostraron que cuando la AEA se aplicaba al medio de registro minutos antes que el K<sup>+</sup> se produce un pico de entrada de Ca<sup>2+</sup> mucho mayor que la simple suma aritmética de los picos de Ca<sup>2+</sup> producidos por la aplicación de ambos estímulos de forma independiente. Esto demuestra que ambos estímulos excitotóxicos en estas condiciones producen un efecto sinérgico.

Además, el tratamiento con isoflurano, activador de homodímeros TASK-3 y heterodímeros TASK-1/TASK-3, protegió a las MNEs silvestres y a las MNEs TASK-1<sup>-/-</sup> de la muerte inducida por glutamato demostrando que la activación de las corrientes TASK protege a las MNEs de la muerte por excitotoxicidad mediada por glutamato.

Por otro lado la interferencia de S100A10 protegió a las MNEs silvestre y a las MNEs TASK3<sup>-/-</sup> del efecto excitotóxico del glutamato de forma dosis dependiente, pero no así a MNEs TASK-1<sup>-/-</sup>. Esto demuestra que S100A10 actúa específicamente sobre las subunidades TASK-1 reduciendo su tráfico hacia la membrana plasmática. Además la concentración de interferente máxima utilizada rescató de la muerte a todas las MNEs ante los estímulos excitotóxicos. Este resultado es muy esperanzador ya que sugiere a S100A10 como una importante diana terapéutica para el desarrollo de fármacos que protejan a las neuronas de la muerte por excitotoxicidad en diversas enfermedades neurodegenerativas o lesiones del SNC.

La última parte de esta tesis la hemos dedicado a estudiar la posible implicación de la vía de señalización NO/S100A10/TASK-1 en el desarrollo de otra enfermedad motora caracterizada por la sobreexpresión de la NOS. En animales SOD1G93A sintomáticos hemos observado un aumento de expresión de S100A10 en el NH y en la médula espinal con respecto a sus hermanos de camada no transgénicos. Por el contrario, los niveles de expresión de TASK-1 resultaron menores en los animales transgénicos. Estos cambios en la expresión de TASK-1 y S100A10 son atribuibles, al menos en parte, a cambios de expresión en las motoneuronas, ya que cultivos de MNEs procedentes de ratones SOD1G93A presentaron las mismas alteraciones en la expresión de estas proteínas. Esto puede explicar que las MNEs SOD1G93A son más sensibles a los estímulos excitotóxicos glutamato y K<sup>+</sup>, que las MNEs silvestres. Todo esto apunta a que la vía de señalización objeto de nuestro estudio podría contribuir a la muerte de las MNEs por excitotoxicidad que ocurre en el transcurso de la ELA.

La producción de NO es un suceso común a multitud de enfermedades neurodegenerativas. Además, la



expresión de las subunidades TASK-1 y de S100A10 en el sistema nervioso no se limita a motoneuronas, sino que ambas proteínas se encuentran distribuidas ampliamente por todo el sistema nervioso en distintos tipos celulares. Por tanto, la vía de señalización propuesta podría sensibilizar a las neuronas a la muerte en multitud de enfermedades neurodegenerativas, además de en los modelos presentados en este trabajo.