

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**  
**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**



**IMPLICACIÓN DE LOS RECEPTORES  
PURINÉRGICOS IONOTRÓPICOS P2X EN LA  
NEUROFISIOLOGÍA Y NEUROLOGÍA DEL  
SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**María Díez Zaera**

Bajo la dirección de los doctores

M<sup>a</sup> Teresa Miras Portugal  
Miguel Díez Hernández

**Madrid, 2011**

**ISBN: 978-84-694-2076-8**

© María Díez Zaera, 2010

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**  
**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**



**Implicación de los receptores purinérgicos ionotrópicos  
P2X en la neurofisiología y neuropatología del sistema  
nervioso central**

**TESIS DOCTORAL**

**María Díez Zaera**  
**Madrid, 2010**



La **Dra. M<sup>a</sup> Teresa Miras Portugal**, Catedrática del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, y el **Dr. Miguel Díaz Hernández**, Profesor Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN:

Que **María Diez Zaera**, licenciada en Biología por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo su dirección, en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, el presente trabajo de investigación titulado "**Implicación de los receptores purinérgicos ionotrópicos P2X en la neurofisiología y neuropatología del sistema nervioso central**" como Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid, Julio de 2010

**VºBº DIRECTORES**

Dra. M<sup>a</sup> Teresa Miras Portugal

Dr. Miguel Díaz Hernández

La interesada:

María Diez Zaera



*A mis padres y hermanos,*

*A Elías,*



## *Agradecimientos*

*Muchas son las personas que pasan por nuestro lado cada día que ayudan un poquito a que todo siga su curso. Muchas de ellas son anónimas, y no por ello merecen menor consideración en este apartado, así que gracias a todo aquel que, aun siendo desconocido, me ha ayudado en mi camino. En cuanto a la gente no anónima...*

*En primer lugar me gustaría dar las gracias a la Doctora María Teresa Miras Portugal, por acogerme en su laboratorio, por su confianza ciega en mí desde el primer momento y por ser el mejor ejemplo de constancia y esfuerzo en este mundo de locos que es la ciencia.*

*Al Doctor Miguel Díaz Hernández tengo que agradecerle todo lo que me ha enseñado en este camino, su inagotable fuente de ideas y su paciencia en los momentos más difíciles.*

*No puedo olvidarme del resto de profesores del departamento. Lola, por su cariño incondicional, Javi, por ayudar siempre en lo posible con gran premura, Raquel y Esmerilda, por sus consejos, y Suso, Magdalena y Pepe.*

*También quiero agradecer a Alba su gran labor, eficacia y comprensión, a Mari Carmen y María Luisa que nos facilitan día a día nuestro trabajo, y a todo el personal del animalario del CBM, que atienden a los requerimientos tan especiales de los experimentos.*

*Al Doctor J. J. Lucas tengo que agradecerle sus consejos y que me haya permitido aprender también un poquito en su grupo. Y por supuesto, a toda su gente, Zaira, por comprenderme mejor que nadie, Cris, Raquel, Charo, Owen (gracias por mi "summary"), Desi, Alicia y la brasileña que ya se fue, Adriana, por toda la ayuda prestada siempre con una sonrisa.*

*I would also like to thank Prof. Dr. Herbert Zimmermann for giving me the chance to stay in his laboratory for three months and for being so helpful and patient. Thanks also to all my colleagues there: Ivette, Tina, Jasmin, Matthias, Prof. Dr. Walter Volkmandt, Frau Nießing, Jörn, Alex, Vanessa, Sara, Peter and Klaus, for making me feel like at home.*

*Sin ninguna duda, una de las mejores cosas de todos estos años ha sido trabajar codo con codo, o un poquito más lejos, con todos mis compañeros del laboratorio. Le agradezco a Miri, mi pequeñina, todo, a Elvira, sus fantásticas historias y su cariño, a Paula, sus locuras y su saber estar, a Vero, las risas constantes por sus "despistes", a Luz María, su gran comprensión sobre todo en estos momentos finales, a Nacho, la biología molecular, la informática y "Within" y a Rosa sus buenos consejos científicos. También tengo mucho que agradecer a todos los compañeros que ya "dejaron el nido" y un gran vacío, a Maibrit, por esos temas de conversación tan inesperados, a David "culipardi" su buen humor y los consejos que nunca escuchamos, a Elenita "frikí" por cuidarme y por "Perdidos", a Patri, ese apoyo incondicional ante todo, a Felipe, por los chistes y los abrazos, a Jesús, por su comprensión y ayuda infinita y a Elena "farmacia", por estar siempre pendiente. Y por supuesto a mis compañeros de un poquito más lejos o "del fondo", a Ricardo le agradezco esas risas gracias a su cabecita, a Mayka, que siempre está dispuesta a escuchar y nos cuida a todos, a Elena "¿rubia?" por su optimismo innato y por las inmensas ayudas con el alemán, a Salvatore, por estar siempre feliz y contagiar esa felicidad, a Jorge, por sus ingeniosos comentarios, a Ana, por ser uno de los mejores ejemplos de fortaleza humana, a David, por ser un claro ejemplo de amor por la*

ciencia, a Carolina, por cuidarme y aconsejarme, a Jose, el recién llegado del barrio, por siempre presente sonrisa, y a los que ya se fueron, Javi "Canario" y Cristina.

Y aunque estén un poquito más lejos, también quiero agradecer a todos "los de abajo" su apoyo y ayuda y el buen rollo que desprenden.

No puedo olvidarme de mis comienzos en la ciencia. Una de las personas a las que más debo agradecer es al Doctor Manuel Guzmán. Sin su confianza inicial y su acogida en su laboratorio, hoy no tendría nada de esto. Gracias Manolo. También he de agradecer a Guille e Isma su confianza, pues fue una entrevista de 3. Y al resto del grupo, que tanto me enseñó durante aquellos dos años, a Cris S., Cris B., Arkaitz, Ainara, María, a Javi, con quien compartí los comienzos, a Mar, y en especial a Blanca, que me enseñó y cuidó más que nadie, y a Tania, porque siempre me has entendido tan bien, que todo ha sido muy fácil contigo.

Aun así, mis comienzos en la ciencia son "culpa" de Esteban. Ningún profesor ha conseguido marcarme ni motivarme tanto como él. Transmite entusiasmo en cada palabra. Gracias por confiar en mí más que yo misma.

Muy importantes en este camino también han sido muchas personas que, sin dedicarse a la ciencia ni entender muy bien lo que hago, me han escuchado y apoyado siempre que lo he necesitado. A Moni, porque es un gran ejemplo de fortaleza y alegría y a Miguel y Lorena, porque sin ellos las noches en el pueblo estarían vacías. A Sara, porque siempre me hace sonreír a Sonia, por ese cariño que desprendes y por tu ingenuidad, a Ángela, por entenderme tan bien y aparecer siempre con una sonrisa y a Sofía, por escuchar mis líos mentales y por apoyarme. A todas mis amigas de la facultad, María, Marta, Estefanía, Gloria, Carmen y Ana, porque aun estando desaparecida, os habéis preocupado por mí. A Tamara, por cuidarme tanto en la distancia, a Elena, por haberme ayudado tanto cuando más lo necesitaba, y a Ángel, por demostrarme que la amistad está por encima de la distancia.

Y a mis "nuevos amigos políticos", que ya son amigos sin comillas, a Jorge y Lidia, por su gran acogida y sus ánimos desde la lejanía, y a María y Dani, por contagiarme su felicidad y hacerme reír con sus historias.

Una parte muy importante de todo este viaje se la debo a mi familia. Está claro que ellos son los que más me han "sufrido" sin entender muy bien qué hacía. Gracias a mis padres y a mi abuela, por su apoyo incondicional y su confianza infinita y ciega. Gracias a mi hermano Rami, por escucharme cada vez que lo he necesitado, y a mi hermano Óscar y a Chus, por transmitir alegría en cada cosa que hacéis. Gracias también a mi familia política, por estar siempre pendientes y cuidarme como a una hija más.

Gracias a mi estrella que me cuida desde el cielo.

Y por último, y no menos importante por ello, sino todo lo contrario, le doy las gracias a Elías. Por su paciencia, su saber estar, sus consejos (que no siempre hago caso), su ayuda, su apoyo, su confianza... Sin ti todo esto habría sido muy difícil.

Muchas y sinceras gracias a todos.

La realización de este trabajo de investigación ha sido posible gracias a la concesión de una beca predoctoral para la formación de personal universitario del Ministerio de Educación y Ciencia. Asimismo, ha contado con la financiación de los proyectos MCyT BFI 2002-03626, CAM (SAL/0551/2004, Fundación la Caixa nº BM05-114-0, MEyC BFU 2005-02079, BFU2008-02699/BFI, la Fundación Marcelino Botín y MEyC Consolider-Ingenio CSD2008\_00005.



# ÍNDICE

<b>Abreviaturas .....</b>	<b>1</b>
<b>Summary .....</b>	<b>5</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>27</b>
<b>1. El sistema purinérgico .....</b>	<b>29</b>
1.1 Los nucleótidos en la neurotransmisión.....	29
1.2 Almacenamiento y liberación de nucleótidos .....	30
1.3 Inactivación ectoenzimática de los nucleótidos .....	33
1.3.1 Fosfatasa alcalina no específica de tejido (TNAP) .....	36
1.4 Receptores de nucleósidos.....	38
1.5 Receptores de nucleótidos .....	39
1.5.1 Receptores P2Y .....	40
1.5.2 Receptores P2X .....	43
1.5.3 Receptor P2X7 .....	53
<b>2. Morfogénesis neuronal: Crecimiento axonal.....</b>	<b>61</b>
2.1 Adquisición de la polaridad neuronal.....	62
2.2 Formación y elongación del axón .....	63
2.3 Elongación, orientación y arborización del axón .....	64
2.4 Modulación de la elongación axonal.....	66
2.5 Implicaciones de la neurotransmisión purinérgica en la morfogénesis neuronal.....	68
<b>3. Enfermedad de Huntington.....</b>	<b>69</b>
3.1 Sintomatología de la Enfermedad de Huntington.....	69
3.2 Neuropatología de la Enfermedad de Huntington.....	70
3.3 Mutación responsable de la Enfermedad de Huntington.....	73
3.4 Huntingtina.....	74
3.5 Agregados de huntingtina .....	76

3.6 Mecanismos de toxicidad de la huntingtina mutada .....	76
3.7 Alteraciones sinápticas en la Enfermedad de Huntington.....	77
<b>Objetivos.....</b>	<b>81</b>
<b>Material y Métodos .....</b>	<b>85</b>
<b>Material.....</b>	<b>87</b>
1. Instrumentación .....	89
2. Reactivos .....	92
3. Modelos de estudio.....	92
3.1 Cultivos celulares .....	92
3.2 Animales.....	92
<b>Métodos.....</b>	<b>95</b>
1. Obtención de sinaptosomas de cerebro de ratón.....	95
2. Aislamiento y cultivo de neuronas .....	96
3. Estudios de expresión génica .....	99
3.1 Obtención de muestras .....	99
3.2 Determinación de la concentración y grado de pureza del ARN extraído .....	100
3.3 Reacción de la transcriptasa inversa (RT) y Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	101
3.4 Amplificación por PCR a tiempo real (PCR cuantitativa en tiempo real). .....	102
4. Transfección transitoria en células de mamífero .....	105
4.1 Plásmidos.....	105
4.2 Transfecciones transitorias en células de mamífero.....	109
5. Técnicas de microfluorimetría: Determinación del Ca <sup>2+</sup> intracelular/intrasinaptosomal.....	109
6. Inmunotransferencia .....	113
6.1 Extracción de proteínas totales .....	113
6.2 Cuantificación de las proteínas totales.....	114
6.3 Electroforesis, transferencia y revelado de las membranas.....	115

7. Inmunohistoquímica.....	116
7.1 Obtención de secciones de cerebro .....	116
7.2 Tinción inmunohistoquímica de secciones de cerebro.....	117
8. Inmunofluorescencia.....	118
9. Citoquímica enzimática.....	119
10. Medida de niveles de ATP .....	120
11. Ensayos de viabilidad celular.....	121
12. Ensayos en ratones R6/1 tratados farmacológicamente.....	122
12.1 Tratamiento farmacológico.....	122
12.2 Análisis de los niveles de BBG en plasma y cerebro .....	122
12.3 Medida de la puntuación de “Clasping” .....	122
12.4 Test motor de Rota Rod .....	123
12.5 Medida de la longitud de la zancada: Test de “ <i>Footprint</i> ” .....	124
13. Análisis estadístico de los datos.....	125
<b>Resultados .....</b>	<b>127</b>
<b>1. Papel de la fosfatasa alcalina no específica de tejido en el crecimiento axonal de neuronas de hipocampo en cultivo.....</b>	<b>129</b>
1.1. Cultivos de neuronas de hipocampo de ratón .....	129
1.2. Análisis de los niveles de ATP extracelular .....	130
1.3. Expresión de la TNAP en los cultivos de neuronas de hipocampo de ratón .....	131
1.4. Localización subcelular de la TNAP en neuronas de hipocampo de ratón en cultivo.....	131
1.5. Efecto de la TNAP en los niveles de ATP extracelular en cultivos de neuronas de hipocampo de ratón .....	133
1.6. La actividad de la TNAP modula el crecimiento axonal de neuronas de hipocampo de ratón en cultivo.....	134

1.7. Efecto de la adenosina en el crecimiento axonal de neuronas de hipocampo de ratón en cultivo.....	139
1.8. Localización subcelular de los receptores P2X en neuronas de hipocampo de ratón en cultivo .....	140
1.9. Acción coordinada de la TNAP y el receptor P2X7 en el crecimiento axonal .....	144
<b>2. Implicaciones del receptor P2X7 en la enfermedad de Huntington.....</b>	<b>151</b>
2.1. Alteración de los niveles de P2X7 en el cerebro de ratones con enfermedad de Huntington (EH) .....	151
2.2. Localización del receptor P2X7 en corteza y estriado de ratones que reproducen la enfermedad de Huntington. ....	153
2.3. Alteración de la función del receptor P2X7 en terminales sinápticos de ratones Tet/HD94 .....	157
2.4. Alteración de la funcionalidad del receptor P2X7 en neuronas primarias que expresan la huntintina mutada. ....	159
2.5. Incremento de la vulnerabilidad a la apoptosis mediada por P2X7 de las neuronas de ratón Tet/HD94 en cultivo .....	163
2.6. La inhibición <i>in vivo</i> del receptor P2X7 en ratones modelo de la enfermedad de Huntington induce una mejora en el déficit motor y disminuye la apoptosis neuronal.....	166
<b>Discusión .....</b>	<b>177</b>
1. Papel de la fosfatasa alcalina no específica de tejido en el crecimiento axonal .....	179
2. Implicaciones del receptor P2X7 en la enfermedad de Huntington .....	185
<b>Conclusiones.....</b>	<b>195</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>199</b>

## Abreviaturas

<b><math>\alpha</math>, <math>\beta</math>-meATP</b>	$\alpha$ , $\beta$ -metilén-adenosina-5'-trifosfato
<b>ABC</b>	ATP binding cassette
<b>ADA</b>	Adenosina deaminasa
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADP</b>	Adenosina-5'-difosfato
<b>AMP</b>	Adenosina-5'-monofosfato
<b>AMPA</b>	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor
<b>AMPc</b>	Adenosina-5'-monofosfato cíclico
<b>AP</b>	Fosfatasa alcalina
<b>Ap<sub>4</sub>A</b>	P <sup>1</sup> ,P <sup>4</sup> -Di(adenosina-5')tetrafosfato
<b>Ap<sub>5</sub>A</b>	P <sup>1</sup> ,P <sup>5</sup> -Di(adenosina-5')pentafosfato
<b>APC</b>	<i>adenomatous polyposis coli</i>
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleic mensajero
<b>ATP</b>	Adenosina-5'-trifosfato
<b>BBG</b>	Brilliant Blue G
<b>BDNF</b>	Factor neural derivado de cerebro
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino
<b>BzATP</b>	3'-O-(4-benzoil)benzoil adenosine-5'-trifosfato
<b>CaMK</b>	Calmodulina quinasa
<b>CaN</b>	Calcineurina
<b>CI</b>	Cuerpo de inclusion
<b>CPA</b>	N <sup>6</sup> -ciclopentiladenosina
<b>CRMP-2</b>	Proteína mediadora de la respuesta a colapsina 2
<b>CSP</b>	<i>Cysteine string protein</i>
<b>Cy3</b>	Cianina tipo 3
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>DARPP-32</b>	Fosfoproteína regulada por dopamina y AMPc de 32 kDa
<b>DEPC</b>	Dietilpirocarbonato
<b>Div</b>	Días <i>in vitro</i>
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EBSS</b>	Earle's Balanced Salt Solution
<b>EC<sub>50</sub></b>	Concentración de agonista que produce el 50% del efecto máximo
<b>EDTA</b>	Ácido etilén-diamino tetraacético
<b>EH</b>	Enfermedad de Huntington
<b>E-NPPasa</b>	Ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasas
<b>E-NTPDasa</b>	Ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasas
<b>ERK</b>	Quinasa regulada por señalización extracelular
<b>FAK</b>	Quinasa de adhesión focal
<b>FBS</b>	Suero fetal bovino

<b>GABA</b>	Ácido- $\gamma$ -aminobutírico
<b>GAP</b>	Proteína activadora de GTPasas
<b>GAPDH</b>	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
<b>GEF</b>	Factor de intercambio de nucleótidos de guanina
<b>GFAP</b>	Proteína glial fibrilar ácida
<b>GFP</b>	Proteína verde fluorescente
<b>GPI</b>	Glicosil fosfatidil inositol
<b>GRK-3</b>	Receptor quinasa acoplado a proteína G
<b>GSK-3</b>	Glucógeno sintasa quinasa 3
<b>GTP</b>	Guanosina 5'-trifosfato
<b>HAP</b>	Proteína asociada a huntingtina
<b>HBM</b>	Medio tamponado hipertónico
<b>HIP</b>	Proteína de interacción con huntingtina
<b>Hsp</b>	Proteína de choque térmico
<b>Htt</b>	Huntingtina
<b>Htt*</b>	Huntingtina mutada
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentración de inhibidor que produce el 50% del efecto máximo
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>IL</b>	Interleukina
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositol trifosfato
<b>KA</b>	Kainato
<b>KN-62</b>	1-[N,O-Bis(5-isoquinolinesulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4phenylpiperazine
<b>KO</b>	Knock out
<b>MAGuK</b>	Guanilato quinasa P55 asociada a membrana
<b>MAP</b>	Proteína asociada a microtúbulos
<b>MAPK</b>	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
<b>MCAO</b>	Oclusión de la arteria cerebral media
<b>mGluR</b>	Receptor metabotrópico de glutamato
<b>MSSN</b>	Neuronas espinosas de tamaño medio
<b>NDP</b>	Nucleótido difosfato
<b>Nf-<math>\kappa</math>B</b>	Factor nuclear- $\kappa$ b
<b>NGF</b>	Factor de crecimiento neural
<b>NMDA</b>	Ácido N-metil-D-aspártico
<b>NMP</b>	Nucleótido monofosfato
<b>NTP</b>	Nucleótido trifosfato
<b>oATP</b>	Adenosina-5'- trifosfato oxidado
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PFA</b>	$\rho$ -formaldeído
<b>Pi</b>	Fosfato inorgánico
<b>PI3-K</b>	Fosfatidilinositol-3-quinasa
<b>PI4-K</b>	Fosfatidilinositol-4-quinasa
<b>PKC</b>	Proteína quinasa C (dependiente de Ca <sup>2+</sup> /fosfolípidos)

<b>PKD</b>	Proteína quinasa D
<b>PLC</b>	Fosfolipasa C
<b>PLP</b>	Piridoxal 5'-fosfato
<b>PSD95</b>	Proteína de densidad postsináptica 95
<b>RT</b>	Transcripción inversa
<b>SCAMP5</b>	<i>Secretory carrier membrane protein 5</i>
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato sódico
<b>shRNA</b>	Ácido ribonucleico <i>small harpin</i>
<b>SNARE</b>	<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor</i>
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>SNP</b>	Polimorfismo de un solo nucleótido
<b>TM</b>	Transmembrana
<b>TNAP</b>	Fosfatasa alcalina no específica de tejido
<b>Trk</b>	Receptor tirosina quinasa
<b>UDP</b>	Uridina 5'-difosfato
<b>UTP</b>	Uridina-5'-O-(3-tiotrifosfato)
<b>VNUT</b>	Transportador vesicular de nucleótidos



# **Summary**



## **Introduction.**

ATP behaves as a fast neurotransmitter in the CNS, exerting its actions via P2X receptors, a family of ligand-operated receptors. These receptors are formed by the assembly of several subunits (P2X1-7) (North, 2002; Burnstock, 2007).

Activation of presynaptic P2X receptors promotes an increase in intracellular  $Ca^{2+}$  levels, and the subsequent activation of protein kinases such as calcium-calmodulin kinase II (CaMKII), p38 mitogen-activated protein kinase and glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) (Armstrong et al., 2002; Diaz-Hernandez et al., 2008; Gomez-Villafuertes et al., 2009), as well as stimulating vesicular neurotransmitter release (Gomez-Villafuertes et al., 2001; Diaz-Hernandez et al., 2002; Gualixet et al., 2003).

The P2X7 receptor has been shown to regulate axonal growth and branching in hippocampal neurons (Diaz-Hernandez et al., 2008) and also modulates neurotransmitter release from presynaptic terminals (Miras-Portugale et al., 2003; Sperlaghet et al., 2007; Leonet et al., 2008). Stimulation of P2X7 in the immune system induces cytokine production (Inoue, 2002).

The availability and half-life of extracellular ATP is governed by ectonucleotidases which sequentially hydrolyze the nucleotide to adenosine (Robson et al., 2006; Zimmermann, 2006). Ectonucleotidases belong to several protein families that differ in their functional and molecular properties (Zimmermann, 2006). The alkaline phosphatase (AP) family releases inorganic phosphate from a variety of organic compounds and is capable of degrading nucleotide 5'-tri-, -di- and -monophosphates. The mammalian isoforms share an optimum alkaline pH and are anchored to the membrane via a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor (Millan, 2006). Tissue nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) represents the only isoform of APs in the mammalian brain and is associated with the blood vessel endothelium and with neuropile, including synaptic contacts (Langer et al., 2008).

Axonal outgrowth is essential for brain development when neurons establish precise connectivity patterns as well as to the processes of regeneration and brain repair in the adult CNS. Axonal growth and guidance represent highly coordinated processes controlled by a variety of extracellular

## Summary

---

and intracellular signalling cues. Recently, our group has demonstrated that ATP negatively controls axonal growth and branching in cultured hippocampal neurons (Diaz-Hernandez et al., 2008) and inhibits neuritogenesis in Neuro 2a neuroblastoma cells (Gomez-Villafuertes et al., 2009). Similarly ATP was found to reduce neurite extension from motoneuron-containing neural tube explants of E12 rat embryos (Cheung et al., 2005). In contrast, adenosine induced neurite elongation in human neuroblastoma cells (Abbracchio et al., 1989).

The opposing effects of ATP and adenosine on neuritogenesis imply that ectonucleotidases - as the elements interlinking the two extracellular signal molecules - could play a pivotal role in the control of neurite development. In the present thesis we analyzed the role of TNAP and its interaction with a specific ATP receptor (P2X7) in axonal growth using cultured hippocampal neurons as a well established model system (Dottiet et al., 1988).

Huntington's disease (HD) is an autosomal dominant neurodegenerative disorder caused by a CAG triplet-repeat expansion coding for a polyglutamine (polyQ) sequence in the N-terminal region of the huntingtin (htt) protein (The Huntington's disease collaborative research group, 1993). Patients suffer motor dysfunction, cognitive decline, and psychological disturbances over 10 to 15 years until death. Neuropathology of this disorder is characterized by brain atrophy and neuronal death predominantly in the cortex and striatum and by the presence of neuropil and nuclear neuronal inclusions (Vonsattel and DiFiglia, 1998). The precise molecular interactions by which mutant htt exerts its toxicity remain unknown, although several pathogenic mechanisms have been proposed (Ross, 1997; Ortega et al., 2007). Among these, synaptic alterations (Liet et al., 2003) and increased susceptibility to neuronal death (Vila and Przedborski, 2003) are known contributors to HD symptomatology, in which there is an initial phase without neuronal loss. Although decreased metabolism has also been associated with HD, recent findings have surprisingly demonstrated decreased neuronal apoptosis in HD animal models in response to small drugs that inhibit metabolism (Varma et al., 2007). Specifically, *in vivo* administration of drugs that impair ATP production such as rotenone or oligomycin decreased neuronal death in *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila* models of HD (Varma et al., 2007). These

effects may represent an attenuation of toxic effects elicited by extracellular ATP. In support of this hypothesis, a recent study reported that extracellular ATP induces both apoptotic and nonapoptotic death of SN4741 dopaminergic neurons through stimulation of the P2X7 receptor (Junet al., 2007). Based on these reported data, we hypothesize a potential role of P2X7 receptors in HD pathogenesis. Accordingly, in the present thesis we have explored the status of P2X7 receptors in cellular and mouse models of HD, as well as the therapeutic potential of P2X7 antagonist administration.

## **Results and discussion.**

### **Tissue nonspecific alkaline phosphatase promotes axonal growth of hippocampal neurons.**

Hippocampal neurons grew extensive branched neurites within 72 h after plating. Interestingly, the culture supernatant contained significant levels of ATP ( $18,4 \pm 1,3$  pmol/mg of protein) that declined considerably with time post-plating ( $0,8 \pm 0,3$  pmol of ATP per mg of protein at 72 h). The decrease in extracellular ATP levels was paralleled by an increase in neuronal expression of the ectonucleotidase TNAP. Next, we confirmed that TNAP activity regulated extracellular ATP levels. Addition of alkaline phosphatase (AP, 4 U/ml) to the culture media induced a rapid and persistent loss of extracellular ATP, while specific inhibition of TNAP with levamisole (500 nM) (Kozlenkovet al., 2004) significantly elevated extracellular ATP concentrations.

Similar to our findings in the neuronal culture supernatant, extracellular ATP is present in the brain extracellular space. It may be released via exocytosis, through membrane channels, or may be derived from damaged cells (Abbracchioet al., 2009). As we have previously demonstrated, axonal growth of cultured hippocampal neurons was inhibited by extracellular ATP via the P2X7 receptor (Diaz-Hernandezet al., 2008).

Our results demonstrate that TNAP, which is expressed in growth cones, is capable of eliminating extracellular ATP, consequently activating outgrowth machinery. The addition of AP to the culture media induced a considerable

## Summary

---

increase ( $\geq 200\%$ ) in total axonal length (including both principal axons and axonal branches). In accordance with this effect, inhibition of TNAP by the specific inhibitor levamisole (Kozlenkovet al., 2004) and silencing with TNAP targeting shRNA induced a 40% reduction in the length of the principal axons and axonal branches, an effect rescued by addition of exogenous AP to the culture media. However, neither AP addition nor TNAP inhibition modified dendritic length.

As an ectonucleotidase, TNAP can hydrolyze extracellular ATP or ADP limiting their effects on P2 receptors and simultaneously increasing extracellular adenosine levels, which can activate adenosine-specific receptors (Zimmermann, 2006). We thus investigated whether the role of TNAP in axonal growth was mediated by extracellular adenosine produced by TNAP catalytic activity, but did not register significant changes in axonal growth.

In addition we investigated the possibility that TNAP exerts its effects by eliminating extracellular ATP, thus preventing P2X7 receptor activation. P2X7, like TNAP, exhibited a spotted distribution in the growth cone, next to TNAP. Overexpression of the P2X7 receptor reduced axon length ( $\geq 30\%$ ), an effect prevented by addition of alkaline phosphatase. Similarly knockdown of the P2X7 receptor increased axon length and had the opposite effect to TNAP knockdown - thus knockdown of both proteins counterbalances the effects. In addition, AP administration in hippocampal neurons increased P2X7 mRNA levels by  $93,3 \pm 40,8 \%$  and P2X7 antagonism decreased TNAP mRNA levels by  $35,4 \pm 9,3 \%$ . These results indicate a coordinated regulation of these two proteins at the transcriptional level.

Interestingly, the factor mediating transcriptional regulation of the P2X7 receptor and TNAP remains unknown. TNAP expression is enhanced by retinoic acid, which increases the transcriptional activity of the TNAP exon 1 and stabilizes the mRNA (Zhouet al., 1994; Escalante-Alcaldeet al., 1996) We previously demonstrated that inhibition of the P2X7 receptor induces phosphorylation of GSK-3, thus inhibiting its catalytic activity (Diaz-Hernandezet al., 2008; Gomez-Villafuerteset al., 2009). GSK-3 activity in turn regulates transcription factors (Grimes and Jope, 2001; Ortegaet al., 2010), potentially

modulating TNAP mRNA levels. Moreover, enhanced P2X7 receptor activation and increased intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations could mediate the direct interaction of  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive proteins with regulatory elements within the DNA sequence.

TNAP is expressed in a variety of mammalian tissues but little is known concerning its functional role in the CNS. Its best described function is its involvement in bone mineralization and remodelling (Kaunitz and Yamaguchi, 2008). Mice deficient in the TNAP gene exhibit defective bone mineralization and mimic a severe form of human hypophosphatasia. TNAP knockout mice also suffer from epileptiform seizures and die from apnea before weaning. They display neural defects revealing aberrant development of the lumbar nerve roots and disturbances in intestinal physiology (Narisawaet al., 1997). Regarding the developing nervous system, TNAP activity was detected in association with nerve fibers emerging from the myelencephalon and spinal cord of the developing mouse brain (Narisawaet al., 1994) and analysis of the developing marmoset brain revealed an association of AP activity with the axonal surface (Fontaet al., 2005). Our finding of an association of TNAP with developing axons of cultured hippocampal neurons are in agreement with previous findings of axonal localization of TNAP during neural development *in situ*, where the enzyme may similarly be involved in the control of axon elongation.

Furthermore TNAP is associated with neurogenic regions of the brain during early embryonic development in the mouse. From embryonic day 8.5 onwards it is highly expressed at the plasma membrane of the neuroepithelial stem cells of the neural tube (Narisawaet al., 1994). During later development of the CNS, TNAP activity is downregulated, but remains highly expressed in the ventricular neurogenic regions up to adult stage (Langeret al., 2007). The functional role of TNAP during neural development has not been investigated but it may play a role in immature neuron mobility and migration, via control of the extracellular availability of purinergic signalling molecules. In a variety of non-mammalian species, alkaline phosphatases have been implicated in cell guidance and migration (Thibaudeauet al., 1993).

The purinergic mechanisms described here may, in addition, have implications both for regenerative processes in the adult brain and neuronal plasticity. In the injured CNS severed axons can begin axonal outgrowth at the site of lesion but growth cones soon adopt a dystrophic morphology typical of growth cone inhibition (Schnorrer and Dickson, 2004; Liuet al., 2006). Under some pathological conditions like traumatic injury, hypoxia or ischemia, ATP is released from damaged cells resulting in elevated extracellular concentrations (Philliset al., 1993; Juranyiet al., 1999), inhibitory to axonal growth. Elevated ATP levels were even shown to cause neuronal cell death in a variety of models which reproduce these pathological conditions *in vitro* (Amadioet al., 2002) or *in vivo* (Ryuet al., 2002), an effect postulated to be mediated by P2X7 receptor.

Moreover similar mechanisms may apply to axonal sprouting and presynaptic structural and functional plasticity. Axonal sprouting occurs as a restorative process emerging from neurons other than those injured, and can result in functional synaptic reinnervation (Frotscheret al., 1997). Interestingly,, TNAP has also been identified in association with the neuropile of the adult rodent and primate brain where it is located around synaptic contacts (Fontaet al., 2005; Langeret al., 2008). Synaptic TNAP expression coincides with the time course of high rate synaptogenesis suggesting a role in synaptic maturation and later in mature synaptic activity (Fontaet al., 2005). While synaptic TNAP may be involved in ATP-mediated neurotransmission or cotransmission (North and Verkhratsky, 2006) we can speculate that TNAP and ATP could also play a role in the structural remodelling of synapses induced by neural activity (Bourne and Harris, 2008). Thus exogenous addition of AP has been reported to modulate purinergic signaling responses in synaptosomal preparations (Diaz-Hernandezet al., 2000).

### **Role of P2X7 receptor in Huntington's disease.**

In order to explore the status and possible pathogenic role of P2X7 receptors in HD, we first analyzed the level of this receptor in the most affected brain regions, striatum and cortex, of two different mouse models expressing N-terminal (exon-1 encoded) mutant htt. P2X7 levels were increased in the striatum

of 10 month old R6/1 mice which ubiquitously express N-terminal mutant htt with a 115 residue PolyQ stretch (Mangiarinet al., 1996) as compared to their non transgenic littermates. A non-significant trend toward increased levels was observed at the age of 5 months, coinciding with the onset of motor impairment (Canalset al., 2004). Similarly, Tet/HD94 mice which conditionally and selectively express exon-1 mutant htt with a shorter PolyQ repeat in forebrain neurons and display a milder and slower-onset motor phenotype (Yamamotoet al., 2000), displayed increased striatal levels of P2X7 receptor beginning at the age of 12 months. This occurred right after onset of motor phenotype and persisted in all older Tet/HD94 mice tested. It is worth noting that P2X7 receptor levels progressively decline with age in the striatum of wild type mice while such decline does not occur in R6/1 mice and is much milder in Tet/HD94 mice. Therefore, it appears that mutant huntingtin expression, rather than increasing the total striatal content of P2X7 receptor, attenuates the age-dependent decrease in P2X7 striatal level. No differences were found in cortical samples from either HD mouse models as compared to corresponding control littermates. Interestingly, increased mRNA levels were observed in the cortex of both mouse models as compared to their wild-type littermates, as measured by real-time quantitative PCR, but no alterations in mRNA were found in striatal samples.

Regarding the P2X7 receptor location in both cortex and striatum, the pattern of P2X7 immunostaining was similar in wild type and HD mice. P2X7 immunopositive cell bodies were found in the cortex, but rarely in the striatum, with the great majority of these cell bodies identified as neurons. In both cortex and striatum, and traversing the corpus callosum, the bulk of P2X7 immunostaining is located in the neuropil where it can be found in axonal projections and in buttons of these projections that line the somata of striatal neurons. Based on these results, the previously reported axonal localization of P2X7 receptor (Deucharset al., 2001; Miras-Portugalet al., 2003; Diaz-Hernandezet al., 2008) and the fact that cortex is the major source of axonal afference in the striatum, it appears that the striatal increase in P2X7 receptor level most likely occurs in axons of cortical neurons projecting to the striatum.

## Summary

---

Transcriptional deregulation triggered by mutant-htt has been extensively postulated as a key mediator in HD pathogenesis (Sugars and Rubinsztein, 2003; Riley and Orr, 2006). We can now add P2X7 to the list of genes whose expression is altered in HD. While many P2X7 gene polymorphisms have been reported including several in the promoter region (Liet al., 2002) none of these alter receptor abundance or activity under the tested conditions. With the exception of this study and to the best of our knowledge no other detailed studies of the promoter region have been reported. Thus further investigation is required to elucidate the mechanism by which mutant htt expression elicits increased P2X7 transcription. It would be of interest to explore whether any of the above mentioned P2X7 gene polymorphisms correlate with those currently being investigated as potential mediators of the severity and age of onset in HD patients with equal CAG repeat mutation length (Gusella et al., 1996).

We next analyzed calcium permeability in individual synaptosomes and axon terminals in response to a 30 second exposure to 10  $\mu$ M concentration of the P2X7 agonist 2',3'-O-(4-benzoyl-4-benzoyl)-ATP (BzATP). Interestingly, the calcium imaging recordings revealed two distinct kinetic profiles. One displayed an initial peak that remained elevated throughout the exposure to BzATP, and progressively declined during BzATP washout (we termed this kinetic as "continuo" profile). The second kinetic profile observed was characterized by multiple upscaling peaks of fluorescence which persisted for at least 25 seconds after BzATP removal (what we termed "oscilante" profile). In control synaptosomal preparations and axon terminals both profiles were similarly represented ( $55.6 \pm 3.2$  % continuo,  $44.4 \pm 4.1$  % oscilante). However, in synaptosomal preparations and axon terminals of mutant-htt expressing neurons, the percentage shifted in favor of the latter ( $24.5 \pm 3.1$  % continuo,  $76.5 \pm 6.1$  % oscilante). These data suggest that, in addition to increased P2X7 receptor levels in the striatum of HD mice, an alteration of P2X7 function occurs in HD. Moreover, we also observed a sensitization induced by mutant Htt in these neuronal somata.

This functional P2X7 alteration may be due to higher receptor levels in the terminals, or to the existence of two different functional states of the P2X7

receptor dependent on mutant-htt induced posttranslational changes. Interestingly, recordings of P2X7-operated single channel currents have demonstrated that this receptor can mediate two different types of currents characterized by short-term and long-term openings, respectively (Riedelet al., 2007). Since this was observed in single channel recordings, a difference in receptor density cannot account for the two different kinetics, we thus suggest posttranslational modifications such as phosphorylation may underlie this effect. In this regard, changes in intracellular signaling cascades have been previously reported in mutant-htt expressing cells (Borrell-Page et al., 2006). In addition, many proteins, such as the molecular chaperones HSP70/HSP90 involved in protein folding and maturation (Wegele et al., 2004), interact with mutant-htt (Kaltenbach et al., 2007), resulting in altered function. These chaperones also interact with the P2X7 receptor (Kim et al., 2001), and thus could modify the P2X7 folding and stability, and consequently its functionality.

To check whether mutant htt-mediated alterations in the P2X7 receptor can induce apoptotic cell death, we performed survival assays on primary cortical and striatal neuronal cultures from Tet/HD94 and R6/1 mice. As previously reported, viability of untreated primary neurons from Tet/HD94 mice was indistinguishable from wild-type mice (Martin-Aparicio et al., 2001). In the case of Tet/HD94 striatal neurons, a trend towards decreased viability was observed in response to exposure to BzATP, though this did not reach statistical significance. However, in cortical neurons, exposure to the ATP analogue dramatically reduced viability of Tet/HD94 neurons by  $46.1 \pm 7.7$  %. To further confirm that this apoptotic effect was due to stimulation of P2X7 receptors, cells were preincubated with its specific antagonist BBG, which fully prevented the deleterious effect of Bz-ATP on neuron viability. In good agreement with these results, Bz-ATP also induced cortical neuron death from R6/1 mice at doses that did not affect survival of wild-type neurons.

In view of the neuroprotective effect of BBG on P2X7 mediated neuronal death in culture, we investigated the potential therapeutic efficacy of this antagonist *in vivo* in a mouse model of HD. Since a significant increase in P2X7 level in the striatum of R6/1 mice is first observed at the age of 8 months BBG

## Summary

---

(45.5 mg/kg, i.p.) or vehicle (PBS) was administered every 48 hours over four weeks to 32 week-old R6/1 mice and to their corresponding wild-type littermates.

The progressive decline in body weight that normally occurs in untreated R6/1 mice also occurred in vehicle (PBS)-treated R6/1 mice. However, BBG administration fully prevented the body weight loss in R6/1 mice without affecting the body weight of wild-type mice. More importantly, while vehicle treated-R6/1 mice displayed a deterioration in motor performance over the four-week testing period, BBG-treated mice displayed no significant deterioration over the four weeks and at the end of the testing period performed significantly better than vehicle treated-R6/1 mice. In contrast, BBG treatment did not affect the motor performance of wild type mice since both PBS- and BBG-treated wild type mice showed the typical progressive improvement in motor performance. In view of the behavioral improvement of R6/1 mice treated with the BBG antagonist, we decided to also test the recently developed P2X7 antagonist A-438079 which reportedly modulates pathological nociception after acute administration to rats (Nelson et al., 2006; McGaraughty et al., 2007). Since 76  $\mu\text{mol/Kg}$  (i.p.) is the reported  $\text{ED}_{50}$  of A-438079 in acute reversal of allodynia in the rat model (Nelson et al., 2006), we administered 100  $\mu\text{mol/kg}$  i.p. once daily to eight month-old R6/1 mice over four weeks. A-438079 administration resulted in a marked tendency to prevent the body weight decline that occurs in vehicle treated mice. However, in the Rota-rod test, A-438079 treated mice were indistinguishable from vehicle-administered mice at all but the last time point (after 28 days of administration) at which a moderate but insignificant improvement was detected. These minor effects of A-438079 compared to those of BBG probably reflect the very short half-life (1.02 h) and limited bioavailability (19%) of this compound (Nelson et al., 2006).

In good agreement with the protective effect of BBG on HD primary cultured neurons, the increased number of apoptotic neurons seen in vehicle treated R6/1 mice was fully prevented in BBG treated counterparts. In summary, these results demonstrate a beneficial effect of the P2X7 antagonist in mutant-htt induced neuronal apoptosis *in vivo*, recapitulating the protective effect observed

in primary neuronal cultures and complementing the *in vivo* positive effect of the antagonist in the body weight- and motor coordination phenotypes.

Based on our *in vitro* and *in vivo* results, the protective effect of P2X7 antagonist administration seems to be clearly exerted in neurons. However, since the P2X7 receptor is also found in glial cells, we analyzed whether BBG administration also affected the gliosis that takes place in HD mice. In this regard, P2X7 antagonists have been shown to exert anti-inflammatory effect in microglia (Inoue, 2002; Le Feuvre et al., 2002). Anti-inflammatory drugs such as minocycline have also been postulated for treatment of HD (Yonget al., 2004) though concerns remain regarding its efficacy in animal models (Herschet al., 2003; Smith et al., 2003) and its safety in humans (Reynolds, 2007). Therefore, apart from the mentioned neuronal effects, *in vivo* administration of BBG might also have produced an anti-inflammatory effect. However, this does not seem to be the case due to we did not observe decreased microgliosis or astrocytosis in BBG-treated HD mice.

Finally, the therapeutic efficacy of the P2X7 antagonist BBG in HD mice strongly suggest a potential of P2X7 antagonists in the treatment of HD patients. BBG is slightly less potent antagonist of the human P2X7 receptor, as compared to rodent (Jianget al., 2000). However, other P2X7 antagonists such as KN62 are more potent at human P2X7 receptors (Humphrey et al., 1998). Regarding the more recent selective antagonist A-438079, its pharmacodynamics and bioavailability do not appear appropriate for chronic i.p. administration protocols. However, given the current research on its applicability for the treatment of other conditions such as chronic pain (Donnelly-Roberts and Jarvis, 2007), it is conceivable that other routes of administration or close derivatives will be soon explored for chronic administration. Therefore, in view of our data and of the current state of research on new P2X7 antagonists, BBG likely has the best potential for translation to a clinical setting. Importantly, BBG may have the advantage of predicted low toxicity based on the safety of its analogue, Brilliant Blue-CFC, which has been used as a food additive dye for decades (Gross, 1961). Preclinical studies are currently being conducted with BBG itself for

## *Summary*

---

ophthalmologic applications, with no detectable toxic effects (Hisatomiet al., 2006; Uenoet al., 2007).

## **CONCLUDING REMARKS**

1. Tissue non specific alkaline phosphatase (TNAP) regulates axonal growth controlling the local extracellular ATP from the dynamic axonal growth zones.
2. TNAP and P2X7 receptor coordinately control axonal elongation therefore TNAP eliminates the P2X7 receptor endogenous agonist.
3. Both proteins, TNAP and P2X7, could be relevant at the nervous system development, synaptic plasticity and neuronal regeneration.
4. P2X7 receptor levels are increased in the cortico-striatal projections of two murine models of Huntington's disease.
5. Besides the increased sensitivity to P2X7 agonist, P2X7 function is also altered as a consequence of mutant huntingtin expression, which increases the susceptibility to apoptosis triggered by P2X7 receptor stimulation.
6. In vivo P2X7 receptor blockade with two different antagonists of a Huntington's disease mouse model prevents from neuronal apoptosis and reduces the corporal weight loss and motor coordination observed in advanced stages of disease progression.
7. The altered P2X7 receptor may contribute to Huntington's disease pathogenesis and suggest a therapeutic potential of P2X7 antagonists for HD.

## **Bibliography**

- Abbracchio MP, Cattabeni F, Clementi F, Sher E** (1989) Adenosine receptors linked to adenylate cyclase activity in human neuroblastoma cells: modulation during cell differentiation. *Neuroscience* 30:819-825.
- Abbracchio MP, Burnstock G, Verkhratsky A, Zimmermann H** (2009) Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends in neurosciences* 32:19-29.
- Amadio S, D'Ambrosi N, Cavaliere F, Murra B, Sancesario G, Bernardi G, Burnstock G, Volonte C** (2002) P2 receptor modulation and cytotoxic function in cultured CNS neurons. *Neuropharmacology* 42:489-501.
- Armstrong JN, Brust TB, Lewis RG, MacVicar BA** (2002) Activation of presynaptic P2X7-like receptors depresses mossy fiber-CA3 synaptic transmission through p38 mitogen-activated protein kinase. *J Neurosci* 22:5938-5945.
- Borrell-Pages M, Zala D, Humbert S, Saudou F** (2006) Huntington's disease: from huntingtin function and dysfunction to therapeutic strategies. *Cell Mol Life Sci* 63:2642-2660.
- Bourne JN, Harris KM** (2008) Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annu Rev Neurosci* 31:47-67.
- Burnstock G** (2007) Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci* 64:1471-1483.
- Canals JM, Pineda JR, Torres-Peraza JF, Bosch M, Martin-Ibanez R, Munoz MT, Mengod G, Ernfors P, Alberch J** (2004) Brain-derived neurotrophic factor regulates the onset and severity of motor dysfunction associated with enkephalinergic neuronal degeneration in Huntington's disease. *J Neurosci* 24:7727-7739.
- Cheung KK, Chan WY, Burnstock G** (2005) Expression of P2X purinoceptors during rat brain development and their inhibitory role on motor axon outgrowth in neural tube explant cultures. *Neuroscience* 133:937-945.
- Deuchars SA, Atkinson L, Brooke RE, Musa H, Milligan CJ, Batten TF, Buckley NJ, Parson SH, Deuchars J** (2001) Neuronal P2X7 receptors are targeted to presynaptic terminals in the central and peripheral nervous systems. *J Neurosci* 21:7143-7152.
- Diaz-Hernandez M, Pintor J, Miras-Portugal MT** (2000) Modulation of the dinucleotide receptor present in rat midbrain synaptosomes by adenosine and ATP. *Br J Pharmacol* 130:434-440.
- Diaz-Hernandez M, Pintor J, Castro E, Miras-Portugal MT** (2002) Co-localisation of functional nicotinic and ionotropic nucleotide receptors in isolated cholinergic synaptic terminals. *Neuropharmacology* 42:20-33.

- Diaz-Hernandez M, del Puerto A, Diaz-Hernandez JI, Diez-Zaera M, Lucas JJ, Garrido JJ, Miras-Portugal MT** (2008) Inhibition of the ATP-gated P2X7 receptor promotes axonal growth and branching in cultured hippocampal neurons. *J Cell Sci* 121:3717-3728.
- Donnelly-Roberts DL, Jarvis MF** (2007) Discovery of P2X7 receptor-selective antagonists offers new insights into P2X7 receptor function and indicates a role in chronic pain states. *Br J Pharmacol* 151:571-579.
- Dotti CG, Sullivan CA, Banker GA** (1988) The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 8:1454-1468.
- Escalante-Alcalde D, Recillas-Targa F, Hernandez-Garcia D, Castro-Obregon S, Terao M, Garattini E, Covarrubias L** (1996) Retinoic acid and methylation cis-regulatory elements control the mouse tissue non-specific alkaline phosphatase gene expression. *Mech Dev* 57:21-32.
- Fonta C, Negyessy L, Renaud L, Barone P** (2005) Postnatal development of alkaline phosphatase activity correlates with the maturation of neurotransmission in the cerebral cortex. *J Comp Neurol* 486:179-196.
- Frotscher M, Heimrich B, Deller T** (1997) Sprouting in the hippocampus is layer-specific. *Trends in neurosciences* 20:218-223.
- Gomez-Villafuertes R, Gualix J, Miras-Portugal MT** (2001) Single GABAergic synaptic terminals from rat midbrain exhibit functional P2X and dinucleotide receptors, able to induce GABA secretion. *J Neurochem* 77:84-93.
- Gomez-Villafuertes R, del Puerto A, Diaz-Hernandez M, Bustillo D, Diaz-Hernandez JI, Huerta PG, Artalejo AR, Garrido JJ, Miras-Portugal MT** (2009) Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II signalling cascade mediates P2X7 receptor-dependent inhibition of neuritegenesis in neuroblastoma cells. *Febs J* 276:5307-5325.
- Grimes CA, Jope RS** (2001) CREB DNA binding activity is inhibited by glycogen synthase kinase-3 beta and facilitated by lithium. *J Neurochem* 78:1219-1232.
- Gross E** (1961) [On induction of sarcomas with specially purified triphenylmethane dyes, Light Green SF and Patent Blue AE, following repeated subcutaneous injection in rats.]. *Z Krebsforsch* 64:287-304.
- Gualix J, Gomez-Villafuertes R, Diaz-Hernandez M, Miras-Portugal MT** (2003) Presence of functional ATP and dinucleotide receptors in glutamatergic synaptic terminals from rat midbrain. *J Neurochem* 87:160-171.
- Gusella JF, McNeil S, Persichetti F, Srinidhi J, Novelletto A, Bird E, Faber P, Vonsattel JP, Myers RH, MacDonald ME** (1996) Huntington's disease. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 61:615-626.

- Hersch S, Fink K, Vonsattel JP, Friedlander RM** (2003) Minocycline is protective in a mouse model of Huntington's disease. *Ann Neurol* 54:841; author reply 842-843.
- Hisatomi T, Enaida H, Matsumoto H, Kagimoto T, Ueno A, Hata Y, Kubota T, Goto Y, Ishibashi T** (2006) Staining ability and biocompatibility of brilliant blue G: preclinical study of brilliant blue G as an adjunct for capsular staining. *Arch Ophthalmol* 124:514-519.
- Humphreys BD, Virginio C, Surprenant A, Rice J, Dubyak GR** (1998) Isoquinolines as antagonists of the P2X7 nucleotide receptor: high selectivity for the human versus rat receptor homologues. *Mol Pharmacol* 54:22-32.
- Inoue K** (2002) Microglial activation by purines and pyrimidines. *Glia* 40:156-163.
- Jiang LH, Mackenzie AB, North RA, Surprenant A** (2000) Brilliant blue G selectively blocks ATP-gated rat P2X(7) receptors. *Mol Pharmacol* 58:82-88.
- Jun DJ, Kim J, Jung SY, Song R, Noh JH, Park YS, Ryu SH, Kim JH, Kong YY, Chung JM, Kim KT** (2007) Extracellular ATP mediates necrotic cell swelling in SN4741 dopaminergic neurons through P2X7 receptors. *J Biol Chem* 282:37350-37358.
- Juranyi Z, Sperlagh B, Vizi ES** (1999) Involvement of P2 purinoceptors and the nitric oxide pathway in [3H]purine outflow evoked by short-term hypoxia and hypoglycemia in rat hippocampal slices. *Brain Res* 823:183-190.
- Kaltenbach LS et al.** (2007) Huntingtin interacting proteins are genetic modifiers of neurodegeneration. *PLoS Genet* 3:e82.
- Kaunitz JD, Yamaguchi DT** (2008) TNAP, TrAP, ecto-purinergic signaling, and bone remodeling. *J Cell Biochem* 105:655-662.
- Kim M, Jiang LH, Wilson HL, North RA, Surprenant A** (2001) Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex. *Embo J* 20:6347-6358.
- Kozlenkov A, Le Du MH, Cuniasse P, Ny T, Hoylaerts MF, Millan JL** (2004) Residues determining the binding specificity of uncompetitive inhibitors to tissue-nonspecific alkaline phosphatase. *J Bone Miner Res* 19:1862-1872.
- Langer D, Ikehara Y, Takebayashi H, Hawkes R, Zimmermann H** (2007) The ectonucleotidases alkaline phosphatase and nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2 are associated with subsets of progenitor cell populations in the mouse embryonic, postnatal and adult neurogenic zones. *Neuroscience* 150:863-879.
- Langer D, Hammer K, Koszalka P, Schrader J, Robson S, Zimmermann H** (2008) Distribution of ectonucleotidases in the rodent brain revisited. *Cell Tissue Res* 334:199-217.

- Le Feuvre R, Brough D, Rothwell N** (2002) Extracellular ATP and P2X7 receptors in neurodegeneration. *Eur J Pharmacol* 447:261-269.
- Leon D, Sanchez-Nogueiro J, Marin-Garcia P, Miras-Portugal MT** (2008) Glutamate release and synapsin-I phosphorylation induced by P2X7 receptors activation in cerebellar granule neurons. *Neurochem Int* 52:1148-1159.
- Li CM, Campbell SJ, Kumararatne DS, Hill AV, Lammas DA** (2002) Response heterogeneity of human macrophages to ATP is associated with P2X7 receptor expression but not to polymorphisms in the P2RX7 promoter. *FEBS Lett* 531:127-131.
- Li JY, Plomann M, Brundin P** (2003) Huntington's disease: a synaptopathy? *Trends Mol Med* 9:414-420.
- Liu BP, Cafferty WB, Budel SO, Strittmatter SM** (2006) Extracellular regulators of axonal growth in the adult central nervous system. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361:1593-1610.
- Mangiarini L, Sathasivam K, Seller M, Cozens B, Harper A, Hetherington C, Lawton M, Trottier Y, Lehrach H, Davies SW, Bates GP** (1996) Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* 87:493-506.
- Martin-Aparicio E, Yamamoto A, Hernandez F, Hen R, Avila J, Lucas JJ** (2001) Proteasomal-dependent aggregate reversal and absence of cell death in a conditional mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci* 21:8772-8781.
- McGaraughty S, Chu KL, Namovic MT, Donnelly-Roberts DL, Harris RR, Zhang XF, Shieh CC, Wismer CT, Zhu CZ, Gauvin DM, Fabiyi AC, Honore P, Gregg RJ, Kort ME, Nelson DW, Carroll WA, Marsh K, Faltynek CR, Jarvis MF** (2007) P2X7-related modulation of pathological nociception in rats. *Neuroscience* 146:1817-1828.
- Millan JL** (2006) Alkaline Phosphatases : Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes. *Purinergic signalling* 2:335-341.
- Miras-Portugal MT, Diaz-Hernandez M, Giraldez L, Hervas C, Gomez-Villafuertes R, Sen RP, Gualix J, Pintor J** (2003) P2X7 receptors in rat brain: presence in synaptic terminals and granule cells. *Neurochem Res* 28:1597-1605.
- Narisawa S, Frohlander N, Millan JL** (1997) Inactivation of two mouse alkaline phosphatase genes and establishment of a model of infantile hypophosphatasia. *Dev Dyn* 208:432-446.
- Narisawa S, Hasegawa H, Watanabe K, Millan JL** (1994) Stage-specific expression of alkaline phosphatase during neural development in the mouse. *Dev Dyn* 201:227-235.

- Nelson DW, Gregg RJ, Kort ME, Perez-Medrano A, Voight EA, Wang Y, Grayson G, Namovic MT, Donnelly-Roberts DL, Niforatos W, Honore P, Jarvis MF, Faltynek CR, Carroll WA** (2006) Structure-activity relationship studies on a series of novel, substituted 1-benzyl-5-phenyltetrazole P2X7 antagonists. *J Med Chem* 49:3659-3666.
- North RA** (2002) Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 82:1013-1067.
- North RA, Verkhratsky A** (2006) Purinergic transmission in the central nervous system. *Pflugers Arch* 452:479-485.
- Ortega F, Perez-Sen R, Morente V, Delicado EG, Miras-Portugal MT** (2010) P2X7, NMDA and BDNF receptors converge on GSK3 phosphorylation and cooperate to promote survival in cerebellar granule neurons. *Cell Mol Life Sci*.
- Ortega Z, Diaz-Hernandez M, Lucas JJ** (2007) Is the ubiquitin-proteasome system impaired in Huntington's disease? *Cell Mol Life Sci* 64:2245-2257.
- Phillis JW, O'Regan MH, Perkins LM** (1993) Adenosine 5'-triphosphate release from the normoxic and hypoxic in vivo rat cerebral cortex. *Neurosci Lett* 151:94-96.
- Reynolds N** (2007) Revisiting safety of minocycline as neuroprotection in Huntington's disease. *Mov Disord* 22:292.
- Riedel T, Lozinsky I, Schmalzing G, Markwardt F** (2007) Kinetics of P2X7 receptor-operated single channels currents. *Biophys J* 92:2377-2391.
- Riley BE, Orr HT** (2006) Polyglutamine neurodegenerative diseases and regulation of transcription: assembling the puzzle. *Genes Dev* 20:2183-2192.
- Robson SC, Sevigny J, Zimmermann H** (2006) The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic signalling* 2:409-430.
- Ross CA** (1997) Intranuclear neuronal inclusions: a common pathogenic mechanism for glutamine-repeat neurodegenerative diseases? *Neuron* 19:1147-1150.
- Ryu JK, Kim J, Choi SH, Oh YJ, Lee YB, Kim SU, Jin BK** (2002) ATP-induced in vivo neurotoxicity in the rat striatum via P2 receptors. *Neuroreport* 13:1611-1615.
- Schnorrer F, Dickson BJ** (2004) Axon guidance: morphogens show the way. *Curr Biol* 14:R19-21.
- Smith DL, Woodman B, Mahal A, Sathasivam K, Ghazi-Noori S, Lowden PA, Bates GP, Hockly E** (2003) Minocycline and doxycycline are not beneficial in a model of Huntington's disease. *Ann Neurol* 54:186-196.
- Sperlagh B, Heinrich A, Csolle C** (2007) P2 receptor-mediated modulation of neurotransmitter release-an update. *Purinergic signalling* 3:269-284.

- Sugars KL, Rubinsztein DC** (2003) Transcriptional abnormalities in Huntington disease. *Trends Genet* 19:233-238.
- The Huntington's disease collaborative research group** (1993) A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell* 72:971-983.
- Thibaudeau G, Drawbridge J, Dollarhide AW, Haque T, Steinberg MS** (1993) Three populations of migrating amphibian embryonic cells utilize different guidance cues. *Dev Biol* 159:657-668.
- Ueno A, Hisatomi T, Enaida H, Kagimoto T, Mochizuki Y, Goto Y, Kubota T, Hata Y, Ishibashi T** (2007) Biocompatibility of brilliant blue G in a rat model of subretinal injection. *Retina* 27:499-504.
- Varma H, Cheng R, Voisine C, Hart AC, Stockwell BR** (2007) Inhibitors of metabolism rescue cell death in Huntington's disease models. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:14525-14530.
- Vila M, Przedborski S** (2003) Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 4:365-375.
- Vonsattel JP, DiFiglia M** (1998) Huntington disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 57:369-384.
- Wegele H, Muller L, Buchner J** (2004) Hsp70 and Hsp90--a relay team for protein folding. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 151:1-44.
- Yamamoto A, Lucas JJ, Hen R** (2000) Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a conditional model of Huntington's disease. *Cell* 101:57-66.
- Yong VW, Wells J, Giuliani F, Casha S, Power C, Metz LM** (2004) The promise of minocycline in neurology. *Lancet Neurol* 3:744-751.
- Zhou H, Manji SS, Findlay DM, Martin TJ, Heath JK, Ng KW** (1994) Novel action of retinoic acid. Stabilization of newly synthesized alkaline phosphatase transcripts. *J Biol Chem* 269:22433-22439.
- Zimmermann H** (2006) Ectonucleotidases in the nervous system. *Novartis Found Symp* 276:113-128; discussion 128-130, 233-117, 275-181.



# **Introducción**



## **1. EL SISTEMA PURINÉRGICO.**

### **1.1 Los nucleótidos en la neurotransmisión.**

El ATP (adenosina 5'-trifosfato) es una molécula indispensable para el desarrollo de la vida. A nivel intracelular participa como fuente de energía en el metabolismo celular, en la regulación enzimática, el mantenimiento de los gradientes iónicos de membrana, el trabajo mecánico del movimiento celular y como integrante estructural de los ácidos nucleicos. Además, su gran tamaño y su naturaleza iónica impiden que atraviese libremente la membrana plasmática de las células vivas. Por otro lado, en el exterior de la célula, es rápidamente hidrolizado por acción de las ectonucleotidasas, lo cual explica el enorme retraso en el reconocimiento del papel que juegan los nucleótidos como mensajeros extracelulares. Sin embargo, hoy en día se conoce la participación de los nucleótidos en multitud de procesos extracelulares, entre los que se encuentran la contracción muscular, la secreción endocrina y paracrina, la respuesta inmune e inflamatoria, la agregación plaquetaria, la función cardíaca, y dentro del sistema nervioso, en la transmisión del dolor, neuroprotección, control central de funciones autónomas y modulación de la neurotransmisión (Gordon, 1986; DUBYAK y el-MOATASSIM, 1993; BURNSTOCK, 1997, 2007a).

Las primeras evidencias de la actuación de las purinas como mensajeros extracelulares fueron aportadas por Drury y Szent-Györgyi en 1929 en diversos estudios en el sistema cardiovascular (Drury y Szent-Györgyi, 1929). Sin embargo, pasaron 40 años hasta que se descubrieron unos nervios denominados no-adrenérgicos no-colinérgicos (NANC), que liberaban ATP como neurotransmisor (Burnstock y cols., 1970; Burnstock y cols., 1972).

En 1983 Jahr y Jessel obtuvieron la primera prueba directa de las acciones extracelulares del ATP en el sistema nervioso central (SNC), al registrar corrientes de entrada en neuronas del asta dorsal de la médula espinal tras la estimulación con ATP (Jahr y Jessell, 1983). Simultáneamente, (Krishtal y cols., 1983) observaron el mismo efecto en neuronas de diversos ganglios sensoriales. Posteriormente se describió la implicación del ATP en la transmisión de sensaciones propioceptivas (Salter y cols., 1993) y de señales nociceptivas

medulares (Chen y cols., 1995). En lo referente a estructuras centrales, se registraron por primera vez corrientes postsinápticas excitatorias en cortes de habénula medial (Edwards y cols., 1992) y en el hipocampo (Pankratov y cols., 1998).

Todo ello indicaba que el ATP debía y debe ser considerado un verdadero neurotransmisor rápido dentro del SNC. Sin embargo, los nucleótidos pueden ejercer también acciones a largo plazo en las neuronas, como diferenciación, crecimiento de neuritas o supervivencia, además de intervenir en procesos patológicos como isquemia, enfermedades neurodegenerativas o trauma cerebral (Burnstock, 2007a, 2008).

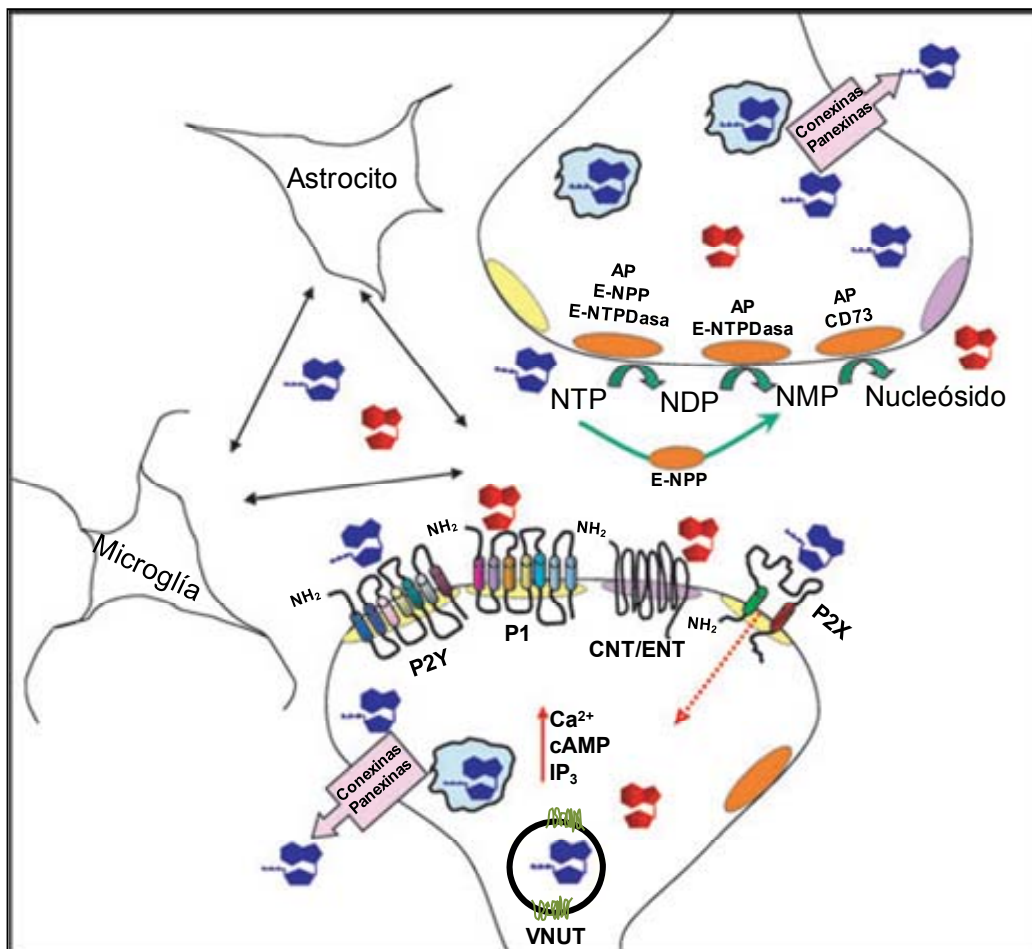
Recientemente se ha denominado al complejo molecular responsable de los efectos biológicos de los ligandos extracelulares de purina y pirimidina *purinoma* (Figura 1) (Volonte y D'Ambrosi, 2009). Está formado por una gran variedad de ligandos purinérgicos y pirimidinérgicos, ecto-enzimas del metabolismo de los nucleótidos (ecto-nucleotidasas), receptores purinérgicos P1 (receptores de nucleósidos) y P2 (receptores de nucleótidos) y transportadores de nucleósidos y nucleótidos. (Volonte y D'Ambrosi, 2009).

## **1.2 Almacenamiento y liberación de nucleótidos.**

El papel del ATP o de cualquier otro nucleótido como agente neurotransmisor requiere de la presencia de dichos compuestos en el medio extracelular. En este sentido, se ha descrito que el ATP y otros nucleótidos están presentes en una amplia variedad de vesículas de almacenamiento y secreción, como por ejemplo las vesículas aminérgicas y colinérgicas de los tejidos neurales o neuroendocrinos, o los gránulos de plaquetas y mastocitos (Burnstock, 2007a). Sin embargo, hasta hace poco tiempo se asumía que la única fuente de ATP extracelular procedía de células dañadas o muertas. Hoy en día está reconocido que la liberación de ATP de células sanas es un mecanismo fisiológico (Bodin y Burnstock, 2001; Lazarowski y cols., 2003).

El concepto de cotransmisión acuñado en los años 70 y postulaba la idea de que una misma célula nerviosa podía almacenar y liberar diferentes tipos de neurotransmisores. De acuerdo con este concepto, se describió

posteriormente el almacenamiento y liberación del ATP en terminales colinérgicas (Richardson y Brown, 1987), noradrenérgicas simpáticas y parasimpáticas (von Kugelgen y Starke, 1991) y GABAérgicas del asta dorsal de la médula espinal (Jo y Schlichter, 1999; Jo y Role, 2002), además de la liberación exocitótica y dependiente de  $Ca^{2+}$  del ATP en terminales nerviosas centrales aisladas (Sawynok y cols., 1993). Todos estos estudios, unidos a multitud de estudios posteriores, establecen firmemente el concepto de cotransmisión que se conoce en la actualidad (Pankratov y cols., 2006).



**Figura 1. Esquema representativo del purinoma.** La maquinaria proteica involucrada en la interacción biológica de los ligandos extracelulares de purina y pirimidina: receptores como P2X y P2Y de nucleótidos tri- y di-fosfatos, o receptores de nucleósidos y nucleótidos monofosfato P1; enzimas de hidrólisis de nucleótidos extracelulares, como ecto-nucleótido trifosfo difosfohidrolasas (E-NTPDasas), pirofosfatasas/fosfodiesterasas (E-NPP), ecto-5' nucleotidasa (CD73) y fosfatasas alcalinas (AP); transportadores de nucleósidos (CNT/ENT); transportadores de nucleótidos (VNUT) y canales (conexinas y panexinas). Adaptado de Volonté y D'Ambrosi, 2009.

Además de los nucleótidos clásicos se conoce una familia de nucleótidos relacionados estructuralmente con el ATP denominados diadenosina polifosfatos ( $Ap_nA$ ). Estos compuestos que también se almacenan en vesículas secretoras ejercen sus acciones tanto a nivel intracelular como extracelular en el SNC y periférico (Pintor y cols., 1993). Se trata de compuestos naturales formados por dos moléculas de adenosina unidas por una cadena de grupos fosfato de longitud variable ( $n = 2-7$ ). Se detectaron por primera vez almacenados en gránulos cromafines junto con ATP y otros neurotransmisores (Rodríguez del Castillo y cols., 1988; Pintor y cols., 1991; Pintor y cols., 1992). Los diadenosina polifosfatos, principalmente el  $Ap_4A$  y el  $Ap_5A$ , se encontraron junto con el ATP, ADP y GTP en vesículas colinérgicas del órgano eléctrico del pez *Torpedo marmorata* (Pintor, 1992). También se liberan por exocitosis junto con el ATP en terminales nerviosas de rata (Pintor y cols., 1993, 1995), lo cual apoya el papel transmisor de los nucleótidos y dinucleótidos en la neurotransmisión. Además se ha demostrado la capacidad del dinucleótido  $Ap_5A$  y del ATP de promover la liberación de glutamato, acetilcolina y GABA en terminaciones sinápticas aisladas de cerebro medio de rata, reconociéndose de este modo su importante papel neuromodulador (Diaz-Hernandez y cols., 2001; Gomez-Villafuertes y cols., 2001; Diaz-Hernandez y cols., 2002a; Gomez-Villafuertes y cols., 2003; Gualix y cols., 2003; Diaz-Hernandez y cols., 2004a; Gomez-Villafuertes y cols., 2004).

El hecho de que los nucleótidos y dinucleótidos de adenina se almacenen en el interior de vesículas de secreción alcanzando concentraciones mucho mayores de las que se encuentran en el citoplasma celular ( $>100$  mM frente a 2-5 mM), pone de manifiesto la necesidad de un sistema de transporte activo específico. Hasta hace muy poco se conocían algunas características funcionales y cinéticas de dicho transportador, como la baja especificidad que permitía el transporte de una gran variedad de nucleótidos, o su comportamiento mnemónico (Gualix y cols., 1997; Gualix y cols., 1999), pero la proteína responsable del transporte no se había identificado. En 2008, Sawada y cols. presentaron evidencias de la actuación de la proteína SLC17A9 como transportador vesicular de nucleótidos (VNUT). Se trata de una isoforma de la

familia de los transportadores SLC17 con 12 segmentos transmembrana y 430 aminoácidos. Esta proteína ha sido identificada tanto en humano como en ratón fundamentalmente en el cerebro y en la médula adrenal, donde juega un papel vital en el almacenamiento y liberación de nucleótidos (Sawada y cols., 2008).

Además de lo anteriormente mencionado existen múltiples evidencias obtenidas en diversos tipos celulares, como células endoteliales, musculares y gliales, que señalan la existencia de una liberación de ATP no excitotónica en respuesta a estímulos como hipoxia, inflamación, daño tisular o estrés mecánico (Bodin y Burnstock, 2001).

Los mecanismos de liberación no excitotónica de nucleótidos de adenina no están totalmente identificados, aunque se ha propuesto que podrían estar mediados por una serie de transportadores o canales que forman parte de la superfamilia de proteínas ABC ("ATP-binding cassette"). Otras hipótesis señalan la posible participación de canales iónicos dependientes de voltaje, conexinas, panexinas y otros miembros de las uniones estrechas entre células (Buettner y cols., 2000; Bahima y cols., 2006; Eltzschig y cols., 2006). Tampoco podemos olvidar que el UTP, UDP y UDP-glucosa son compuestos funcionales en el Golgi y el grupo del Dr. Boucher ha propuesto su salida mediante exocitosis constitutiva como excedente de la funcionalidad del Golgi (Lazarowski, 2006).

### **1.3 Inactivación ectoenzimática de los nucleótidos.**

Como todos los neurotransmisores, los nucleótidos deben ser inactivados, degradados o retirados del medio extracelular para evitar su acción prolongada. Así, una vez en la hendidura sináptica, son rápidamente hidrolizados por unas enzimas extracelulares específicas denominadas ectonucleotidasas. Como consecuencia de esta hidrólisis los nucleótidos van perdiendo secuencialmente sus grupos fosfato, generando diferentes metabolitos hasta sus correspondientes nucleósidos precursores (Harkness, 1968; Miki y cols., 1986), que a su vez pueden actuar como ligandos fisiológicos de otros receptores purinérgicos.

Las ectonucleotidasas están formadas por varias familias de enzimas que se pueden diferenciar gracias a sus propiedades funcionales y moleculares.

Varían en su preferencia y afinidad por el sustrato, en el producto formado, la dependencia de cationes y el pH óptimo catalítico. Se encuentran ampliamente distribuidas en todos los tejidos y actúan de forma concertada o consecutiva formando cascadas de hidrólisis. Normalmente se encuentran ancladas a la membrana celular con su dominio catalítico orientado hacia el espacio extracelular, aunque también se han descrito formas solubles liberadas al medio (denominadas exonucleotidasas) a partir de vesículas sinápticas o, como la ecto-5'-nucleotidasa, como resultado de la hidrólisis de su anclaje a la membrana (Todorov y cols., 1997). Además, existen evidencias de la multifuncionalidad de estas enzimas, pudiendo actuar también en procesos de adhesión celular o en funciones de receptores transmembrana. (Zimmermann y cols., 2007)

Las ectonucleotidasas se clasifican en las siguientes familias (Tabla 1):

**Ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasas (E-NTPDasas).** También se conocen como ecto-ATPasas, ecto-ADPasas, ecto-apiratasas o CD39. Esta familia está formada por 8 miembros, de los cuales sólo las NTPDasas 1, 2, 3 y 8 son enzimas extracelulares de membrana, con dos hélices transmembrana y un dominio extracelular largo portador del sitio catalítico (Bigonnesse y cols., 2004; Robson y cols., 2006). Hidrolizan nucleósidos tri- y difosfatos, generando los correspondientes monofosfatos, aunque los ratios de hidrólisis varían considerablemente entre las cuatro enzimas (Kukulski y cols., 2005).

**Ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasas (E-NPP).** Estas enzimas son glicoproteínas ancladas a membrana por un único segmento, con el extremo catalítico hacia el espacio extracelular. Comparten su pH óptimo catalítico alcalino con las fosfatasas alcalinas. Los tres miembros de esta familia de ectoenzimas, NPP1, 2 y 3, hidrolizan enlaces 5'-monodiester en nucleótidos y sus derivados, generando la liberación de nucleósidos 5'-monofosfato (Goding y cols., 2003; Stefan y cols., 2005). También pueden hidrolizar otros compuestos, como los dinucleósidos polifosfatos (Vollmayer y cols., 2003).

**Ecto-5'-nucleotidasa.** También se la conoce como CD-73. Es una proteína dimérica de unión a zinc, anclada a la membrana por un glicosilfosfatidil inositol (GPI), que hidroliza los nucleósidos monofosfato generando los

respectivos nucleósidos. Es decir, cataliza la etapa final de la cadena de hidrólisis de los nucleótidos. Se encuentra ampliamente distribuida entre los diferentes tejidos (Zimmermann, 1996, 2000).

**Tabla 1. Familias de ectonucleotidasas. (Tomado de Robson y cols., 2006; Zimmermann y cols., 2007).**

Ecto-Nucleotidasas		Reacción catalizada	Inhibidores
<i>Familia Ecto-NTPDasa</i>			
	<i>Preferencia de sustrato</i>		
NTPDasa 1 (CD39)	NTP ~ NDP	NTP → NMP + 2Pi NDP → NMP + Pi	ARL 67156; 8-BuS-ATP; polioxometalatos; antagonistas receptores P2.
NTPDasa 2 (CD39L1)	NTP >>> NDP		
NTPDasa 3 (CD39L3)	NTP >NDP		
NTPDasa 8	NTP >NDP		
<i>Familia Ecto-nucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasas</i>		NTP, NDP → NMP	
NPP1, NPP2, NPP3		Dinucleósido polifosfatos → NMP + N <sub>p-1</sub>	
		NAD <sup>+</sup> → AMP + nicotinamida mononucleótido	
		UDP-glucosa → UMP + Glucosa-6-fosfato	
<i>Ecto-5'-nucleotidasa</i>		NMP → Nucleósido + Pi	AOPCP
<i>Fosfatasa alcalina</i>			
TNAP		NTP → NDP → AMP → Nucleósido + 3Pi	Levamisole L-homoarginine
Placental			L-fenilalanina
Intestinal De células germinales			

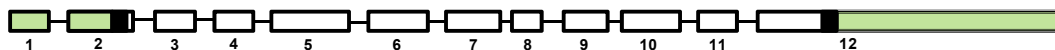
**Fosfatasas alcalinas.** Estas enzimas forman homodímeros y poseen tres cationes en cada sitio catalítico. Liberan el fosfato inorgánico de una gran variedad de compuestos e hidrolizan nucleósidos 5'-tri-, -di- y -monofosfato, generando los correspondientes nucleósidos (Millan, 2006). Las cuatro isoformas de la familia, placentar, intestinal, de células germinales y no específica de tejido

(TNAP), poseen un pH óptimo alcalino y se encuentran ancladas a la membrana plasmática gracias a un glicosilfosfatidil inositol (GPI) (Ogata y cols., 1988). Son enzimas alostéricas no competitivas (Hoylaerts y cols., 1997). Su distribución varía en gran medida entre humanos y roedores (Millan, 2006).

### **1.3.1 Fosfatasa alcalina no específica de tejido (TNAP).**

Esta enzima es la única fosfatasa alcalina que se expresa en cerebro, aunque no es específica de esta estructura, dado que también se localiza en hígado, riñón y hueso.

El gen de la TNAP humana (Alpl), diferente a los genes de las otras isoformas, se localiza en la región distal del brazo corto del cromosoma 1 (1p36.1-p34). Está compuesto por 12 exones y 11 intrones (Figura 2), aunque la secuencia de inicio se localiza en el segundo exón (Smith y cols., 1988). El gen de la TNAP de ratón (Akp2) también está compuesto por 12 exones, pero se localiza en el cromosoma 4 (Terao y cols., 1988; Terao y cols., 1990). Tanto en humano como en ratón adulto y rata se han descrito dos transcritos diferentes dirigidos por dos promotores, 1B y 1L (humano) (Matsuura y cols., 1990) y E1A y E1B (ratón) (Terao y cols., 1990; Studer y cols., 1991) y E1 y E2 en rata (Toh y cols., 1989), que poseen la misma secuencia codificante. La comparación de los genes de las tres especies indica que el promotor 1B humano coincide con los promotores E1A de ratón y E1 rata, y el 1L humano con los E1B de ratón y E2 de rata. Este último grupo de promotores carecen de caja TATA y caja CAAT (Matsuura y cols., 1990; Studer y cols., 1991).



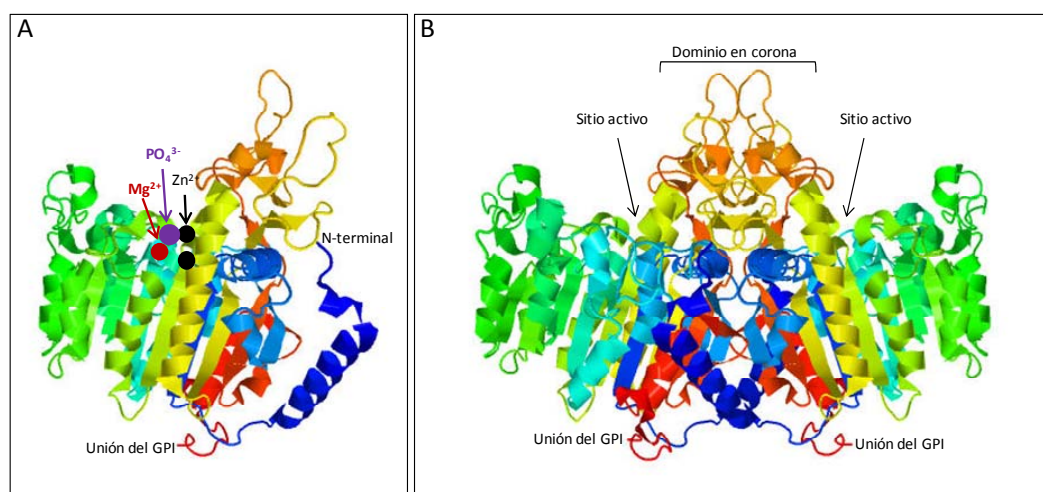
**Figura 2. Estructura del gen de la TNAP.** Los exones se representan como rectángulos. Las regiones que no se traducen se muestran en verde. El péptido señal del extremo N-terminal del exón 2 y la región hidrofóbica del extremo C-terminal del exón 12 se muestran en negro. Adaptado de Weiss y cols., 1988.

La actividad transcripcional de este gen está regulada positivamente por el ácido retinoico, y de forma negativa por la metilación del ADN (Escalante-Alcalde y cols., 1996; Orimo y Shimada, 2005). La expresión de la TNAP

también está regulada por una forma activa de la vitamina D<sub>3</sub> aumentando la estabilidad del ARNm de la enzima (Kyeyune-Nyombi y cols., 1991).

Las alteraciones en el gen de la TNAP causan alteraciones patológicas en el metabolismo que se traducen en hipofosfatasa (Mornet, 2000).

Al igual que el resto de miembros de la familia de las fosfatasa alcalinas, la TNAP es una enzima homodimérica que contiene tres iones metálicos en cada subunidad, dos moléculas de zinc y una de magnesio, y un ión fosfato (Figura 3). El núcleo central de cada subunidad consiste en una serie de β-láminas rodeadas de α-hélices, y la parte más alejada de la membrana plasmática está formada por un dominio flexible conocido como el “dominio en corona” (Figura 3). (Millan, 2006)



**Figura 3. Modelo estructural de la TNAP humana.** A. Monómero. B. Dímero. Se indican los sitios de unión de los cationes, del fosfato y de los GPI (Glicosil fosfatidil inositol) de anclaje a membrana, los sitios activos de cada subunidad y el dominio en corona.

Farmacológicamente, los inhibidores más empleados para su estudio consisten en pequeñas moléculas no competitivas que incluyen L-homoarginina, levamisol y teofilina, todas ellas con una K<sub>i</sub> en el rango micromolar (Kozlenkov y cols., 2004). Recientemente se han desarrollado nuevos inhibidores competitivos derivados del pirazol con mayor potencia que los anteriores (rango nanomolar) (Sidique y cols., 2009), e inhibidores no competitivos derivados de sulfonamidas que actúan en el rango nanomolar alto (Dahl y cols., 2009).

Sus funciones han sido principalmente investigadas en hueso, donde juegan un papel muy importante en la osteogénesis (Henthorn y cols., 1992; Anderson y cols., 2004). Poco se conoce acerca del papel fisiológico de esta isoforma en el sistema nervioso, dada su reciente descripción asociada al neuropilo (Langer y cols., 2008). Sin embargo, se sugirió su participación en la regulación de las vías neurogénicas y gliogénicas del cerebro en desarrollo y adulto, debido a su expresión en células inmaduras de las zonas proliferativas del cerebro embrionario y postnatal, y finalmente en la zona subventricular del cerebro adulto (Langer y cols., 2007). Los ratones deficientes de TNAP reproducen una forma severa de hipofosfatasa y sufren ataques epilépticos, apnea, fallos en el metabolismo de piridoxal 5'-fosfato (PLP) y defectos en la mineralización de los huesos, y mueren tras el destete. El estudio de los tejidos muestra cambios morfológicos en los osteoblastos, desarrollo anormal de las raíces de los nervios lumbares y de la fisiología intestinal, aumento de la apoptosis en el timo y alteraciones en el bazo. Además, como consecuencia de las alteraciones en el metabolismo del PLP, el cerebro de estos ratones posee reducidos niveles de GABA (Waymire y cols., 1995; Narisawa y cols., 1997).

#### **1.4 Receptores de nucleósidos.**

Hasta la fecha se han clonado y caracterizado cuatro tipos de receptores específicos de adenosina, denominados inicialmente receptores P1. Actualmente se los conoce como: A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> y A<sub>3</sub> (Olah y Stiles, 2000; Fredholm y cols., 2001; Yaar y cols., 2005). Todos ellos poseen 7 dominios transmembrana y están acoplados a proteínas G y adenilato ciclasa principalmente. Existen varios agonistas y antagonistas específicos de los distintos subtipos de receptor que se muestran en la Tabla 2 (Burnstock, 2007b). Estos receptores pueden mediar diversos efectos fisiológicos como modulación del sistema cardiovascular, inmune y nervioso (Ledent y cols., 1997; Sun y cols., 2001a). A modo de ejemplo, en nuestro grupo se demostró que la activación de los receptores presinápticos de adenosina modulaban la respuesta a dinucleótidos en terminales nerviosos de cerebro de rata (Diaz-Hernandez y cols., 2000; Diaz-Hernandez y cols., 2002b).

**Tabla 2. Clasificación de los receptores de adenosina. Los datos reflejados en la tabla han sido obtenidos de (Fredholm y cols., 2001; Burnstock, 2007b).**

Receptor	Agonistas	Antagonistas	Transducción de la señal	Distribución mayoritaria
A <sub>1</sub>	CCPA, CPA S-ENBA, CVT-510	DPCPX, N-0840 MRS1754, WRC-0571	G <sub>i/o</sub> ↓AMPc ↑IP <sub>3</sub>	Cerebro, médula espinal, testículos, corazón, terminales nerviosas autónomas
A <sub>2A</sub>	CGS 21680 HE-NECA, CVT-3146	KF17837, SCH58261 ZM241385, K2 6002	G <sub>S</sub> ↑AMPc	Cerebro, corazón, pulmón, bazo
A <sub>2B</sub>	NECA (no selectivo)	Enprofilina, MRE2029-F20 MRS17541, MRS 1706	G <sub>S</sub> ↑AMPc G <sub>Q/11</sub> ↑IP <sub>3</sub>	Intestino grueso, vejiga
A <sub>3</sub>	IB-MECA, 2-Cl-IB-MECA DBXRM, VT160	MRS1220, L-268605 MRS1191, MRS1523 VUF8504	G <sub>i/o</sub> G <sub>Q/11</sub> ↓AMPc ↑IP <sub>3</sub>	Pulmón, hígado, cerebro, testículos, corazón

### 1.5 Receptores de nucleótidos.

Los receptores específicos de nucleótidos, o receptores P2, se dividen en dos familias en función de su estructura molecular y de los mecanismos de transducción de la señal acoplados a su activación: los receptores P2X, que son canales iónicos activados por ligando, y los receptores P2Y, que son receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G (Abbracchio y Burnstock, 1994). Hasta la fecha, en mamíferos se han clonado y caracterizado farmacológicamente siete subunidades diferentes que constituyen los receptores P2X (P2X1-P2X7) y ocho subunidades P2Y (P2Y<sub>1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14</sub>) (Burnstock, 2007b). La nomenclatura empleada en esta Tesis Doctoral tiene en cuenta las últimas directrices del Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Farmacología (IUPHAR) (Collingridge y cols., 2009).

La identificación y caracterización farmacológica de los receptores P2 no es tarea sencilla. La falta de disponibilidad de agonistas y antagonistas específicos y potentes para diferenciar bien los distintos subtipos hace que se produzca solapamiento de las respuestas obtenidas en sistemas que coexpresan varios subtipos de receptores. Además, las ectonucleotidasas presentes pueden degradar o transformar los compuestos utilizados. Por lo

tanto, aunque haya sido posible encontrar en los tejidos nativos receptores análogos a algunos de los receptores P2 clonados (coincidiendo en la distribución, mecanismos de señalización y farmacología), en la mayoría de los casos no se ha podido establecer una correspondencia inequívoca. Por este motivo se tiende a calificar a los receptores endógenos con el sufijo anglosajón “-like” (“P2X<sub>1</sub>-like”, “P2Y<sub>2</sub>-like”, etc.) hasta que se apliquen criterios posteriores que corroboren su identificación.

### **1.5.1 Receptores P2Y.**

Los receptores P2Y son receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G pertenecientes a la familia de los receptores de rodopsina clase A. En general responden a nucleótidos de purinas y pirimidinas. Poseen 7 segmentos transmembrana hidrofóbicos conectados por tres lazos extracelulares y tres intracelulares, el extremo N-terminal se orienta hacia el espacio extracelular, mientras que el extremo C-terminal posee una orientación intracelular. Su señalización está acoplada a proteínas de membrana, como PLC, adenilato ciclasa, o a canales iónicos a través de la interacción con subunidades específicas de las proteínas G (Ralevic y Burnstock, 1998; Abbracchio y cols., 2003). Actualmente la familia consta de ocho subtipos clonados y caracterizados en tejidos humanos o de mamíferos: P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> y P2Y<sub>14</sub> (Abbracchio y cols., 2006; Burnstock, 2007b). Los receptores P2Y se expresan a lo largo de todo el organismo (ver Tabla 3), mediando por sí mismos o modulando multitud de funciones, aunque a día de hoy solamente unos pocos efectos fisiológicos mediados por estos receptores han sido confirmados fuera de toda duda (Fischer y Krugel, 2007).

#### **Señalización intracelular mediada por receptores P2Y.**

Los receptores P2Y activan diversos mecanismos de señalización intracelular. Por un lado, los receptores P2Y<sub>1,2,4,6,11</sub> están acoplados principalmente a la fosfolipasa C (PLC), a través de una proteína G<sub>q/11</sub> insensible a la toxina pertúsica. Como resultado del acoplamiento a la PLC/IP<sub>3</sub>, los receptores P2Y producen incrementos en la concentración intracelular de Ca<sup>2+</sup> mediante la salida de calcio de reservorios intracelulares, y activan la proteína quinasa C

(PKC) en las células que los expresan, activando así numerosas cascadas de señalización secundarias (Erb y cols., 2006), como la cascada de las MAP quinasas en astrocitos (Delicado y cols., 2005) y plaquetas (García y cols., 2007). Los receptores P2Y clonados recientemente, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> y P2Y<sub>14</sub>, parecen estar relacionados mayoritariamente con la disminución de los niveles de AMPc por su acoplamiento a una proteína sensible a la toxina pertúsica Gi/o, aunque el P2Y<sub>13</sub> y el P2Y<sub>14</sub> pueden, de modo adicional, producir incrementos de calcio (Abbracchio y cols., 2006; Erb y cols., 2006). Además, nuestro grupo ha descrito recientemente la inhibición de la glucógeno sintasa quinasa GSK-3 dependiente de AKT, y la translocación nuclear de su sustrato, β-catenina, en neuronas granulares de cerebelo de rata, fenómeno que parece estar mediado por el receptor P2Y<sub>13</sub> (Ortega y cols., 2008).

Además de todas estas vías de señalización, en el sistema nervioso los receptores P2Y están igualmente acoplados a la modulación de canales iónicos, como canales dependientes de voltaje de Ca<sup>2+</sup> o K<sup>+</sup>, los receptores NMDA de glutamato, los propios receptores P2X y los receptores de vanilloides (Lechner y Boehm, 2004; Abbracchio y cols., 2006).

### **Características farmacológicas y distribución de los receptores P2Y en el sistema nervioso.**

Farmacológicamente, los receptores P2Y se pueden clasificar atendiendo a la afinidad que muestran frente a los nucleótidos de adenina y uridina. Aunque estas respuestas varían en potencia dependiendo de las especies, los receptores P2Y pueden dividirse en tres grupos. El primero está formado por los receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub> y P2Y<sub>13</sub>, que son activados únicamente por nucleótidos de adenina (ATP/ADP). Otro grupo lo forman receptores activados tanto por nucleótidos de adenina como de uracilo (receptores P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>4</sub>), y por último el P2Y<sub>6</sub>, que es específico para pirimidinas. Un caso especial es el del P2Y<sub>14</sub>, activado por UDP-glucosa y por otros UDP-azúcares (Abbracchio y cols., 2006; von Kugelgen, 2006; Burnstock, 2007b). La Tabla 3 resume las características farmacológicas de los subtipos de la familia P2Y clonados hasta el momento.

**Tabla 3.- Clasificación de los receptores P2Y.** Los datos reflejados en la tabla han sido obtenidos de (von Kugelgen and Wetter, 2000; Moore y cols., 2001; Abbracchio y cols., 2003; King and Townsend-Nicholson, 2003; von Kugelgen, 2006; Burnstock, 2007b)

Receptor	Potencia de agonistas (EC <sub>50</sub> )	Antagonistas	Transducción de la señal	Distribución mayoritaria
P2Y <sub>1</sub>	2MeSADP>ADPβS>2MeSATP=ADP >ATP UTP, UDP inactivos Ap <sub>3</sub> A>Ap <sub>2</sub> A	MRS 2279>MRS 2179> Suramina> PPADS	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> PLCβ/IP <sub>3</sub> /Ca <sup>2+</sup>	Plaquetas, cerebro, placenta, próstata, endotelio, corazón, músculo esquelético, tracto digestivo, células gliales, osteoclastos.
P2Y <sub>2</sub>	ATP≈UTP>Ap <sub>4</sub> A ADP, UDP y 2MeSATP inactivos	Suramina>Azul reactivo 2, ARC126313	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> ; G <sub>0</sub> , G <sub>12</sub> PLCβ/IP <sub>3</sub> /Ca <sup>2+</sup>	Músculo esquelético, epitelio respiratorio, hueso, pulmón, pituitaria, endotelio de microvasculatura coronaria, bazo, linfocitos, osteoblastos, riñón.
P2Y <sub>4</sub>	UTP>UTPγS>>ATP, UDP (agonistas parciales) UTP=ATP=Ap <sub>4</sub> A (rata)	PPADS Azul reactivo 2 (rata)>Suramina	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> ; G <sub>i/0</sub> PLCβ/IP <sub>3</sub> /Ca <sup>2+</sup>	Intestino, cerebro, pituitaria, placenta, corazón, pulmón, músculo liso vascular, células endoteliales.
P2Y <sub>6</sub>	UDPβS >UDP >UTP>ADP>2MeSATP	Azul Reactivo 2 >PPADS>Suramina, MRS2578	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> PLCβ/IP <sub>3</sub> /Ca <sup>2+</sup>	Placenta, bazo, riñón, corazón, aorta, intestino, cerebro, timo, pulmón
P2Y <sub>11</sub>	ATPγS ≈BzATP>ATP>2MeSATP	Suramina > Azul reactivo 2, NF157, 5'- AMPs	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> y G <sub>s</sub> PLCβ/IP <sub>3</sub> /Ca <sup>2+</sup> Activación AC	Cerebro, placenta, pituitaria, intestino, sistema inmune, granulocitos.
P2Y <sub>12</sub>	2MeSADP=2MeSATP>>ADP>>ATP UTP, UDP inactivos	AR-C69931,AR-C66096, Clopidogrel, Ticlopidina, Azul Reactivo 2, Suramina, 2MeSAMP, CT50547, AZD6140,INS49266, PSB0413, PPADS inactivo, BzATP (rata)	G <sub>i</sub> Inhibición AC Activación RhoA	Plaquetas humanas, cerebro.
P2Y <sub>13</sub>	2MeSADP≥2MeSATP>ADP>> ATP UTP, UDP inactivos	AR-C69931>PPADS>Suramina 2MeSAMP MRS2211	G <sub>i/0</sub> PLCβ/IP <sub>3</sub> /Ca <sup>2+</sup> Inhibición AC Activación RhoA	Bazo, cerebro, células gliales, médula ósea, ganglios linfáticos endotelio.
P2Y <sub>14</sub>	UDP-glucosa>UDP-galactosa>UDP- Glucurónico>UDP-N-acetilglucosamina ATP, ADP, UTP, UDP inactivos		G <sub>i/0</sub> Activación PLC	Placenta, adiposo, estómago, intestino, cerebro, bazo, corazón, pulmón.

Estos receptores tienen una amplia distribución en todo el organismo (ver Tabla 3). Concretamente, en el sistema nervioso central, se ha descrito la expresión de la mayoría de los subtipos conocidos, mediando funciones muy importantes, como la regulación de la plasticidad sináptica, la liberación de neurotransmisores o la regulación de procesos de neurodegeneración y neuroregeneración.

En el cerebro humano se expresan abundantes niveles de ARNm de los receptores P2Y<sub>1</sub> y P2Y<sub>11</sub> en comparación con otros tejidos. El P2Y<sub>1</sub> se expresa principalmente en corteza, cerebelo, hipocampo y ganglios basales (Moore y cols., 2000; Moore y cols., 2001). Por el contrario, únicamente son detectables niveles bajos o moderados del mensajero de los receptores P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub> y P2Y<sub>6</sub> en cerebro humano (Moore y cols., 2001). El receptor P2Y<sub>12</sub> se localiza preferentemente en células gliales (Hollopeter y cols., 2001), al igual que el P2Y<sub>14</sub>, descrito en líneas de astrocitos y microglía (Fumagalli y cols., 2003). Por último se ha descrito la presencia del receptor P2Y<sub>13</sub> en cerebelo, hipocampo, tálamo, sustancia nigra o núcleo caudado (Communi y cols., 2001).

### **1.5.2 Receptores P2X.**

Los receptores P2X son canales iónicos insertados en la membrana plasmática que se activan por la unión del ATP extracelular y una vez activados permiten el paso selectivo de cationes de pequeño tamaño (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup>) (North, 2002). Se expresan en todo el organismo, mediando multitud de procesos que van desde la transmisión sináptica hasta la coagulación sanguínea. Tienen un papel destacado en la transmisión sináptica rápida entre neuronas y en la transmisión neuromuscular en el músculo liso, donde el ATP actúa como neurotransmisor principal (Edwards y cols., 1992; Sneddon y cols., 2000). Hasta la fecha se han identificado siete subunidades P2X diferentes, denominadas P2X1 a P2X7, que se ensamblan en forma de canales homo- o heterotriméricos (Nicke y cols., 1998; Vial y cols., 2004b). También han sido identificados los genes que codifican para cada subunidad. Tanto la subunidad P2X4 como la P2X7 se localizan en el mismo cromosoma (brazo largo del cromosoma 12 humano), al igual que les ocurre a las subunidades P2X1 y P2X5

(brazo corto del cromosoma 13). Sin embargo el resto de subunidades se localizan en cromosomas diferentes. El descubrimiento de nuevas isoformas de estas subunidades ha aumentado la diversidad de esta familia de receptores. Cabe destacar, por ejemplo, las isoformas identificadas como consecuencia del procesamiento diferencial en cerebelo de rata, cóclea y pituitaria, del receptor P2X2 (Simon y cols., 1997; Housley y cols., 1998; Lynch y cols., 1999). Aunque la mayoría de las variantes no son capaces de formar canales activos por sí mismas, su expresión en los tejidos pone de manifiesto la posibilidad de que la heterogeneidad de los receptores P2X *in vivo* sea mayor de la esperada.

### **Características estructurales y oligomerización.**

Los receptores P2X constituyen una familia estructuralmente bien diferenciada dentro del grupo de canales iónicos activados por ligando (North, 1996). Las subunidades P2X varían entre los 379 aminoácidos del receptor P2X6 a los 595 del P2X7. Poseen dos regiones transmembrana (TM1 y TM2) y los extremos N- y C- terminal citosólicos, con motivos de unión a proteínas quinasas. Mientras que el extremo N-terminal tiene un tamaño uniformemente corto (24-31 aa) en todas las subunidades, el extremo C-terminal es muy variable en secuencia y tamaño: muy corto en los receptores P2X1, 3, 4 y 6, intermedio en los P2X2 y 5 e inusualmente grande en la subunidad P2X7, con más de 200 aa y un dominio hidrofóbico extra. Este hecho sugiere que el extremo carboxi-terminal podría conferir propiedades específicas a cada receptor. Por otro lado, entre el 50 y el 70% de la estructura de estas subunidades lo forma un bucle extracelular situado entre los dos segmentos transmembrana. Este dominio posee alrededor de 280 aminoácidos, 93 de los cuales se encuentran altamente conservados en, al menos, seis de las siete subunidades P2X (Vial y cols., 2004b).

Recientemente, Gouaux y su grupo han descrito la arquitectura de los receptores P2X basándose en la cristalización de la estructura del receptor P2X4. Como se muestra en la Figura 4, cada subunidad presenta una estructura en forma de delfín con las hélices transmembrana y la región extracelular semejantes a la cola y el cuerpo, respectivamente (Kawate y cols., 2009). La

arquitectura central del cuerpo extracelular está caracterizada por dos dominios de  $\beta$ -lámina que otorgan rigidez y resistencia a cambios conformacionales. El dominio de la cabeza se define por tres  $\beta$ -láminas antiparalelas y una  $\alpha$ -hélice (Kawate y cols., 2009). En esta región extracelular se encuentran también altamente conservados 10 residuos de cisteína que forman series de puentes disulfuro y así contribuyen a la estabilización de la estructura terciaria (Ennion y Evans, 2002), así como numerosos sitios de glicosilación, necesarios para la inserción de las proteínas en la membrana plasmática y para la regulación de la potencia del ligando



**Figura 4. Modelo estructural de las subunidades P2X humanas.** Los colores en la estructura de la subunidad P2X representan las diferentes partes del delfín: en verde la cola, en azul el cuerpo, la cabeza en rosa, la aleta dorsal en naranja y las aletas laterales en rojo y amarillo. Adaptado de Kawate y cols., 2009. Ç

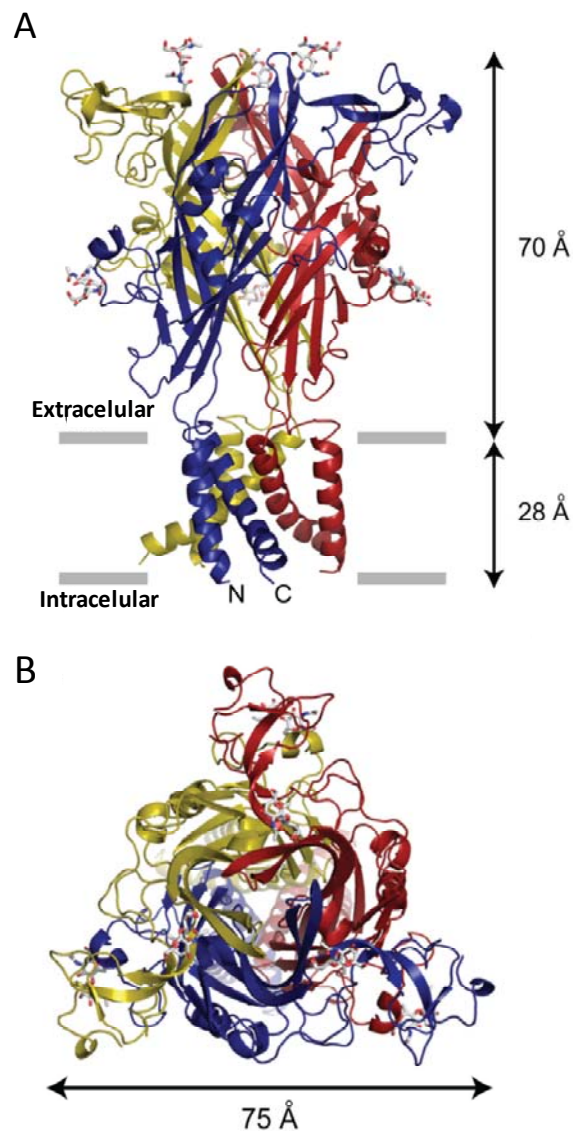
Los dos segmentos transmembrana (TM) que presentan las subunidades P2X no son capaces, por sí mismos, de formar un poro iónico, motivo por el que

las distintas subunidades se asocian como homo- o heterotrímeros para formar un canal funcional (Nicke y cols., 1998; Aschrafi y cols., 2004; Nagaya y cols., 2005) (Figura 5). El trímero posee un dominio extracelular muy extenso que sobresale aproximadamente 70 Å sobre el plano de la membrana, y una región transmembrana de 28 Å (Figura 5). El canal está formado por seis hélices TM, dos por cada subunidad que lo compone. Los segmentos TM1 forman múltiples interacciones con las hélices TM2 de la misma subunidad, pero también con los TM1 y TM2 de las otras subunidades. Así, las hélices TM1 presentan la mayoría de contactos con la bicapa lipídica, mientras que las TM2 cubren el poro iónico. (Gonzales y cols., 2009) La entrada y salida del canal están formadas principalmente por residuos hidrofóbicos e incluyen aproximadamente dos vueltas de las  $\alpha$ -hélices de los TM2 (Kawate y cols., 2009). En la región extracelular, las  $\beta$ -láminas centrales interaccionan con las subunidades adyacentes, mientras que no se producen contactos entre ellas en la base de dicha región. Esta conformación podría permitir a las hélices TM el movimiento hacia una conformación abierta ante la interacción de la región extracelular con el ligando. (Kawate y cols., 2009)

En este sentido, Gouaux y su grupo proponen que el sitio de unión del ATP a los receptores P2X se localiza en las ranuras que quedan entre las distintas subunidades (Kawate y cols., 2009). Estas ranuras están formadas por residuos conservados que se han descrito implicados en la apertura del canal dependiente de ATP (Jiang y cols., 2000a; Ennion y Evans, 2002; Roberts y Evans, 2004, 2006; Marquez-Klaka y cols., 2007).

Los receptores homoméricos están compuestos por subunidades idénticas, aunque la interacción entre las subunidades P2X5 y P2X6 presenta mayor dificultad (King y cols., 2000; Wildman y cols., 2002; Barrera y cols., 2005). Además de estos homo-oligómeros, las distintas subunidades P2X pueden interaccionar entre sí formando hetero-oligómeros (Torres y cols., 1999), aunque este ensamblaje no se produce aleatoriamente entre cualquier subunidad P2X. Hasta la fecha se han descrito varios receptores heteroméricos: P2X1/P2X2, P2X1/P2X4, P2X1/P2X5, P2X2/P2X3, P2X2/P2X6 y P2X4/P2X6 (Roberts y cols., 2006; Abbracchio y cols., 2009). La heteromerización de la

subunidad P2X7 aun no está claramente establecida ni descartada. Durante mucho tiempo se pensó que únicamente formaba homo-oligómeros, sin embargo, en el año 2007 se propuso su intervención en heterómeros funcionales con la subunidad P2X4 (Guo y cols., 2007). Por el contrario, estudios posteriores indican que estos trímeros no son estables o no representan un porcentaje significativo en los modelos estudiados (Nicke, 2008).



**Figura 5. Modelo estructural de los receptores P2X triméricos.** Cada subunidad se representa en un color diferente. A. Vista en paralelo a la membrana. B. Vista perpendicular a la membrana desde el espacio extracelular. Adaptado Kawate y cols., 2009.

Los receptores P2X no aparecen insertados en la membrana celular de forma aleatoria, donde pueden aparecer agrupados o localizados en diferentes partes de la célula. A modo de ejemplo, respuestas inducidas por el receptor P2X2 se registraron de las terminales pre-sinápticas de las interneuronas hipocámpales, pero no en el soma neuronal (Khakh y cols., 2003). Dado que la membrana celular no es homogénea, los receptores pueden agruparse junto a las proteínas de membrana en microdominios. Un posible mecanismo para mantener las proteínas y moléculas de señalización juntas, puede ser su inclusión en balsas lipídicas ("lipid rafts"), como sucede para los receptores P2X1, P2X3 y P2X7 (Vacca y cols., 2004; Vial y Evans, 2005; Gonnord y cols., 2009). Sin embargo, otros receptores, como los P2X2, 4, no parecen estar asociados a lipid rafts en neuronas granulares del cerebelo (Vacca y cols., 2004).

#### **Características funcionales y regulación de los receptores P2X.**

Las propiedades funcionales y farmacológicas de los receptores P2X dependen de las subunidades que componen el canal. Los diferentes receptores P2X pueden ser clasificados en función de su perfil de respuesta, su afinidad por agonistas y antagonistas y su sensibilidad ante la regulación por calcio, magnesio, protones o zinc. En los receptores heteroméricos las características pueden venir determinadas por una de las subunidades que lo forman, o ser una combinación de las características de las distintas subunidades integrantes del receptor. Sin embargo, es muy usual que en el mismo tejido o tipo celular se coexpresen diversas subunidades complicando el estudio de las mismas.

La activación de los receptores P2X produce la entrada rápida (milisegundos) y no selectiva de cationes  $Ca^{2+}$ ,  $Na^{+}$  o  $K^{+}$  (Bo y cols., 2003). La permeabilidad relativa para cada uno de estos iones varía en función de la subunidad P2X implicada, aunque también puede modificarse dependiendo de su regulación. Los receptores P2X1 y P2X3 son los que más rápido pierden la respuesta en presencia continuada del agonista (desensibilización), cayendo dicha respuesta en un 90% en 1-2 segundos. Las respuestas de los otros receptores P2X son mucho más sostenidas, situándose en el extremo contrario el receptor P2X7, cuya respuesta se mantiene durante minutos (North, 2002). En

algunos casos la desensibilización sucede como consecuencia de la constitución de una forma cerrada del receptor unido al agonista, requiriéndose varios minutos de lavado para recobrar la funcionalidad completa (Rettinger y Schmalzing, 2003). Esta recuperación puede regularse por muchos factores, incluyendo el agonista empleado (Sokolova y cols., 2004) o el calcio (Wildman y cols., 2002).

Los estudios de la apertura y cierre del canal y la conductividad de iones en estos receptores indican que la regulación de estos dos componentes está mediada por la interacción de varias regiones de los mismos. Es muy posible que se produzcan cambios conformacionales en el dominio extracelular de los receptores P2X, semejantes a los vistos en otros receptores ante la unión de su ligando (Jin y cols., 2003). Estos cambios coordinarían la unión de alta afinidad de los grupos adenina y trifosfato del ATP a estos receptores, lo que explicaría la selectividad de los P2X por determinados ligandos. En la región extracelular de varios receptores P2X, existen residuos conservados de prolina y glicina que podrían dotar de flexibilidad y estar implicados en cambios conformacionales ante la unión del agonista (Nakazawa y Ohno, 1999; Nakazawa y cols., 2004). Por otro lado, varios estudios con receptores P2X quiméricos demuestran cómo la interacción entre los dos segmentos transmembrana de los receptores modula la apertura y cierre de los canales (Werner y cols., 1996; Haines y cols., 2001).

El dominio intracelular también colabora en la regulación de la apertura del canal y la permeabilidad iónica. A modo de ejemplo, las mutaciones que eliminan la secuencia de unión a PKC, presente en la zona N-terminal del receptor y que se encuentra constitutivamente fosforilada, pueden aumentar la velocidad de desensibilización de ciertas isoformas. Esto pone de manifiesto que el extremo N-terminal participa directamente en la regulación de la conductividad iónica a través de estos canales (Boue-Grabot y cols., 2000; Ennion y Evans, 2002; Liu y cols., 2003). En cuanto al extremo C-terminal, conserva en todas las isoformas un motivo YxxxxK, cercano al TM2, que está asociado al correcto transporte del receptor a la membrana y a la estabilización de su expresión en la superficie celular (Bobanovic y cols., 2002; Chaumont y cols., 2004). Además, estudios de mutagénesis dirigida sugieren también que puede estar relacionado

con la regulación de la apertura en sí y de las propiedades del poro de estos receptores (Eickhorst y cols., 2002).

Los receptores P2X están modulados alostéricamente por protones extracelulares, cationes divalentes y varios metales, como el  $\text{Cu}^{2+}$  y el  $\text{Zn}^{2+}$  (North, 2002). Kawate y cols. han propuesto recientemente la presencia de 4 sitios de unión de cationes di- y trivalentes, uno en el centro de la región extracelular, los otros 3 en la periferia del receptor (un sitio por cada subunidad), y una regulación negativa del receptor por parte de estos iones (Kawate y cols., 2009).

A su vez, los receptores P2X pueden modularse a través de diversas acciones sobre su dominio intracelular. Las fosforilaciones en serina, treonina o tirosina en determinadas zonas de este dominio regulan de forma importante la actividad de los receptores. (Boue-Grabot y cols., 2000; Toth-Zsomboki y cols., 2002). Por ejemplo, en la zona de transición entre el dominio TM2 y el C-terminal del receptor P2X7 se localiza una tirosina (Tyr343), cuya defosforilación tras la activación del canal reduce la duración de la respuesta (Becker y cols., 2008).

La actividad de los receptores P2X también puede verse regulada por gran variedad de componentes, como receptores de serotonina acoplados a proteínas G (Nakazawa y cols., 1994), receptores purinérgicos metabotrópicos P2Y (Vial y cols., 2004a) o la estimulación con sustancia P y bradiquinina (Vial y cols., 2004a). En nuestro grupo también se ha estudiado la modulación de los P2X por parte de otros receptores. Los canales presinápticos de  $\text{GABA}_B$  en terminaciones nerviosas de cerebro medio de rata son capaces de potenciar las respuestas generadas por los receptores P2X (Gomez-Villafuertes y cols., 2003). Igualmente los receptores colinérgicos nicotínicos modulan la actividad de los P2X mediante la activación de la proteína CaMKII (Diaz-Hernandez y cols., 2004a; Diaz-Hernandez y cols., 2006).

La principal consecuencia de la activación de los receptores P2X es un incremento transitorio en la concentración intracelular de calcio libre, que despolariza la membrana. Esto induce la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje, lo que se suma a la entrada de calcio a través del

propio canal P2X. El incremento del calcio citosólico dispara posteriormente una serie de eventos intracelulares como activación o inhibición de proteínas quinasas, entre las que se encuentran la calcio-calmodulina quinasa II (CaMKII) (Diaz-Hernandez y cols., 2004a; Diaz-Hernandez y cols., 2006; Leon y cols., 2006), MAP quinasas (MAPK), proteína quinasa C (PKC) (Erb y cols., 2006) o glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3) (Diaz-Hernandez y cols., 2008; Gomez-Villafuertes y cols., 2009; Ortega y cols., 2009); así como la liberación vesicular de neurotransmisores como acetilcolina (Diaz-Hernandez y cols., 2002a), glutamato (Gualix y cols., 2003) o GABA (Gomez-Villafuertes y cols., 2001).

### **Características farmacológicas.**

Las herramientas farmacológicas disponibles a la hora de discriminar entre los diferentes receptores P2X son en muchos casos muy limitadas, e incluso existen agonistas y antagonistas que, a las mismas concentraciones, pueden actuar tanto sobre receptores P2X como P2Y. En la Tabla 4 se resumen los principales agonistas y antagonistas empleados en la caracterización farmacológica de los receptores P2X.

En general pueden distinguirse dos grandes grupos en la familia de los receptores P2X. Los receptores P2X1 y P2X3 se caracterizan por presentar una elevada afinidad por el ATP. Además son activados por el análogo estructural del ATP  $\alpha,\beta$ -meATP, sufren una desensibilización rápida, inactivándose totalmente en menos de 1 s de exposición a ATP y una recuperación lenta. El resto de receptores, P2X2, P2X4, P2X5, P2X6 y P2X7, muestran menor afinidad por el ATP, insensibilidad al  $\alpha,\beta$ -meATP (excepto el P2X6) y desensibilización menos marcada (North, 2002; Gever y cols., 2006). Las curvas de dosis-respuesta para los receptores P2X expresados en sistemas heterólogos muestran que la  $EC_{50}$  para el ATP varía desde concentraciones submicromolares ( $EC_{50} \sim 0,1 \mu\text{M}$ , P2X1, 3), hasta el micromolar bajo ( $EC_{50} = 10 \mu\text{M}$ , P2X2, 4, 6). De todos los receptores homoméricos P2X, el constituido por las subunidades P2X7 es el que presenta menor afinidad para el ATP, con una  $EC_{50}$  elevada (400  $\mu\text{M}$ ) (Ver Tabla 4) (North, 2002; Gever y cols., 2006).

**Tabla 4.- Clasificación de los receptores P2X homoméricos.** Los datos reflejados en la tabla han sido obtenidos de (Norenberg and Illes, 2000; Khakh y cols., 2001; North, 2002; King and Townsend-Nicholson, 2003; Illes and Alexandre Ribeiro, 2004; Burnstock, 2007b; Chambers y cols., 2010; Chen y cols., 2010)

Receptor	EC <sub>50</sub> (ATP)	Potencia de agonistas (EC <sub>50</sub> )	Antagonistas (IC <sub>50</sub> )	Modulación por iones	Desensibilización	Distribución mayoritaria
P2X1	0,1 μM	ATP=2MeSATP>A <sub>p6</sub> A>α,β-meATP>BzATP>ADP	NF449>TNP-ATP>I <sub>p5l</sub> >MRS2257>PPADS (rango nM) Suramina>RB 2 (rango μM)	H <sup>+</sup> ↓ Zn <sup>2+</sup> ↓	Rápida	Cerebro, médula espinal, músculo liso, plaquetas, ganglios simpáticos
P2X2	5 μM	ATP ≥ATP <sub>γ</sub> S>2MeSATP>A <sub>p4</sub> A α,β-meATP y ADP inactivos	RB 2=NF279, NF770>PPADS= TNP-ATP=BBG>Suramina (rango μM)	H <sup>+</sup> ↑ Zn <sup>2+</sup> ↑ Cu <sup>2+</sup> ↑ Ca <sup>2+</sup> ↓	Lenta	Cerebro, médula espinal, ganglios simpáticos, células cromafines, músculo liso, retina
P2X3	1,3 μM	2MeSATP>ATP= α,β-meATP>A <sub>p5</sub> A>ADP	TNP-ATP>MRS2257=A317491> MRS2159=PPADS (rango nM) NF279=NF449>I <sub>p5l</sub> >Suramina>NF023>RB 2 (rango μM) A317491, NF110, rojo fenol	Zn <sup>2+</sup> ↑ H <sup>+</sup> ↓ Ca <sup>2+</sup> ↓	Rápida	Cerebro, médula espinal, ganglios simpáticos, neuronas sensoriales
P2X4	4 μM	ATP>2MeSATP α,β-meATP y ADP inactivos Potenciación por Ivermectina, Propofol y Cibacron blue	TNP-ATP>BBG (rango μM) fenoltaleína	H <sup>+</sup> ↓ Zn <sup>2+</sup> ↑ Cd <sup>2+</sup> ↑	Lenta	Cerebro, médula espinal, ganglios simpáticos, testículos, colon
P2X5	0,4 μM	ATP=2MeSATP=A <sub>p4</sub> A> α,β-meATP y ADP inactivos	PPADS>TNP-ATP>Suramina> RB 2 (rango μM)	Zn <sup>2+</sup> ↑ H <sup>+</sup> ↓ Ca <sup>2+</sup> ↓	Lenta	Ganglio del trigémino, médula espinal, células proliferativas de la piel, timo, vejiga
P2X6	0,6 μM	2MeSATP>ATP=α,β-meATP ADP inactivo	TNP-ATP> PPADS Insensible a Suramina	---	Lenta	Ganglios simpáticos, cerebro, médula espinal
P2X7	400 μM	BzATP>>ATP 2MeSATP, ATP <sub>γ</sub> S y ADP inactivos	A-740003 ≥ A-438079 (rata, humano) BBG (rango nM) (rata) PPADS=TNP-ATP (rango nM) KN-62 (rango nM) (humano) Derivados de pirazolacetamida (rango nM) 2-Cloro-N-((4,4-difluoro-1-hidroxiciclohexil)metil)-5-(5-fluoropirimidina-2-il) benzamida (rango nM)	H <sup>+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup> ↓ Zn <sup>2+</sup> ↓	Lenta	Ganglios de retina y cóclea, células inmunes, cerebro, médula espinal, páncreas y piel.

### **1.5.3 Receptor P2X7**

El receptor P2X7, inicialmente denominado P2Z, se distingue del resto de receptores P2X por su largo extremo C terminal y su baja sensibilidad por el ATP (North, 2002).

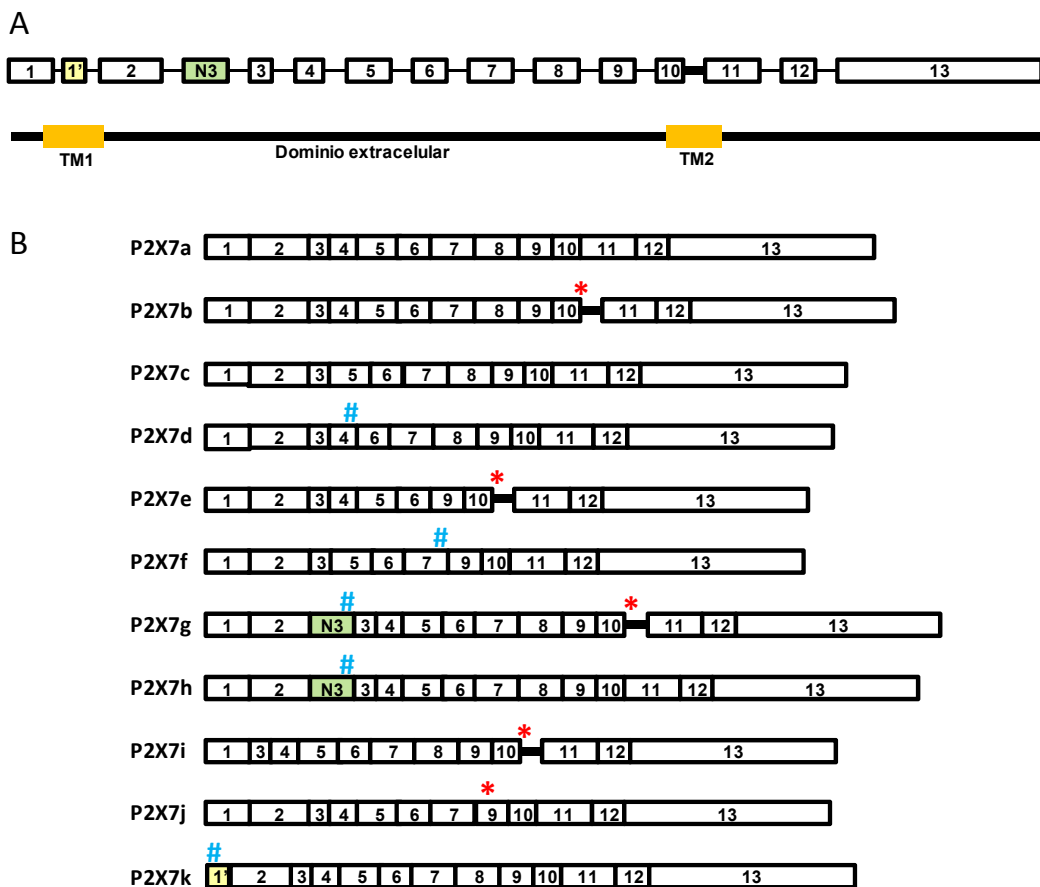
El gen del receptor P2X7 humano se localiza en el cromosoma 12 (12q24). Inicialmente se describió conteniendo 13 exones que codificaban para una proteína de 595 aminoácidos (Buell y cols., 1998), sin embargo, hoy en día se conoce la existencia de dos nuevos exones: el exón 1' en rata, localizado en la región intrónica entre el exón 1 y el exón 2 (Nicke y cols., 2009), y en humano el exón N3, localizado en la región intrónica entre el exón 2 y el 3 (Cheewatrakoolpong y cols., 2005).(Figura 6)

Hasta la fecha se han descrito 10 variantes de splicing (P2X7b-P2X7k) (ver Figura 6), 9 en humano (P2X7b-P2X7j) y una en rata y ratón (P2X7k), aunque sólo de 4 de estas variantes se han detectado a nivel proteico (P2X7b, P2X7h, P2X7j y P2X7k) (Cheewatrakoolpong y cols., 2005; Feng y cols., 2006; Nicke y cols., 2009), y sólo dos de ellas parecen ser funcionales (P2X7b y P2X7k) (Cheewatrakoolpong y cols., 2005; Nicke y cols., 2009). La variante P2X7a es la proteína completa.

Como se muestra en la Figura 6, el ARNm de la variante P2X7b conserva el intrón localizado entre los exones 10 y 11, que introduce un nuevo codón de stop. Esto genera una proteína más pequeña que la P2X7a (Figura 7), que ha perdido los últimos 171 aminoácidos de la proteína completa, y presenta los 18 aminoácidos posteriores al TM2 alterados, además de una menor sensibilidad a la activación por BzATP (Cheewatrakoolpong y cols., 2005).

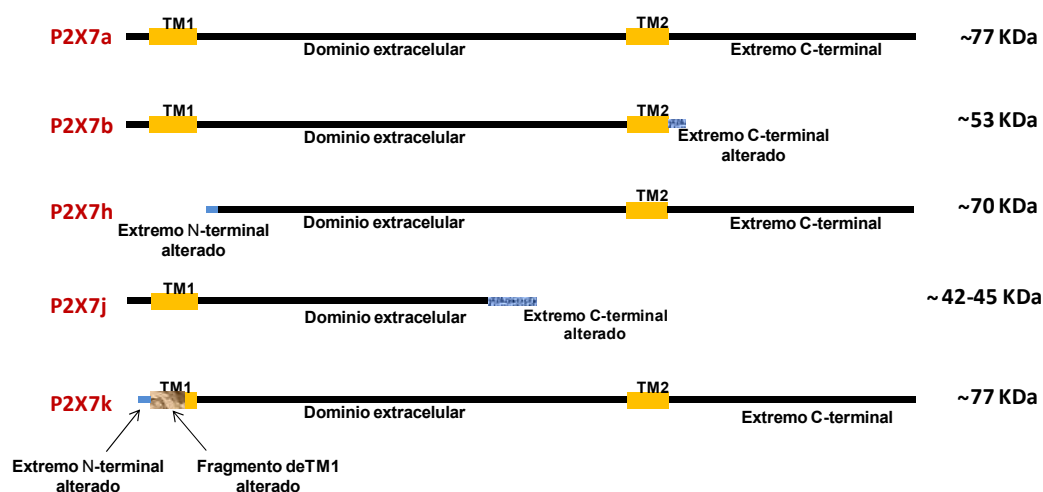
El ARNm de la variante P2X7h incluye el exón N3, que crea un nuevo codón de inicio (Figura 6). Este nuevo codón genera la traducción de una proteína de P2X7 de 70 KDa aproximadamente, que ha perdido el dominio TM1 (Figura 7) y no es funcional (Cheewatrakoolpong y cols., 2005).

La variante P2X7j carece de exón 8, lo que genera la aparición de un nuevo codón de fin en el exón 9 (Figura 6). Así, la proteína pierde el extremo C-terminal, el dominio TM2 y un tercio del bucle extracelular próximo al TM2, generando un extremo C-terminal alterado (Figura 7), y una subunidad P2X7 de 42 a 45 KDa. Esta variante es deficiente en la unión al ligando, pero es capaz de interactuar con la variante P2X7a y bloquear su actividad (Feng y cols., 2006).



**Figura 6. Estructura del gen del receptor P2X7 y las variantes con procesamiento alternativo.** A. Estructura propuesta del gen P2X7. Los exones están numerados e indicados como cajas. Los intrones se representan como líneas horizontales entre los exones. Bajo la estructura genómica se muestra la estructura del ARN mensajero. TM1 y TM2: segmentos transmembrana 1 y 2. B. Organización de los exones en el ARNm de las variantes con procesamiento alternativo del gen del receptor P2X7 aislados hasta el momento. Los nuevos codones de inicio se representan como # y los nuevos codones de stop como \*. Datos obtenidos de Cheewatrakoolpong y cols. (2005), Feng y cols. (2006) y Nicke y cols. (2009).

Por último, el ARNm de la variante P2X7k incluye el exón 1' (Figura 6), que codifica para 39 amino ácidos que sustituyen a los primeros 42 aminoácidos de la subunidad P2X7a. Esto genera un extremo N-terminal y un dominio TM1 alternativos (Figura 7) que incrementan la sensibilidad del receptor por el agonista y el tiempo necesario para la inactivación del receptor. (Nicke y cols., 2009)

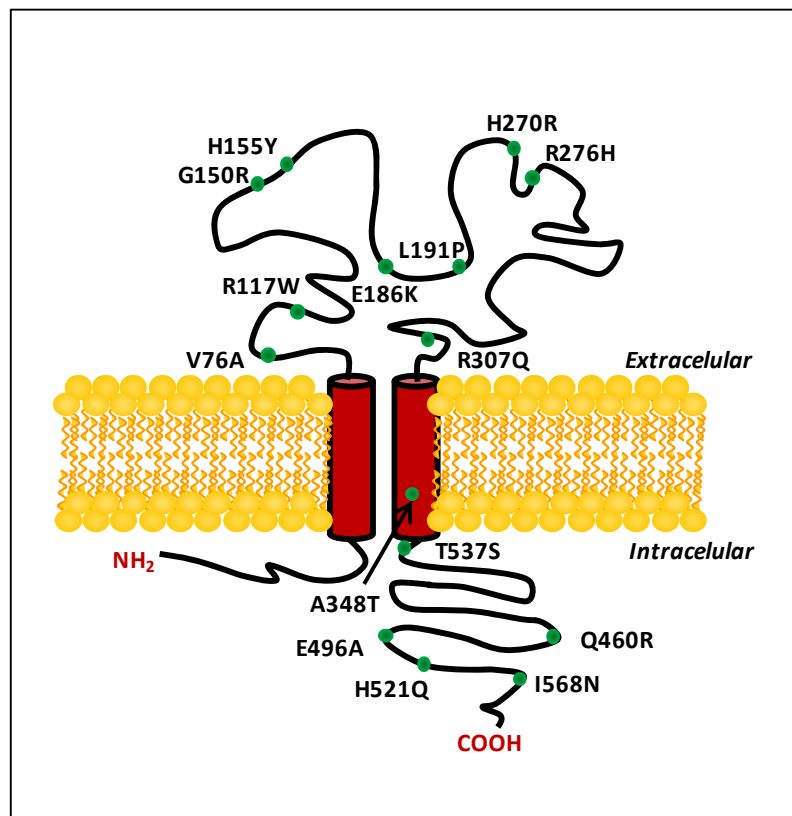


**Figura 7. Localización de algunos polimorfismos de un solo nucleótido no silenciosos en el receptor P2X7.** Datos obtenidos de Stokes y cols., 2010 y Roger y cols., 2010.

Además, se han identificado multitud de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en el gen del receptor P2X7 humano. (Figura 8) La mayoría de estos SNPs confieren la pérdida de función de algunos eventos activados por el receptor P2X7 (Gu y cols., 2001; Wiley y cols., 2003; Gu y cols., 2004; Shemon y cols., 2006; Roger y cols., 2010), aunque algunos también inducen ganancia de función (Cabrini y cols., 2005; Denlinger y cols., 2006; Roger y cols., 2010; Stokes y cols., 2010). Adicionalmente se han identificado varios SNPs en el gen del receptor P2X7 que están asociados con trastornos del ánimo como los trastornos bipolares (Barden y cols., 2006; Lucae y cols., 2006; McQuillin y cols., 2009).

Como se ha mencionado previamente, el extremo C-terminal del receptor P2X7 posee una longitud extrema, que alcanza los 240 aminoácidos y posee numerosas secuencias de la interacción con otras proteínas. Entre ellas

destacan: la tirosina-fosfatasa  $\beta$  (RPTP $\beta$ ), la  $\alpha$ -actinina 4, la  $\beta$ -actina, la supervillina, 3 proteínas de choque térmico (Hsp90, Hsp70 y Hsc71), la fosfatidilinositol 4 quinasa (PI4K), la guanilato quinasa P55 asociada a membrana (MAGuK), las miosinas IIA y Va, GRK-3, dinamina, clatrina, caveolina 1 y calmodulina (Kim y cols., 2001; Feng y cols., 2005; Barth y cols., 2007; Roger y cols., 2008; Gu y cols., 2009). También se encuentran en el extremo C-terminal de este receptor dominios SH2 (Surprenant y cols., 1996) y una secuencia de unión a lípidos similar a la secuencia de unión a lipopolisacárido encontrada en otras proteínas, que parece estar involucrada en el transporte a membrana y en la funcionalidad del receptor (Denlinger y cols., 2003). Además, Becker y cols. han propuesto que la interacción física observada entre el receptor y el dominio C-terminal conecta señales del exterior e interior de la célula controlando así la apertura y cierre del canal (Becker y cols., 2008).



**Figura 8. Localización de algunos polimorfismos de un solo nucleótido no silenciosos en el receptor P2X7.** Datos obtenidos de Stokes y cols., 2010 y Roger y cols. 2010.

### **Características farmacológicas.**

La estimulación del receptor con agonistas durante un breve periodo de tiempo (<10 segundos) conduce a una apertura rápida y reversible del canal, que permite el paso de iones  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  (Surprenant y cols., 1996). Además, la activación aguda del receptor desencadena una serie de respuestas celulares como la liberación de citoquinas, proliferación celular o activación de caspasas y la consiguiente apoptosis celular (North, 2002; Verhoef y cols., 2003; Kahlenberg y Dubyak, 2004). Como se ha mencionado anteriormente, los receptores P2X7 homoméricos son activados por elevadas concentraciones de ATP ( $\text{EC}_{50}$  400  $\mu\text{M}$ ) y por BzATP, siendo este último significativamente más potente (20  $\mu\text{M}$ ) que el ATP (Young y cols., 2007). Sin embargo el BzATP no es un agonista selectivo del receptor P2X7, puesto que también activa los receptores P2X1 y P2X3 (Bianchi y cols., 1999), y el receptor metabotrópico P2Y<sub>13</sub> en astrocitos de cerebelo de rata (Carrasquero y cols., 2009).

Característica de este receptor es la potenciación de sus respuestas ante una reducción de la presencia de cationes divalentes, como el calcio o el magnesio, en el medio extracelular (Surprenant y cols., 1996). Otros cationes divalentes como el zinc y el cobre también inhiben la respuesta en estos receptores (Virginio y cols., 1997; Liu y cols., 2008). Estas observaciones indican que, bien es la forma  $\text{ATP}^{4-}$  el ligando activo de esta subunidad, bien los cationes divalentes son capaces de inhibir dicho receptor alostéricamente.

Los antagonistas más empleados, suramina y PPADS, no son selectivos para este receptor y lo bloquean con baja afinidad y de forma no competitiva (Jacobson y cols., 2002). El Brilliant Blue G (BBG) es un antagonista más potente y selectivo, sobre todo en rata ( $\text{IC}_{50}$  ~ 10-15nM) y en ratón ( $\text{IC}_{50}$  100 nM), mientras que en humano su efectividad es mucho menor ( $\text{IC}_{50}$   $\geq$  10 $\mu\text{M}$ ) (Jiang y cols., 2000b; Young y cols., 2007). Se une al receptor por un sitio de unión diferente al del ATP y posee un ratio lento de disociación (Michel y cols., 2007). El ATP oxidado (oATP) es un inhibidor irreversible de los receptores P2X7 que requiere incubaciones de 1 a 2 horas para inhibir la activación de los canales (Di Virgilio, 2003), sin embargo posee otras acciones farmacológicas como bloqueo

de los receptores P2X1 y P2X2 (Evans y cols., 1995) o reducción de la señalización proinflamatoria (Beigi y cols., 2003).

Otros bloqueantes, como el KN-62 (conocido como inhibidor de la calcio/calmodulina quinasa tipo II, CaMKII), ejercen su efecto en función de la especie, bloqueando el receptor P2X7 humano de forma no competitiva, pero no el de rata (Gargett y Wiley, 1997; Humphreys y cols., 1998). En 2006 los laboratorios Abbot generaron dos nuevos antagonistas selectivos para esta subunidad, el A-438079, tetrazol que bloquea de forma competitiva y reversible los receptores P2X7, y el A-740003, cianoguanidina que actúa de forma competitiva sobre los receptores, ambos con acción tanto en rata como en humano, en el rango nanomolar alto (Honore y cols., 2006; Nelson y cols., 2006). Recientemente se han desarrollado dos nuevos antagonistas de los receptores P2X7 humanos y de rata, uno derivado de pirazolacetamida (Chambers y cols., 2010) y el otro derivado de cicloheptanol clorobenzamida, ambos con una IC<sub>50</sub> en el rango nanomolar (Chen y cols., 2010).

El P2X7 es el receptor que menos se desensibiliza y sus corrientes se mantienen en presencia de ATP y BzATP durante aplicaciones prolongadas (hasta minutos) (North, 2002). Además, las aplicaciones de larga duración a veces van acompañadas de incrementos en la amplitud de la corriente (Surprenant y cols., 1996; Virginio y cols., 1997; North, 2002).

#### **Señalización del receptor P2X7.**

Como se ha mencionado anteriormente, la activación de estos receptores induce la apertura rápida y reversible del canal, lo que permite el paso de iones Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>. Los cambios producidos en la concentración intracelular de potasio como consecuencia de dicha activación provocan la activación de caspasa-1 y la liberación de IL-1β (Kahlenberg y Dubyak, 2004; Ferrari y cols., 2006).

La activación de los receptores P2X7 y la consecuente entrada de calcio a la célula también se ha asociado con otras vías de señalización entre las que se incluyen la fosfolipasa D (Humphreys y Dubyak, 1996), Nf-κB (Ferrari y cols., 1997a), GSK-3 (Diaz-Hernandez y cols., 2008; Ortega y cols., 2009; Ortega y

cols., 2010) y proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPKs) (Aga y cols., 2002). Diversos estudios demuestran que las diferentes MAPKs afectadas por la activación del receptor P2X7 varían dependiendo del modelo de estudio. Por ejemplo, en células del astrocitoma humano 1321, la activación del receptor P2X7 recombinante media el incremento en la ERK1/2 (Gendron y cols., 2003), mientras que no ocurre así en células humanas diferenciadas THP-1 (Donnelly-Roberts y cols., 2004).

Además, el calcio citoplásmico es importante para la liberación de neurotransmisores, en un proceso dependiente de calmodulina. En esta cascada de señalización, el calcio activa la calmodulina, que activa a su vez la calmodulina quinasa II (CaMKII). Esta quinasa fosforila la sinapsina de la superficie de las vesículas sinápticas, provocando la liberación de las vesículas del citoesqueleto, de modo que puedan fusionarse con las zonas activas de la terminal presináptica y liberar así su contenido de neurotransmisores (Lin y cols., 1990; Leon y cols., 2006).

Por otro lado, la activación del receptor P2X7 también es capaz de inducir la activación de otras proteínas en un proceso independiente de la entrada de calcio, como por ejemplo la activación de PKD en astrocitos de rata en cultivo (Carrasquero y cols., 2010).

En último lugar cabe destacar que la estimulación del receptor P2X7 induce su propia redistribución en la membrana y el citosol. Este proceso se asocia con cambios en el estado de fosforilación del receptor y con un aumento en la interacción del receptor a GRK-3 (receptor quinasa acoplado a proteína G),  $\beta$ -arrestina-2 y dinamina (Feng y cols., 2005).

### **El receptor P2X7 en el Sistema Nervioso y su función neuronal. Implicaciones en neuroprotección y neurodegeneración.**

El receptor P2X7 se expresa en una gran variedad de tejidos y se asocia a múltiples funciones. Inicialmente se clonó en macrófagos (Buisman y cols., 1988; Di Virgilio, 1995) y se describió su expresión, junto con los receptores P2X1 y P2X4, en una gran variedad de células del sistema inmune, incluyendo linfocitos B y T, monocitos, eritrocitos, macrófagos, microglía y también en

osteoclastos (Burnstock y Knight, 2004). Así, este receptor participa en el proceso inflamatorio por medio de la liberación de IL-1 $\beta$  en macrófagos y microglía activada, lo que puede causar la apoptosis en las células circundantes (Ferrari y cols., 2006; Di Virgilio, 2007).

Durante mucho tiempo se postuló que el receptor P2X7 estaba ausente de las neuronas, siendo expresado únicamente por células no neurales del sistema nervioso como microglía, linfocitos, macrófagos y astrogliá (Collo y cols., 1997). Estudios recientes utilizando técnicas de hibridación in situ y análisis por RT-PCR han permitido detectar la presencia del ARNm del receptor P2X7 en diversas áreas del SNC como el bulbo olfatorio, la corteza cerebral, la médula espinal, el cerebelo, el estriado, el tálamo e hipotálamo y el hipocampo participando en numerosas e importantes funciones (Yu y cols., 2008b). Además, cada vez son más los trabajos que ponen de manifiesto la expresión funcional de estos receptores en neuronas (Hervas y cols., 2003; Miras-Portugal y cols., 2003; Hervas y cols., 2005; Sanchez-Nogueiro y cols., 2005; Leon y cols., 2006; Marin-García, 2007; Alloisio y cols., 2008; Diaz-Hernandez y cols., 2008; Marin-Garcia y cols., 2008; Sanchez-Nogueiro y cols., 2009), participando en numerosas e importantes funciones.

Cabe destacar la significativa presencia del receptor P2X7 en las terminales nerviosas, dado que más del 50% presentan marcaje con anticuerpos frente a dicha subunidad, y es posible, además, medir respuestas presinápticas en ellas al estimularlas con agonistas específicos del receptor P2X7 (Miras-Portugal y cols., 2003; Hervas y cols., 2005). Esta localización tan específica apoya una de las funciones más importantes de estos receptores, la modulación de la liberación de neurotransmisores como el glutamato o el GABA (Atkinson y cols., 2004; Papp y cols., 2007; Sperlagh y cols., 2007; Leon y cols., 2008).

Los receptores P2X7 se han descrito como agentes involucrados en procesos neurodegenerativos regulando la concentración intracelular de calcio, la liberación y procesamiento de la IL-1 $\beta$ , activación de caspasas y liberación de glutamato en condiciones patológicas como inflamación, daño mecánico, isquemia y estrés (Solle y cols., 2001; Le Feuvre y cols., 2002; Chessell y cols.,

2005; Sperlagh y cols., 2006). En pacientes afectados de Alzheimer, así como en modelos de ratones transgénicos empleados en el estudio de esta enfermedad, la expresión del receptor P2X7 en cerebro se encuentra incrementada alrededor de las placas amiloides y localizada en la microglía activada y en astrocitos (Parvathenani y cols., 2003; McLarnon y cols., 2006). Los receptores P2X7, además, median la producción de peróxido de hidrógeno en microglía, contribuyendo así a la neurodegeneración que sucede en un modelo animal de esta enfermedad (Parvathenani y cols., 2003; McLarnon y cols., 2006).

En otros sistemas, como las neuronas granulares de cerebelo de rata, la activación de este receptor está asociada a la supervivencia neuronal frente a determinados estímulos proapoptóticos (Ortega y cols., 2009; Ortega y cols., 2010). También median la producción de 2-araquidonilglicerol y endocannabinoides en astrocitos y microglía, contribuyendo en los procesos neuroprotectores (Witting y cols., 2004; Witting y cols., 2006). Además, la estimulación de los receptores induce fosforilación de CREB (proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc) lo que genera un efecto inhibitorio de la inflamación en la microglía (Potucek y cols., 2006).

## **2. MORFOGÉNESIS NEURONAL: CRECIMIENTO AXONAL.**

Las neuronas son las células especializadas del sistema nervioso y poseen una complejidad morfológica y funcional mucho mayor que el resto de células del organismo. Presentan prolongaciones más o menos delgadas, denominadas dendritas y, normalmente, otra de mayor longitud llamada axón. Las dendritas son las vías de entrada de los impulsos nerviosos a las neuronas y los axones son las vías de salida. Así, las neuronas forman redes de conexiones nerviosas que conectan todo el organismo. Además, los axones pueden extenderse a lo largo de distancias extremadamente largas hasta alcanzar sus tejidos diana durante el proceso de diferenciación del sistema nervioso.

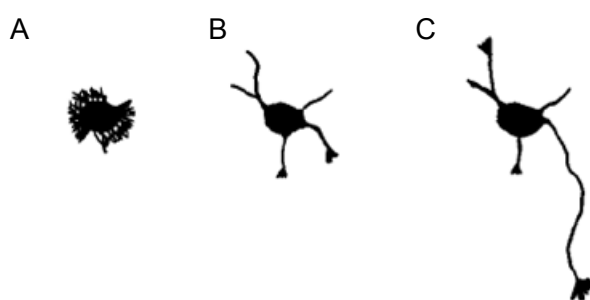
## **2.1 Adquisición de la polaridad neuronal.**

La polaridad neuronal morfológica y funcional, entendiéndose ésta como la formación del axón y la distribución diferencial de proteínas de membrana en el compartimento axonal, segmento inicial del axón y dendritas, otorgan a las neuronas la elevada complejidad que las caracteriza.

La secuencia de eventos que suceden en la adquisición de la polaridad axonal fue descrita por Dotti y cols (Dotti y cols., 1988) y comprobada por Kaech y Banker (Kaech y Banker, 2006) en un modelo de cultivo de neuronas de hipocampo (Figura 9). Inicialmente, y una vez adheridas al sustrato, las neuronas desarrollan un lamelipodio formado por filamentos de actina alrededor del soma, que permanece en constante movimiento, extendiéndose y retrayéndose. En ocasiones el lamelipodio se extiende a lo largo de toda la circunferencia de la célula, en otras permanece en zonas discretas de la misma. Esta fase se conoce como estadio 1 y dura aproximadamente 2 horas. En el comienzo de la segunda fase o estadio 2, que dura de 12 a 24 horas, se rompe la simetría del lamelipodio con la concentración, en una zona discreta del mismo, de receptores y proteínas que regulan la estabilidad de la actina, como RhoA, cofilina y profilina (Arber y cols., 1998; Da Silva y cols., 2003). En esas zonas se produce la despolimerización de la actina, lo que permite a los microtúbulos crecer y generar pequeñas neuritas, diferentes en comportamiento y morfología al lamelipodio, que se pierde. Las neuritas presentan microtúbulos orientados de forma paralela a lo largo del eje y, en su extremo, conos de crecimiento con filamentos de actina. Son las estructuras responsables del crecimiento y orientación de los axones y dendritas. Entonces, una de las pequeñas proyecciones comienza a crecer rápidamente, alcanzando una longitud mayor al doble que el resto y adquiriendo las características propias del axón. En esta fase o estadio 3 la célula está polarizada. El axón sigue creciendo unos días, mientras el resto de neuritas se desarrollan en menor medida. Al finalizar esta fase y pasar al estadio 4, las proyecciones comienzan a crecer, aunque en menor medida que el axón, convirtiéndose en dendritas.

## 2.2 Formación y elongación del axón.

Como se ha descrito previamente, la formación del axón se inicia cuando una de las neuritas comienza a crecer a un ritmo mayor que el resto. Una vez definido, el axón debe continuar elongando hasta alcanzar su tejido diana para formar las redes neuronales. El principal mecanismo involucrado en la formación y extensión del axón consiste en la reorganización de los elementos del citoesqueleto de actina y de los microtúbulos (Witte y Bradke, 2008).



**Figura 9. Imágenes representativas de los estadios de desarrollo de una neurona de hipocampo en cultivo. A.** Estadio 1, neurona rodeada de un lamelipodio. **B.** Estadio 2, formación de neuritas de igual longitud. **C.** Estadio 3, adquisición de la polaridad axonal con el crecimiento del axón. Imagen modificada de Dotti y cols., 1988.

La importancia de la despolimerización de la actina de forma localizada para permitir el crecimiento del axón fue demostrada en 1999 por el grupo de Carlos Dotti (Bradke y Dotti, 1999). También demostraron que la inhibición de las proteínas de la familia de las Rho GTPasas producía la aparición de múltiples neuritas con morfología de axón en las neuronas.

La actividad de la PI3-quinasa también es esencial en la formación y elongación del axón (Shi y cols., 2003; Yoshimura y cols., 2006). Esta actividad genera PI3P fosfo inosítidos que regulan la localización polarizada de proteínas como mPar3 y mPar6 en el extremo de la neurita que se convertirá en axón (Shi y cols., 2003). Además es capaz de influir sobre otras proteínas como AKT, GSK3 o Rho GTPasas (Shi y cols., 2004; Yoshimura y cols., 2006), relacionadas con el citoesqueleto de actina y microtúbulos, que permiten la elongación del axón. Este proceso de polarización es, además, dependiente de microdominios especializados en la membrana conocidos como balsas lipídicas (“lipid rafts”), los

cuales también influyen en el crecimiento y orientación del axón (Kamiguchi, 2006).

Por su parte, la inhibición de la actividad de la GSK-3 impide la formación del axón, aunque la elongación posterior se acentúa (Kim y cols., 2006; Garrido y cols., 2007). Además, la GSK-3 regula el crecimiento y estabilidad de los microtúbulos fosforilando proteínas asociadas a ellos, como CRMP-2 (proteína mediadora de la respuesta a colapsina 2), APC (“*adenomatous polyposis coli*”), tau o MAP1B (proteína asociada a microtúbulos 1B), participando así en la regulación del crecimiento axonal (Witte y Bradke, 2008). Tanto las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs), como las tau, participan en la estabilización de los heterodímeros de  $\alpha/\beta$ -tubulina de los protofilamentos de los microtúbulos (Witte y Bradke, 2008). Dicha estabilización de los microtúbulos es suficiente para inducir la formación del axón en neuronas de hipocampo no polarizadas (Witte y cols., 2008), dado que les permitiría avanzar distalmente con sus extremos dinámicos (Witte y Bradke, 2008).

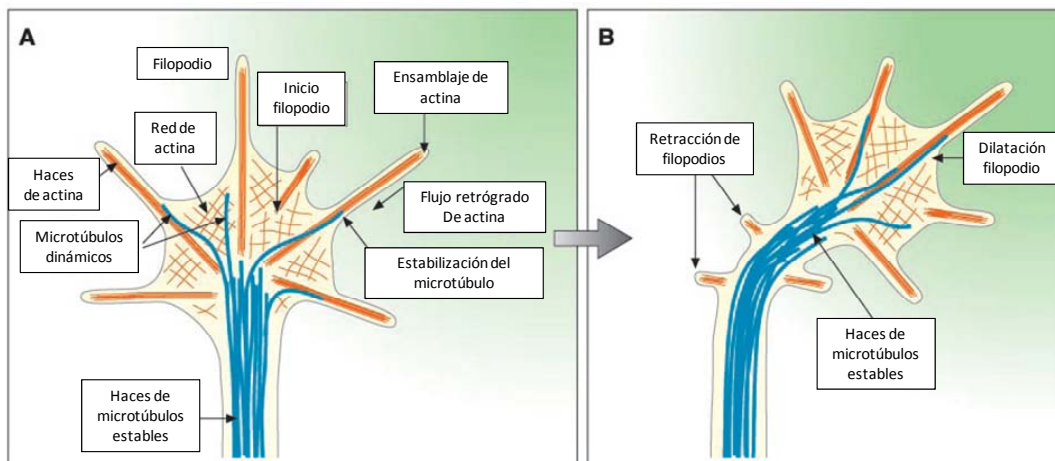
### **2.3 Elongación, orientación y arborización del axón.**

El axón, una vez formado, debe recorrer largas distancias para alcanzar dianas específicas y así generar contactos sinápticos con otras neuronas o células especializadas de diferentes tejidos. Esta elongación está controlada por señales externas positivas y negativas que regulan el crecimiento o retracción del axón. De este modo, los conos de crecimiento exploran el ambiente extracelular que los rodea y migran por las zonas permitidas hacia su diana (Gordon-Weeks, 2004).

El cono de crecimiento axonal cuenta con receptores de las señales extracelulares que promueven o inhiben el crecimiento axonal (como las semaforinas o netrinas), que están acoplados a mecanismos de regulación del citoesqueleto (Zhou y cols., 2008). Hasta el momento se han descubierto varias familias de señales de guía y sus receptores, conservadas filogenéticamente. Entre ellas destacan las semaforinas y sus receptores plexinas y neuropilinas (Pasterkamp y Kolodkin, 2003); las netrinas y sus receptores DCC y UNC5 (Kennedy, 2000); las Slits y su receptor *roundabout* (Robo) (Brose y Tessier-

Lavigne, 2000), y las efrinas y sus receptores Eph (Kullander y Klein, 2002). Todas estas señales actúan sobre GEFs (factores de intercambio de nucleótidos de guanina) y GAPs (proteínas activadoras de GTPasas), que activan o inhiben a los miembros de la familia de las Rho GTPasas (O'Donnell y cols., 2009). Estos procesos regulan la dinámica de los microtúbulos y microfilamentos de actina en zonas específicas del cono de crecimiento, modificando la actividad de las cascadas de señalización y permitiendo su crecimiento en una u otra dirección (Garrido y Diaz-Hernandez, 2009).

La mayoría de las señales extracelulares de crecimiento o repulsión poseen un papel dual en la elongación axonal, es decir, son capaces de atraer o repeler los conos de crecimiento dependiendo de la modulación de las cascadas intracelulares inducida por la activación de sus receptores (Hou y cols., 2008) (ver ejemplo de atracción en Figura 10).



**Figura 10. Esquema de un modelo de orientación del cono de crecimiento hacia una sustancia atrayente (degradado en verde).** Modificado de (Dickson, 2002)

Además de la elongación axonal, la formación de ramificaciones axonales (proceso conocido como arborización axonal) es muy importante en el desarrollo del sistema nervioso. En principal mecanismo implicado en la arborización axonal es, de nuevo, la reorganización de los elementos del citoesqueleto. El axón, a partir del cual se generan las ramificaciones, está formado por largos microtúbulos que deben ser localmente cortados en pequeños elementos móviles capaces de viajar hacia la ramificación en formación. Recientemente se

han propuesto dos modelos de fragmentación de los microtúbulos durante la arborización axonal, en los que intervienen dos proteínas diferentes, la katanina y la espastina (Yu y cols., 2008a). Aunque las moléculas que intervienen no están claramente definidas, hoy en día se sabe que GSK-3, RhoA, FAK (quinasa de adhesión focal) y las corrientes de calcio juegan un papel esencial en la arborización axonal (Rico y cols., 2004; Tang y Kalil, 2005; Garrido y cols., 2007; Ohnami y cols., 2008). Además, la netrina-1 induce corrientes transitorias de calcio que actúan sobre dos de sus proteínas diana (CaMKII y MAPK), y coinciden con los puntos de formación de las ramificaciones en el axón (Tang y Kalil, 2005)

## **2.4 Modulación de la elongación axonal.**

Las cascadas de señalización estimuladas por las señales permisivas o repulsivas en el crecimiento axonal, pueden estar moduladas, a su vez, por una gran variedad de señales del ambiente extracelular como factores de crecimiento (especialmente las neurotrofinas) (Lykissas y cols., 2007), componentes de la matriz extracelular (Kuhn y cols., 1995), moléculas de adhesión celular (Skaper, 2005), movilización de calcio (Gomez y Zheng, 2006) o neurotransmisores (van Kesteren y Spencer, 2003), entre otras.

La **neurotrofinas** forman el grupo de factores de crecimiento que intervienen en el desarrollo y función del sistema nervioso mejor caracterizado. Sus miembros, factor de crecimiento neuronal (NGF), neurotrofinas 3 y 4 (NT3 y NT4) y el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), actúan activando sus correspondientes receptores tirosina quinasa (TrkA, TrkB y TrkC), y poseen efectos de supervivencia neuronal y morfológicos (Barbacid, 1995). La vía de señalización activada por los factores de crecimiento que mejor se conoce es la cascada activada por Ras Raf-Mek-ERK (Markus y cols., 2002). Esta cascada es necesaria para la extensión y guía del axón de neuronas periféricas.

El **calcio** intracelular está involucrado en multitud de procesos biológicos, como la migración neuronal y el crecimiento o la arborización y guía axonal y dendrítica. Incrementos en los niveles de calcio intracelular en el cono de crecimiento han sido relacionados de forma inversa a la elongación del axón. Así

se ha descrito cómo la ausencia de corrientes de calcio acelera la extensión axonal, mientras que una elevada frecuencia de corrientes de calcio induce el colapso del cono de crecimiento y la retracción del axón (Tang y cols., 2003a; Gomez y Zheng, 2006). A su vez, la ruta de señalización intracelular activada al elevarse los niveles de calcio citosólicos interviene en los cambios en la dirección del crecimiento de los axones inducidos por la glicoproteína asociada a la mielina. Además, Hutchins y cols. confirmaron que corrientes de calcio de alta frecuencia favorecían el crecimiento de axones corticales y sus ramificaciones, mientras que aquellas de baja frecuencia producían la retracción de las prolongaciones (Hutchins y Kalil, 2008).

Estos cambios en la concentración intracelular de calcio estarían modulando distintas respuestas celulares, dada la gran cantidad de proteínas diana del calcio intracelular. Muchas de las proteínas activadas por calcio que se expresan en el cono de crecimiento regulan los procesos de crecimiento axonal. Por ejemplo, las proteínas quinasa y fosfatasa dependientes de calcio/calmodulina más conocidas, CaMKII y calcineurina (CaN), parecen estar implicadas en la regulación de la dirección que sigue el cono de crecimiento, así como en la ramificación axonal. Concretamente, elevaciones significativas de calcio citosólico activan de forma preferente CaMKII, lo cual induce la expansión del cono de crecimiento; mientras que una señal más modesta de calcio actúa preferentemente a través de CaN y proteín fosfatasa 1 provocando la retracción del cono de crecimiento (Wen y cols., 2004). También la familia de las Rho GTPasas (RhoA, Rac1 y Cdc42), que está implicada en la regulación del citoesqueleto de actina (Nobes y Hall, 1995) y de los puntos de adhesión (Woo y Gomez, 2006), exhibe una extensa comunicación con el calcio intracelular (Jin y cols., 2005; Gomez y Zheng, 2006).

A su vez, los **neurotransmisores** también son capaces de influir en el crecimiento axonal de forma positiva o negativa. Por ejemplo, la aplicación local de glutamato en áreas somatodendríticas induce la retracción rápida del axón (Yamada y cols., 2008), mientras que la activación del receptor gabaérgico GABA(A) estimula la elongación del axón a través de la CaMKII (Ageta-Ishihara y cols., 2009).

## **2.5 Implicaciones de la neurotransmisión purinérgica en la morfogénesis neuronal.**

Una de las familias de moléculas que más importancia está adquiriendo en los últimos años, por el papel que desempeñan en la diferenciación y supervivencia neuronal, son los nucleótidos de adenina.

El ATP juega un importante papel en la supervivencia y reparación del sistema nervioso tanto en condiciones normales como patológicas (Ralevic y Burnstock, 1998; Rathbone y cols., 1999; Volonte y cols., 2003; Franke y Illes, 2006), sin embargo, su papel en el crecimiento axonal aún es poco conocido y, en ocasiones, contradictorio. Heine y cols. describieron el efecto promotor del ATP en el crecimiento de las fibras nerviosas del giro dentado de hipocampo de ratón a través de sus receptores específicos P2X1, P2X2, P2X4, P2Y<sub>1</sub> y P2Y<sub>2</sub> (Heine y cols., 2006). Aun así, la mayor parte de los estudios indican un efecto negativo del ATP en el crecimiento axonal. En este sentido se ha descrito que en motoneuronas del tubo neural de rata embrionaria (estadio 12), tanto el ATP, como el análogo sintético  $\alpha,\beta$ -metilen-ATP, reducían de forma significativa la extensión de las neuritas vía activación del receptor P2X3 (Cheung y cols., 2005).

Recientemente, nuestro grupo también demostró el efecto negativo del ATP en el crecimiento axonal en neuronas de hipocampo de ratón en cultivo (Díaz-Hernández y cols., 2008). Mientras que el antagonista específico de las subunidades P2X1 y P2X3, Ip5I (King y cols., 1999), no modificó el crecimiento axonal, y el PPADS, antagonista de los receptores P2X2 y P2X4 (North, 2002), mostraba una tendencia a aumentarlo, los antagonistas del receptor P2X7, BBG, A438079 y KN-62 (Humphreys y cols., 1998; Jiang y cols., 2000b; McGaraughty y cols., 2007), incrementaban significativamente la longitud y arborización axonal. Este efecto positivo de la inhibición del receptor P2X7 en el crecimiento y arborización axonal estaba mediado por una cascada de señalización iniciada con la defosforilación de CaMKII y la consecuente activación FAK. Esto desencadenaba la activación de PI3K e inactivación de GSK3, y la disminución

de la forma fosforilada de la proteína tau asociada a microtúbulos, contribuyendo así a la estabilidad de los mismos (Díaz-Hernández y cols., 2008).

Además se han descrito varios efectos tróficos de otras purinas en el crecimiento de neuritas en diferentes sistemas, como el efecto promotor de la adenosina y guanosina en la elongación de neuritas de células del ganglio de la retina (Benowitz y cols., 1998), o la potenciación del crecimiento axonal de neuronas de hipocampo en cultivo por GTP y guanosina (Rathbone y cols., 1999).

### **3. ENFERMEDAD DE HUNTINGTON**

Aunque Paracelso (1493-1541) realizó la primera descripción médica, no fue hasta el siglo XIX cuando el doctor George Huntington, en el *Medical and Surgical Reporter*, la describió formalmente como Enfermedad de Huntington (EH) (Huntington, 1872). En esta publicación se estableció por primera vez la edad de comienzo (después de los 40 años), la tendencia a la locura y al suicidio, y el carácter hereditario de la enfermedad. En la actualidad la EH se define como un trastorno neurodegenerativo heredado de forma autosómica dominante (Wexler y cols., 1987), que comienza en la edad adulta del individuo (40 años aproximadamente) y progresa inevitablemente hasta que termina con la vida del paciente, después de aproximadamente 15 años de enfermedad (Ambrose y cols., 1994). La prevalencia de la EH es de aproximadamente 4-8 de cada 100.000 individuos en la población europea (Harper, 1992), aunque existen pequeñas áreas de prevalencia particularmente alta o baja relacionadas con los orígenes étnicos de estas poblaciones. Hasta el momento no existe ningún tratamiento que disminuya la progresión de la enfermedad, aunque sí se conocen algunos fármacos que mejoran la calidad de vida de los enfermos, como la tetrabenacina, que reduce los movimientos coreicos (Group, 2006).

#### **3.1 Sintomatología de la Enfermedad de Huntington.**

Las manifestaciones clínicas características de la EH consisten en disfunción motora, declive cognitivo o demencia y trastornos psicopatológicos. La edad media de inicio de la EH suele ser los 40 años, aunque también existen

casos en los que los síntomas comienzan a manifestarse a edades muy tempranas (formas juveniles), y otros en los que aparecen a partir de los 70-80 años (formas tardías o seniles) (Craufurd y Dodge, 1993). A pesar de estas grandes diferencias en el inicio de la EH, no existen variaciones tan grandes en cuanto a su duración (Roos y cols., 1993).

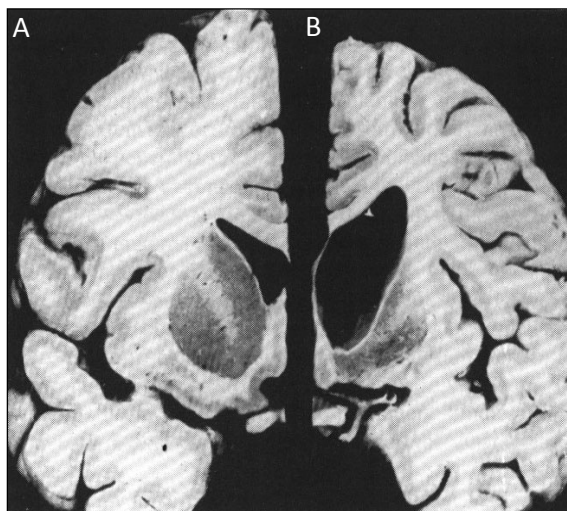
Entre los síntomas motores extrapiramidales destacan los movimientos coreicos involuntarios, la rigidez y la distonía (Berardelli y cols., 1999). Los enfermos también padecen disfunción oculomotora y de movimientos voluntarios, hiperactividad y anormalidad en el habla (Berardelli y cols., 1999; van Vugt y cols., 2001). Los trastornos cognitivos están caracterizados por demencia subcortical, con cambios afectivos y de la personalidad y problemas para integrar nuevos conocimientos, además de procesos maníacos y alucinaciones (Haddad y Cummings, 1997; Rosenblatt y Leroi, 2000; Paulsen y cols., 2001). Emocionalmente, los pacientes sufren depresión, frustración, irritabilidad, apatía y mayor tendencia al suicidio (Di Maio y cols., 1993; Baliko y cols., 2004). La mayoría de los pacientes de EH también pierden peso durante el curso de la enfermedad y sufren problemas de sueño e incontinencia en los estadios finales.

### **3.2 Neuropatología de la Enfermedad de Huntington.**

La EH se engloba dentro de las enfermedades de los ganglios basales, entre las que también se encuentran otras enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson (Albin y cols., 1989; DeLong, 1990; DeLong y Wichmann, 2007).

La neuropatología de la EH es sorprendentemente selectiva y se caracteriza por pérdida neuronal, gliosis y atrofia del estriado (Figura 11) (Vonsattel y DiFiglia, 1998). En menor medida también se ven afectadas las capas III, V y VI de la corteza (Heinsen y cols., 1994) y en estadios avanzados de la enfermedad el hipocampo (Spargo y cols., 1993), el tálamo (Heinsen y cols., 1999) o el cerebelo (Jeste y cols., 1984). La evolución de la enfermedad puede seguirse atendiendo a 4 estadios o grados, que dependen del estado de

degeneración del estriado, apareciendo además una pérdida neuronal del 95% en el estadio 4. (Vonsattel y cols., 1985)

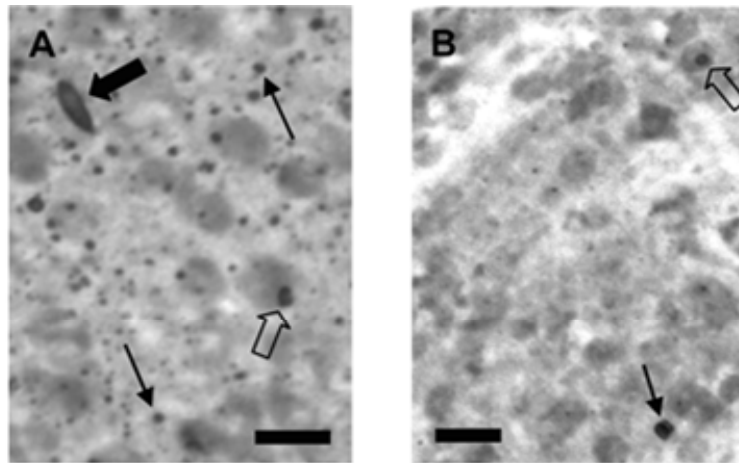


**Figura 11. Alteraciones macroscópicas en el cerebro en la enfermedad de Huntington.** Cortes sagitales correspondientes a un cerebro control sano (A) y a un cerebro con EH (B) en el que se aprecia claramente la atrofia generalizada del cerebro y la consecuente dilatación ventricular.

La atrofia del estriado cursa con pérdida específica de las neuronas GABAérgicas espinosas de tamaño medio (MSSNs, o *medium-sized spiny neurons*) (Graveland y cols., 1985), que comprenden el 95% de la población neuronal estriatal. La progresión en la degeneración hacia otras estructuras cerebrales hace que paulatinamente vayan apareciendo nuevos síntomas tanto motores como cognitivos en los pacientes de Huntington. En estadios posteriores (estadios 3 y 4), se produce la degeneración de la corteza (Vonsattel y DiFiglia, 1998), llegando a ser muy severa en el estadio 4. En esta estructura, las células principalmente afectadas son las neuronas piramidales de las capas III, V y VI, desencadenando déficits en la memoria operativa y en la capacidad de iniciar una tarea, así como pasar de una a otra (Heinsen y cols., 1994; Vonsattel y DiFiglia, 1998). En las últimas fases de la enfermedad (estadio 4), cuando la degeneración es generalizada, también se ven afectados el globo pálido, el tálamo, la sustancia nigra, el hipocampo, la médula espinal y otras estructuras (Vonsattel y cols., 1985; Vonsattel y DiFiglia, 1998).

La gliosis que tiene lugar en la EH se da principalmente en el estriado, aunque también aparece en menor medida en la corteza, y se caracteriza por un incremento en el número de astrocitos reactivos. Estos astrocitos tienen un núcleo más grande de lo normal y poseen un número mayor de haces de filamentos gliales (Vonsattel y cols., 1985).

La enfermedad de Huntington también se caracteriza por la presencia de inclusiones intranucleares neuronales y agregados proteicos en neuritas en las neuronas corticales y en menor medida en las estriatales (Figura 12) (DiFiglia y cols., 1997; Sapp y cols., 1999).



**Figura 12. Agregados nucleares y del neuropilo característicos de la EH en cortes histológicos de corteza (A) y estriado (B).** Las flechas huecas señalan agregados intranucleares, las flechas finas agregados del neuropilo y la flecha negra gruesa indica una neurita distrófica. Adaptado de Díaz-Hernández y cols., 2004.

Las alteraciones observadas en los pacientes de Huntington se han logrado reproducir en modelos transgénicos de ratón (Guidetti y cols., 2001; Martín-Aparicio y cols., 2001). Además, en estos ratones que reproducen la enfermedad, la pérdida neuronal tanto apoptótica (Portera-Cailliau y cols., 1995; Díaz-Hernández y cols., 2005), como no apoptótica (Turmaine y cols., 2000; Díaz-Hernández y cols., 2003), se observa después de la aparición de los primeros síntomas.

También se ha descrito una disminución del metabolismo mitocondrial en pacientes de la EH. Sin embargo, el tratamiento de dos modelos animales que reproducen la EH (*Caenorhabditis elegans* y *Drosophila*) con fármacos que

inhiben el metabolismo, y más específicamente la producción de ATP, reduce la muerte neuronal observada en dichos modelos (Varma y cols., 2007). En este sentido, el ATP extracelular también se ha visto implicado en la muerte de neuronas dopaminérgicas, a través de la activación del receptor ionotrópico P2X7 (Jun y cols., 2007).

### **3.3 Mutación responsable de la enfermedad de Huntington.**

La mutación responsable de la EH consiste en una expansión de repeticiones CAG cerca del extremo 5' del gen HTT, que codifican para una secuencia de poliglutaminas. Inicialmente este gen se denominó IT15, y se localiza en el brazo corto del cromosoma 4 (región 4p\_16.3) (The Huntington's disease collaborative research group, 1993; Rubinsztein y cols., 1994; Gusella y cols., 1996). Este gen está formado por 67 exones que codifican para una proteína de ~348 kD denominada huntingtina (htt). El gen IT15 se expresa en todos los tejidos, aunque los niveles más altos de expresión se encuentran en el cerebro y los testículos (Li y cols., 1993; Strong y cols., 1993; Landwehrmeyer y cols., 1995).

La expansión de los tripletes CAG se traduce en una secuencia de poliglutaminas (poliQ) en el extremo N-terminal de la htt (The Huntington's disease collaborative research group, 1993). Los individuos sanos poseen entre 11 y 35 repeticiones de CAG, mientras que los enfermos de EH tienen más de 39 repeticiones. El número de repeticiones de CAG condiciona la edad de inicio y la severidad de la enfermedad, siendo más severa y comenzando antes cuanto mayor sea la expansión. Así, la forma más común de la enfermedad se produce con 40-50 repeticiones de glutamina, mientras que los alelos que contienen entre 35 y 39 repeticiones están asociados con formas seniles de la enfermedad (en algunos casos no aparece). La aparición de más de 50 repeticiones induce el desarrollo de la forma juvenil de la enfermedad, siendo esta su forma más agresiva (The Huntington's disease collaborative research group, 1993). Aproximadamente en el 80% de los casos de EH juvenil, los pacientes han heredado la mutación por vía paterna (Srivastava y cols., 1999).

### **3.4 Huntingtina.**

La huntingtina es una proteína de expresión ubicua, con su máximo de expresión en cerebro y testículos, y cantidades más moderadas en hígado corazón y pulmones (Li y cols., 1993; DiFiglia y cols., 1995). En el cerebro se encuentra en mayores cantidades en los tipos neuronales más grandes como son las neuronas piramidales de la corteza; las neuronas del globo pálido y células de Purkinje del cerebelo (Gutekunst y cols., 1995; Sharp y cols., 1995). Su localización es principalmente citoplásmica, aunque también puede detectarse en el núcleo (Hoogeveen y cols., 1993; Sharp y cols., 1995; De Rooij y cols., 1996; Sapp y cols., 1997). Además, se observa una gran presencia de htt en las dendritas, principalmente asociada a microtúbulos. En un pequeño porcentaje de espinas dendríticas se limita a membranas o densidades postsinápticas, y en axones y terminales axónicos se encuentra principalmente asociada a microtúbulos y vesículas sinápticas (DiFiglia y cols., 1995; Gutekunst y cols., 1995; DiFiglia y cols., 1997).

La htt es una proteína muy compleja, por lo que se han propuesto multitud de mecanismos celulares en los que puede estar involucrada, aunque se desconoce la función exacta que desempeña en cada uno de ellos. Se ha descrito como una proteína muy importante en el desarrollo embrionario. Así, los ratones que poseen deleción del gen de la htt padecen letalidad embrionaria (Duyao y cols., 1995; Nasir y cols., 1995; Zeitlin y cols., 1995). Sin embargo, la expresión de la htt\* (huntingtina mutada) en estos ratones los rescata de la muerte embrionaria (Leavitt y cols., 2001), sugiriendo que la función de la htt durante el desarrollo es independiente de la cola de poliQ (poliglutaminas) y que la htt\* puede suplir la función de la htt en esta etapa.

Varios estudios han mostrado que la htt es capaz de unirse e interactuar con numerosas proteínas (actualmente se conocen más de 200) a través de su región rica en prolinas, dominios SH3 o a través dominios HEAT. En la mayoría de los casos, estas proteínas interactúan tanto con la htt normal como con la proteína mutada. Así, podrían intervenir en los procesos en los que

participen dichas proteínas. (Li y Li, 2004; Kaltenbach y cols., 2007) A continuación se detallan algunos ejemplos relevantes.

- Interacción con HAP1 (proteína asociada a huntingtina 1), que a su vez actúa sobre la dinactina, influyendo así en el transporte intracelular (Li y cols., 1998).
- Interacción con HIP1 (proteína de interacción con huntingtina 1), proteína que se une a moléculas implicadas en citoesqueleto y endocitosis (como  $\alpha$ -adaptina o clatrina) (Waelter y cols., 2001).
- Asociación con HIP2 (proteína de interacción con huntingtina 2), enzima de conjugación de ubiquitina, que cataliza la unión covalente de la ubiquitina a las proteínas intracelulares, marcándolas para la degradación por el proteasoma. (Kaltenbach y cols., 2007)
- Regulación del anclaje a la membrana postsináptica de los receptores de kainato y NMDA a través de la unión de la proteína PSD95 a la htt (Sun y cols., 2001b).
- Interacción con proteínas del metabolismo, como la GAPDH (Burke y cols., 1996).
- Regulación de la señalización intracelular por interacción con proteínas como la calmodulina (Bao y cols., 1996).
- Regulación de la transcripción a través de la interacción de la htt con factores de transcripción como REST/NRSF (Zuccato y cols., 2003).

La htt también se asocia a la síntesis de BDNF (factor neurotrófico derivado de cerebro), una neurotrofina particularmente importante en la supervivencia de las neuronas estriatales y en la actividad de las sinapsis cortico-estriatales (Nakao y cols., 1995; Jovanovic y cols., 2000). Estudios in vitro e in vivo demuestran que la htt normal, pero no la htt\*, estimula la producción de BDNF (Zuccato y cols., 2001; Zuccato y cols., 2003).

Además, la htt normal podría participar en procesos antiapoptóticos, por ejemplo previniendo la activación de las caspasas 3 y 9 (Rigamonti y cols., 2000; Rigamonti y cols., 2001).

### **3.5 Agregados de huntingtina.**

Existen otras ocho enfermedades neurodegenerativas hereditarias causadas por una expansión de la cola de poliglutaminas. Todas ellas son neurológicas, a pesar de la diferente naturaleza y la expresión ubicua de las proteínas que llevan la mutación. Esto sugiere una vulnerabilidad selectiva de las neuronas a la expansión de la poliQ.

Todas las proteínas que poseen la cola poliQ tienden a formar agregados intracelulares (tras un corte proteolítico parcial normalmente) en el cerebro de los enfermos (DiFiglia y cols., 1997; Ross, 1997; Gutekunst y cols., 1999; Nakamura y cols., 2001). Estos agregados proteicos intracelulares, llamados cuerpos de inclusión (CI), están formados por fragmentos de las proteínas que llevan la mutación. Por este motivo, en un principio se pensaba que los CIs eran patogénicos y que la agregación se debía a la ganancia de función tóxica que confería la mutación a las proteínas, sin embargo, hoy en día existe controversia en este punto. Varios estudios demuestran que los CIs no sólo no serían patogénicos, sino que constituirían un mecanismo de protección de la célula frente a proteínas mal plegadas y/o extrañas, y concretamente frente a la toxicidad de la poliQ (Saudou y cols., 1998; Arrasate y cols., 2004; Diaz-Hernandez y cols., 2006). Por otro lado, varios trabajos demuestran que las especies intermedias presentes en el proceso de agregación (oligómeros en distintos estados de agregación) serían las responsables de la toxicidad de la poliQ (Bennett y cols., 2005; Nagai y cols., 2007; Takahashi y cols., 2008).

Los CIs son estructuras dinámicas que requieren un continuo aporte de la proteína mutada para su formación y mantenimiento. Si se inhibe el influjo de proteína mutada, los CIs desaparecen a la vez que tiene lugar una mejora en el fenotipo neurológico (Yamamoto y cols., 2000; Diaz-Hernandez y cols., 2004b; Diaz-Hernandez y cols., 2005).

### **3.6 Mecanismos de toxicidad de la htt mutada.**

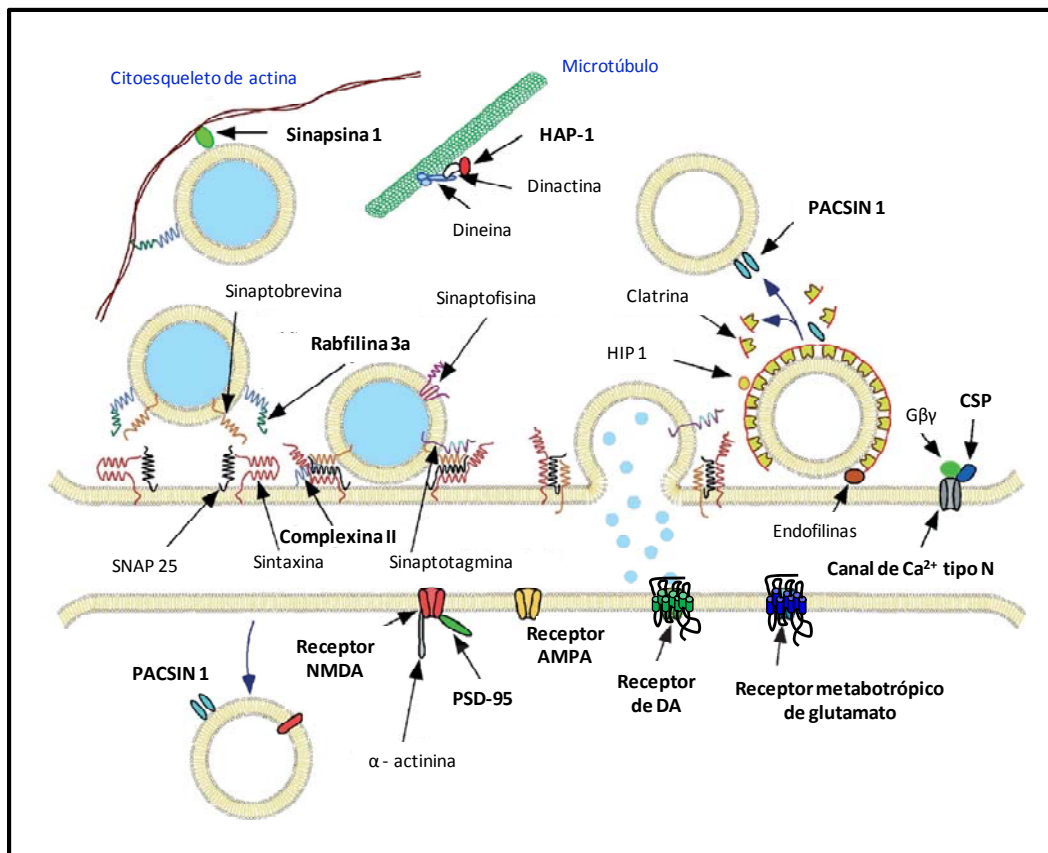
Como se ha mencionado anteriormente, la expansión de glutaminas confiere a la huntingtina una función tóxica para las células. Aunque todavía no se conoce con exactitud el mecanismo de toxicidad, se ha descrito que, tanto la

forma soluble como los agregados interrumpen varias vías intracelulares a través de la interacción o el secuestro de los componentes de dichas vías. Por otro lado, varios estudios también sugieren que la pérdida de función de la htt normal, bien por una disminución en su expresión, bien por su secuestro en los agregados por interacción con la htt\*, también contribuye al desajuste de la homeostasis intracelular, culminando en la disfunción y muerte neuronal (Gil y Rego, 2008).

### **3.7 Alteraciones sinápticas en la EH.**

Uno de los procesos más importantes que se ven afectados en la enfermedad de Huntington es la transmisión sináptica, además de las alteraciones en el transporte axonal (Li y cols., 1998; Gauthier y cols., 2004). Hoy en día se conocen multitud de proteínas sinápticas alteradas por la expresión de htt mutada (ver revisiones (Li y cols., 2003b; Smith y cols., 2005a; Rozas y cols.) (Figura 13). La complexina II, que regula la liberación de neurotransmisor interaccionando con el complejo SNARE (del inglés *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*), se encuentra disminuida en pacientes de la EH y en ratones transgénicos (Morton y Edwardson, 2001; Morton y cols., 2001). Otra proteína con menores niveles de expresión en pacientes y en ratones con EH es la rabfilina 3A, involucrada en la preparación y anclaje de las vesículas a la membrana (Smith y cols., 2005b; Smith y cols., 2007). Por otro lado, la proteína vesicular SCAMP5 (del inglés "*secretory carrier membrane protein 5*") presenta elevados niveles de expresión en el estriado de pacientes de Huntington (Noh y cols., 2009).

También cabe destacar que la homeostasis del calcio, fundamental en la liberación exocitótica de neurotransmisores, se encuentra alterada en la EH. Así, los ratones R6/2 (que expresan el exón 1 de la htt con 150 repeticiones de CAG) y los ratones YAC128 (que expresa la htt con 128 repeticiones de CAG) presentan mayores niveles intracelulares de calcio que los ratones sanos (Hansson y cols., 2001; Tang y cols., 2005). A su vez, el grupo de Bezprozvanny demostró una conexión directa entre la señalización anormal de calcio y la apoptosis de las MSSN del modelo de ratón de EH YAC128 (Tang y cols., 2005).



**Figura 13. Esquema representativo de la endocitosis, exocitosis y señalización sináptica en una sinapsis.** Las proteínas involucradas en la enfermedad de Huntington que se mencionan en el texto se indican en negrita. Modificado de Smith y cols., 2005.

Además, la interacción de la htt\* con la CSP (del inglés *Cysteine string protein*) (Figura 13) bloquea la inhibición de los canales de calcio tipo N por parte de dicha proteína, incrementando las corrientes de calcio a través de dichos canales (Miller y cols., 2003). El tráfico y reciclado vesicular también se ven afectados en la EH. La proteína sinapsina I, que regula la asociación de las vesículas sinápticas con el citoesqueleto de actina y los microtúbulos (Figura 13), posee un estado anormal de fosforilación en la corteza y el estriado de los ratones R6/2, que podría estar alterando la reserva de vesículas (Lievens y cols., 2002; Smith y cols., 2005a). A su vez, la fosfoproteína PACSIN 1 (Figura 13) está involucrada en la endocitosis y el reciclado de receptores. Su capacidad de interacción con la htt se ve favorecida al aumentar el número de repeticiones,

así, en la EH se encuentra secuestrada en agregados perinucleares de htt\* (Modregger y cols., 2002).

La huntingtina mutada también puede inducir la disfunción sináptica alterando la actividad y la expresión de varios receptores de neurotransmisores pre- y postsinápticos (revisado por (Li y cols., 2003b; Smith y cols., 2005a). Así, en ratones R6/2 hay una disminución de la expresión de los receptores metabotrópicos de glutamato mGluR1, 2 y 3, de los de AMPA y kainato (KA), de los receptores colinérgicos muscarínicos y de los receptores dopaminérgicos D1 y D2 (Cha y cols., 1998; Cha y cols., 1999; Dunah y cols., 2002). Sin embargo, en el modelo de ratón YAC128, las alteraciones en la expresión de los receptores quedan restringidos a los glutamatérgicos (Benn y cols., 2007).

En el cerebro humano de pacientes de EH también se han encontrado alteraciones en la expresión de los receptores. Los niveles del receptor cannabinoide CB<sub>1</sub>, del receptor A<sub>2a</sub> de adenosina y del receptor dopaminérgico D1 disminuyen en los ganglios basales de los pacientes de Huntington en estadios presintomáticos (grado 0). Conforme avanza la enfermedad también se reducen los niveles del receptor D2 de dopamina y continuán disminuyendo los niveles de los receptores CB<sub>1</sub>, A<sub>2a</sub> y D1 en esta zona (Glass y cols., 2000).

Además, la expansión de poliglutaminas disminuye la capacidad de la htt de unirse a la proteína PSD95 (Figura 13), que queda libre y accesible para interactuar con los receptores NMDA y KA, y sensibilizarlos o hiperactivarlos, favoreciendo el proceso de excitotoxicidad por glutamato (Sun y cols., 2001b). En este sentido, se ha descrito un aumento de sensibilidad a la excitotoxicidad inducida por la activación de los receptores NMDA, y más concretamente por el subtipo NR2B, en un modelo de ratón de la EH (YAC72, que expresa la htt con 72 repeticiones de CAG) (Zeron y cols., 2002).

Esta excitotoxicidad y muerte celular inducida por la acción de la htt\* sobre los receptores glutamatérgicos también se ha registrado en MSSNs de ratones con EH (Tang y cols., 2003b). Sin embargo, Li y cols. observaron una reducción de la liberación de glutamato en cortes de cerebro de ratones con EH

que contenían agregados axonales y menor densidad de vesículas sinápticas (Li y cols., 2003a), disminuyendo en parte la excitotoxicidad del glutamato.

También se produce una reducción selectiva de la fosfoproteína regulada por dopamina y AMPc de 32 kDa (DARPP-32) en modelos de ratón de la EH presintomáticos (Bibb y cols., 2000). DARPP-32 participa en el control de receptores y canales iónicos y está involucrada en la transducción dopaminérgica, glutamatérgica y serotoninérgica. Por lo tanto, la reducción observada en los ratones con EH podría contribuir a la disfunción de los receptores de dopamina, NMDA y AMPA (Li y cols., 2003b).

Recientemente el grupo de Bota también ha descrito en un modelo de *Drosophila* de la EH un aumento de la liberación de neurotransmisor en las sinapsis, que favorece el proceso de neurodegeneración (Romero y cols., 2008). Sin embargo, no han encontrado diferencias significativas en los niveles y/o la distribución de las proteínas sinápticas, ni alteraciones en las propiedades de los receptores postsinápticos, en las moscas que expresan la htt mutada.

# **Objetivos**



La liberación de ATP, y otros nucleótidos, al espacio extracelular mediante exocitosis, transportadores de membrana, o hemicanales, es un proceso celular que transcurre en condiciones fisiológicas (Bodin y Burnstock, 2001; Lazarowski y cols., 2003). Sin embargo, en condiciones patológicas como isquemia/hipoxia e inflamación, las células nerviosas (astrocitos activados, neuronas, microglía, células endoteliales) también pueden liberar ATP (Dubyak y el-Moatassim, 1993; Bodin y Burnstock, 2001). De esta forma se puede acumular ATP en el espacio extracelular que puede influir en la fisiología neuronal o incluso modificarla procesos patológicos.

Estos antecedentes nos llevaron al planteamiento de los siguientes objetivos:

- Dado que el ATP, vía activación del receptor P2X7, inhibe el crecimiento axonal, se decidió investigar si las enzimas que controlan la disponibilidad de ATP endógeno estaban implicadas en este proceso. Este estudio se centró en la TNAP, dado que es una ectoenzima capaz de hidrolizar el ATP extracelular generando directamente adenosina y no otros intermediarios nucleotídicos capaces de activar otros receptores P2X o receptores P2Y.
- Recientemente se ha descrito que el empleo de fármacos que disminuyen la producción de ATP reducen la apoptosis neuronal en varios modelos de la enfermedad de Huntington. Además, el ATP extracelular, a través de la estimulación del receptor P2X7, produce la muerte de neuronas dopaminérgicas estriatales, las cuales son las principales afectadas en dicha enfermedad. Teniendo en cuenta, además, que la subunidad P2X7 es la más abundante en cerebro medio de ratón, el siguiente objetivo fue estudiar la implicación del receptor P2X7 en la enfermedad de Huntington.



# **Material y Métodos**



**MATERIALES****1. Instrumentación** (ver Tabla 5).

Tabla 5. Relación del los diferentes aparatos utilizados

Categoría y uso	Instrumentación	Modelo
<b>Instrumentación general</b>	Granatario AND	Fx 2000
	Balanza de precisión AND	ER-60
	Agitadores magnéticos	S
	Agitadores orbitales	Luckham 802
	pHmetros	Crison 2001
	Pipétas automáticas	Eppendorf y Gilson
	Sistemas de filtración	Milli-Ro/Milli-Q (Millipore)
	Microfuga Eppendorf	5414D
	Centrífugas Eppendorf	5702 R y 5804 R
	Centrífuga refrigerada	Sorvall RC5C
	Baños termostatzados	Tectron 3473100
	Calentadores multibloque	Thermomixer compact de Eppendorf
<b>Cultivos celulares</b>	Campana de flujo laminar horizontal	Tel-Star, AH-100
	Autoclave alta capacidad	Steam Sterilizer, Trade Raypa
	Autoclave baja capacidad	Certoclav
	Placas petri estériles	Falcon
	Cubreobjetos de vidrio	Deckgläser
	Pipetas de aspiración	Pipet-Aid XP (Drummond)
	Pipetas estériles	Costar
	Incubador	Shel-Lab
	Filtros de 0,22 µM	Milllex-GS (Millipore)
	Jeringas estériles	Falcon
	Cámara de Neubauer	Nessler
	Microscopio óptico	Nikon

<b>Expresión génica</b>	<p>Equipo de extracción de ARN</p> <p>Lector de placas</p> <p>Espectrofotómetro</p> <p>Termociclador</p> <p>Sistema de visualización de genes</p>	<p>ABI PRISM 6100 Nucleic Acid Prepstation (Applied Biosystems)</p> <p>FLUOstar OPTIMA</p> <p>Eppendorf Biophotometer</p> <p>GeneAmp2400 (Applied Biosystems)</p> <p>Gel Logic 200 Imagin System (Kodak)</p>
<b>Microfluorimetría</b>	<p>Microscopio</p> <p>Cámara</p> <p>Objetivo</p> <p>Monocromador con apertura de 10 nm.</p> <p>Software controlador</p>	<p>Nikon Eclipse TE-200</p> <p>ORCA-ER 42-98 CCD (Hamamatsu)</p> <p>Nikon S Fluor 40x 0,5-1,3</p> <p>Optoscan monocromator, Cairin</p> <p>Metafluor 6.3r &amp; PC software (Universal Imaging Copr).</p>
<b>Técnicas inmunológicas</b>	<p><i>Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia</i></p> <p>Criostato</p> <p>Microscopio de fluorescencia</p> <p>Lámpara de Xenon</p> <p>Cámara</p> <p>Software controlador</p> <p><i>Inmunotransferencia</i></p> <p>Sistema de electroforesis</p> <p>Sistema de transferencia</p> <p>Máquina de revelado</p> <p>Equipo de densitometrado</p>	<p>Leica</p> <p>NIKON TE-200</p> <p>Nikon</p> <p>Kappa DX2</p> <p>Kappa Image Base Control</p> <p>Mini-Protean 3 (Bio-Rad)</p> <p>Mini-Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell</p> <p>AGFA CP-1000</p> <p>Gel Logic 200 Imagin System (Kodak)</p>
<b>Evaluación de la capacidad motora de los ratones</b>	<p>Rota-Rod</p>	<p>Ugo Basile, Comero, Italia</p>

## 2. Reactivos.

Todos los medios y soluciones se prepararon con sales inorgánicas Merck de grado analítico (pro anal.) disueltas en agua desionizada de alta calidad y pureza. En la Tabla 6 se detallan los compuestos y reactivos utilizados en cada uno de los ensayos realizados, así como las casas comerciales que los suministraron. En general, cualquier sustancia no especificada en las tablas fue proporcionada por Sigma-Aldrich o Merck.

**Tabla 6. Relación de compuestos y reactivos utilizados**

Categoría y uso	Reactivo	Casa comercial
<b>Obtención Sinaptosomas</b>	Percoll. DTT, TES, EDTA. Sacarosa.	Amersham Sigma Merck
<b>Cultivos de neuronas</b>	Neurobasal, B27, solución de antibióticos/antimicóticos. Glutamina, AraC. Papain Dissociation System Poly-L-lisina (0,1 mg/ml). Azul tripán, Poly-L-lisina (1 mg/ml).	Gibco Sigma Whorthington Biochrom AG Sigma
<b>Experimentos de PCR</b>		
<i>Extracción y limpieza de ARN</i>	RNeasy Mini Kit. Kit DNA free	Quiagen Ambion
<i>Geles</i>	Agarosa D1, Agarosa M8. SYBR-Save DNA stain.	Pronadisa Molecular Probes
<i>RT</i>	TaqMan <sup>®</sup> RT reagents. M-MLV RT reagents.	Applied Biosystems. Invitrogen
<i>PCR</i>	AmpliTaqGold PCR Master Mix	Applied Biosystems
<i>Q-PCR</i>	TaqMan <sup>®</sup> Universal PCR Master Mix Fast No Amperease, TaqMan <sup>®</sup> Gene Expression Assays.	Applied Biosystems

## Materiales y Métodos

<i>Inhibidores de ARNsas</i>	DEPC, RNase-Zap.	Fluka Chemie Sigma
<b>Transfecciones</b>	Lipofectamina 2000	Invitrogen
<b>Microfluorimetría</b> <i>Sonda fluorescente de Ca<sup>2+</sup></i>	Fura-2 AM	Molecular Probes
<b>Farmacología</b> <i>Agonistas y antagonistas purinérgicos</i>	ATP, ADP, AMP, BzATP, Adenosina, CPA, BBG, A438079.	Sigma, Tocris, Boehringer
<i>Enzimas</i>	Fosfatasa alcalina, Adenosina deaminasa.	Sigma, Roche
<i>Otros antagonistas</i>	Levamisol	AppliChem
<b>Inmunohistoquímica</b> <i>Fijación y bloqueo</i>	<i>p</i> -formaldehído, suero de cabra, Tritón X-100, BSA.	Sigma, Molecular Probes
<i>Anticuerpos primarios</i>	anti-Iba-1 (conejo). anti-Cleaved Caspase-3 (Asp175) (conejo). anti-GFAP (conejo).	Wako Cell Signaling Sigma
<i>Anticuerpos secundarios</i>	anti-inmunoglobulinas de conejo y ratón biotinizadas (cabra).	Atom
<i>Revelado</i>	Streptavidina-HRP. Diaminobencidina.	Sigma
<b>Inmunofluorescencia</b> <i>Fijación y bloqueo</i>	<i>p</i> -formaldehído, suero de cabra, Tritón X-100 y BSA.	Sigma, Molecular Probes
<i>Anticuerpos primarios</i>	anti-sinaptofisina (ratón) anti-GFAP (conejo). anti-P2X7 (conejo). Anti-P2X1, P2X2, P2X3, P2X4, P2X5 anti-Darpp-32 (conejo) anti-NeuN (ratón) anti-Cleaved Caspase-3	Sigma Sigma Alomone, Chemicon Alomone Chemicon Chemicon Cell Signaling

<i>Anticuerpos secundarios</i>	(Asp175) (conejo) anti-Iba-1 (conejo) anti-βIII-tubulina (ratón) anti-TNAP (conejo) anti-IgG de ratón–Cy3 (burro). anti-IgG de conejo-Cy3 (burro).	Wako Promega Abcam Jackson Jackson
<i>Toxinas fluorescentes</i>	Alexa 488 anti-IgG de ratón (cabra) Alexa 488 anti-IgG de conejo (cabra) Alexa-Fluor-594-conjugated phalloidin	Invitrogen Invitrogen Invitrogen
<b>Inmunotransferencia</b>		
<b><i>Extracción y cuantificación de proteínas</i></b>	Hepes, EDTA, NaCl, NaF, Triton X-100, Ortovanadato sódico, Ácido okadaico, Complete (inhibidores de proteasas), RIPA.  Reactivo Bradford	Sigma, Merck, Roche, Calbiochem  BioRad
<b><i>Electroforesis y transferencia</i></b>	Persulfato amónico, bis-acrilamida, SDS, Temed, Glicina, patrones de peso molecular conocido y b-mercaptoetanol.  Tris, azul de bromofenol y metanol.	BioRad  Merck
<b><i>Anticuerpos primarios</i></b>	Membranas de nitrocelulosa. Rojo Ponceau anti-sinaptofisina (ratón). anti-P2X7 (conejo). anti-α-tubulina (ratón).	Whatman Sigma Sigma Alomone, Chemicon Sigma
<b><i>Anticuerpos secundarios</i></b>	Anti-TNAP (conejo) anti- IgG de conejo-HRP (cabra) y anti-IgG de ratón-HRP (conejo).	Abcam DakoCytomation
<b><i>Revelado de membranas</i></b>	Reactivo ECL. Películas de autorradiografía.	PerkinElmer Agfa

<b>Citoquímica enzimática</b> <i>Actividad PA</i>	BCIP/NBT	Sigma
<b>Niveles de ATP extracelular</b>	ENLITEN ATP Assay System Bioluminescence Detection Kit for ATP Measurement	Promega
<b>Ensayos de viabilidad</b>	Kit Calceína.	Molecular Probes

### 3. Modelos de estudio

#### 3.1 Cultivos celulares.

En esta Tesis Doctoral se emplearon cultivos de neuronas de hipocampo, corteza y estriado de ratones C57/bl6 (control), R6/1, Tet/HD94 y Knock out para el receptor P2X7 (ver apartado siguiente), a alta o baja densidad, dependiendo del ensayo a realizar.

#### 3.2 Animales.

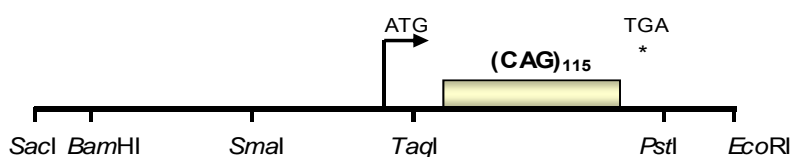
Los animales empleados en este estudio se utilizaron según la normativa internacional para animales de laboratorio (ICLAS).

Se criaron en el animalario del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid y del grupo del Profesor Doctor H. Zimmermann, en el Institut für Zellbiologie und Neurowissenschaft de la Johann Wolfgang Goethe-Universität. De cuatro a cinco ratones por jaula, con comida y agua *ad libitum*, con temperatura controlada y ciclos de luz-oscuridad de 12 horas.

**Ratones C57/bl6.** Los ratones de esta cepa se utilizaron como control en todos los experimentos realizados en este estudio.

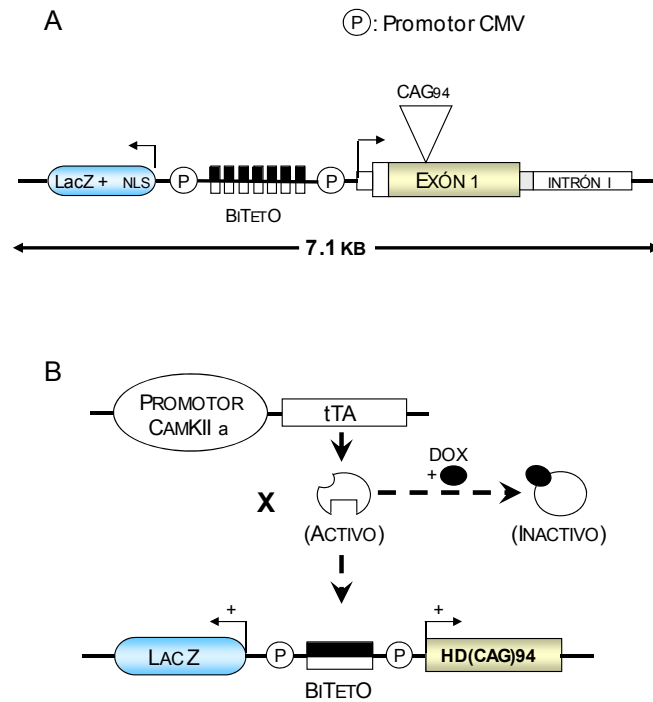
**Ratones R6/1.** Estos ratones originados por Mangiarini y cols. (Mangiarini y cols., 1996) contienen insertado al azar en su genoma, por microinyección en células embrionarias, el exón 1 de la huntingtina humana con 115 repeticiones de CAG (Figura 14) que se expresan de forma ubicua bajo el promotor de la misma. El alto número de repeticiones de CAG hace que el fenotipo de la

enfermedad se manifieste de forma muy agresiva y evolución rápida, aunque, los cambios estructurales que se producen en el estriado se asemejan más a una patología menos agresiva de inicio tardío. Los ratones sufren reducción del peso corporal, pérdida de volumen y peso del cerebro, disminución del volumen del estriado y declive cognitivo y motor caracterizado por temblores, corea, movimientos estereotípicos y distonía. La aparición de los síntomas ocurre a las 15-21 semanas aproximadamente, y la esperanza de vida máxima es de 40 semanas.



**Figura 14.** Mapa de restricción del fragmento genómico humano empleado en la microinyección para la generación de los ratones R6/1 (Modificado de (Mangiarini y cols., 1996))

**Ratones Tet/HD94.** Este modelo condicional de la enfermedad de Huntington, diseñado y originado por Yamamoto y cols. (Yamamoto y cols., 2000), expresa el N-terminal (exón 1) de la huntingtina con una cola de 94 poliglutaminas bajo el control de un promotor represible (BiTetO) que necesita la unión de un transactivador para su funcionamiento. El transactivador se encuentra bajo el control de la Calcio/calmodulina kinasa II $\alpha$  (CaMKII), lo que restringe su expresión a la zona anterior del cerebro. El promotor represible es bidireccional y posee el exon 1 de la htt en un sentido, y en el otro, la secuencia reportera lacZ que codifica para  $\beta$ -galactosidasa, lo cual permite evaluar el patrón de expresión del sistema. Así, en ausencia de tetraciclina, el transactivador activa la expresión de la cola de 94 repeticiones y de la  $\beta$ -galactosidasa, mientras que la adición de tetraciclina (u homólogos como doxiciclina) reprime dicha expresión (Figura 15). Los animales desarrollan características neuropatológicas (menor tamaño cerebral y estriatal acompañados de un engrosamiento de los ventrículos y astrogliosis reactiva) y comportamentales (disfunción motora progresiva con movimientos coreicos y distónicos) características de la enfermedad de Huntington.



**Figura 15. Esquema de la construcción del ratón TetHD94.** A. Transgen poliQ-htt inducible. El péptido de la htt mutada está formado por el exón 1 de la htt con una expansión de poliglutaminas de 94 repeticiones. El promotor BiTetO permite la regulación simultánea de LacZ con una secuencia de localización nuclear (NLS). B. La molécula tTA activa se une al promotor BiTetO induciendo la expresión de los transgenes. La adición de tetraciclina o doxiciclina (DOX) inhibe la expresión de los transgenes uniéndose al tTA e inactivándolo. (Yamamoto y cols., 2000)

**Ratones knock out (KO) para la subunidad P2X<sub>7</sub>.** Este modelo KO, derivado de Pfizer (Groton, CT, USA) y originado por (Solle y cols.), posee delecionada la región comprendida entre los nucleótidos 1527 a 1607 e insertado por recombinación homóloga el gen de resistencia a Neomicina (Figura 16). Estos ratones fueron cedidos amablemente por el Dr. J. P. Dehaye (Laboratoire de Biochimie et de Biologie Cellulaire, Institut de Pharmacie, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Bélgica).



**Figura 16. Esquema de la construcción del ratón P2X<sub>7</sub><sup>-/-</sup> de Pfizer.** Deleción de la región comprendida entre los nucleótidos 1527 a 1607 e inserción por recombinación homóloga del gen de resistencia a Neomicina.

## MÉTODOS

### 1. Obtención de sinaptosomas de cerebro de ratón.

Para la realización de cada experimento se sacrificaron 2 ratones C57Bl/6J o Tet/HD94 mediante dislocación cervical y posterior decapitación. De aquí en adelante todas las manipulaciones llevadas a cabo tuvieron lugar a una temperatura de 4°C.

Los sinaptosomas se purificaron en un gradiente discontinuo de Percoll según describieron Dunkley y col. (1986) y Wang y col. (1989) y modificaron Pintor y Miras-Portugal (1995) (Figura 17).

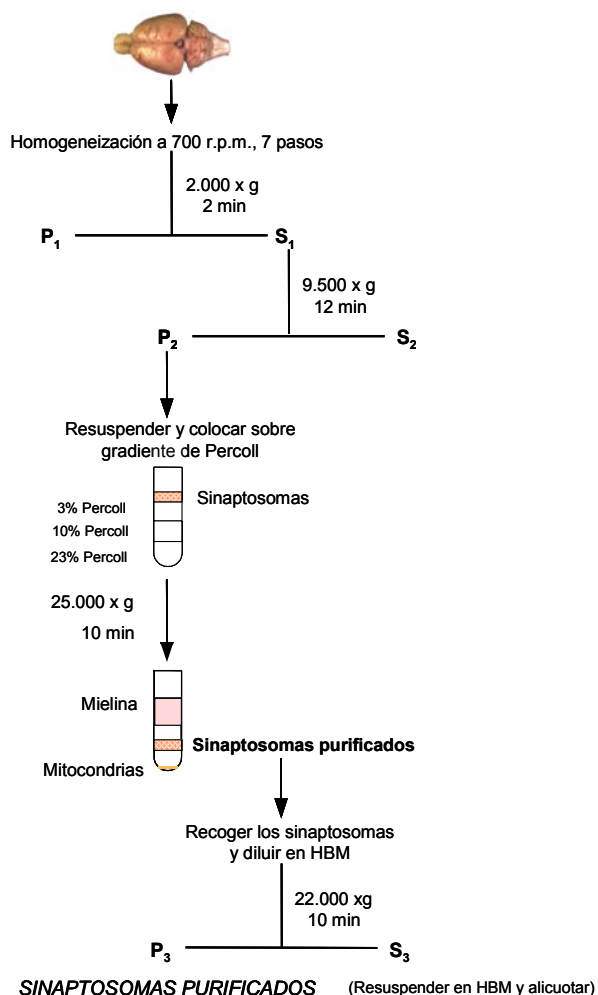


Figura 17. Representación esquemática de la preparación de sinaptosomas purificados por gradiente de Percoll.

Cada cerebro se extrajo inmediatamente tras la decapitación del animal y se lavó con el medio de sacarosa-*TES*. A continuación se diseccionó el cerebro medio y se homogeneizó con siete pasos completos de homogeneización a 700 r.p.m. El homogeneizado resultante se centrifugó a 2.000 x g durante 2 minutos, recogiendo el sobrenadante ( $S_1$ ) que se centrifugó de nuevo a 9.500 x g durante 12 minutos. El nuevo sobrenadante ( $S_2$ ) se eliminó y el sedimento ( $P_2$ ) se resuspendió en 2 mL de sacarosa-*TES*. Esta suspensión de sinaptosomas se colocó sobre un gradiente discontinuo de *percoll*.

Los gradientes se centrifugaron a 25.000 x g durante 10 minutos, recogiendo los sinaptosomas en la interfase formada por las bandas de *percoll* al 10% y al 23% (la banda de *percoll* al 3% contiene la mielina, mientras que las mitocondrias sedimentan en el fondo del tubo). Los sinaptosomas así recogidos se diluyeron hasta un volumen final de 2 mL con medio *HBM* y se centrifugaron a 20.000 x g durante 10 minutos. El sedimento resultante ( $P_3$ ) se resuspendió en 2 mL de medio *HBM*, se realizaron 4 alícuotas de 500  $\mu$ L cada una, se diluyeron con medio *HBM* hasta 10 mL y se centrifugaron a 3.000 x g durante 10 minutos. El sobrenadante se decantó y los sinaptosomas sedimentados se conservaron en un baño de hielo hasta su posterior utilización, siendo funcionales durante 5-6 horas. Tanto en el homogeneizado, como en las posteriores resuspensiones se tuvo especial cuidado de no producir burbujas ya que éstas podrían afectar negativamente a la viabilidad de los sinaptosomas.

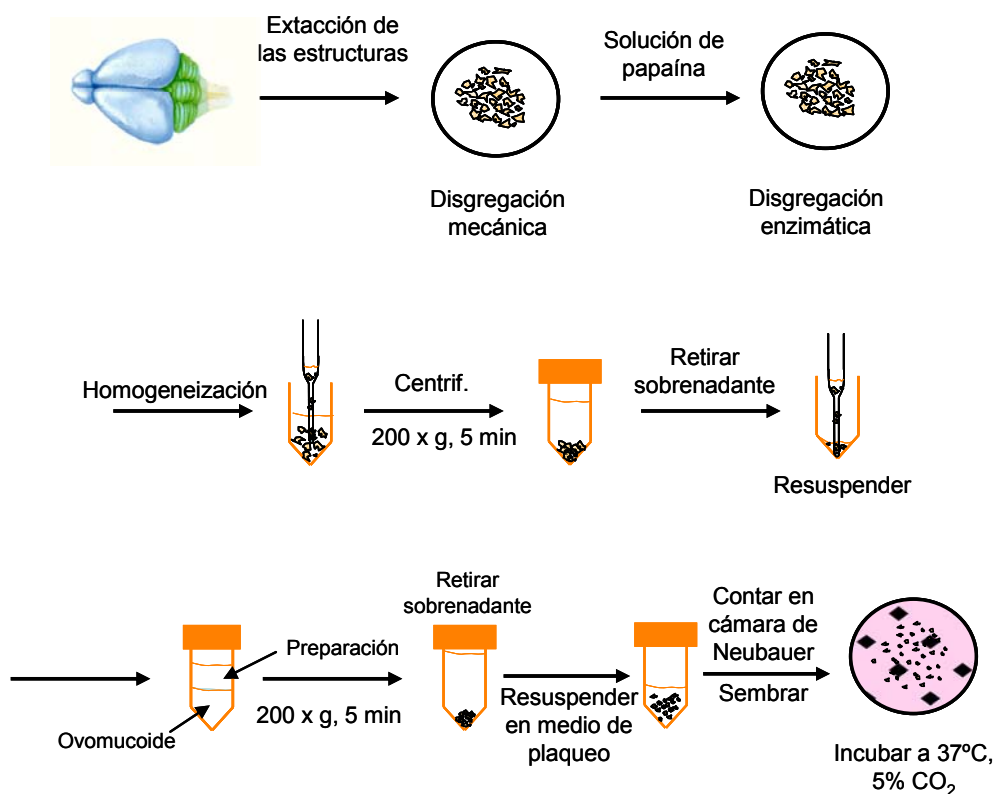
### **2. Aislamiento y cultivo de neuronas.**

Las neuronas de corteza y estriado se obtuvieron a partir de ratones C57Bl/6, Tet/HD94 y P2X7 KO de 1 día de vida, mientras que las neuronas de hipocampo se obtuvieron de ratones C57Bl/6 en estadio embrionario 18 (E18). Los cultivos se realizaron en base a método descrito por Dubinsky (1989) y por Banker y Goslin (1988) respectivamente.

Las hembras gestantes se sacrificaron por dislocación cervical y se extrajeron los embriones por cesárea. Los ratones (tanto los E18 como los P1) se sacrificaron mediante decapitación. Las cabezas se llevaron al interior de una campana de flujo laminar, donde se sumergieron en etanol 70% y se lavaron con

medio neurobasal estéril. A continuación, se diseccionaron y disociaron las diferentes estructuras de forma independiente siguiendo el protocolo del kit comercial de disociación de Papaina (PDS; Worthington Biochemical Corporation) (ver Figura 18). Con ayuda de unas pinzas de microdissección o agujas, ambas estériles, se extrajeron las diferentes estructuras y se introdujeron en una placa con medio EBSS (Earle's Balanced Salt Solution) estéril y frío. Para identificar los fenotipos de las crías de los ratones Tet/HD94, el resto del tejido cerebral se incubó en solución de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactósido), sustrato de la  $\beta$ -galactosidasa que, al ser hidrolizado, produce un compuesto (indoxil) que presenta un intenso color azul.

Figura 18. Representación esquemática de la obtención de neuronas de cerebro de ratón.



Una vez se acabó la disección de todos los animales, se retiró el medio EBSS y se procedió a la disgregación mecánica de las estructuras con ayuda de cuchillas estériles. Inmediatamente después se añadió la solución de papaina (preparada de acuerdo a las instrucciones del kit) y se mantuvieron durante 45

minutos a 37° C. Posteriormente se recogieron los fragmentos con una pipeta pasteur estéril siliconizada, se pasaron a un tubo cónico de centrifuga de 15 mL y finalizó la disgregación con 15 pases por la pipeta pasteur hasta conseguir una mezcla homogénea, que se centrifugó 5 minutos a 37° C y 200 x g. El sedimento resultante se resuspendió en la solución indicada por el protocolo (ovomucoide, albúmina y DNAsa), y se colocó sobre la solución de inhibición (ovomucoide y albúmina). Se centrifugó de nuevo la mezcla 5 minutos a 37° C 200 x g y el sedimento resultante se resuspendió en el medio de plaqueo de neuronas (medio Neurobasal suplementado con FBS, penicilina-estreptomicina, glutamina y piruvato). En este momento se determinó la viabilidad celular por exclusión del azul tripán y el recuento de células en una cámara de Neubauer (Nessler, Madrid). Para ello se mezclaron 50 µL de la suspensión celular con otra alícuota de igual volumen de azul tripán (1:1, v/v) y se llevó a la cámara de Neubauer para el recuento bajo el microscopio óptico. Se consideraron como células viables sólo aquellas capaces de excluir el colorante, contándose por tanto sólo las células no azules. Normalmente la viabilidad de las preparaciones superó el 95%.

El número de células por mL se estimó según la relación:

$$\text{N}^{\circ} \text{ células/mL} = \text{n}^{\circ} \text{ células contadas} \times 10^4 \times \text{dilución}$$

Tras el recuento, las neuronas se llevaron al volumen total necesario de medio de plaqueo para obtener la densidad celular deseada, y se sembraron. A las 3 horas se cambió el medio de las células a medio de cultivo (medio neurobasal suplementado con penicilina-estreptomicina, glutamina, piruvato y B27) para permitir la diferenciación y crecimiento neuronal.

Los cultivos celulares se mantuvieron en incubador de atmósfera controlada de CO<sub>2</sub> al 5%, saturada de humedad y temperatura constante a 37°C.

En los experimentos en los que las neuronas iban a ser tratadas farmacológicamente, dicho tratamiento se añadía en el momento del cambio de medio final, a la concentración indicada en cada caso.

### **3. Estudios de expresión génica.**

Los estudios de expresión génica se llevaron a cabo mediante cuantificación relativa de los transcritos expresados realizando análisis de RT-PCR en tiempo real. La manipulación de ARN en todo momento tuvo lugar en condiciones libres de ARNasas.

#### **3.1. Obtención de muestras.**

El material genético necesario para los ensayos de expresión del ARN mensajero específico de los genes de estudio se obtuvo a partir de muestras biológicas diferentes, según el experimento en curso.

En una primera parte se determinaron de los niveles de expresión de la TNAP y el receptor P2X7 en los experimentos de crecimiento axonal a partir de muestras de neuronas hipocampales de 3 días en cultivo.

Posteriormente se llevó a cabo el estudio de la expresión del receptor P2X7 en muestras de corteza y estriado obtenidas *post mortem* a partir de los ratones utilizados para este estudio.

**Muestras de ARN de cultivos celulares.** La extracción de ARN total a partir de neuronas de hipocampo en cultivo, se realizó según el protocolo descrito para el kit comercial "RNeasy mini Kit" (Quiagen) cuyo fundamento está basado en la capacidad que tiene el ARN de unirse de forma específica a una columna de sílica gel cuando está en presencia de una elevada concentración de sal.

Las neuronas se sembraron en placas de 60 mm a una densidad de  $3 \times 10^6$  células/placa y se mantuvieron en cultivo durante 3 días. En el momento de la extracción del ARN, se aspiró el medio de cultivo de las placas y se lavaron las neuronas una vez con PBS estéril. Se añadieron 600  $\mu$ L del tampón especificado en el protocolo (RLT Plus con  $\beta$ -mercaptoetanol) sobre las neuronas, que se levantaron de las placas de cultivo mediante el uso de raspadores celulares estériles. De esta forma se consiguió una inactivación rápida de las ARNasas evitando así la degradación del ARN en el lisado celular. Una vez se completó el proceso de homogenización, las muestras se lavaron

con etanol 70% y se procedió a la purificación del ARN siguiendo las pautas descritas por el fabricante en el protocolo de extracción.

**Muestras de ARN de tejido.** La extracción de ARN total a partir de los tejidos procedentes de los ratones se realizó mediante el sistema automatizado de extracción de ácidos nucleicos: ABI PRISM® 6100 Nucleic Acid Prepstation (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), usando el protocolo propio del sistema, específico para aislar ARN a partir de muestras de tejido. La homogenización inicial de las muestras comenzó con la disgregación mecánica con tijeras y después jeringas, ambas estériles, en presencia del tampón de lisis indicado en el protocolo, y la incubación del homogenado en presencia de proteinasa K (Sigma) durante 1-2 horas. A partir de aquí se siguieron los pasos indicados en el protocolo de extracción.

**Tratamiento con ADNasa.** Independientemente del método utilizado, una vez finalizada la extracción del ARN total, se procedió a la incubación de las mismas en presencia de ADNasa I libre de ARNasas (DNA-free™, Ambion), durante 45 minutos a 37°C, con el fin de eliminar la posible contaminación de las muestras con ADN. Finalizado el tiempo de incubación se inactiva la ADNasa remanente y se recupera la fracción de ARN altamente purificada.

### **3.2. Determinación de la concentración y grado de pureza del ARN extraído.**

La concentración de ARN en las muestras extraídas se determinó mediante un método fluorimétrico de gran sensibilidad utilizando el reactivo RiboGreen (RNA Quantitation Reagent, Molecular Probes). El RiboGreen unido al ARN en solución presenta un máximo de excitación de 500 nm y de emisión de 525 nm, pudiendo detectar concentraciones de ARN próximas a 1 ng/mL.

Las concentraciones de ARN de las muestras problema se estimaron interpolando los valores de emisión de fluorescencia obtenidos en el ensayo a partir de una recta estándar, que se construyó representando las concentraciones de ARN conocidas frente a sus correspondientes datos de emisión de fluorescencia.

El grado de pureza del material extraído se estimó a partir del cociente entre la Absorbancia de la muestra medida a 260 nm y a 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) el cual, para una disolución de ARN puro, debe tener un valor igual o muy próximo a 2.

### **3.3. Reacción de la transcriptasa inversa (RT) y Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**

La síntesis de la primera cadena de ADN (ADNc) se realizó utilizando la transcriptasa inversa M-MLV, 6  $\mu$ g de random primers y 350  $\mu$ M de dNTPs (Invitrogén) a partir de 1  $\mu$ g de ARN total extraído de la muestra correspondiente. La reacción se desarrolló durante 1 hora y 30 minutos a 37° C, seguida de una incubación a 70°C durante 15 minutos con el fin de inactivar la transcriptasa inversa.

Los fragmentos correspondientes en cada caso se amplificaron por PCR a tiempo final a partir del ADNc resultante de la reacción anterior. Para ello se tomaron 5  $\mu$ L del producto de la retrotranscripción en un volumen de reacción de 25  $\mu$ L que contenía: AmpliTaqGold polimerasa y oligonucleótidos específicos, ambos de Applied Biosystems, y agua.

En todos los casos, la reacción de amplificación se inició incubando la mezcla a 94°C durante 5 minutos para la activación de la AmpliTaq Gold DNA polimerasa, y a continuación se repitieron 40 ciclos en las condiciones de desnaturalización, anillamiento y elongación (94° C, 30 segundos; 60° C, 30 segundos; 72° C, 30 segundos). Una vez completado el número total de ciclos, se realizó un paso de extensión final manteniendo la mezcla durante 7 minutos a 72°C para facilitar la completa elongación de todos los fragmentos amplificados durante la reacción de PCR.

Las reacciones de retrotranscripción y amplificación por PCR a tiempo final se llevaron a cabo en el termociclador GeneAmp 2400 de Applied Biosystems. La separación e identificación de los productos resultantes de la amplificación se realizó en geles de agarosa al 1,5-2%, teñidos con SYBR Save (Molecular Probes). Como marcador de tamaños moleculares conocidos se utilizó el patrón de ADN comercial PCR 100 bp Low ladder (Sigma). Los

fragmentos de ADN amplificados se visualizaron mediante el sistema de captación de imágenes Gel Logic 200 Imagin System (Kodak) con luz ultravioleta.

#### **3.4. Amplificación por PCR a tiempo real (PCR cuantitativa en tiempo real).**

Este método permite detectar la amplificación de un producto de PCR durante el desarrollo de la reacción. El uso de esta técnica para cuantificar el material genético de una muestra está basado en la relación directa que existe entre la cantidad de ADN molde inicial y el producto que se amplifica a partir del mismo. De esta forma a mayor cantidad de ADN molde más temprana será la aparición del producto amplificado.

El seguimiento del proceso de amplificación se realiza mediante el uso de sistemas de marcado fluorescente que permiten detectar los productos que se van sintetizando durante el transcurso de la reacción. Así, la cantidad de fluorescencia emitida por el producto en cuestión incrementa en cada ciclo de amplificación. La reacción se lleva a cabo en termocicladores diseñados con un sistema capaz de monitorizar y cuantificar la señal de fluorescencia emitida.

Existen diversos sistemas de marcaje fluorescente que permiten la detección y cuantificación en las reacciones de PCR a tiempo real. Uno de los más utilizados es el sistema con sondas de hibridación TaqMan<sup>®</sup>. Este sistema se basa en la utilización de un tercer oligonucleótido (sonda) que hibrida de forma específica con el amplicón deseado en una región interna del mismo, el cual queda localizado entre los cebadores sentido y antisentido. La sonda está marcada en el extremo 5' con un fluoróforo (*reporter*) que requiere una luz de excitación de alta energía y en el extremo 3' con otro fluoróforo diferente (*quencher*), que requiere una luz de excitación de baja energía y que absorbe la emisión de fluorescencia del extremo 5'. Por tanto, cuando la sonda está intacta no emite señal fluorescente.

Al inicio de la reacción de PCR, los dos oligonucleótidos y la sonda hibridan en la región diana de ADN molde y la Taq DNA polimerasa comienza el proceso de amplificación. Durante el proceso de extensión de la cadena que se

está sintetizando, la ADN polimerasa termoestable, por su actividad 5'-3' exonucleasa, hidroliza la sonda en su extremo 5'. De esta forma el fluoróforo "reporter" se libera, la fluorescencia que emite no es extinguida por el "quencher" y su emisión puede ser detectada por el sistema. Los fragmentos de sonda son entonces desplazados del molde y la polimerización de la nueva cadena continúa (Figura 19). La extensión de la sonda durante el proceso de síntesis se evita al estar su extremo 3' bloqueado. El proceso de hibridación e hidrólisis de la sonda ocurre en cada ciclo y no interfiere en la acumulación exponencial del producto.

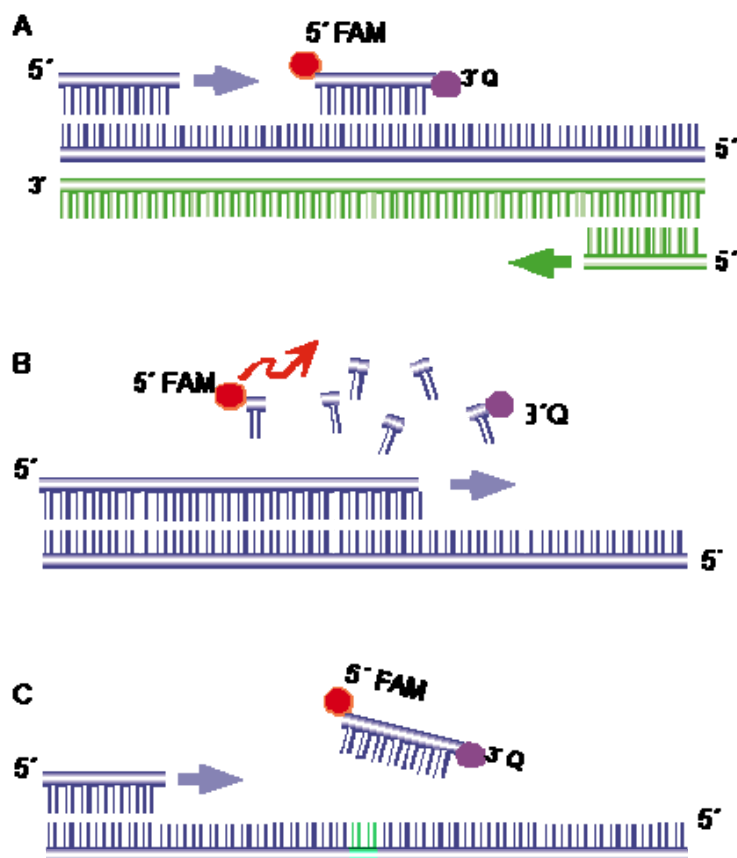
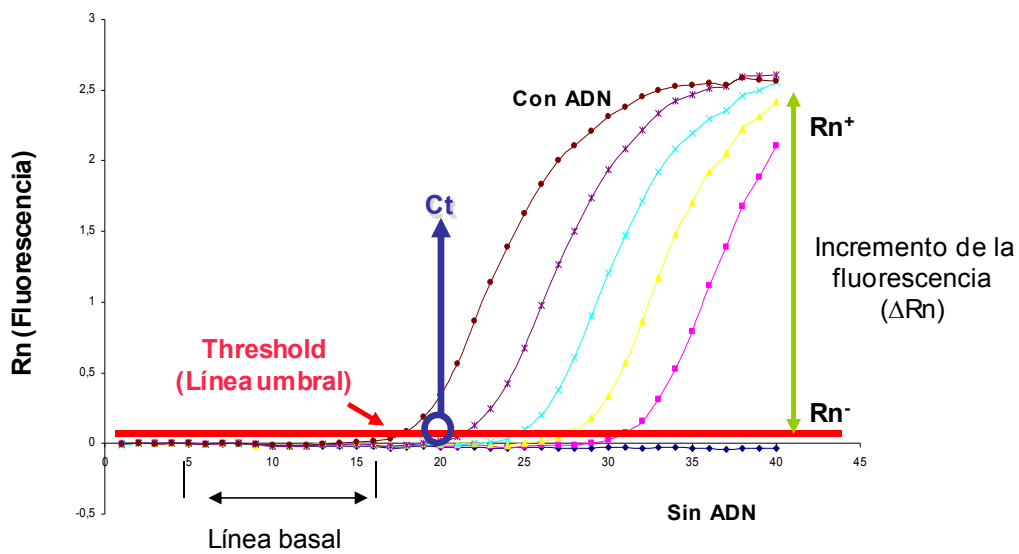


Figura 19.- Esquema de los sucesos que tienen lugar durante el desarrollo de una reacción de PCR cuantitativa en tiempo real.

La acumulación de los productos amplificados durante la PCR se detecta monitorizando el aumento de fluorescencia que se produce como consecuencia de la liberación del fluoróforo situado en el extremo 5' de la sonda. A medida que

los ciclos de la reacción avanzan, aumenta el número de copias de producto generado, por lo que la intensidad de la fluorescencia emitida aumentará también de forma proporcional a la cantidad de amplicón sintetizado. El termociclador detecta el incremento de fluorescencia ( $\Delta R$ ) y lo representa frente al número de ciclos de la PCR (Figura 20). Durante los primeros ciclos de amplificación no hay incremento de fluorescencia ya que es necesario que se acumule una cantidad mínima de producto amplificado para que la fluorescencia detectada por el sistema sea significativamente distinta del valor de fluorescencia basal. El ciclo de PCR en el que se acumula suficiente producto amplificado y el valor de fluorescencia se eleva por encima de la fluorescencia basal, se define como ciclo umbral o Ct (Cycle threshold). El valor del Ct es proporcional al logaritmo de la cantidad inicial de ADN molde.



### Ciclo de amplificación

**Figura 20. Modelo de las curvas obtenidas en una reacción de PCR cuantitativa en tiempo real.** La línea roja indica la línea basal o threshold. En azul se muestra el punto considerado como el valor de  $C_t$ . Este valor coincide con el número de ciclos de amplificación en la reacción de PCR necesarios para iniciarse el incremento exponencial de fluorescencia ( $R_n$ ).

Los ensayos de cuantificación de la expresión génica se llevaron a cabo mediante la amplificación por PCR en tiempo real de las muestras de ADNc obtenidas por retrotranscripción a partir de los mensajeros correspondientes. Los

ADN complementarios se obtuvieron mediante el ensayo de transcriptasa inversa descrito en el apartado anterior.

Las reacciones de RT-PCR cuantitativa se realizaron usando el sistema StepOne Plus Real Time PCR de Applied Biosystems utilizando el kit de amplificación TaqMan® Universal PCR Maxter Mix No AmpErase UNG del mismo fabricante. Se utilizaron sondas fluorescentes TaqMan marcadas con el fluoróforo FAM en el extremo 5' y en el 3' con NFQ-MGB. Los oligonucleótidos y sondas específicos para cada transcrito fueron diseñados, sintetizados y comercializados por Applied Biosystems.

El ensayo de amplificación se llevó a cabo en placas multipocillo en un volumen final de 25 µL, conteniendo 1,25 µL de la mezcla de cebadores y sonda correspondiente, 2,5 µL de ARNt ([30 ng/mL]f), 3,75 µL de agua ultrapura estéril, 12,5 µL de la mezcla TaqMan® Universal PCR Master Mix (incluye los dNTPS, tampón de reacción y AmpliTaqGold® polimerasa) y 5 µL del ADNc obtenido tras las RT.

La reacción se desarrolló en un programa de 2 pasos:

- Incubación inicial a 95°C durante 20 segundos para la activación de la TaqGold® polimerasa.
- 40 ciclos de: desnaturalización durante 1 segundo a 95°C e hibridación durante 20 segundos a 60 °C.

La cuantificación de los genes se realizó mediante el Método Comparativo de los Cts ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) (Livak y Schmittgen, 2001) y la realización de una curva patrón. Para hacer la recta patrón hicimos una PCR a tiempo final con las sondas que utilizamos en la cuantitativa y supusimos que ésta posee alrededor de  $10^4$  copias del fragmento de estudio. Como control interno de la cantidad total de ADNc añadida se utilizó el gen de expresión constitutiva  $\beta$ -actina.

#### **4. Transfección transitoria en células de mamífero.**

##### **4.1. Plásmidos.**

**Sobreexpresión del receptor P2X7.** El ADNc que codifica para el receptor P2X7 humano se adquirió y secuenció en Geneservice (servicio de genómica) (número del clon de ADNc MGC: 20089, IMAGE: 4298811; Cambridge, UK). El ADNc del receptor P2X7 se aisló del plásmido original (pOTB7) por digestión con *KpnI* y *Apal*, y subclonó la construcción P2X7-GFP en los sitios correspondientes del vector pd2EGFP-N1 (Clontech) (Figura 21 A) para la expresión en células de mamífero. Además, el P2X7 se insertó en el vector pIRES.eGFP (BD Bioscience) (Figura 21 B) para así obtener la expresión de ambas proteínas sin fusionar. Del mismo modo que en los silenciamientos, la expresión de la GFP permitió la identificación y el seguimiento de las neuronas transfectadas. El producto de la ligación se confirmó mediante secuenciación con los siguientes primers:

5' PCR primer: CTAGGGTACCATGCCGGCCTGCTGCAGCTG.

3' PCR primer: CTAGGGGCCCGGTAAGGACTCTTGAAGCCAC.

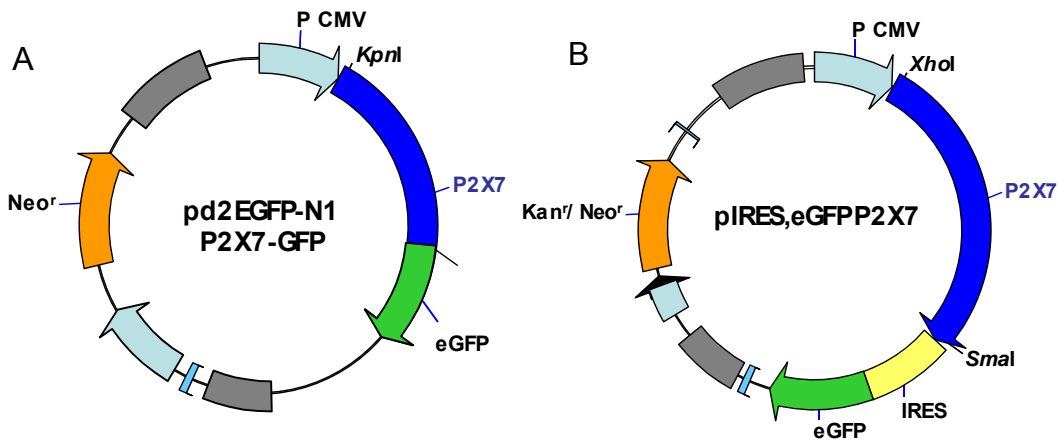


Figura 21. Mapa de los plásmidos pd2EGFP-N1 y pIRES,eGFP.

**Sobreexpresión del N-terminal de la huntingtina.** En este caso se emplearon plásmidos que codificaban el extremo N-terminal de la huntingtina, con diferente número de repeticiones de CAG (17Q ó 72Q), fusionado a GFP en el vector de expresión pGW1-Httex1. Estos plásmidos fueron cedidos amablemente por los Doctores Finkbeiner y Arrasate (Gladstone Institute, San Francisco, CA, USA) (Arrasate y cols., 2004).

**Generación del “small hairpin RNA” (shRNA) para el receptor P2X7.**

El silenciamiento del receptor P2X7 se realizó mediante la expresión de los correspondientes shRNA (“small hairpin RNA”). Para ello se utilizó el vector de expresión pSuper-neo/gfp (Oligoengine, Seattle, WA, EEUU), que, al expresar en paralelo el shRNA y la proteína verde fluorescente (GFP), permitió la identificación y el seguimiento de las neuronas transfectadas.

Para el diseño de los shRNA se siguieron los criterios de diseño racional descritos por (Reynolds y cols., 2004)(Figura 22). La especificidad de las secuencias seleccionadas se confirmó mediante BLAST frente al receptor P2X7 de ratón, rata y humano.

<b>Criterios de selección de ARNi (Reynolds y cols., 2004).</b>	
1.	Contenido en GC 30%-52%.
2.	Al menos 3 A/ U en posición 15-19 (sentido).
3.	Ausencia de repeticiones internas.
4.	A en posición 19 (sentido).
5.	A en posición 3 (sentido).
6.	U en posición 10 (sentido).
7.	Ninguna G/ C en posición 19 (sentido).
8.	Ninguna G en posición 13 (sentido).

Oligonucleótido seleccionado como siARN contra el receptor P2X7:

5'-GTTTTGACATCCTGGTTTT-3'

**Figura 22. Criterios de selección de ARNi de (Reynolds y cols., 2004) y oligonucleótido seleccionado.**

A partir de las secuencias seleccionadas, se diseñaron unos oligonucleótidos de 64 bp (Isogen, Barcelona, España), de forma que, al ser expresados en la célula a partir del vector, se genera una estructura en horquilla (shRNA) con las secuencias sentido y antisentido de la región seleccionada (Figura 23). Esta estructura es reconocida por la enzima Dicer, que rompe la horquilla y produce los ARN de interferencia (ARNi) funcionales, que se unen a la secuencia correspondiente del ARN mensajero y conduce a su degradación por el complejo RISC (Figura 23). Si la especificidad de la secuencia de ARNi no

es completa -presenta alguna base desapareada-, el mecanismo de acción consiste en prevenir la traducción debido a la presencia de fragmentos del mensajero que tienen doble cadena, lo cual paraliza la acción de los ribosomas y la síntesis de la proteína a partir de dicho mensajero, sin degradar el ARNm.

Como control de las células transfectadas, se utilizó una secuencia contra el ADNc de la luciferasa de luciérnaga (5'-ctg acg cgg aat act tcg a-3'), no presente en el genoma de células de mamífero (Ohtsuka y cols., 2004).

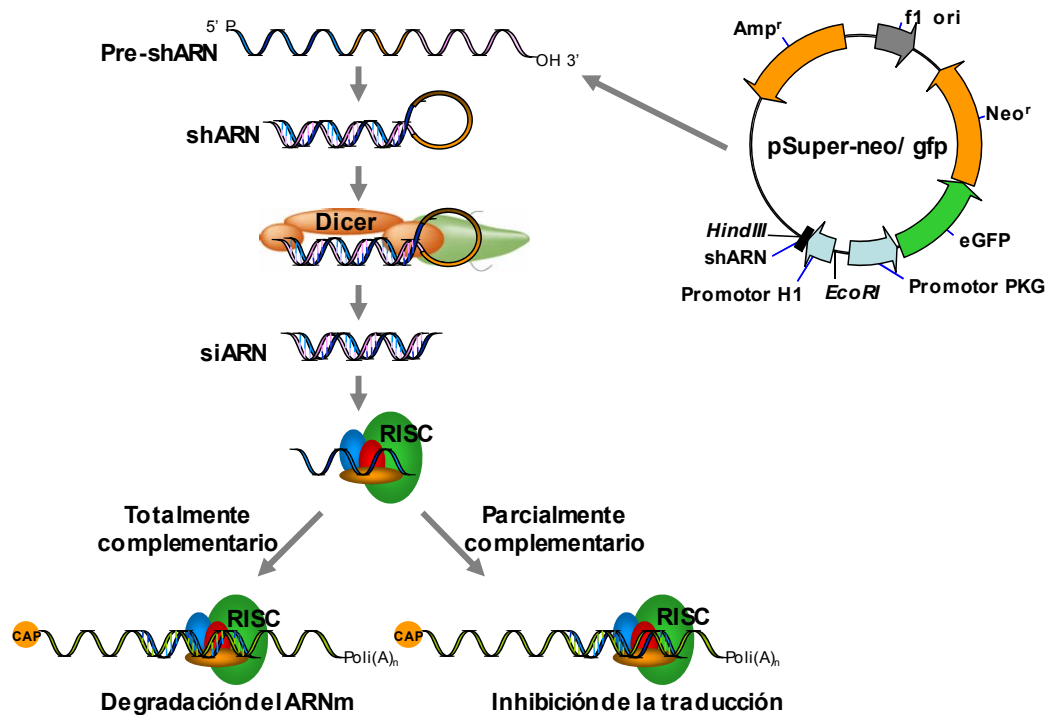


Figura 23. Mapa del plásmido pSuper-neo/GFP y mecanismo de acción de los ARN de interferencia.

**Silenciamiento de la fosfatasa alcalina no específica de tejido (TNAP).** El silenciamiento de la TNAP se realizó mediante la expresión de los correspondientes shRNA (“small hairpin RNA”) comerciales insertados en el vector de expresión pGeneClip™ hMGFP (SABiosciences) (Figura 24). Al igual que en el apartado anterior, la expresión en paralelo del shRNA y la proteína verde fluorescente (GFP) permitió la identificación y el seguimiento de las neuronas transfectadas.

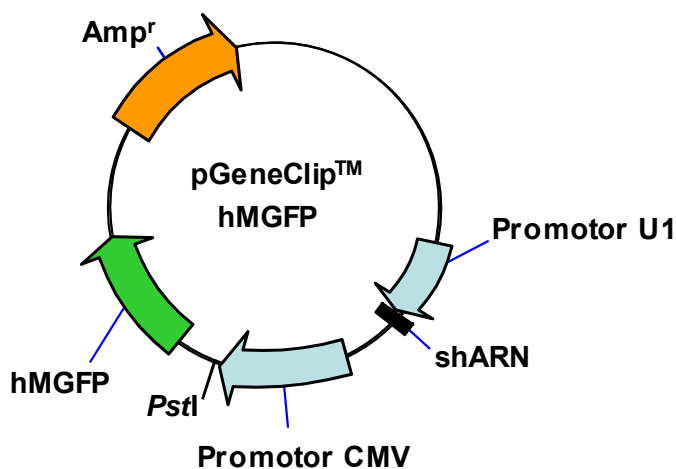


Figura 24. Mapa del vector pGeneClip™ hMGFP.

#### 4.2. Transfecciones transitorias en células de mamífero.

Las transfecciones neuronales se realizaron con el reactivo catiónico Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Madrid), siguiendo las instrucciones del fabricante, 24 horas tras ser plaqueadas. Después de 3 horas de tratamiento con la lipofectamina y los plásmidos, se retiró el medio y se añadió medio nuevo, con el que se mantuvieron las neuronas los días indicados en cada caso.

#### 5. Técnicas de microfluorimetría: Determinación del $\text{Ca}^{2+}$ intracelular/intrasinaptosomal.

La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico libre, tanto en sinaptosomas aislados de estriado como en neuronas de corteza en cultivo, se determinó utilizando un método microfluorimétrico empleando el indicador fluorescente Fura-2, según la técnica descrita por Grynkiewicz y col. (1985). La sonda fluorescente Fura-2 es un compuesto polianiónico hidrofílico que une  $\text{Ca}^{2+}$  de forma específica. En los ensayos se utilizó la forma acetoximetil éster, Fura-2 AM, capaz de atravesar la membrana plasmática de las células o de las terminales sinápticas en su caso, debido a su naturaleza hidrofóbica. Una vez en el citosol, las esterasas inespecíficas rompen el enlace éster de modo que el Fura-2 liberado queda confinado en el citosol donde une el calcio libre para formar el complejo Fura- $\text{Ca}^{2+}$ . La formación de este complejo da lugar a una emisión fluorescente cuyo

máximo se registra a una longitud de onda de 510 nm, produciéndose al mismo tiempo un desplazamiento hacia el ultravioleta del máximo del espectro de excitación, de 380 a 340 nm (Figura 25).

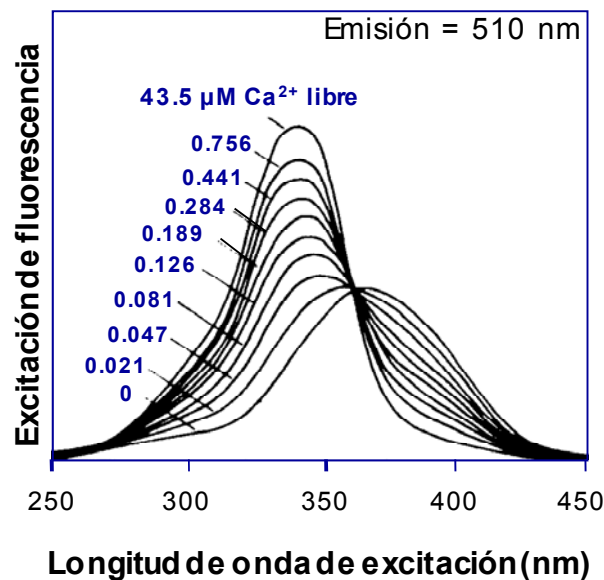


Figura 25. Espectros de excitación de la sonda fluorescente para el Ca<sup>2+</sup>, Fura-2, en presencia de diferentes concentraciones de Ca<sup>2+</sup>.

Las células sembradas sobre cubreobjetos redondos de vidrio (200.000 células/cubreobjeto) se incubaron con Fura-2 AM 5 µM en medio HBM con magnesio y con calcio (1,33 mM), en oscuridad durante 30 minutos a 37°C, para permitir la hidrólisis de la sonda. Transcurrido este tiempo, los cubres con las células se sacaron de la solución de Fura-2 AM, deteniéndose así la carga con el mismo, y se introdujeron en otra conteniendo HBM sin magnesio. En el momento de realizar los ensayos los cubreobjetos se pegaron con grasa de vacío (hidrófoba) a la parte inferior de una cámara de perfusión (34 µL) de metacrilato.

Por su parte, los sedimentos de sinaptosomas obtenidos se resuspendieron en 1 mL de medio HBM con calcio (CaCl<sub>2</sub> 1,33 mM) atemperado a 37°C y se incubaron en agitación a esta misma temperatura durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo se añadió Fura-2 AM 5 µM y los sinaptosomas se incubaron con esta sonda durante 30 minutos en el baño a 37°C.

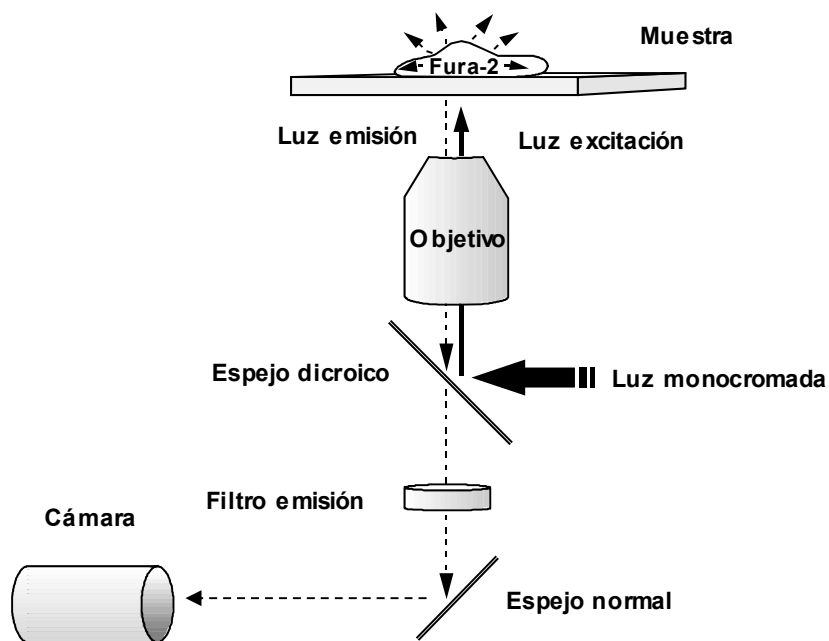
Posteriormente, se aplicaron 60  $\mu$ L de esta suspensión de sinaptosomas sobre cubreobjetos redondos de vidrio de 15 mm de diámetro y 0.15 mm de espesor (previamente tratados con poli-L-lisina durante 1 hora a 37°C), permaneciendo así durante 1 hora para permitir la adhesión de los sinaptosomas al vidrio. Una vez adheridos a los cubreobjetos, éstos se montaron sobre la cámara de perfusión.

La cámara, con las neuronas o los sinaptosomas dependiendo del ensayo, se situó sobre la platina de un microscopio de epifluorescencia (Nikon) y se conectaron a la cámara los tubos de silicona de entrada y salida para las soluciones de perfusión. Las soluciones de entrada se encontraban en un baño termostaticado a 37°C y éste, a su vez, a una altura suficiente para que el flujo se mantuviese constante a 1,2 mL/min por simple diferencia de presión hidrostática. Tras atravesar la cámara, el medio de perfusión (HBM sin magnesio) se aspiraba de forma continua mediante la aspiración a través de una bomba de vacío. Este sistema de perfusión continua evita que se acumule cualquier metabolito que pueda salir de las células durante la perfusión, o bien, cualquier producto de degradación de los fármacos aplicados. Todos los agonistas y/o antagonistas e inhibidores utilizados se disolvieron en medio HBM sin magnesio, seguidos de lavados con medio de perfusión. Al final de todos los experimentos se aplicó KCl 60 mM con el fin de comprobar la naturaleza y viabilidad neuronal. Aquellas células que no se despolarizaban en presencia de KCl no se tuvieron en consideración en los análisis posteriores.

Una vez montada la cámara sobre el microscopio, las células se iluminaron alternativamente con luz de 340 y 380 nm, procedente de un monocromador (Optoscan) de ancho de banda 10 nm. La selección de las longitudes de onda corresponde a los máximos de los registros de fluorescencia de soluciones de Fura-2 saturadas de calcio (340 nm) y Fura-2 libre de calcio (380 nm). Del mismo modo, se comprobó que el punto isobéptico del Fura-2 (360 nm) coincidía con el descrito por Castro y col. (1994).

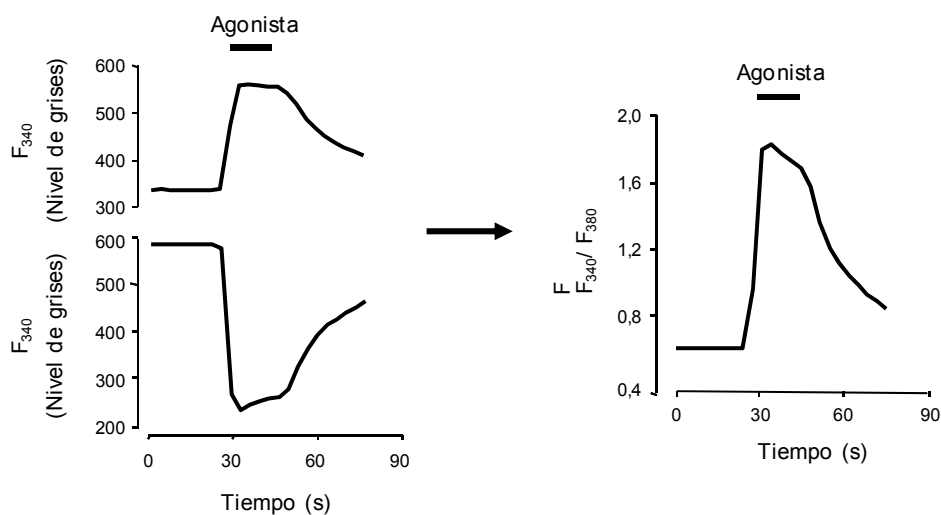
El haz de luz monocromada se condujo desde una rueda de filtros hacia el microscopio con una guía líquida. La luz es reflejada hacia el objetivo

mediante un espejo dicroico que transmite las longitudes de onda superiores a 430 nm y refleja las longitudes de onda inferiores. De este modo, sólo alcanzan la muestra la luz de 340 y 380 nm, mientras que la luz fluorescente emitida por el Fura-2, de 510 nm, atraviesa el espejo dicroico y es conducida hacia la cámara ORCA-ER C 47 42-80 de Hamamatsu, después de pasar por un filtro interferencial de paso de banda centrado a 510 nm. El tiempo de exposición de cada longitud de onda era de 250 ms, y el tiempo que tardaban en cambiar era inferior a 5 ms. Para hacer las medidas de fluorescencia se usó un objetivo NIKON 40x de inmersión en aceite (0.5-1.3 Oil Iris). Todo el equipo estuvo controlado por un ordenador con un software MetaFluor 6.3r6 PC (Universal Imaging Corp.) (Figura 26).



**Figura 26. Esquema representativo del sistema de microfluorimetría.** La luz de excitación proviene de una rueda de filtros que emite exclusivamente a la longitud de onda deseada (340 o 380 nm). El haz de luz monocromada llega al microscopio a través de una guía líquida, se refleja en un espejo dicroico centrado en 430 nm y alcanza la preparación a través del objetivo del microscopio. La luz fluorescente emitida por el Fura-2 intrasinaptosomal o intracelular es capturada por el objetivo, atraviesa el espejo dicroico ( $> 430$  nm) y se dirige hasta el filtro de emisión centrado en 510 nm. Por último, el haz de luz llega a la cámara CCD.

Los registros de fluorescencia se muestran en este trabajo como la relación existente entre la fluorescencia a 340 y 380 nm ( $F_{340}/F_{380}$ ) en función del tiempo de las distintas regiones de las neuronas (Figura 27).



**Figura 27. Cálculo de la relación de fluorescencias a cada tiempo medidas a 340 y 380 nm.** Los registros temporales de fluorescencia obtenidos para cada longitud de onda de excitación (340 y 380 nm) se dividen entre sí para obtener la ratio de fluorescencia  $F_{340}/F_{380}$ .

## 6. Inmunotransferencia.

Los ensayos de inmunotransferencia o Western Blot se llevaron a cabo a partir de proteínas extraídas de tejido total, de cultivos de neuronas (Apdo. 2.1 de *Materiales y Métodos*) y de preparaciones de sinaptosomas (Apartado 2.2 de *Materiales y Métodos*).

### 6.1. Extracción de proteínas totales.

**Extracción de proteínas de tejido cerebral total.** Los ratones de las diferentes edades se sacrificaron mediante dislocación cervical y posterior decapitación. Se diseccionó la región del cerebro deseada en cada momento, se congeló rápidamente en nieve carbónica y se guardó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la extracción de proteínas. Entonces se adicionó tampón de lisis y se disgregó el tejido con un mini póter y varios pases a través de una aguja estéril

(diámetro 20G). Transcurrido este tiempo se centrifugó a 16.000 x g en microfuga a 4° C durante 10 min. El sobrenadante de esta centrifugación, en el que han quedado solubilizadas las proteínas totales, se recuperó en un tubo eppendorf, y una alícuota de este sobrenadante se reservó para medir la concentración de proteínas siguiendo el método Bradford.

**Extracción de proteínas de preparaciones de sinaptosomas.**

Preparaciones de sinaptosomas de cerebro medio obtenidos por purificación en gradiente de Percoll fueron tratadas con tampón de lisis tal y como se indica en el apartado anterior, a excepción de la disgregación del tejido, ya que en este caso no fue necesario el uso de un mini póter para disgregar los sinaptosomas.

**Extracción de proteínas de cultivos de neuronas de hipocampo.** Las neuronas que se utilizaron en estos experimentos se sembraron tras su aislamiento en placas de 60 mm de diámetro (aproximadamente  $3 \times 10^6$  células por placa), y se mantuvieron 3 días en cultivo. Las células se lisaron utilizando un raspador celular estéril en tampón de lisis RIPA (Sigma) con inhibidor de proteasas (250  $\mu$ L de tampón de lisis por placa de células) y se mantuvieron durante 30 minutos en hielo, agitando con vórtex cada 10 minutos. Posteriormente se centrifugaron las muestras durante 10 minutos a 4° C y 16.000 x g y los sobrenadantes se recuperaron como en los casos anteriores.

**6.2. Cuantificación de las proteínas totales.**

La determinación de la concentración de proteínas presente en los extractos procedentes de los diferentes lisados se realizó mediante el método de Bradford (1976). El ensayo está basado en el cambio que se produce en el espectro de absorción a 595 nm del colorante Azul de Comassie, que al unirse específicamente a las proteínas, aumentan su absorción a esta longitud de onda.

La concentración de proteínas en las muestras problema se calculó interpolando los valores de absorbancia medidos en cada una de ellas a 595 nm, en una recta patrón. Esta recta patrón se obtuvo a partir de los valores de absorbancia medida a 595 nm en distintas diluciones de albúmina de suero bovino (BSA) de concentración conocida. De este modo, conociendo la

concentración de proteínas en cada uno de los extractos se pudo cargar en cada uno de los pocillos del gel de electroforesis la misma cantidad de proteína.

**Tabla 7. Anticuerpos y diluciones empleadas en inmunotransferencia.**

Anticuerpo Primario	Diluciones empleadas del Anticuerpo Primario	Diluciones empleadas del Anticuerpo Secundario
Anti-sinaptofisina	1/10000	Anti-IgG de ratón-HRP (cabra), 1/10000
Anti-P2X <sub>7</sub> (Alomone Intracelular)	1/1000	Anti-IgG de conejo-HRP (cabra), 1/1000
Anti-P2X <sub>7</sub> (Chemicon)	1/1000	Anti-IgG de conejo-HRP (cabra), 1/1000
Anti-TNAP	1/200	Anti-IgG de conejo-HRP (cabra), 1/500
Anti- $\alpha$ -tubulina	1/10000	Anti-IgG de ratón-HRP (cabra), 1/10000

### 6.3. Electroforesis, transferencia de proteínas y revelado de las membranas.

Un volumen del extracto de proteínas conteniendo entre 20-30  $\mu$ g de proteína se mezcló con un volumen del tampón de carga 5 veces concentrado. En estas condiciones las muestras se calentaron a 100°C durante 5 minutos en un calentador multibloque y se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida del porcentaje (p/v) requerido en cada caso, en presencia de SDS. Uno de los pocillos del gel se reservó para una mezcla de patrones preteñidos de peso molecular conocido. La electroforesis se desarrolló en el sistema mini-Protean 3 (BioRad), a un voltaje constante de 120 voltios, en tampón de electroforesis.

Tras la separación electroforética, las proteínas problema se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Whatman), previamente equilibradas durante 5 minutos en tampón de transferencia, en un sistema mini-Trans Blot de BioRad, a una intensidad de 140 mA durante 70 minutos.

Finalizada la transferencia, las membranas se tñieron durante 10 minutos con el colorante rojo ponceau para comprobar la correcta separación y transferencia de las proteínas, y se destñieron mediante lavados con tampón PBS conteniendo 0,1% (v/v) de Tween-20 (PBS-Tween o solución de lavado). Posteriormente se bloquearon con leche en polvo desnatada preparada al 5% en PBS-Tween, durante una hora a temperatura ambiente, empleando un agitador orbital. A continuación, la membrana se incubó con el anticuerpo primario preparado en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos utilizados se indican en la Tabla 7. El exceso de anticuerpo se lavó con el tampón PBS-Tween y se realizó la incubación con el anticuerpo secundario ligado a peroxidasa (anti-IgG HRP de ratón o conejo, en función del anticuerpo primario utilizado). Esta incubación se llevó a cabo durante una hora a temperatura ambiente. El exceso de anticuerpo secundario se lavó con el tampón de lavado y la membrana se reveló incubando 2 minutos utilizando el sistema western lightning chemiluminescence reagent, de PerkinElmer. Este sistema contiene luminol, que es el sustrato específico para la peroxidasa, y que al oxidarse genera una señal luminiscente que es detectada mediante la exposición autorradiográfica a diferentes tiempos. Para ello se emplearon películas de radiografía Agfa, y se utilizó una máquina de revelado CP 1000 Agfa.

La densidad de marcaje inmunorreactivo se analizó en el sistema Gel Logic 200 Imaging System (Kodak) mediante un programa específico denominado Kodak Molecular Imaging 4.0.

## **7. Inmunohistoquímica**

### **7.1. Obtención de secciones de cerebro**

Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y posterior decapitación. Los cerebros se dividieron en los dos hemisferios, mediante la

realización de un corte longitudinal y se fijaron por inmersión en PFA al 4% en PBS durante 24 horas a 4° C. Después se lavaron con PBS a 4° C y se sometieron al proceso de crioprotección, que consistió en la inmersión del tejido en una solución de sacarosa al 33% durante 48 horas a 4° C, lo que evita la formación de cristales de hielo que pudieran dañar el tejido. Finalmente se realizaron los bloques de los medios cerebros en OCT (Optimal Cutting Temperature medium, Tissue-Tek; Sakura) por congelación rápida y se guardaron a -80°C hasta el momento de ser cortados.

Antes de realizar las secciones histológicas correspondientes, los bloques se dejaron aproximadamente 1 hora en el criostato para que alcanzasen la temperatura de corte. Se realizaron secciones longitudinales de 30 µm de grosor de los cerebros en un criostato Leica y se recogieron sobre una solución de glicol y se guardaron a -20°C hasta el momento de su utilización.

### **7.2. Tinción inmunohistoquímica de secciones de cerebro.**

Las secciones mantenidas en solución glicol se lavaron con PBS y se incubaron con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 45 minutos para inhibir la peroxidasa endógena. Tras lavar de nuevo las preparaciones con PBS, las secciones se mantuvieron con la solución de bloqueo (BSA 1%, FBS 5%, TritónX-100 0,1% (v/v)), durante 45 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, los tejidos se incubaron con los anticuerpos primarios (ver Tabla 8) toda la noche a 4°C, en cámara húmeda. Al día siguiente, se lavaron las muestras con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado (Vecstatin ABC peroxidase kit, Atom) en PBS-BSA 1% (), 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. Se lavaron nuevamente con PBS y se incubaron con el complejo streptavidina-peroxidasa (siguiendo las instrucciones de los reactivos), durante 1 hora a temperatura ambiente y en cámara húmeda. A continuación, después de lavar de nuevo con PBS, se procedió al revelado con diaminobencidina (Sigma), durante 10 minutos. La reacción se frenó lavando las preparaciones varios minutos con agua destilada. Finalmente, las preparaciones se montaron y almacenaron hasta su estudio al microscopio.

Tabla 8. Anticuerpos y diluciones empleadas en inmunohistoquímica (IHQ) y en inmunofluorescencia (IF).

Anticuerpo Primario	Diluciones empleadas del Anticuerpo Primario	Diluciones empleadas del Anticuerpo Secundario
Anti-sinaptofisina	IF: 1/200	IF: anti-IgG de ratón-Cy3 (burro), 1/400 Alexa 488 anti-IgG de ratón (cabra) 1/400
Anti-P2X <sub>7</sub> (Alomone Intracelular)	IF: 1/200	IF: anti-IgG de ratón-Cy3 (burro), 1/400 Alexa 488 anti-IgG de conejo (cabra) 1/400
Anti-P2X <sub>7</sub> (Chemicon)	IF: 1/200	IF: anti-IgG de ratón-Cy3 (burro), 1/400 Alexa 488 anti-IgG de conejo (cabra) 1/400
Anti-TNAP	IF: 1/50	IF: Alexa 488 anti-IgG de conejo (cabra) 1/400
Anti-Iba-1	IHQ: 1/100 IF: 1/500	IHQ: anti-inmunoglobulinas de conejo biotiniladas (cabra). IF: anti-IgG de conejo-Cy3 (burro), 1/400
Anti-Cleaved Caspase-3	IHQ: 1/100 IF: 1/50	IHQ: anti-inmunoglobulinas de conejo biotiniladas (cabra) IF: anti-IgG de conejo-Cy3 (burro), 1/400
Anti-GFAP	IHQ: 1/200	IHQ: anti-inmunoglobulinas de ratón biotiniladas (cabra)
Anti-Darpp32	IF: 1/500	IF: anti-IgG de conejo-Cy3 (burro), 1/400
Anti-NeuN	IF: 1/100	IF: anti-IgG de ratón-Cy3 (burro), 1/400 Alexa 488 anti-IgG de ratón (cabra) 1/400
Anti-β-III tubulina	IF: 1/200	IF: Alexa 488 anti-IgG de ratón (cabra) 1/400

## 8. Inmunofluorescencia

Secciones de cerebro (apartado 2.6.1) o células o sinaptosomas fijados en cubreobjetos (10 minutos en paraformaldehído al 2% en PBS seguidos de

otros 10 minutos en el mismo compuesto al 4%, pH 7,4) se lavaron dos veces con PBS y se trataron con la solución de bloqueo (BSA 1%, FBS 5%, TritónX-100 0,1% (v/v)), durante 45 minutos a temperatura ambiente. Al igual que en la inmunohistoquímica, las muestras se incubaron con los anticuerpos primarios (ver Tabla) a 4° C en cámara húmeda durante toda la noche. Al día siguiente se lavaron con PBS-BSA 3% y se reveló el marcaje incubando las preparaciones con los anticuerpos secundarios acoplados a fluorocromos (Alexa 488 ó 594) (ver Tabla 8) durante 1 hora a 37°C. Transcurrido este tiempo, se lavaron con PBS. En los casos en los que las células se tiñeron con DAPI, este compuesto se aplicó junto con la mezcla de anticuerpos secundarios. Por último, los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos con un medio de montaje FluorSave Reagent (Calbiochem) que reduce el apagamiento de los fluorocromos. Las preparaciones se almacenaron en oscuridad a 4°C. Las imágenes de inmunofluorescencia se tomaron con un microscopio NIKON TE-200 acoplado a una lámpara de Xenon de 75 W de Nikon y a una cámara Kappa modelo DX2. Todo el equipo estuvo controlado por ordenador con un software Kappa Image Base Control.

Los análisis de longitud axonal y ramificaciones se llevaron a cabo empleando el complemento Neuron J del programa informático Image J.

Las imágenes se procesaron y presentaron con los programas Adobe PhotoShop e Illustrator CS3.

### **9. Citoquímica enzimática.**

La actividad de la fosfatasa alcalina se detectó como ya describieron previamente Langer et al (2008), empleando el protocolo para el sustrato comercial BCIP/NBT (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/Nitro blue tetrazolium; 0,35 mM BCIP, 0,37 mM NBT, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM Tris buffer, pH 9.5) de Sigma. Estos compuestos se emplean para la detección colorimétrica de la fosfatasa alcalina. El NBT actúa como oxidante (y marcador de color), mientras que el BCIP es el sustrato de la enzima. El BCIP, sustrato de la enzima, se une fuertemente en el sitio activo de la fosfatasa alcalina, pero cuando el NBT

(oxidante y marcador de color) reacciona con él, se libera de la enzima y se forma el precipitado morado-azulado.

Una vez fijadas las células, se lavaron con tampón Tris-HCl 0,1 M (pH 7.6) durante 10 minutos y posteriormente se incubaron con el sustrato el tiempo necesario para conseguir la intensidad de marcaje óptima. Se lavaron de nuevo las células con tampón Tris-HCl y se montaron en glicerina-gelatina para preservar el marcaje.

### **10. Medida de niveles de ATP.**

Los niveles de ATP extracelular del medio de cultivo se midieron usando el protocolo para el kit comercial “ENLITEN ATP Assay System Bioluminescence Detection Kit for ATP Measurement”. El fundamento del mismo está basado en la siguiente reacción catalizada por la enzima luciferasa recombinante:



Cuando el ATP es el componente limitante en la reacción, la intensidad de la luz emitida es proporcional a la concentración de ATP.

La cantidad de ATP de las muestras problema se calculó interpolando los valores de luz emitida medidos de cada una de ellas a 560 nm, en una recta patrón. Esta recta patrón se obtuvo a partir de los valores medidos en las mismas condiciones en distintas diluciones de ATP de concentración conocida en el medio de cultivo de las neuronas, conteniendo entre 0 y 10 pmol de proteína.

Las neuronas de hipocampo que se utilizaron en estos experimentos se sembraron tras su aislamiento en placas de 35 mm de diámetro (aproximadamente  $1 \times 10^6$  células por placa), y permanecieron 72 horas en cultivo. Para realizar la medida se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de la parte más superficial del medio de cultivo, que se mezclaron con 100  $\mu\text{L}$  del L/L Reagent en el momento de realizar la medida. El propio lector de placas FLUOstar OPTIMA

empleado en las mediciones adicionaba el L/L Reagent de forma automática, previa lectura de la luz emitida.

Posteriormente las células se lisaron utilizando un raspador celular estéril en el mismo tampón de lisis (250  $\mu$ L de tampón de lisis por placa de células) y siguiendo el mismo protocolo que para la extracción de proteínas de cultivos de neuronas (apartado 2.5.1.c). La determinación de la concentración de proteínas presente en los extractos se realizó mediante el método de Bradford (1976) descrito anteriormente, para poder referir la cantidad de ATP del medio a los  $\mu$ g de proteína de cada condición.

### **11. Ensayos de viabilidad celular.**

Los estudios de supervivencia y/o viabilidad neuronal se llevaron a cabo en cultivos de neuronas corticales y estriatales de ratones control y Tet/HD94 utilizando calceína y yoduro de propidio (Molecular Probes).

Este ensayo de viabilidad se basa en la determinación simultánea de la supervivencia y muerte celular mediante el empleo de 2 sondas fluorescentes que reconocen parámetros de la viabilidad celular como son la actividad de esterasas intracelulares y la integridad de la membrana plasmática. Las células vivas se distinguen por la presencia de actividad esterasa intracelular capaz de transformar la calceína AM permeable y no fluorescente en calceína que es retenida en el citosol y produce una elevada intensidad de fluorescencia verde. Las neuronas con daños en la membrana plasmática internalizan el yoduro de propidio, que se intercala entre los ácidos nucleicos produciendo una brillante fluorescencia roja.

Para llevar a cabo estos ensayos, las neuronas corticales y estriatales se estimularon con BzATP y adenosina deaminasa (para eliminar el posible efecto de la adenosina generada por la hidrólisis extracelular del BzATP). En algunos casos las neuronas se pretrataron con BBG durante los 10 minutos previos a la estimulación. Después de 48 horas con el tratamiento se trataron las neuronas con la calceína y el yoduro de propidio como indica el protocolo de la casa comercial. Se lavaron las neuronas y se tomaron las imágenes con un microscopio de fluorescencia Axiovert 135 (Zeiss).

## **12. Ensayos en ratones R6/1 tratados farmacológicamente.**

### **12.1. Tratamiento farmacológico.**

Los ratones fueron tratados con los diferentes antagonistas del receptor P2X7 diluidos a 3mg/ml en soluciones vehículo. Estas soluciones fueron: PBS libre de calcio y magnesio suplementado con DMSO al 0,2% para el BBG, y solución salina para el A-438079. Ambos compuestos se administraron intraperitonealmente a los ratones, el BBG a una concentración de 45,5 mg/kg (mg compuesto/peso corporal) cada 48 horas, mientras que el A-438079 a 34,2 mg/kg (mg compuesto/peso corporal) cada 24 horas. Los animales control se trataron con la misma relación con las soluciones vehículos. Una vez cada semana se pesaba a los animales para controlar la evolución del peso y corregir posibles variaciones en la cantidad de compuesto a administrar.

### **12.2. Análisis de los niveles de BBG en plasma y cerebro.**

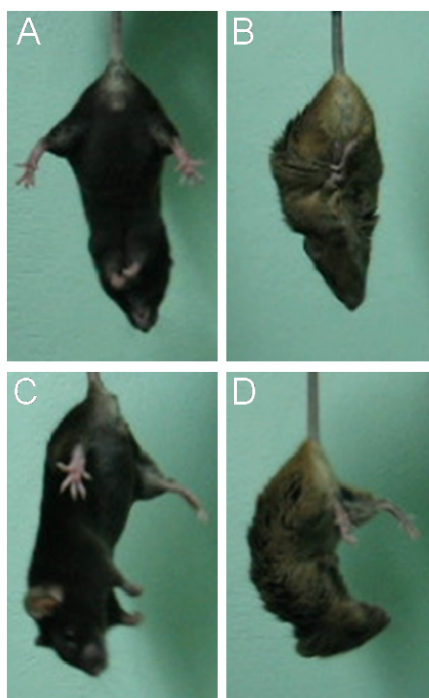
En primer lugar se analizó el espectro de absorbancia del BBG tanto en PBS como en plasma o en homogenado de cerebro, empleando diferentes concentraciones conocidas del compuesto. Se escaneó en un rango de 200 a 800 nm de longitud de onda usando un espectrofotómetro (Ultrospec III, Pharmacia), obteniendo en todos los casos el máximo a 576 nm.

Los niveles de BBG en plasma y en homogenados de cerebro de aquellos ratones tratados con BBG se determinaron interpolando los valores de absorbancia obtenidos a 576 nm en las rectas de calibrado. Éstas se generaron con un rango de concentraciones de BBG conocidas en plasma o en homogenado de cerebro.

### **12.3. Medida de la puntuación de “Clasping”**

La disfunción más común demostrada en los modelos transgénicos de ratón de la enfermedad de Huntington es un “clasping” progresivo en las patas, que se desencadena mediante la suspensión del ratón por la cola (Mangiarini y cols., 1996). De este modo, los ratones R6/1 se sometieron a este test para evaluar el grado de disfunción que presentaban (Figura 28).

Una vez por semana, los ratones fueron suspendidos por la cola durante 30 segundos mientras eran grabados en vídeos. Posteriormente se contaba el número de patas que tenían retraídas de forma distónica cada 5 segundos. Finalmente se sumaban los valores obtenidos para cada ratón, y ese dato final era la puntuación del “Clasping”.



**Figura 28. Imágenes representativas del test de suspensión de la cola.** En B y D se muestra la retracción distónica característica observada en el test en los ratones enfermos (R6/1), en comparación con los ratones sanos (A y C).

#### **12.4. Test motor de Rota-Rod**

La coordinación motora de los ratones R6/1 se analizó en un aparato Rota-Rod (Ugo Basile, Comerio, Italia) de aceleración (Figura 29). La prueba consiste en la colocación de un ratón en una rueda que gira, mientras la velocidad de rotación aumenta gradualmente. De este modo se registra la capacidad del roedor de permanecer caminando en la rueda.

Inicialmente los ratones fueron entrenados a velocidad constante (8rpm), siendo colocados de nuevo en el Rota-Rod las veces necesarias hasta que fueron capaces de permanecer 60 segundos en el aparato. Este proceso se realizó durante 5 minutos 4 veces al día con intervalos de 2 horas entre ellos, durante dos días. Tras el entrenamiento, el Rota-Rod se fijaba en modo de aceleración de 4 a 40 rpm a lo largo de 5 minutos, y los ratones se testaban cada 3 horas dos

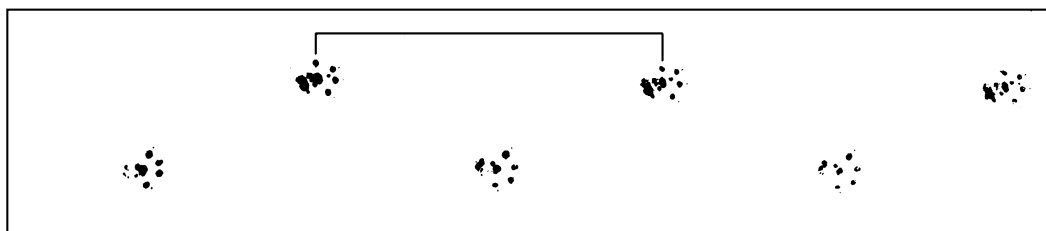


**Figura 29.** Imagen del Rota Rod (Ugo Basile, Comero, Italia) empleado en la medida de la capacidad motora de los ratones enfermos de Huntington.

veces al día durante dos días consecutivos (en total 4 pruebas), semanalmente. Durante los tests de aceleración se midió el tiempo que permaneció cada ratón caminando sobre la rueda.

### **12.5. Medida de la longitud de la zancada: Test de “Footprint”.**

Este test se realizó como segunda aproximación en el análisis de la coordinación motora de los ratones, mediante modificaciones en el método descrito por (Fernagut y cols., 2002). Se colorearon las patas traseras de los ratones con tinta y se los hizo caminar por un túnel de 15 cm de ancho, 50 cm de largo y 10 cm de alto con una tira de papel en el suelo. La longitud de la zancada se midió como la distancia entre dos huellas, sólo cuando la velocidad del ratón era constante (Figura 30). Las huellas de los primeros y últimos 7 cm del túnel se excluyeron, debido a que eran zonas de cambios en la velocidad. Para la representación gráfica se tomó el valor medio de los tres pasos más largos de cada secuencia. Los ratones se testaron 3 veces (con intervalos de una hora entre cada prueba) un día por semana.



**Figura 30. Medida representativa de la longitud de la zancada de ratón.** Modificado de (Fernagut y cols., 2002)

### **13. Análisis estadístico de los datos.**

Los experimentos mostrados en este trabajo fueron repetidos al menos tres veces, y los datos obtenidos se presentan, en general, como la media aritmética  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). En el estudio del papel de la TNAP en el crecimiento axonal de neuronas de hipocampo de ratón el cultivo, las comparaciones entre medias se realizaron con un análisis de la varianza (ANOVA), seguido del test de Newman Keuls. En el estudio de la alteración del receptor P2X7 en la enfermedad de Huntington las medias se compararon con el análisis de la varianza (ANOVA) seguido del test de Bonferroni, o bien con el análisis de la *t de Student*. Los niveles de significación establecidos han sido:  $P < 0,001$ , diferencia extremadamente significativa (\*\*\*) ;  $P < 0,01$ , diferencia significativa (\*\*);  $P < 0,05$ , diferencia marginalmente significativa (\*).



# **Resultados**



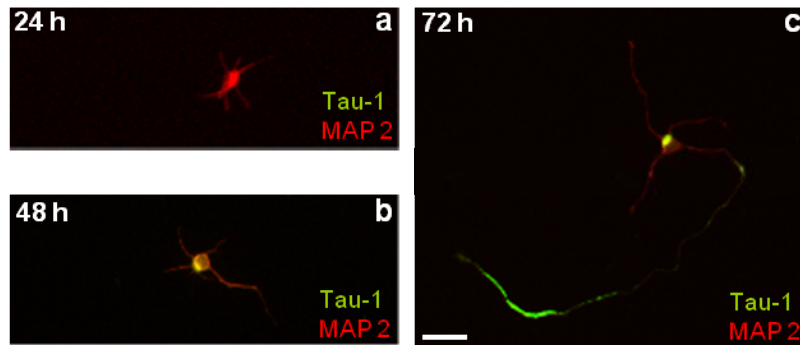
## **1. PAPEL DE LA FOSFATASA ALCALINA NO ESPECÍFICA DE TEJIDO EN EL CRECIMIENTO AXONAL DE NEURONAS DE HIPOCAMPO EN CULTIVO.**

Nuestro grupo de investigación ha sido pionero en la caracterización de los nucleótidos de adenina, y en especial del ATP, como agentes neuromoduladores en el sistema nervioso central. También ha descrito recientemente que dichos nucleótidos están implicados en la neuritogénesis en células de neuroblastoma de ratón (Neuro 2a) (Gomez-Villafuertes y cols., 2009), así como en el crecimiento y arborización axonal en neuronas de hipocampo de ratón en cultivo (Diaz-Hernandez y cols., 2008). Sin embargo se desconoce el papel que desempeñan las enzimas que hidrolizan el ATP extracelular en estos procesos. Por este motivo decidimos estudiar el papel que ejerce en la diferenciación celular la fosfatasa alcalina no específica de tejido (TNAP), única isoforma de la familia de las fosfatasas alcalinas que se expresa en cerebro (Langer y cols., 2008).

### **1.1 Cultivos de neuronas de hipocampo de ratón.**

Para abordar el estudio del crecimiento y arborización axonal se utilizó el modelo estandarizado de cultivo de neuronas de hipocampo establecido por (Dotti y cols., 1988), en el que, como se ha indicado previamente (ver Introducción apartado 2.1), se han caracterizado las distintas fases de adquisición de la polaridad neuronal. En el estadio 1 la célula se adhiere al sustrato y comienza a emitir lamelipodios. Posteriormente los lamelipodios se transforman en procesos definidos (estadio 2) donde se observan ya conos de crecimiento en sus extremos. En el tercer estadio, una de las prolongaciones (el futuro axón) crece continuamente hasta alcanzar una longitud doble o triple que el resto (Dotti y cols., 1988; Kaech y Banker, 2006). En condiciones óptimas, el 80% de las neuronas alcanzan el estadio 3 a las 48 horas (Kaech y Banker, 2006) y lo mantienen durante 48 horas aproximadamente, motivo por el que establecimos las 72 horas de cultivo *in vitro* como punto de análisis. En la Figura 31 se muestran imágenes representativas de la evolución de una neurona de

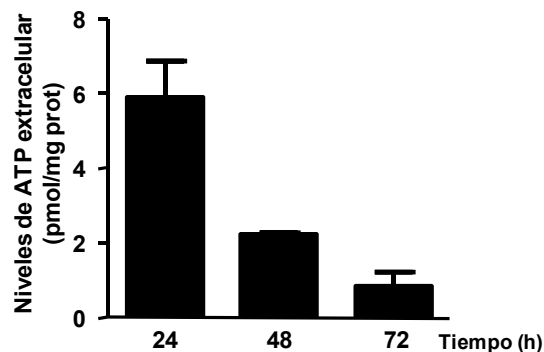
hipocampo de ratón en cultivo a distintas horas *in vitro*. Hacia los 3 días *in vitro* (*div*) (72 horas) casi todas las neuronas han alcanzado el estadio 3.



**Figura 31. Evolución morfológica de las neuronas de hipocampo en cultivo.** Las imágenes muestran micrografías de neuronas hipocámpales de ratón tomadas a distintas horas de cultivo. a) Estadio 2, emergencia de neuritas. b) Estadio 3, especificación del axón. c) Estadio 4, elongación de dendritas y axón. La barra de escala corresponde a 50  $\mu\text{m}$ .

### 1.2 Análisis de los niveles de ATP extracelular.

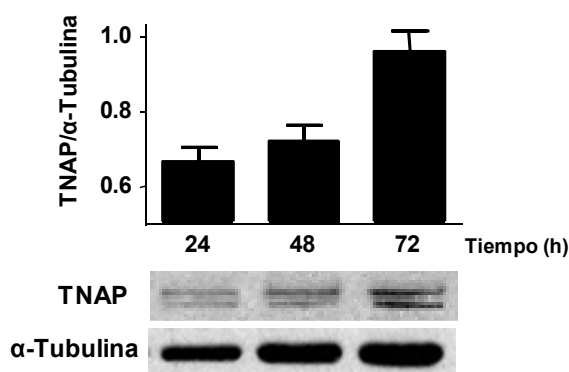
Conocido el papel inhibitorio que el ATP desempeña en el crecimiento del axón de las neuronas de hipocampo de ratón, se decidió estudiar la evolución de los niveles de ATP extracelular en los cultivos, empleando, con este fin, el reactivo luciferasa/luciferina. De este modo, como se observa en la Figura 32, los niveles de ATP extracelular descendían progresivamente en el medio de cultivo en función del tiempo, desde valores de  $18,4 \pm 1,3$  pmol/mg proteína al inicio hasta  $0,8 \pm 0,3$  pmol/mg proteína a las 72 horas.



**Figura R32. Evolución de los niveles de ATP extracelular en los cultivos de neuronas de hipocampo.** Los niveles de ATP extracelular se midieron usando el reactivo comercial luciferasa/luciferina de Promega. Las barras representan la media  $\pm$  SEM de los niveles de ATP extracelular obtenidos en 5 experimentos diferentes, por mg de proteína.

### 1.3 Expresión de la TNAP en los cultivos de neuronas de hipocampo de ratón.

Como ya se ha descrito, las neuronas se diferencian y crecen en los cultivos, coincidiendo con una disminución en los niveles extracelulares de ATP. Por este motivo se decidió analizar la expresión de una de las principales enzimas encargadas de la hidrólisis extracelular de ATP, la fosfatasa alcalina no específica de tejido (TNAP), en las neuronas hipocampales de ratón en cultivo. Como se observa en la Figura 33, se produce un progresivo aumento de la expresión de dicha enzima en función del tiempo, y en paralelo a la disminución descrita de los niveles de ATP.



**Figura 33. Evolución de los niveles de TNAP en los cultivos de neuronas de hipocampo.** Se extrajeron las proteínas de neuronas de hipocampo en cultivo 24, 48 y 72 horas *in vitro*. 30 µg fueron inmunotransferidos a membranas de nitrocelulosa y tratados con anticuerpos que reconocían la TNAP y la α-tubulina (como control de carga). Las barras representan la cantidad de TNAP con respecto a la α-tubulina.

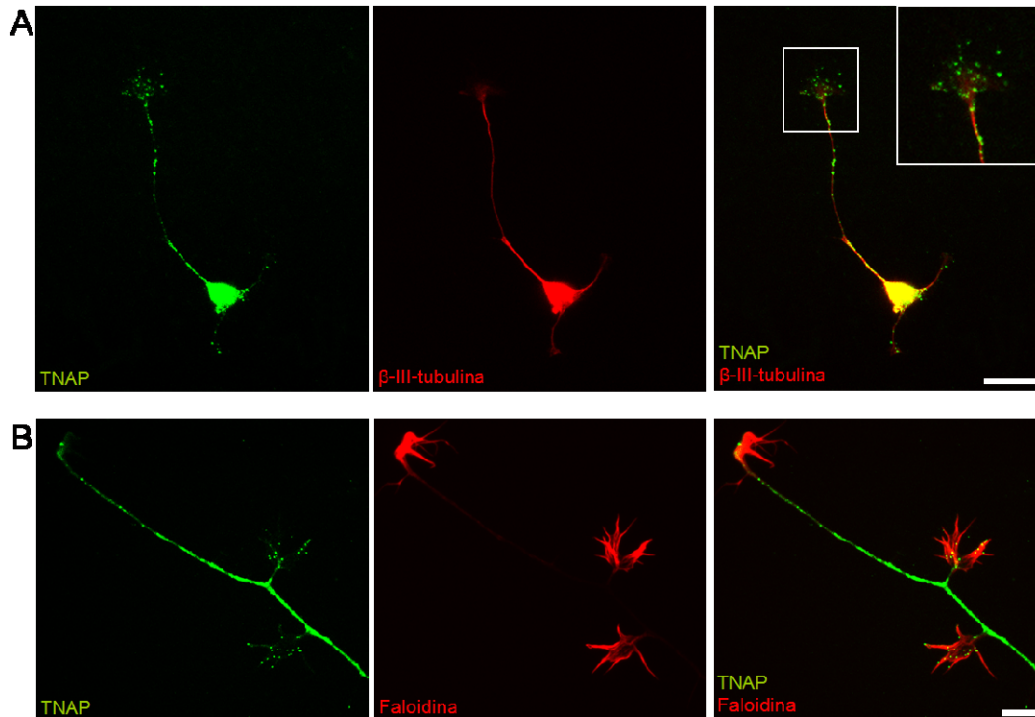
### 1.4 Localización subcelular de la TNAP en neuronas de hipocampo de ratón en cultivo.

En una primera aproximación para analizar la expresión de la TNAP dentro de la citoarquitectura celular se realizaron dobles marcajes utilizando anticuerpos específicos que reconocían la propia TNAP y la β-III-tubulina (proteína más importante de los microtúbulos del citoesqueleto), que permite observar la morfología neuronal. También se utilizó faloidina marcada con una sonda fluorescente, junto con anticuerpos de la TNAP. La faloidina es una micotoxina producida por hongos del género *Amanita phalloides* que se une a

## Resultados

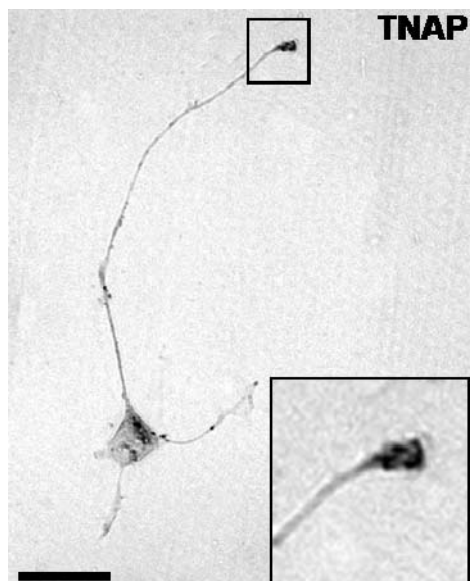
---

los filamentos de actina F, de forma que nos permite observar la morfología de los conos de crecimiento, muy ricos en estos filamentos. De este modo se confirmó la localización de la TNAP en toda la citoarquitectura neuronal, con un patrón punteado en las proyecciones neuronales y en los conos de crecimiento (Figura 34).



**Figura 34. Immunolocalización de la TNAP en neuronas de hipocampo de ratón en cultivo.** Las neuronas de 3 *div* se marcaron con anticuerpos frente a la TNAP revelado con Alexa 488 (verde). El doble marcaje se realizó con anti- $\beta$ -III-tubulina (A) revelada con Cy3 o faloidina Alexa Fluor 594 (B), ambos en rojo. Las barras de escala corresponden a 50  $\mu$ m (A) y 25  $\mu$ m (B).

Para confirmar este patrón de expresión de la TNAP, y su funcionalidad, se realizaron ensayos de citoquímica enzimática empleando el reactivo BCIP/NBT, que revela la presencia de la enzima con la formación de un precipitado morado (ver apartado 9 de Métodos). Como se muestra en la Figura 35, la actividad de la TNAP aparecía nuevamente de forma punteada a lo largo de las proyecciones neuronales y en los cuerpos neuronales, y muy intensa en los conos de crecimiento (ver Figura R5 inserto).



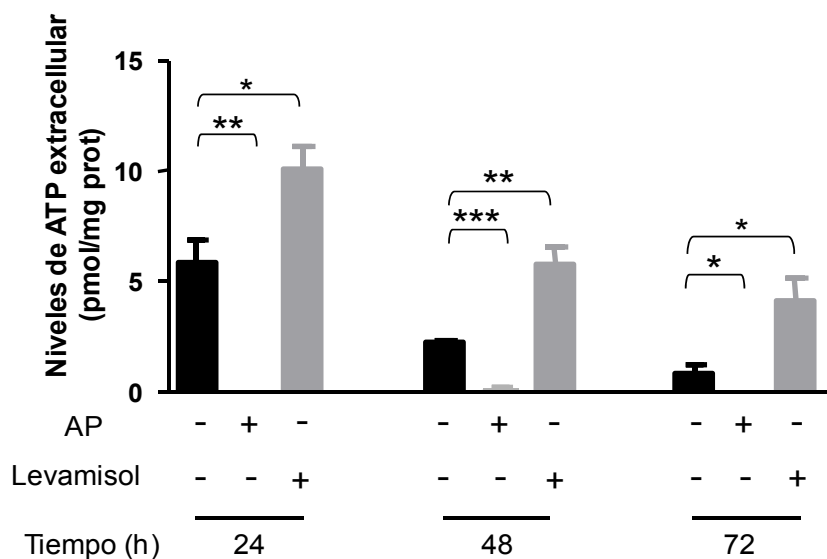
**Figura 35. Identificación por citoquímica enzimática de la localización de la TNAP en neuronas de hipocampo en cultivo.** Las neuronas se incubaron con 0,35 mM del reactivo comercial BCIP/NBT (Sigma) durante 45 minutos. La expresión se identifica por la aparición de un precipitado coloreado consecuencia de la actividad del enzima. Se registró actividad enzimática en toda la neurona, tanto en el soma como en las proyecciones y cono de crecimiento, de forma punteada. El inserto muestra en detalle la intensa actividad presente el cono de. La barra de escala corresponde a 50  $\mu\text{m}$ .

### **1.5 Efecto de la TNAP en los niveles de ATP extracelular en cultivos de neuronas de hipocampo de ratón.**

Una vez confirmado que el incremento en la expresión de la TNAP en las neuronas de hipocampo en cultivo se producía en paralelo a la disminución de ATP extracelular en el medio de cultivo, parecía probable que la TNAP estuviera interviniendo en dicha disminución. Por este motivo se estudió la posibilidad de modular los niveles de ATP extracelular en función de la actividad de la fosfatasa. Como se muestra en la Figura 36, la adición de fosfatasa alcalina (AP, del inglés “*alkaline phosphatase*”) exógena al medio de cultivo provocaba una disminución drástica del ATP extracelular, que llegaba incluso a desaparecer a las 24 horas de cultivo y se mantenía a lo largo del tiempo. Sin embargo, como era de esperar, el bloqueo de la enzima con un antagonista específico, levamisol (Kozlenkov y cols., 2004), mantenía elevados los niveles de ATP extracelular, incluso por encima de los niveles observados en ausencia de tratamiento (Figura 36).

Además, al analizar la morfología neuronal en los cultivos realizados a alta densidad de neuronas en presencia y ausencia de levamisol o AP, se observaron cambios morfológicos en las neuronas de hipocampo en cultivo (Figura 37). Así, mientras que las neuronas tratadas con fosfatasa alcalina

presentaban una red de proyecciones mucho más compleja que la de las neuronas control, el entramado de las neuronas mantenidas en presencia de levamisol resultaba muy simple, sin apenas entrecruzamientos de fibras. Estos resultados aportaban una idea acerca del posible efecto de la TNAP en la elongación axonal.

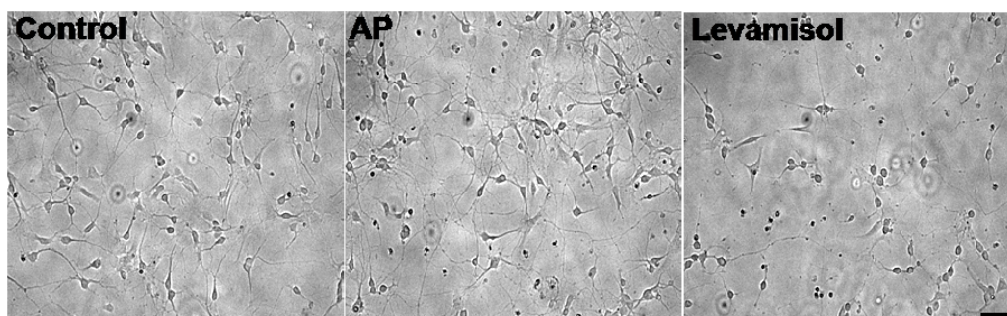


**Figura 36. Modulación de los niveles de ATP extracelular en los cultivos de neuronas de hipocampo.** Los cultivos se mantuvieron en presencia o ausencia de fosfatasa alcalina exógena (AP) o levamisol. Los niveles de ATP extracelular se midieron usando el reactivo comercial luciferasa/luciferina de promega. Las barras representan la media±SEM de los niveles de ATP extracelular obtenidos en 5 experimentos diferentes, referidos a su cantidad correspondiente de proteína. \*\*\* p<0,001; \*\* p<0,01; \* p<0,05.

### 1.6 La actividad de la TNAP modula el crecimiento axonal de neuronas de hipocampo de ratón en cultivo.

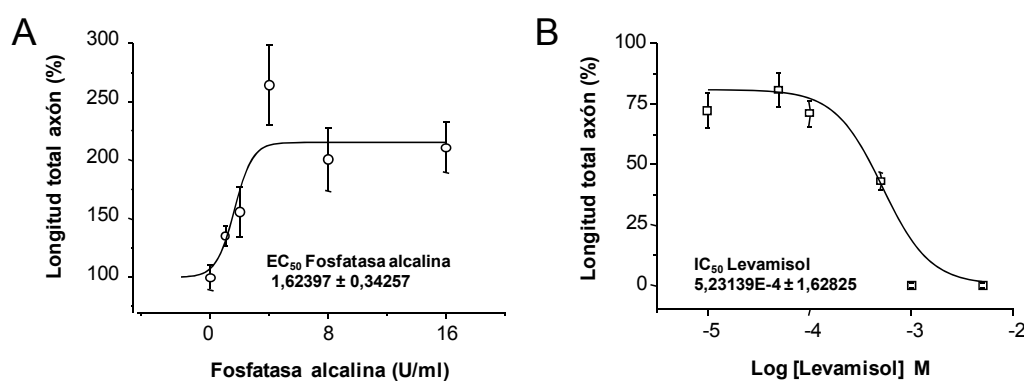
Para abordar el estudio del papel de la TNAP en el crecimiento axonal se realizaron cultivos de neuronas de hipocampo de ratón sembradas a baja densidad, con objeto de conseguir neuronas aisladas. Como primera aproximación se realizaron curvas dosis-respuesta tratando a las neuronas con un inhibidor de la enzima (levamisol) o añadiendo AP exógena al medio de cultivo. Los cultivos neuronales se trataron con concentraciones crecientes de estas moléculas durante 3 *div*. Para cada una de las concentraciones utilizadas se hizo la media de la longitud axonal total, considerada como la suma de la longitud del axón principal (prolongación más larga y marcada con anticuerpo

anti-Tau-1) más la longitud de las ramificaciones de dicho axón. Al representar estos valores se obtuvieron las curvas dosis-respuesta que se observan en la Figura 38.



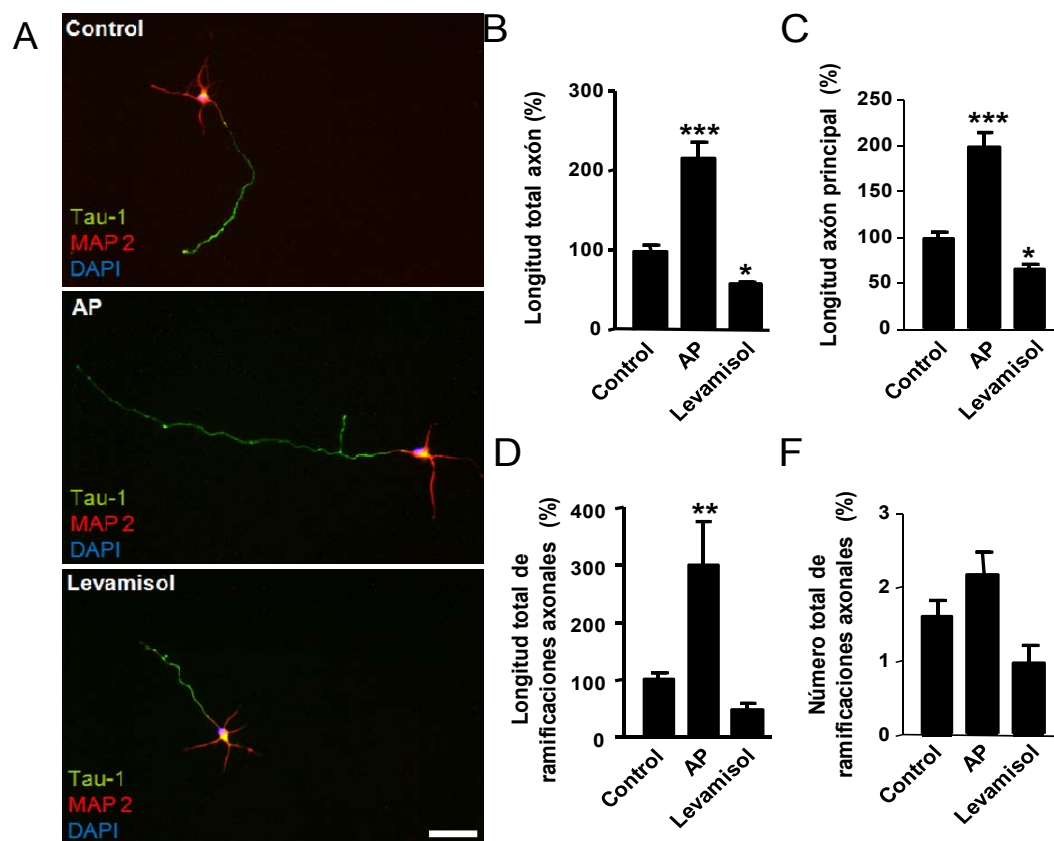
**Figura 37. Morfología de las neuronas de hipocampo de cultivo tratadas con SP o levamisol.** Imágenes representativas de las neuronas cultivadas a alta densidad durante 72 horas en presencia o ausencia de AP o levamisol. Barra de escala 100 µm.

Como era de esperar debido a su capacidad de hidrolizar ATP, la adición de fosfatasa alcalina exógena al medio de cultivo inducía un incremento en la longitud total del axón comparado con aquellas neuronas sin tratar (Figura 38 A, 39). El valor de  $EC_{50}$  obtenido fue de  $1,62 \pm 0,34$ , y el efecto máximo se observó con la adición de 4 U/mL, motivo por el que se seleccionó esta concentración para los ensayos posteriores.



**Figura 38. Curvas dosis-respuesta para la fosfatasa alcalina y el levamisol en el crecimiento axonal de neuronas de hipocampo de ratón en cultivo 3 div.** Las neuronas en cultivo se estimularon durante 3 div con concentraciones crecientes de fosfatasa alcalina (A) y levamisol (B). Al final de cada experimento las neuronas se fijaron con paraformaldehído y se inmunomarcaron con anti- $\beta$ -III-tubulina para observar la morfología neuronal. La longitud total del axón corresponde a la suma de la longitud del axón (identificado como la prolongación más larga) más la longitud de las ramificaciones del mismo. Los valores corresponden al valor promediado  $\pm$  SEM para cada concentración de agonista.

Por otro lado, el tratamiento de las neuronas en cultivo con levamisol (antagonista de la TNAP) inducía disminución de la longitud total del axón, es decir, el efecto contrario a la adición de fosfatasa alcalina, con una  $IC_{50}$  de  $5,23 \pm 1,62 \mu\text{M}$  (Figura 38 B, 39). En este caso, valores de concentración de 1 mM o superiores inhibían completamente la neuritogénesis, desencadenando incluso muerte neuronal.



**Figura 39. Efecto de la fosfatasa alcalina y el levamisol en el crecimiento axonal de neuronas de hipocampo de ratón en cultivo 3 div.** Las neuronas en cultivo (3 div) se estimularon con fosfatasa alcalina (4U/mL) y levamisol (500 nM). Al final de cada experimento las neuronas se fijaron con paraformaldehído y se inmunomarcaron con anti-tau-1 y anti-MAP-2 para diferenciar las dendritas de los axones. La barra de escala corresponde a 50  $\mu\text{m}$ . (A). B-F. Los gráficos muestran las modificaciones en los distintos parámetros estudiados. Los valores corresponden al valor promediado  $\pm$  SEM para cada parámetro y condición. El 100% de la longitud total del axón corresponde a  $214,5 \pm 13,4 \mu\text{m}$ . El 100% de la longitud del axón principal corresponde a  $158,6 \pm 10,9 \mu\text{m}$ , y el 100% de la longitud de las ramificaciones a  $43,1 \pm 7,1 \mu\text{m}$ . La media del número de ramificaciones axonales de las neuronas control es de  $1,8 \pm 0,3$ . \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ .

Al igual que para la longitud total del axón (Figura 39 A, B), la adición de AP exógena incrementaba la longitud del axón principal al doble y la longitud de las ramificaciones al triple, mientras que el tratamiento con levamisol disminuía ambos parámetros un 30% (Figura 39 C, D). Sin embargo, no se registraron diferencias significativas en el número de ramificaciones axonales de las neuronas tratadas con AP exógena o levamisol, comparadas con aquellas sin tratamiento (Figura 39 F) (El número total de ramificaciones axonales se define como el número de ramificaciones del axón principal (ramificaciones secundarias) más el número de ramificaciones que parten de las ramificaciones secundarias). Esto eliminaba la posibilidad de que el aumento en la longitud total del axón fuese debida a un aumento en el número de ramificaciones.

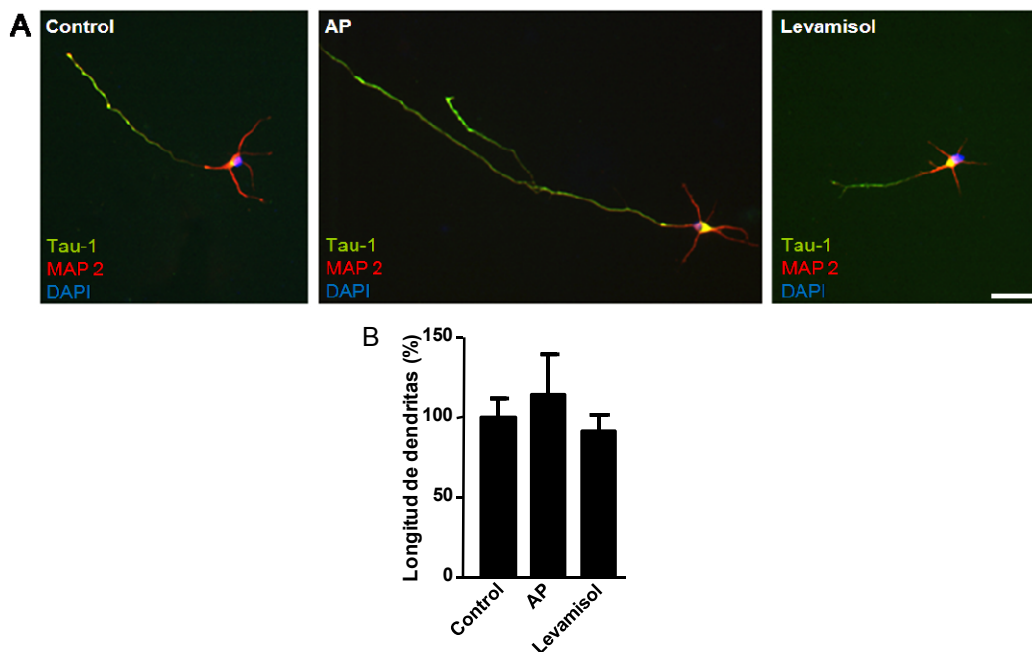
Por último se analizó si la TNAP influía en la longitud de las dendritas. Como se observa en la Figura 40, ni el bloqueo de la TNAP ni la adición de AP exógena modificaron de forma significativa la longitud de las dendritas (calculando la longitud de las dendritas como la longitud media de las dendritas de una neurona).

**Silenciamiento de la TNAP.** Con objeto de confirmar el efecto positivo de la TNAP sobre el crecimiento axonal, observado mediante el uso de herramientas farmacológicas, se adoptó una segunda aproximación basada en el silenciamiento de la enzima. Por este motivo se utilizaron los ARN de interferencia para la TNAP (shRNA-TNAP) insertados en el vector de expresión pGeneClip™ hMGFP (SABiosciences) (ver apartado 3 de Métodos), que permitían además la expresión en paralelo de la proteína verde fluorescente (GFP) para garantizar la identificación y el seguimiento de las neuronas transfectadas. Las neuronas se transfectaron 24 horas tras ser plaqueadas y se fijaron a las 72 horas (Figura 41) para analizar los parámetros anteriormente mencionados.

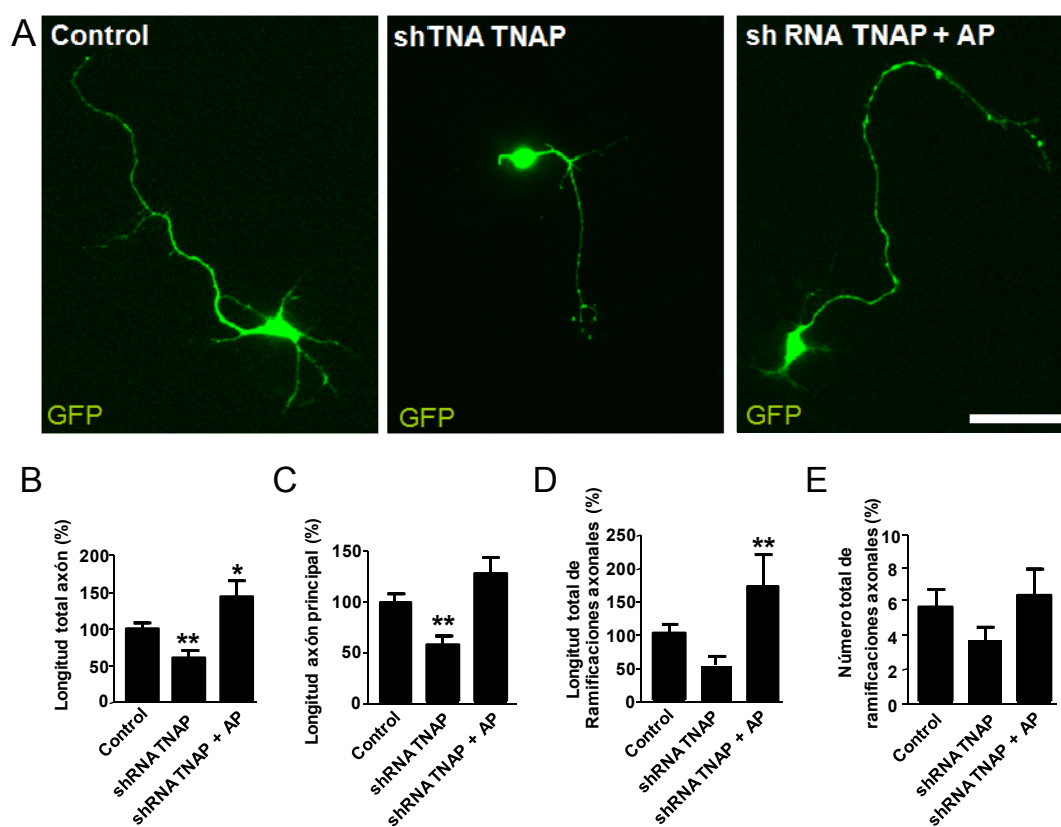
Al igual que ocurría en las neuronas tratadas con levamisol, el silenciamiento de la TNAP indujo axones hasta un 40% más cortos, tanto para el axón principal (Figura 41 C), como para la longitud total (Figura 41 B), que los observados en las neuronas transfectadas con el plásmido control (que sólo

## Resultados

expresaba la GFP). Sin embargo no se observaron diferencias significativas en la longitud total de las ramificaciones (Figura 41 D). Cabe destacar que la disminución axonal inducida por el silenciamiento de la TNAP se revertió cuando se trataron las neuronas transfectadas con shRNA-TNAP con AP exógena, superando incluso la longitud total axonal de las neuronas control en un 40% (Figura 41 B). En este caso el aumento de la elongación axonal se debía a la longitud total de las ramificaciones, que aumentaba hasta un 70% (Figura 41 D). Además, el silenciamiento de la expresión de la TNAP no indujo diferencias significativas en el número total de ramificaciones axonales, reproduciendo los resultados observados con los tratamientos farmacológicos (Figura 41 E)



**Figura 40. Efecto de la fosfatasa alcalina y el levamisol en la elongación de dendritas de neuronas de hipocampo de ratón en cultivo 3 *div*.** Las neuronas en cultivo (3 *div*) se estimularon con fosfatasa alcalina (AP, 4U/mL) y levamisol (500 nM). Al final de cada experimento las neuronas se fijaron con paraformaldehído y se inmunomarcaron con anti-tau-1 y anti-MAP-2 para diferenciar las dendritas de los axones (A). La barra de escala corresponde a 50  $\mu$ m. B. El histograma muestra el porcentaje de la media  $\pm$  SEM de la longitud de las dendritas para cada condición estudiada. El 100% de la longitud de las dendritas corresponde a 31,1  $\pm$  2,6  $\mu$ m.



**Figura 41. Efecto del silenciamiento de la TNAP en el crecimiento axonal de neuronas de hipocampo de ratón en cultivo 3 div.** Las neuronas en cultivo se transfectaron 24 horas tras plaquear y se mantuvieron otros 2 div. Al final del experimento las neuronas se fijaron con paraformaldehído y se montaron para su estudio (A). La barra de escala corresponde a 50  $\mu$ m. B-E. Los gráficos muestran las modificaciones en los distintos parámetros estudiados. Los valores corresponden al valor promediado  $\pm$  SEM para cada parámetro y condición. El 100% de la longitud total del axón corresponde a  $310,8 \pm 28,0 \mu$ m. El 100% de la longitud del axón principal corresponde a  $242,4 \pm 28,7 \mu$ m, y el 100% de la longitud de las ramificaciones a  $126,9 \pm 24,2 \mu$ m. La media del número de ramificaciones axonales de las neuronas control es de  $2,6 \pm 0,9$ . \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ .

### 1.7 Efecto de la adenosina en el crecimiento axonal de neuronas de hipocampo de ratón en cultivo.

Como se ha descrito previamente, la adición de AP al medio de cultivo reduce drásticamente los niveles extracelulares de ATP, lo cual se traduce en un incremento en la longitud de los axones. Dado que la TNAP hidroliza los nucleótidos de adenina generando como producto final adenosina, la adición de AP a los cultivos podría estar generando un aumento de los niveles de adenosina extracelular. Por este motivo se investigó si el efecto observado sobre el crecimiento axonal estaba inducido por la adenosina.

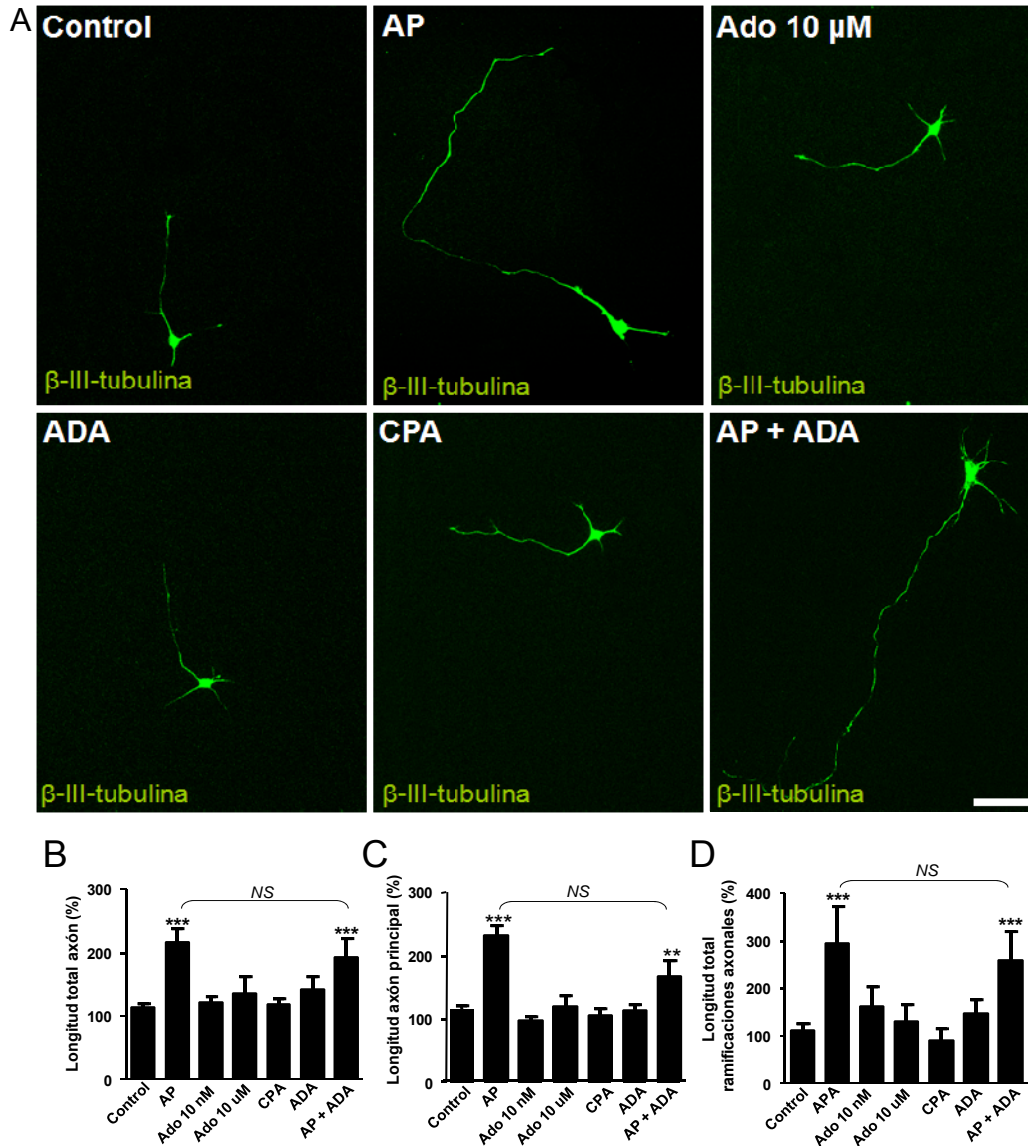
Como se muestra en la Figura 42, al tratar las neuronas de hipocampo en cultivo durante 3 días con adenosina a diferentes concentraciones (10 nM para activar de forma selectiva los receptores de adenosina tipo 1 ( $A_1$ ), y 10  $\mu$ M para activar todos los receptores de adenosina), o con el análogo  $N^6$ -ciclopentiladenosina (CPA) no se observaron cambios significativos en la morfología neuronal. Además, al analizar la longitud total del axón, la longitud del axón principal y la longitud de las ramificaciones no se registraron diferencias significativas en dichos parámetros, en comparación con las neuronas control (Figura 42 B).

Para descartar la posible activación de los receptores de adenosina durante los tratamientos con AP, se añadió la enzima adenosina deaminasa (ADA, 0,2 U/mL) al medio de cultivo. La adenosina deaminasa es una enzima que convierte la adenosina en su metabolito inactivo inosina (Cristalli y cols., 2001). La adición de esta enzima por sí sola no indujo cambios significativos en la longitud axonal (ver Figuras 42). Además, las neuronas tratadas con AP más ADA desarrollaron unos axones de longitud semejante a la de las neuronas tratadas exclusivamente con AP, es decir, no se registraron diferencias significativas entre ambos tratamientos (AP y AP + ADA; Figura 42), excluyendo así cualquier implicación de la adenosina en el crecimiento axonal.

### **1.8 Localización subcelular de los receptores P2X en neuronas de hipocampo de ratón en cultivo.**

Una vez excluida la adenosina como agente responsable del crecimiento axonal inducido por la TNAP, parecía claro que el efecto de aumento de la elongación axonal estaba provocado por la desaparición del ATP extracelular, y por lo tanto, por la inhibición de la activación de algún receptor específico de ATP.

Dado que las ondas de calcio en los conos de crecimiento regulan negativamente el crecimiento axonal (Gomez y Spitzer, 1999; Tang y cols., 2003a), y que el ATP puede activar receptores ionotrópicos P2X que inducen incrementos de calcio puntuales, el efecto observado con el tratamiento con AP exógena podría deberse al bloqueo de estos receptores. Para validar esta

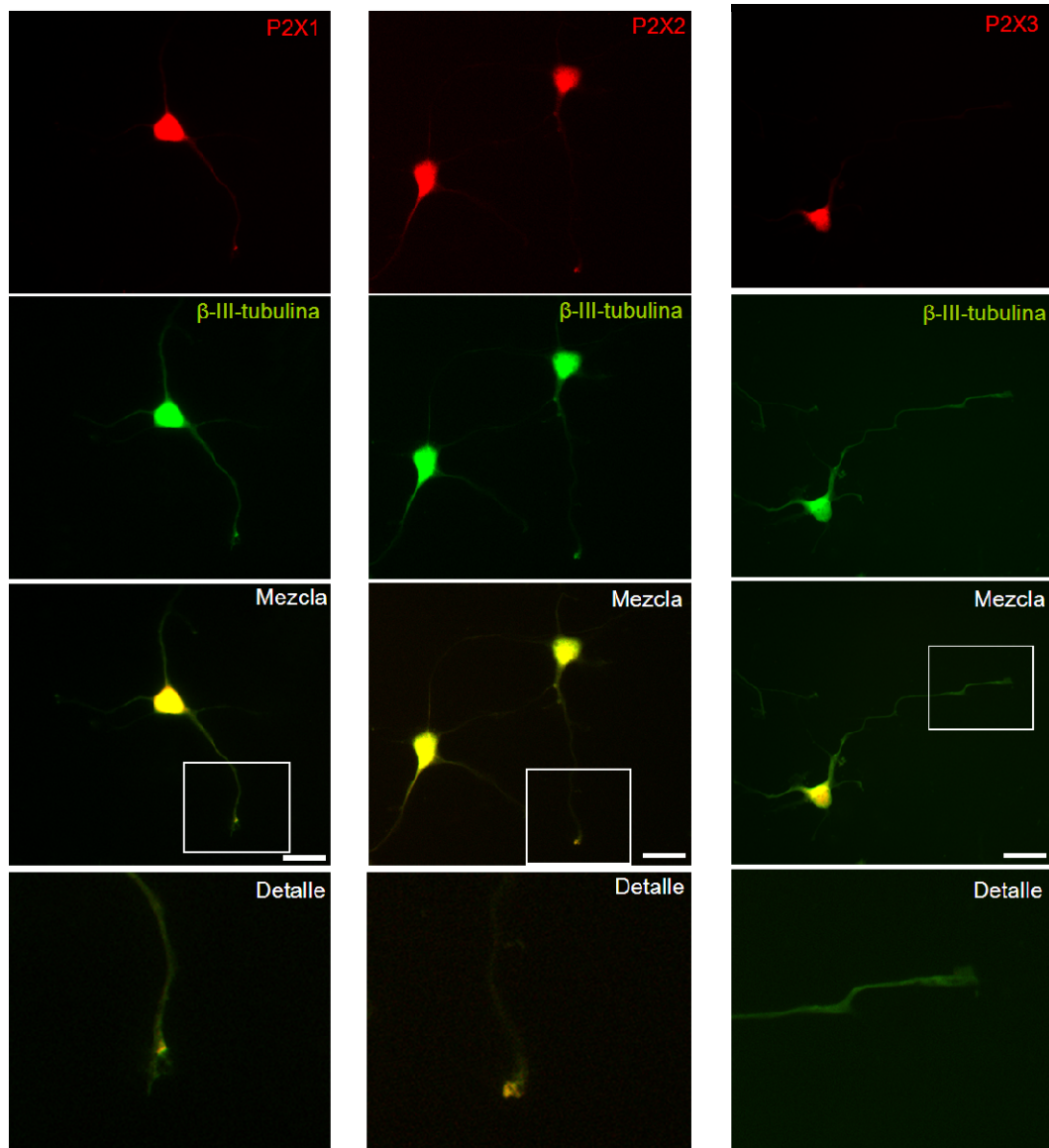


**Figura 42. Efecto de la adenosina en el crecimiento axonal de neuronas de hipocampo de ratón en cultivo 3 div.** Las neuronas en cultivo (3 div) se estimularon con fosfatasa alcalina (4U/mL), ADA (0,2 U/mL), adenosina (10  $\mu$ M) y CPA (50 nM). Al final del experimento las neuronas se fijaron con paraformaldehído y se inmunomarcaron con anti- $\beta$ -III-tubulina para observar la morfología neuronal. La barra de escala corresponde a 50  $\mu$ m (A). B-D. Las gráficas muestran el valor promediado  $\pm$  SEM de la longitud total del axón, longitud del axón principal y longitud de las ramificaciones para las diferentes condiciones estudiadas. Los valores corresponden al valor promediado en porcentaje  $\pm$  SEM para cada parámetro y condición. El 100% de la longitud total del axón corresponde a  $198,9 \pm 9,8 \mu$ m. El 100% de la longitud del axón principal corresponde a  $148,2 \pm 7,7 \mu$ m, y el 100% de la longitud de las ramificaciones a  $31,3 \pm 4,4 \mu$ m. \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; NS: no significativo.

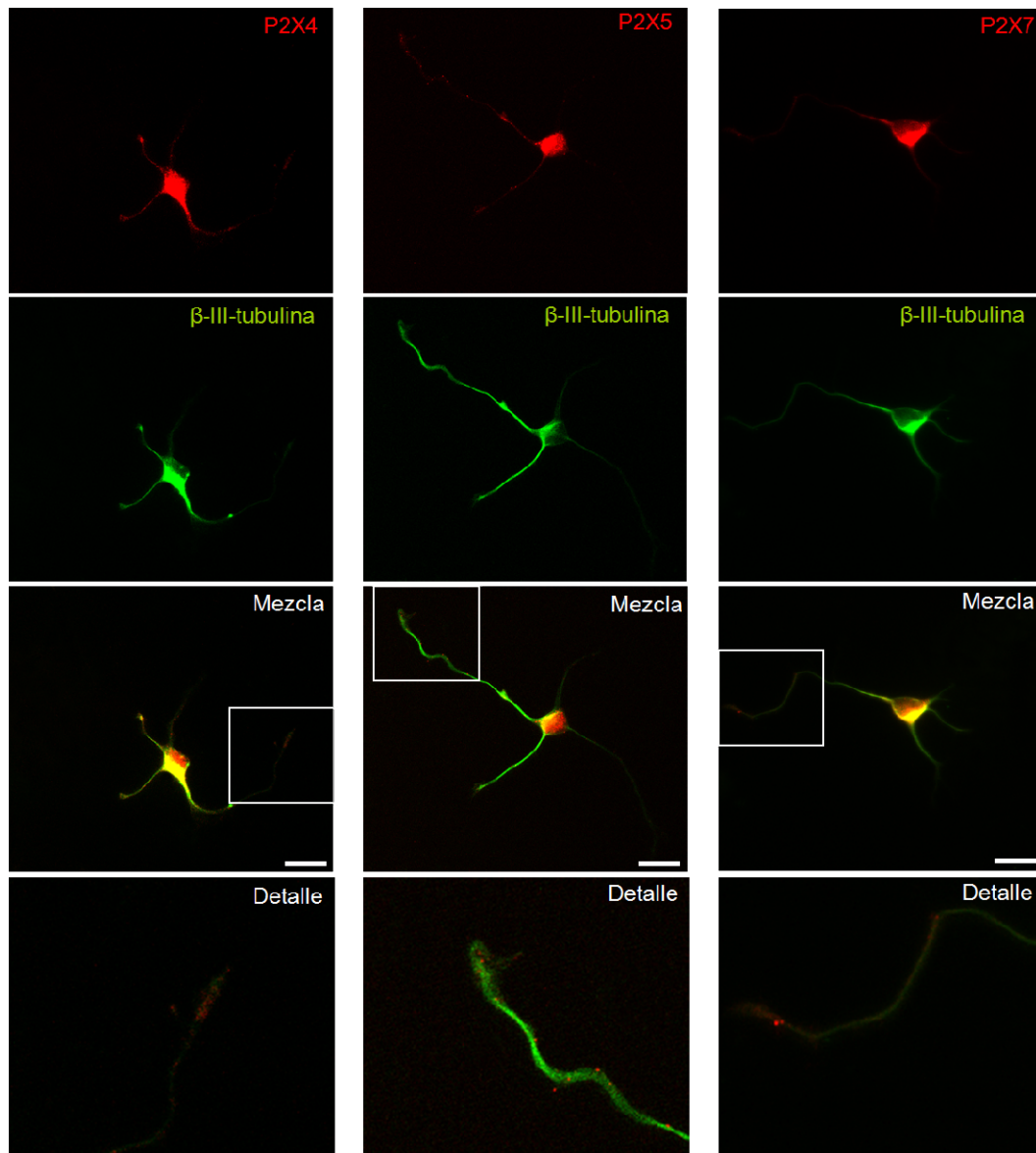
hipótesis se decidió estudiar, en primer lugar, la presencia de estos receptores en el cono de crecimiento axonal. Por este motivo se realizaron dobles

## Resultados

immunofluorescencias utilizando anticuerpos específicos que reconocían cada subunidad P2X y un anticuerpo frente a  $\beta$ -III-tubulina que, como ya se ha indicado anteriormente, permitía observar la morfología neuronal (Figuras 43 y 44).



**Figura 43. Inmunolocalización de las subunidades P2X presentes en neuronas de hipocampo de ratón en cultivo.** Las neuronas (*3div*) se marcaron con anticuerpos frente a las subunidades P2X1, 2 y 3 revelados con Cy3 (rojo) y con un anticuerpo anti  $\beta$ -III-tubulina revelado con Alexa 488 (verde). La co-localización de ambos anticuerpos se observa en las imágenes de abajo, tanto la original (mezcla), como un detalle del axón (detalle). La barra de escala corresponde a 25  $\mu$ m.



**Figura 44. Inmunolocalización de las subunidades P2X presentes en neuronas de hipocampo de ratón en cultivo.** Las neuronas (*3div*) se marcaron con anticuerpos frente a las subunidades P2X4, 5 y 7 revelados con Cy3 (rojo) y con un anticuerpo anti  $\beta$ -III-tubulina revelado con Alexa 488 (verde). La co-localización de ambos anticuerpos se observa en las imágenes de abajo, tanto la original (mezcla), como un detalle del axón (detalle). La barra de escala corresponde a 25  $\mu$ m.

Como se muestra en la Figura 43, las subunidades P2X1 y P2X2 mostraban un patrón de distribución similar, encontrándose en el soma neuronal y en el cono de crecimiento, mientras que la P2X3 sólo aparecía en el cuerpo

neuronal y en la región proximal del axón. En el caso de la subunidad P2X4 se encontró presente tanto en los cuerpos celulares como en las prolongaciones y las regiones proximal y distal del axón (Figura 44). Las subunidades P2X5 y P2X7 presentaban un patrón de expresión semejante en el soma neuronal, prolongaciones dendríticas, axón y cono de crecimiento axonal (Figura 44).

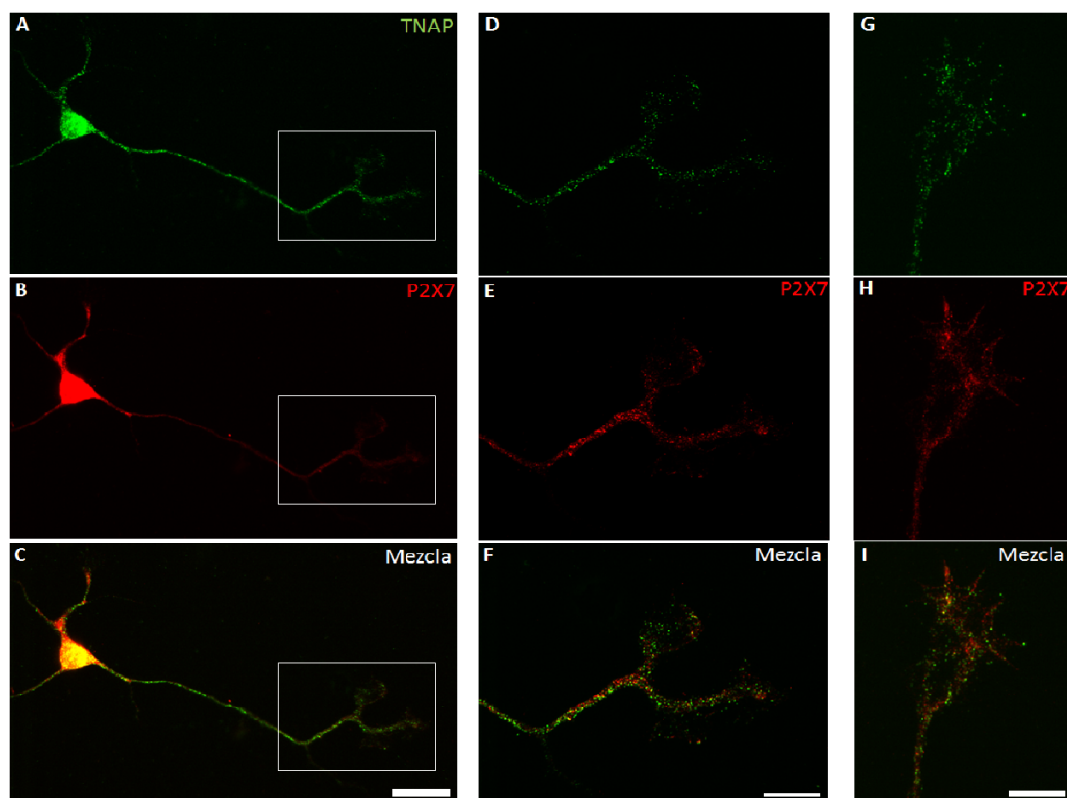
En resumen, todas las subunidades analizadas, excepto la P2X3, se localizaban en el cono de crecimiento axonal, siendo candidatos, por lo tanto, para influir en el efecto inducido por el ATP en la elongación axonal.

Sin embargo, en base a los resultados aportados por nuestro grupo previamente descritos (ver Introducción, apartado 2.6), en los que se demostraba la implicación directa del receptor P2X7 en el crecimiento axonal, los experimentos realizados se centraron en determinar si el efecto inducido por la TNAP en el crecimiento axonal era debido a la regulación de la actividad del receptor P2X7 por dicha enzima.

### **1.9 Acción coordinada de la TNAP y el receptor P2X7 en el crecimiento axonal.**

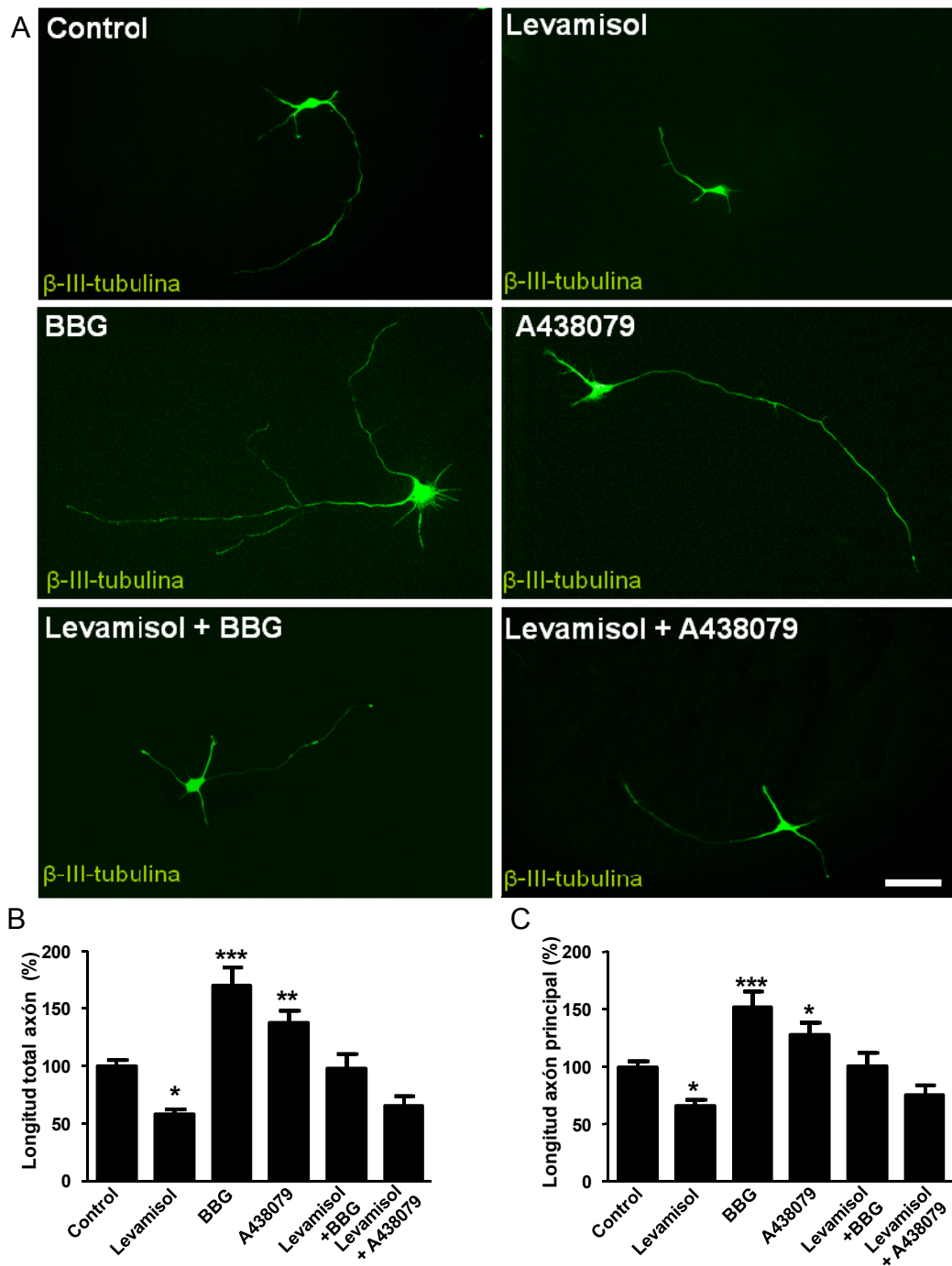
En primer lugar se analizó el patrón de expresión neuronal de TNAP y P2X7 realizando dobles marcajes con anticuerpos específicos frente a cada una de ellas. Como se muestra en la Figura 45, el patrón de expresión de la TNAP y del receptor P2X7 en la arquitectura neuronal resultó ser similar y punteado en ambos casos en las neuronas de hipocampo de ratón en cultivo, y más concretamente en el cono de crecimiento.

Con el fin de comprobar la posible relación existente entre la actividad de estas dos proteínas sobre el crecimiento axonal, las neuronas de hipocampo de ratón en cultivo fueron tratadas con los antagonistas de ambas proteínas (Figura 46). Mientras que el levamisol por sí solo reducía un 40% la longitud de los axones, los antagonistas específicos del receptor P2X7 (BBG y A438079) la aumentaban significativamente, en torno a un 70% y 30% respectivamente. Sin embargo, el tratamiento de las neuronas con levamisol más BBG, o levamisol más A438079, generó axones de igual longitud que los observados en neuronas sin tratar (Figuras 46 B y C).



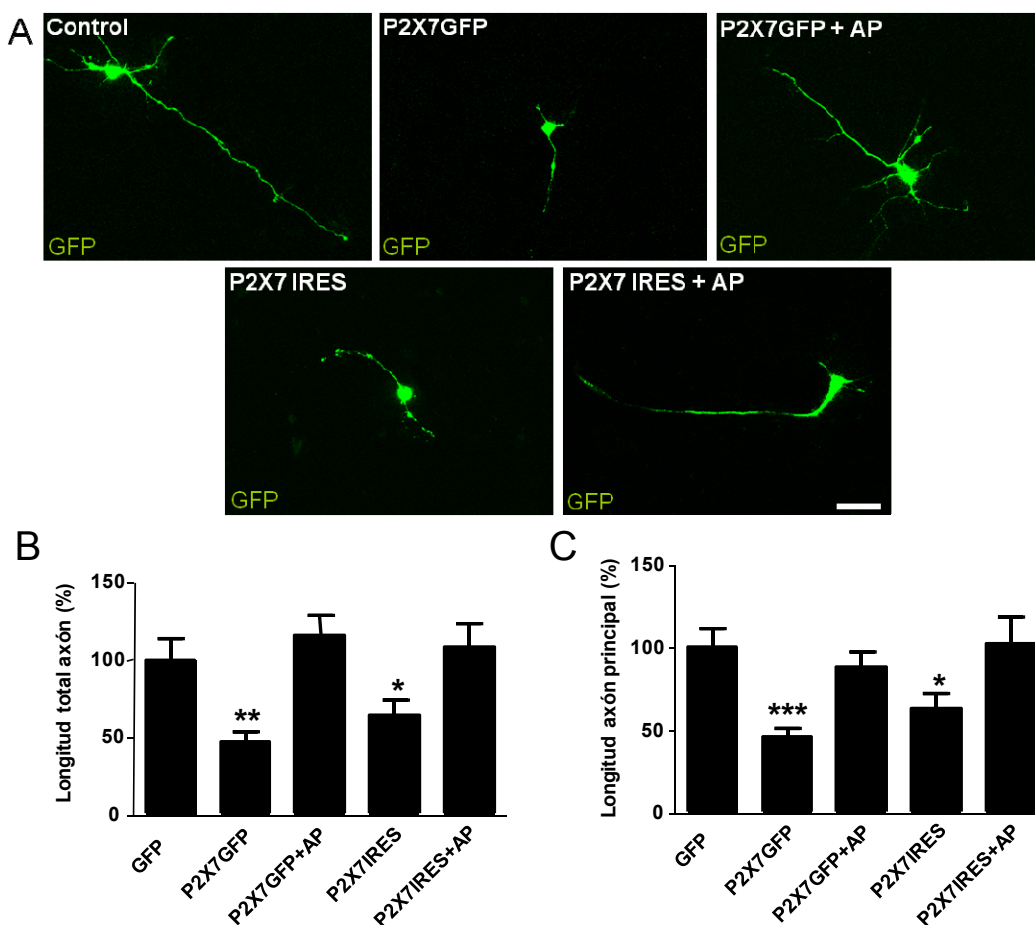
**Figura 45. Co-localización de la TNAP con la subunidad P2X7 en neuronas de hipocampo de ratón en cultivo.** Las neuronas de 3 *div* se marcaron con anticuerpos frente a TNAP revelados con Alexa 488 (verde) y con anticuerpos frente a la subunidad P2X7 revelados con Cy3 (verde). La co-localización de ambos anticuerpos se observa en las imágenes inferiores. D-F Detalle de los conos de la neurona mostrada en A-C. La barra de escala corresponde a 50  $\mu\text{m}$  en A-C y de 25  $\mu\text{m}$  en D-I.

Los resultados obtenidos parecen indicar la existencia de una acción coordinada de la actividad de la TNAP y el receptor P2X7 para regular la elongación axonal. Para confirmar esta hipótesis se utilizó una segunda estrategia basada en la utilización de herramientas de biología molecular mediante las cuales se modificó la expresión tanto de la TNAP como del receptor P2X7. Como se muestra en la Figura 47, la sobreexpresión del receptor P2X7, tanto fusionado con la proteína GFP, como sin fusionar, disminuían significativamente (50% y 35% respectivamente) la longitud total del axón y del axón principal.



**Figura 46. Efecto de la TNAP y el receptor P2X7 en el crecimiento axonal de neuronas de hipocampo de ratón en cultivo 3 div.** Las neuronas en cultivo (3 div) se trataron con levamisol (500 nM), BBG (5  $\mu$ M) y A438079 (1  $\mu$ M). A. Al final del experimento las neuronas se fijaron con paraformaldehído y se inmunomarcaron con anti- $\beta$ -III-tubulina para observar la morfología neuronal. La barra de escala corresponde a 50  $\mu$ m. B, C. Los histogramas muestran las modificaciones en la longitud total del axón y la del axón principal con los distintos tratamientos aplicados. Los valores corresponden al valor promediado  $\pm$  SEM para cada condición. El 100% de la longitud total del axón corresponde a  $187,9 \pm 9,82 \mu$ m. El 100% de la longitud del axón principal corresponde a  $148,2 \pm 7,77 \mu$ m \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ .

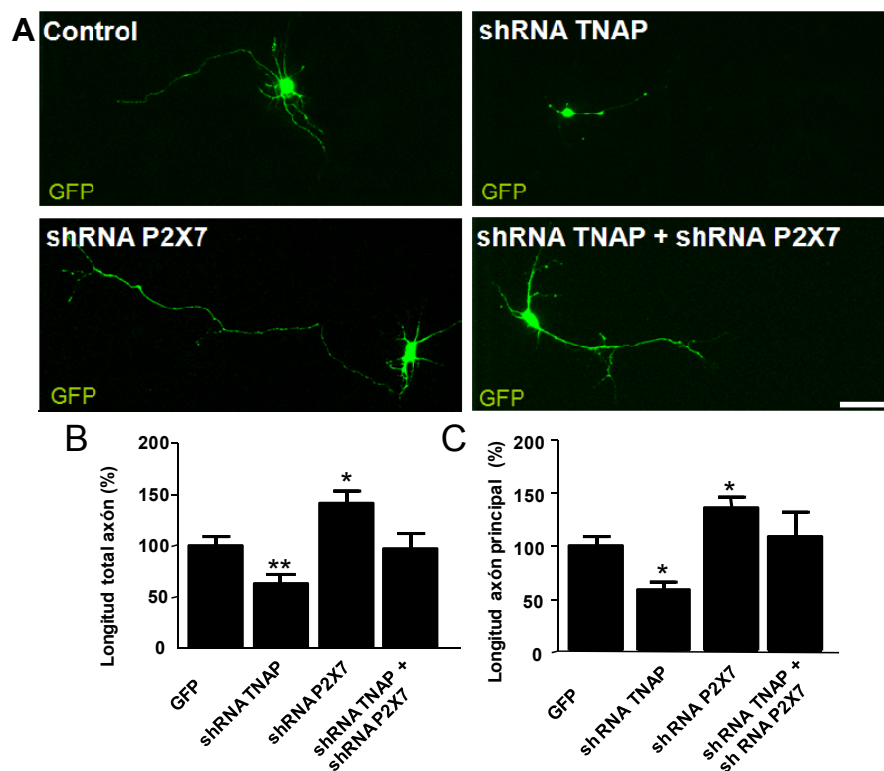
Dado que la adición de AP al medio de cultivo generaba un incremento en la longitud de los axones (en al menos un 100%), presumiblemente por la eliminación del ATP extracelular del medio, se comprobó si la adición de AP al medio de cultivo de las neuronas que sobreexpresaban el receptor P2X7 influía en el tamaño de sus axones. Los resultados obtenidos en estos experimentos demostraron que la adición de AP revertía el efecto negativo que el receptor P2X7 ejerce sobre la longitud axonal, generando axones de longitud semejante a la de aquellas neuronas que sólo expresaban la GFP (Figura 47 A-C).



**Figura 47. Reversión, por adición de fosfatasa alcalina exógena, del efecto inhibitorio del crecimiento axonal causado por la sobreexpresión del receptor P2X7 en neuronas de hipocampo de ratón en cultivo 3 div.** Las neuronas en cultivo se transfectaron 24 horas tras el plaqueo y se añadió la fosfatasa alcalina exógena. Posteriormente se mantuvieron 2 div. Al final del experimento las neuronas se fijaron con paraformaldehído y se montaron para su posterior estudio. La barra de escala corresponde a 50  $\mu$ m.(A). B, C. La gráfica muestra el porcentaje del valor promediado  $\pm$  SEM de las modificaciones en la longitud total del axón y del axón principal en las distintas condiciones. El 100% de la longitud total del axón corresponde a  $199,2 \pm 27,1 \mu$ m. El 100% de la longitud del axón principal corresponde a  $153,6 \pm 17,79 \mu$ m. \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ .

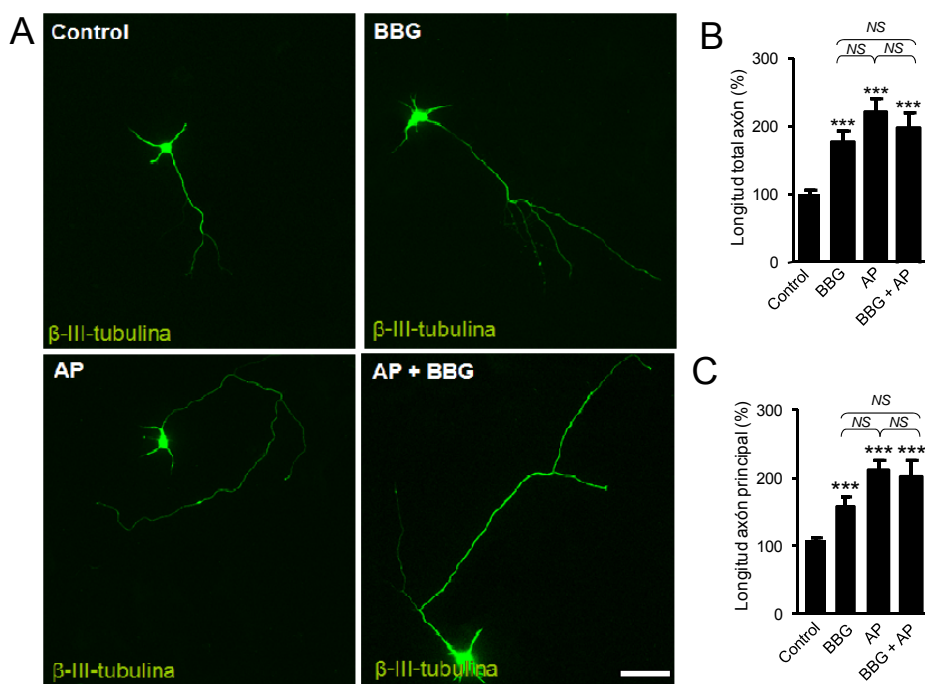
## Resultados

Para confirmar el efecto regulador que el receptor P2X7 y la fosfatasa ejercen sobre el crecimiento axonal, se silenciaron de forma conjunta y separada la TNAP y el receptor P2X7 en las neuronas en cultivo, con los correspondientes ARN de interferencia (Material y Métodos, apartado 3.1) (Figura 48A). Mientras que el silenciamiento de la TNAP reducía el crecimiento axonal en un 40% aproximadamente, el silenciamiento del receptor P2X7 lo incrementaba, generando axones un 40% más largos que aquellos procedentes de neuronas control (Figura 48 B y C). Sin embargo, al silenciar de forma simultánea la TNAP y el receptor P2X7, y se observó que, al igual que ocurría cuando inhibíamos farmacológicamente ambas moléculas, las neuronas presentaban una longitud axonal similar a la de las neuronas transfectadas únicamente con GFP (Figura 48).



**Figura 48. Efecto coordinado de la TNAP y el P2X7 en el crecimiento axonal de neuronas de hipocampo de ratón en cultivo 3 div.** Las neuronas en cultivo se transfectaron 24 horas tras el plaqueo y se mantuvieron 2 div. Al final del experimento las neuronas se fijaron con paraformaldehído y se montaron para su posterior estudio. La barra de escala corresponde a 50  $\mu\text{m}$ . (A). B. El diagrama de barras muestra el porcentaje del valor promediado  $\pm$  SEM de las modificaciones en la longitud del axón principal en las distintas condiciones. El 100% de la longitud total del axón corresponde a  $214,5 \pm 13,4 \mu\text{m}$ . El 100% de la longitud del axón principal corresponde a  $158,6 \pm 10,9 \mu\text{m}$  \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ .

Una evidencia más de la acción coordinada que ambas proteínas ejercen en el crecimiento axonal se obtuvo al no observarse un efecto sumatorio en la longitud axonal cuando se trataba las neuronas con BBG más AP exógena (Figura 49).

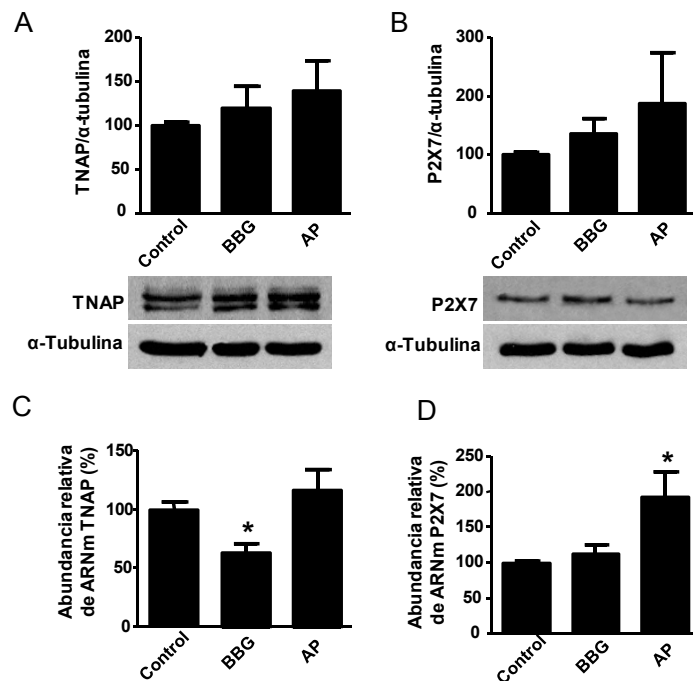


**Figura 49 Efecto de la fosfatasa alcalina y el receptor P2X7 en el crecimiento axonal de neuronas de hipocampo de ratón en cultivo 3 div.** Las neuronas en cultivo (3 div) se trataron con fosfatasa alcalina exógena (4 U/mL) y BBG (5  $\mu$ M). Al final del experimento las neuronas se fijaron con paraformaldehído y se inmunomarcaron con anti- $\beta$ -III-tubulina para observar la morfología neuronal. La barra de escala corresponde a 50  $\mu$ m (A). B. El histograma muestra las modificaciones en la longitud del axón principal con los distintos tratamientos aplicados. Los valores corresponden al porcentaje del valor promediado  $\pm$  SEM para cada condición. El 100% de la longitud total del axón corresponde a  $214,5 \pm 13,4 \mu$ m. El 100% de la longitud del axón principal corresponde a  $158,6 \pm 10,9 \mu$ m. \*\*\*  $p < 0,001$ ; NS: no significativo.

En una última aproximación investigamos si la coordinación entre ambas proteínas se producía a niveles transcripcionales. Por este motivo se analizaron los niveles de proteína y ARNm de ambas moléculas en neuronas tratadas durante 3 div con AP exógena o BBG. Como se muestra en la Figura 50 A y B, el bloqueo del receptor P2X7 con BBG y la adición de AP no modificaron de forma significativa los niveles de proteína del P2X7 ni los de la enzima TNAP. Sin embargo, sí se registraron alteraciones significativas en los niveles de ARNm de

## Resultados

la TNAP y del receptor P2X7 con los tratamientos (Figura 50), de forma que los niveles de ARNm de la TNAP resultaron un  $35,4 \pm 9,3\%$  menores cuando se bloqueaba el receptor P2X7 con BBG durante 3 días, mientras que no se modificaron al tratar a las neuronas con AP (Figura 50 C). Por otro lado, los niveles de ARNm del receptor P2X7 aumentaron un  $93,3 \pm 40,8\%$  al mantener a las neuronas durante 3 días en presencia de AP, mientras que no variaron cuando se las trató con el antagonista del receptor, BBG (Figura 50 D). Estos datos demostraban la existencia de una estrecha regulación entre ambas proteínas.



**Figura 50. Expresión de TNAP y el receptor P2X7 en neuronas de hipocampo de ratón en cultivo.** Las neuronas se mantuvieron en ausencia o presencia de BBG (5  $\mu$ M) o AP (4U/mL) y se extrajo proteína y ARNm. A, B. 30 $\mu$ g de proteína se sometieron a electroforesis e inmunotransferencia y las membranas se revelaron con anticuerpos que reconocían la TNAP (A) y el receptor P2X7 (B). Los diagramas de barras representan los niveles de proteína de TNAP (A) y P2X7 (B) referidos a los niveles de  $\alpha$ -tubulina. C, D. Los diagramas de barras representan los porcentajes de las variaciones en los niveles de ARNm de TNAP (A) y P2X7 (B). Los valores aparecen como la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos diferentes. \*  $p < 0.05$ .

## **2. IMPLICACIONES DEL RECEPTOR P2X7 EN LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON.**

Como se ha descrito previamente, en la enfermedad de Huntington (EH) se producen alteraciones sinápticas, tanto a nivel de proteínas implicadas en endocitosis, como en receptores de neurotransmisores (Cha y cols., 1998; Cha y cols., 1999; Li y cols., 2003b; Smith y cols., 2005a). Sin embargo se desconocía el papel que ejercen los receptores purinérgicos en el desarrollo de la enfermedad. Entre los receptores ionotrópicos purinérgicos, la subunidad P2X7 es la más abundante en cerebro medio de ratón (Miras-Portugal y cols., 2003), y ha sido implicada recientemente en los procesos de daño celular en neuronas dopaminérgicas estriatales (Jun y cols., 2007). En este sentido, el tratamiento de dos modelos animales que reproducen la EH (*Caenorhabditis elegans* y *Drosophila*) con fármacos que inhiben el metabolismo, y más específicamente la producción de ATP, reduce la muerte neuronal observada en dichos modelos (Varma y cols., 2007). Por todo esto, nuestro estudio se centró en la implicación de los receptores P2X7 en la enfermedad de Huntington.

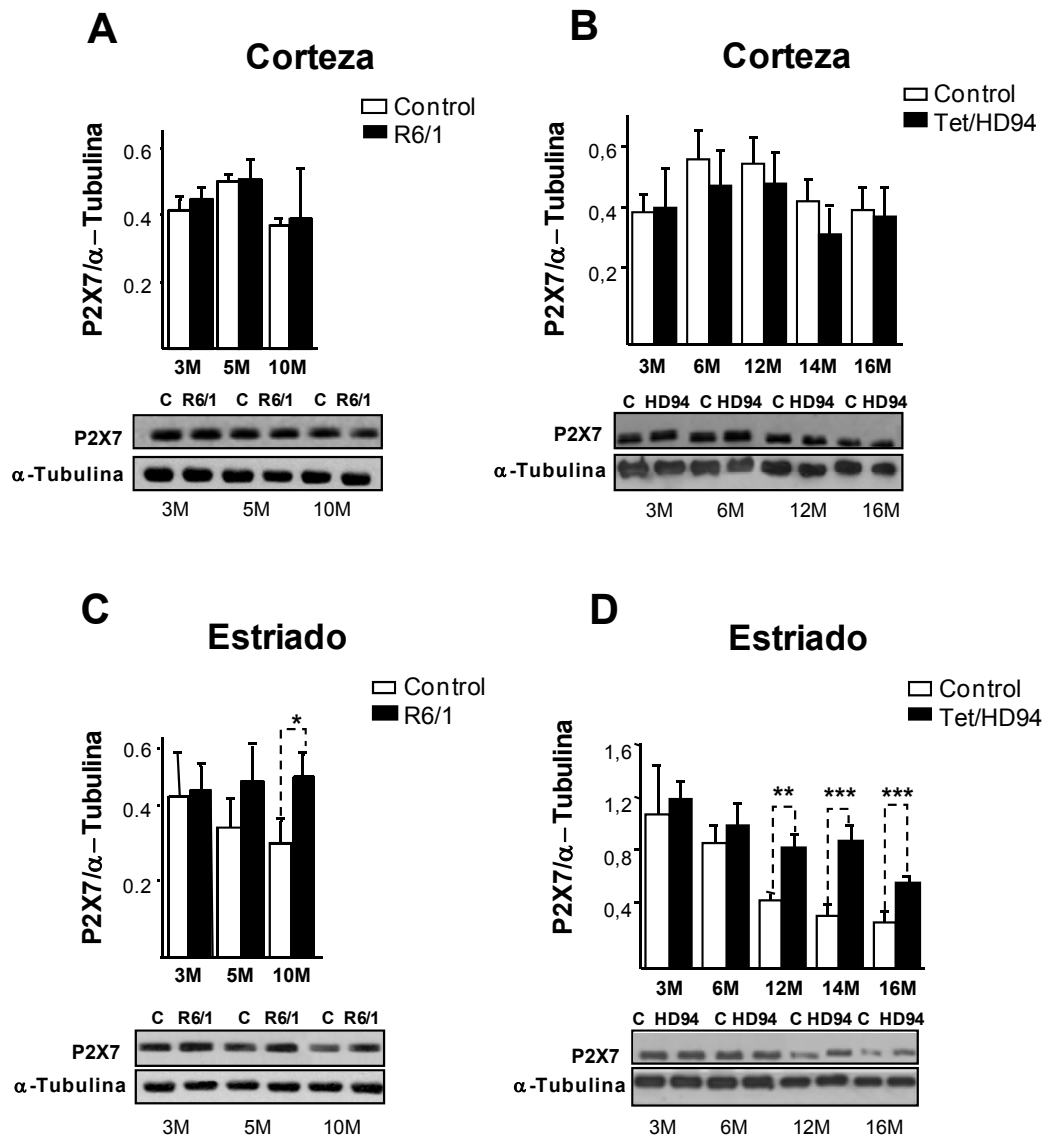
### **2.1 Alteración de los niveles de P2X7 en el cerebro de ratones con enfermedad de Huntington (EH).**

En primer lugar se analizaron, a diferentes edades, los niveles del receptor P2X7 en la corteza y estriado de dos modelos murinos que expresaban el N-terminal de la huntingtina mutada y que reproducen la enfermedad (R6/1 y Tet/HD94).

Como se observa en la Figura 51 A y B, en las diferentes edades analizadas, los niveles del receptor P2X7 en la corteza de los ratones, tanto R6/1 como Tet/HD94, eran similares a los observados en los ratones control.

Por otro lado, aunque no se observaron diferencias significativas en los niveles del receptor P2X7 en el estriado de ratones control y R6/1 a los 3 meses de edad (Figura 51 C); a los 5 meses, coincidiendo con el comienzo de los síntomas motores (Canals y cols., 2004), se observó una tendencia a incrementar los niveles del receptor en el estriado de los ratones con EH. Esta tendencia se tradujo en un incremento significativo de los niveles del receptor

P2X7 en ratones R6/1 de 10 meses de edad comparados con sus correspondientes controles.



**Figura 51. Niveles del receptor P2X7 en corteza y estriado de ratones enfermos de Huntington.** Extractos proteicos de corteza (A y B) y estriado (C y D) de dos modelos de ratón de la enfermedad de Huntington (R6/1, A y C, y Tet/HD94, B y D) de diferentes edades se analizaron por inmunotransferencia utilizando un anticuerpo específico para el receptor P2X7. Los histogramas muestran los niveles de P2X7 normalizados con los valores de la  $\alpha$ -tubulina de estos dos modelos (barras negras), en comparación con sus correspondientes controles (barras blancas). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Al igual que sucedía en los ratones R6/1, los ratones Tet/HD94 (Figura 51 D), cuyo fenotipo aparece de forma más tardía y es menos severo que el de los R6/1, presentaban mayores niveles del receptor P2X7 en el estriado a partir de los 12 meses de edad, tras la aparición de los síntomas motores.

Es importante anotar que los niveles del receptor P2X7 disminuyen progresivamente con la edad en el estriado de los ratones control (Figura 51 C y D), mientras que en los ratones R6/1 y Tet/HD94 no ocurre así. Además, el incremento del receptor en el estriado tiene lugar en ratones sintomáticos, pero a una edad en la que aún no se detecta una muerte neuronal significativa (Díaz-Hernández y cols., 2005).

Parece posible pensar, por lo tanto, que la expresión de la htt mutada atenúe la disminución progresiva del receptor P2X7 en el estriado de los ratones que reproducen la enfermedad.

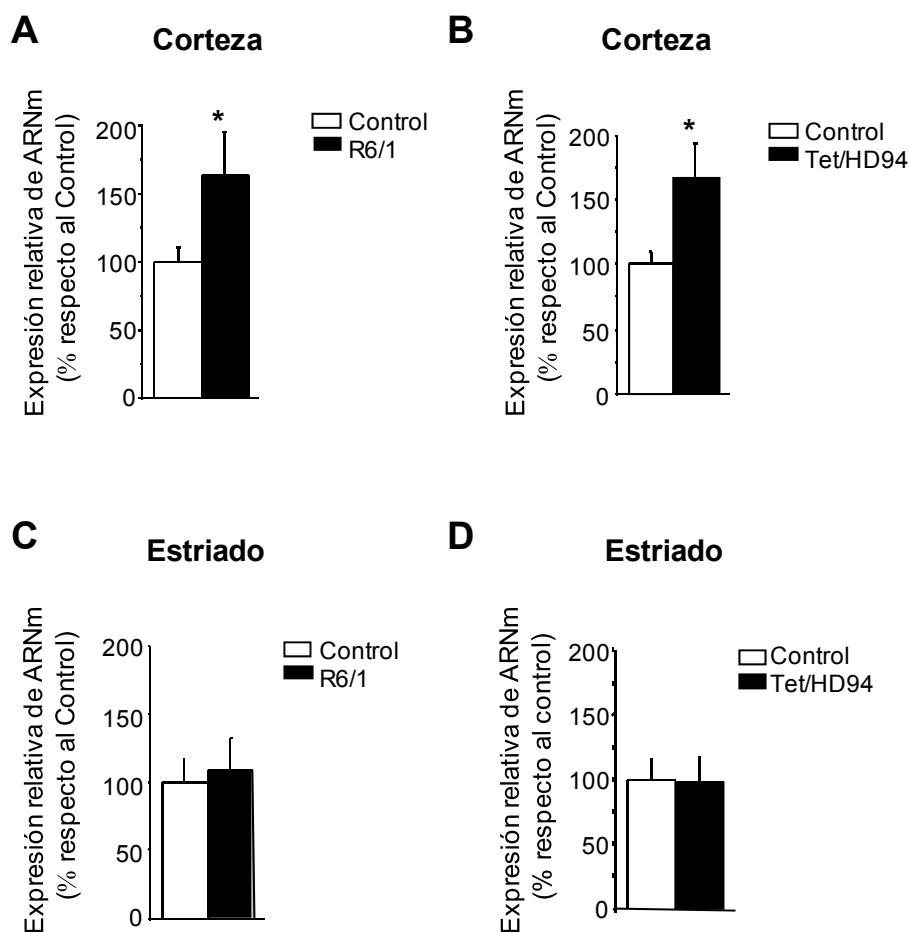
Como ya se ha estudiado en varias ocasiones, la htt expandida es capaz de translocarse al núcleo celular e interactuar con varios factores de transcripción (Li y Li, 2004). Por este motivo, con objeto de comprobar una posible desregulación transcripcional por la htt mutada, se analizaron los niveles de ARNm del receptor P2X7 en corteza y estriado de ratones control y R6/1 y Tet/HD94, de avanzada edad (cuando ya se registraban alteraciones significativas en los niveles de proteína). Los niveles de ARNm del receptor P2X7 resultaron similares en las muestras de estriado de los ratones control y de ambos modelos de ratón (Figura 52 C y D). Sin embargo, en las muestras de corteza se observó un aumento de dicho mensajero de un  $63.23 \pm 22.52\%$  en los ratones R6/1 a 10 meses de edad (Figura 52 A), y de un  $61.7 \pm 21.28\%$  en los ratones Tet/HD94 a 16 meses (Figura 52 B), con respecto a los niveles obtenidos en los ratones control a dichas edades.

## **2.2 Localización del receptor P2X7 en corteza y estriado de ratones que reproducen la enfermedad de Huntington.**

Considerando la localización preferentemente presináptica del receptor P2X7 (Miras-Portugal y cols., 2003; Díaz-Hernández y cols., 2008) y el hecho de que la corteza es la mayor fuente de aferencias axonales al estriado, parecía

## Resultados

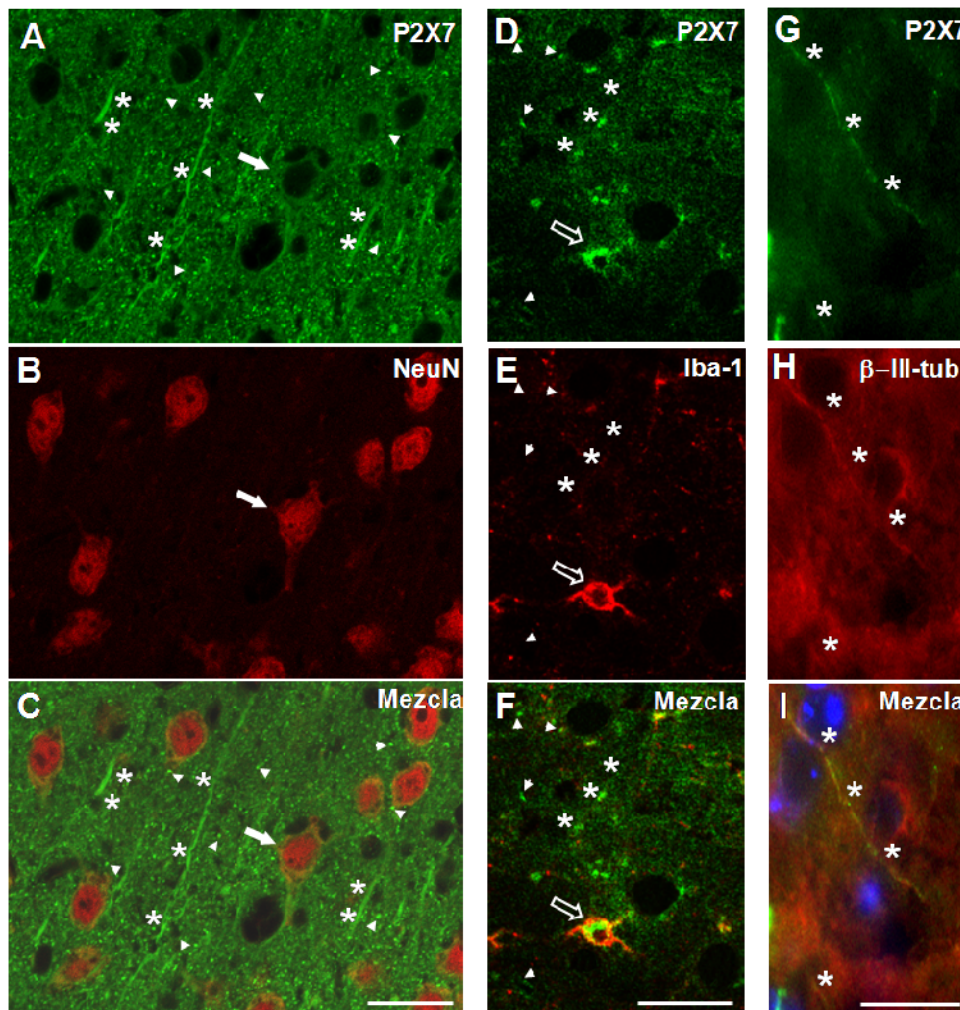
lógico pensar que el aumento de los niveles del P2X7 en el estriado ocurría preferentemente en axones de las neuronas corticales que proyectaban hacia el estriado. Para comprobar esta hipótesis se analizó la localización del receptor en los distintos modelos murinos de la EH, mediante técnicas inmunológicas, empleando anticuerpos específicos.



**Figura 52. Niveles de ARNm del receptor P2X7 en corteza y estriado de ratones enfermos de Huntington.** Se extrajo ARNm de estriado (A y B) y corteza (C y D) de dos modelos de ratón de la enfermedad de Huntington (R6/1, A y C, y Tet/HD94, B y D) en estadios de avanzada enfermedad (16 meses para los Tet/HD94; 9 meses para los R6/1) y se analizó por PCR cuantitativa. Los histogramas muestran los niveles del ARNm del receptor P2X7 normalizados con  $\beta$ -actina de estos dos modelos (barras negras), en comparación con sus correspondientes controles de la misma edad (barras blancas). Los valores aparecen como la media  $\pm$  SEM de 4 ratones diferentes. \*  $p < 0.05$ .

La mayor parte de los somas celulares con expresión de P2X7 se encontraron en la corteza (Figura 53) y no en el estriado (Figura 54). Además, de

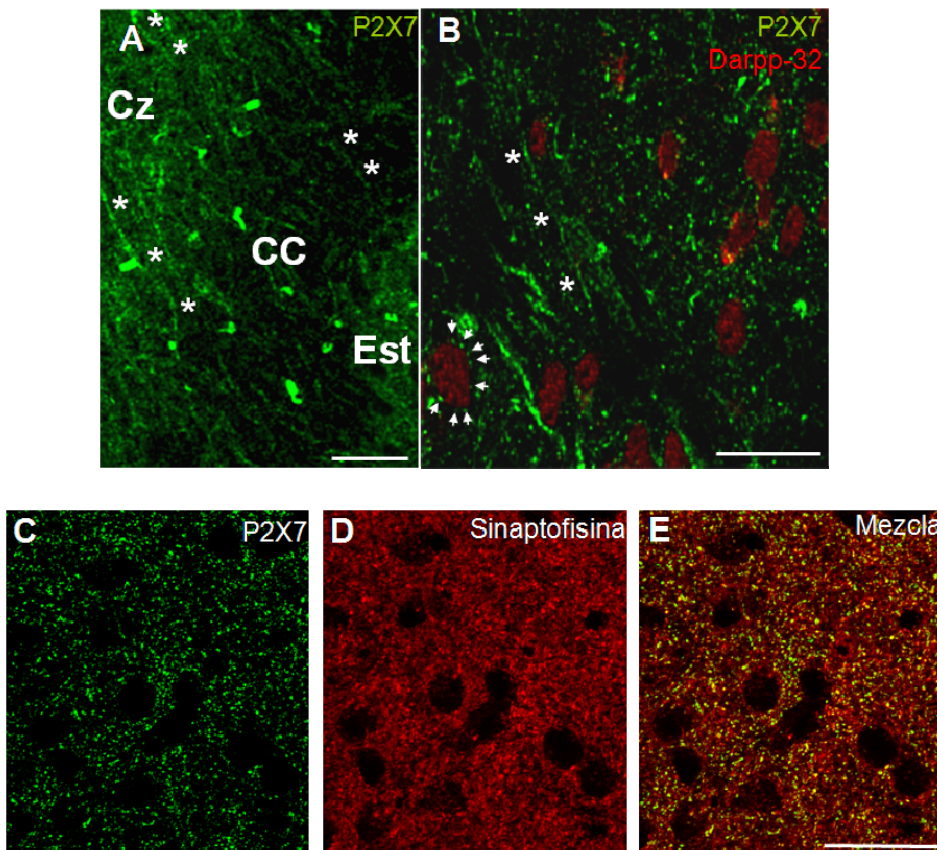
acuerdo a la expresión de ARNm de P2X7 en cerebro de rata descrita por (Yu y cols., 2008b), el doble marcaje con el NeuN reveló que la gran mayoría de las células corticales inmunomarcadas con anticuerpos anti-P2X7 eran de naturaleza neuronal (Figura 53 A-C), mientras que una pequeña fracción de estos somas P2X7 positivos correspondían a células microgliales (Iba-1 positivas, Figura 53 D-F). Además parte de la expresión del receptor se



**Figura 53** Inmunolocalización del receptor P2X7 en corteza de ratones enfermos de Huntington. Las secciones de cerebro de ratones R6/1 de 10 meses de edad se marcaron con anticuerpos para el receptor P2X7 (verde) con doble marcaje (rojo) usando diferentes anticuerpos: anti-NeuN (B), anti-Iba-1 (E) y anti- $\beta$ -III-tubulina (H). En el panel I también se muestra el marcaje nuclear (DAPI, azul). Los asteriscos marcan la trayectoria de las proyecciones P2X7 positivas. Las flechas pequeñas en A-F indican ejemplos de marcaje punteado de terminales sinápticos. Las barras de escala corresponden a 20  $\mu$ m.

## Resultados

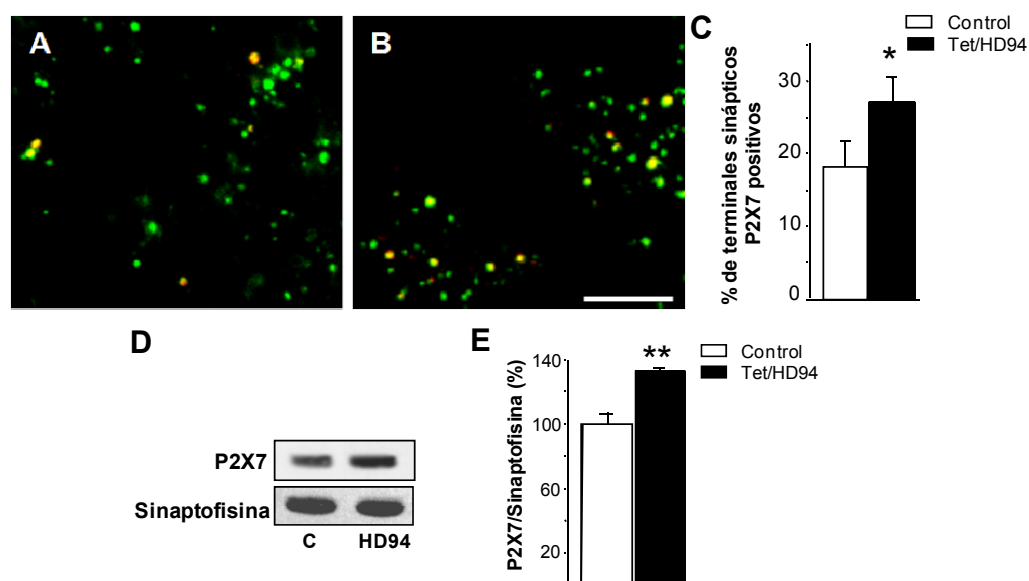
localizaba en las proyecciones o fibras que partían de la corteza para atravesar el cuerpo calloso (asteriscos Figuras 53 y 54) hasta llegar al estriado, donde se observó un marcaje principalmente punteado (cabezas de flechas Figuras 53 y 54 y Figura 54 C-E). El doble marcaje con el marcador neuronal  $\beta$ -III-tubulina confirmó que las proyecciones eran procesos neuronales (Figura 53 G-H). Las dobles inmunofluorescencias con marcadores de neuronas estriatales (DARPP-32, Figura 54 B) y de terminales sinápticos (sinaptofisina, Figura 54 C-E) revelaron que aquellos botones eran terminales nerviosas, la mayoría de los cuales se encontraban bordeando los somas de las neuronas estriatales.



**Figura 54. Inmunolocalización del receptor P2X7 en estriado de ratones enfermos de Huntington.** Las secciones de cerebro de ratones R6/1 de 10 meses de edad se marcaron con anticuerpos para el receptor P2X7 (verde) con doble marcaje (rojo) usando diferentes anticuerpos: Darpp-32 (B) y anti-sinaptofisina (D, E). Cz, corteza; CC, cuerpo calloso; Est, estriado. Los asteriscos marcan la trayectoria de las proyecciones P2X7 positivas. Las flechas pequeñas en A-F indican ejemplos de marcaje punteado de terminales sinápticos. Las barras de escala corresponden a 20  $\mu$ m.

### 2.3 Alteración de la función del receptor P2X7 en terminales sinápticos de ratones Tet/HD94.

En una segunda aproximación se estudió la funcionalidad de los receptores P2X7 en los modelos murinos de la EH. Para abordar este estudio se prepararon sinaptosomas de estriado de ratones Tet/HD94 de 16 meses de edad. De acuerdo a los resultados obtenidos por inmunotransferencia, los terminales nerviosos estriatales de los ratones Tet/HD94 expresaban mayor cantidad de receptor P2X7 que los de los ratones control. Además, como se muestra en la Figura 55 A-C, las dobles inmunofluorescencias con P2X7 y sinaptofisina revelaron que el  $27,1 \pm 3,5\%$  de los sinaptosomas de los ratones Tet/HD94 presentaban el receptor P2X7, frente al  $18,3 \pm 3,2\%$  de los sinaptosomas de los ratones control.

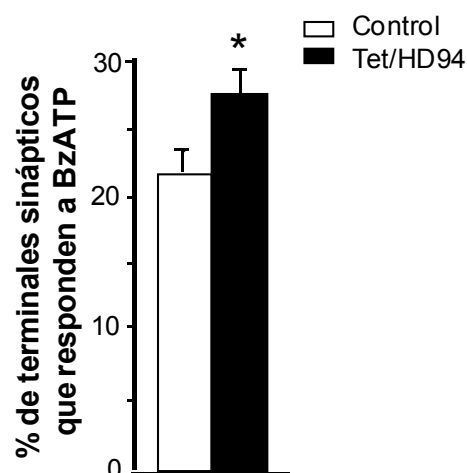


**Figura 55. Elevados niveles del receptor P2X7 en terminales sinápticas de cerebro anterior de ratón enfermo de Huntington.** A-B. Identificación del receptor P2X7 por inmunofluorescencia en preparaciones de sinaptosomas estriatales de ratones control (A) y Tet/HD94 (B) de 14 meses de edad. Barra de escala 20  $\mu\text{m}$ . C. Cuantificación del número de terminales sinápticos doblemente marcados con P2X7 y sinaptofisina, analizados en 10 campos por genotipo (control y Tet/HD94) y seleccionados aleatoriamente, en tres experimentos independientes (~ 700 sinaptosomas por campo). D. Extractos proteicos de las preparaciones sinaptosomales se analizaron por inmunotransferencia utilizando anticuerpos específicos para el receptor P2X7 y para la sinaptofisina. La gráfica muestra los niveles de P2X7 normalizados con los valores de sinaptofisina. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

En una segunda aproximación se analizaron los incrementos de calcio intracelular inducidos por la activación de los receptores P2X7 en terminales nerviosas aislados del estriado de los ratones que reproducen la EH. En estos experimentos se estimularon los terminales nerviosas con un agonista selectivo del receptor P2X7, el BzATP (2',3'-O-(4-benzoil-4-benzoil)-ATP).

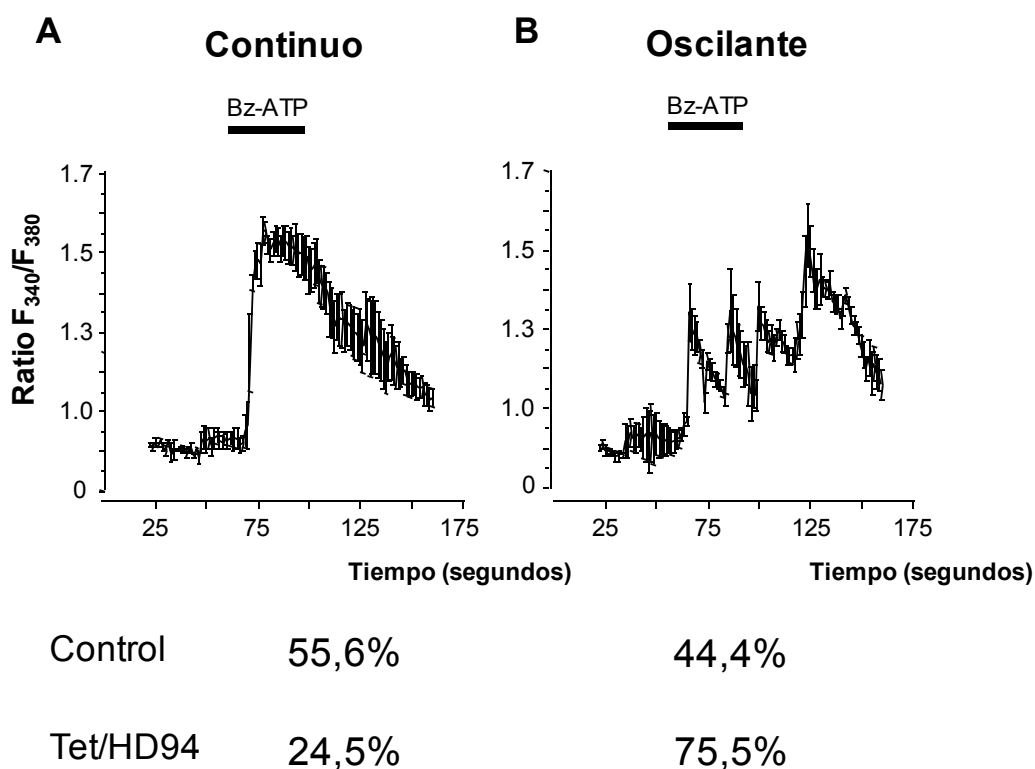
Coincidiendo con el alto porcentaje de terminales sinápticas marcados con anticuerpos anti-P2X7 y anti-sinaptofisina, el porcentaje de sinaptosomas que respondían al agonista fue significativamente mayor en las preparaciones de los ratones Tet/HD94 ( $27,3 \pm 2,0\%$ ) comparado con los ratones control ( $21,6 \pm 1,8\%$ ) (Figura 56).

Además, los registros de imagen de calcio en respuesta a BzATP presentaron dos tipos de cinéticas diferentes (Figura 57). En uno de ellos, los sinaptosomas mostraban una cinética de recuperación lenta, con un pico inicial sostenido durante la exposición a BzATP que disminuía progresivamente durante el lavado (denominamos este perfil como *continuo*, Figura 57 A). El segundo perfil observado mostraba también una cinética de recuperación lenta caracterizada por varios máximos oscilantes, que persistían al menos durante 25 segundos tras retirar el agonista (calificamos este perfil como *oscilante*, Figura 57 B). Mientras que en las preparaciones sinaptosomales de ratones control, ambos perfiles aparecían representados en la misma proporción ( $55,6 \pm 3,2\%$  *continuo*;  $44,4 \pm 4,1\%$  *oscilante*), en los sinaptosomas de ratones Tet/HD94 el porcentaje se inclinaba a favor del oscilante ( $24,5 \pm 3,1\%$  *continuo*,  $75,5 \pm 6,1\%$  *oscilante*) (Figura R34). Estos datos sugerían que, además del aumento de los



**Figura 56. Respuesta a BzATP en sinaptosomas de estriado de ratones control y Tet/HD94.** A. Cuantificación del número de terminales sinápticos control y Tet/HD94 que responden a la estimulación con  $10 \mu\text{M}$  de BzATP. Los datos representan la media  $\pm$  SEM del número de terminales sinápticos que responden a BzATP en nueve campos seleccionados aleatoriamente por genotipo ( $\sim 300$  sinaptosomas por campo).

niveles del receptor en el estriado de ratones con EH, la expresión de la htt mutada alteraba la funcionalidad del receptor P2X7 en la terminal nerviosa.



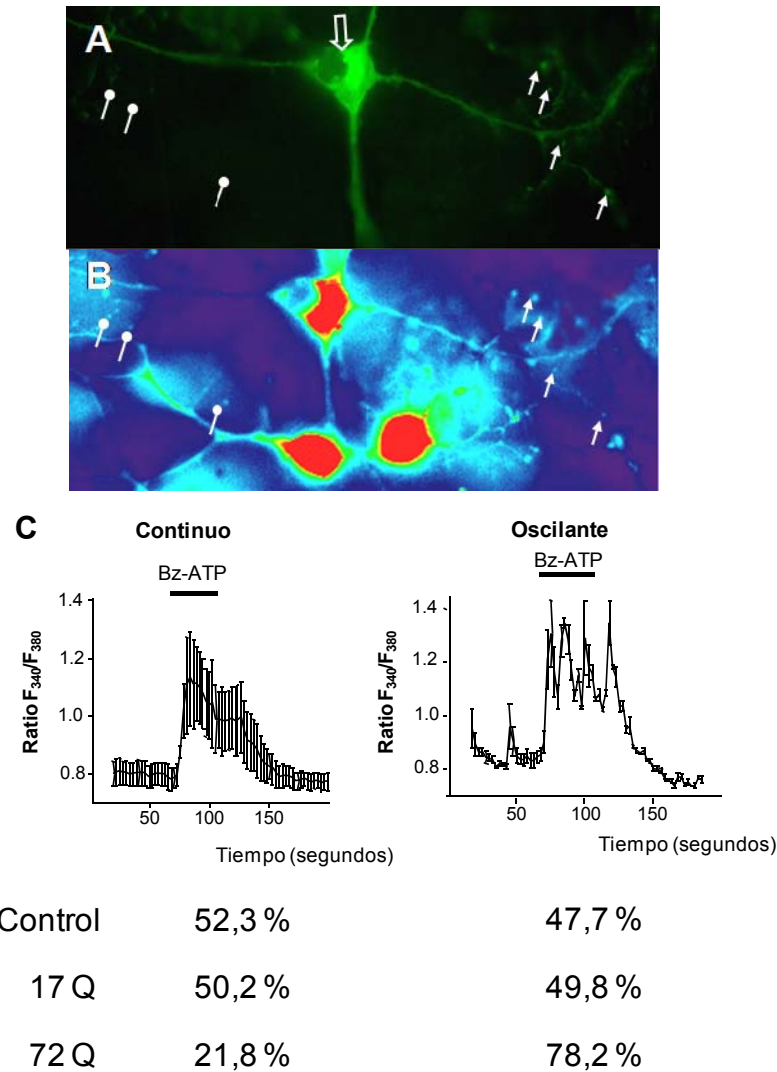
**Figura 57. Perfiles de la respuesta a BzATP en sinaptosomas de estriado de ratones control y Tet/HD94.** A, B. Perfiles representativos de fluorescencia de fura-2 obtenidos tras la estimulación de terminales sinápticos con BzATP 10  $\mu$ M. Las barras negras situadas sobre los perfiles indican los periodos de estimulación con Bz-ATP. Se indican también los porcentajes de terminales sinápticos que muestran cada tipo de perfil cinético en ambos genotipos. La funcionalidad de todos los terminales analizados se verificó estimulando con  $K^+$  (30mM). \*  $p < 0,05$ .

#### **2.4 Alteración de la funcionalidad del receptor P2X7 en neuronas primarias que expresan la huntintina mutada.**

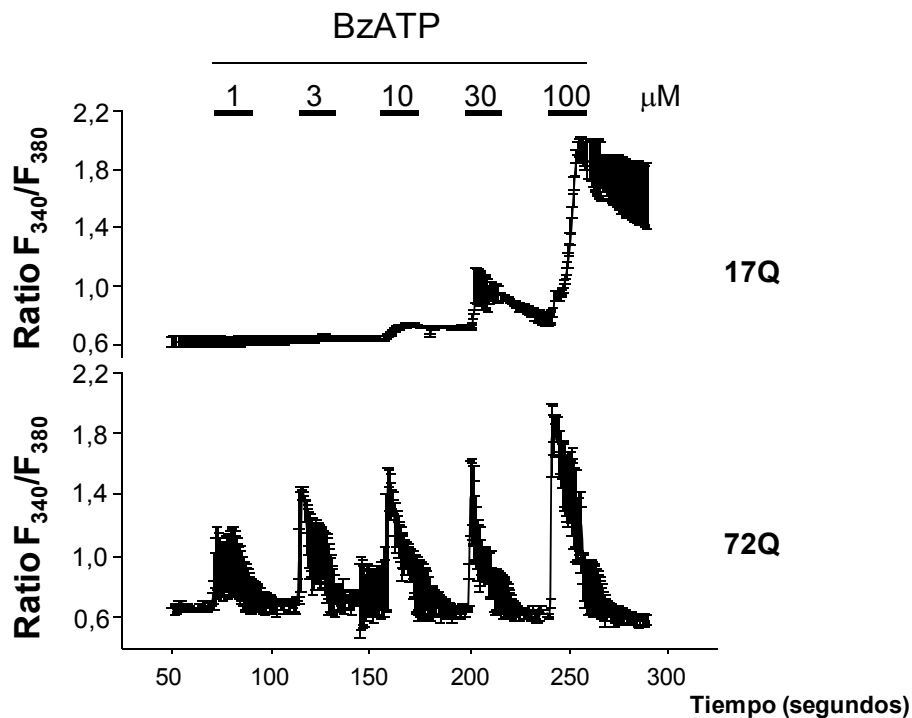
Con objeto de analizar en profundidad el efecto que la htt mutada induce sobre el receptor P2X7, se transfectaron neuronas corticales procedentes de ratones control con plásmidos que expresaban el exon 1 de la htt con 17 ó 72 repeticiones de glutamina (17Q o 72Q), fusionado a la proteína GFP (Figura 58 A). Mediante técnicas de microfluorimetría, se analizaron las respuestas inducidas por el BzATP en somas y terminales sinápticos de las neuronas que

expresaban los distintos fragmentos N-terminales de htt, así como en las neuronas control (Figura 58 B). Coincidiendo con los resultados obtenidos en las preparaciones sinaptosomales, se registraron dos tipos de cinéticas de respuesta inducidas por el agonista selectivo del receptor P2X7 en los terminales nerviosos de las neuronas analizadas, uno *continuo* y otro *oscilante* (Figura 58 C). De acuerdo con los datos obtenidos de las preparaciones sinaptosomales de los ratones control, aproximadamente la mitad de los terminales de las neuronas control (sin transfectar) y de las transfectadas con el fragmento de 17Q presentaban uno de los dos perfiles cinéticos descritos, y la otra mitad el otro perfil correspondiente ( $52,3 \pm 3,1\%$  *continuo* y  $47,7 \pm 4,5\%$  *oscilante*, en terminales control;  $50,2 \pm 1,9\%$  *continuo* y  $49,8 \pm 3,5\%$  *oscilante*, en terminales de 17Q). Sin embargo, el porcentaje de neuronas transfectadas con el fragmento de 72Q que presentó el perfil *oscilante* fue mucho mayor que el porcentaje del perfil *continuo* ( $78,2 \pm 9,5\%$  del primero frente al  $21,8 \pm 7,5\%$  del segundo).

Por otro lado, en el soma neuronal se registró una cinética de respuesta inducida por BzATP caracterizada por un máximo seguido de una recuperación rápida (Figura 59). Además, la expresión del N-terminal de la htt con 72 repeticiones de glutamina producía un incremento en la afinidad del receptor por el agonista, dado que se activaba con concentraciones de BzATP que no inducían respuesta en los somas que expresaban el N-terminal de la htt con 17Q (Figura 59). Más concretamente, la  $EC_{50}$  obtenida para el BzATP fue de  $37,9 \pm 1,21 \mu\text{M}$  en las neuronas con 17Q, y de  $4,91 \pm 1,86 \mu\text{M}$  en las neuronas con 72Q (Figura 60 A). El aumento en la afinidad del receptor P2X7 inducido por la huntingtina mutada fue confirmado mediante el empleo de ratones deficientes en P2X7. Así, cuando se analizó la respuesta a BzATP en las neuronas corticales en cultivo procedentes de estos ratones, se observó que la expresión de la htt\* no modificaba la afinidad del receptor por su ligando.

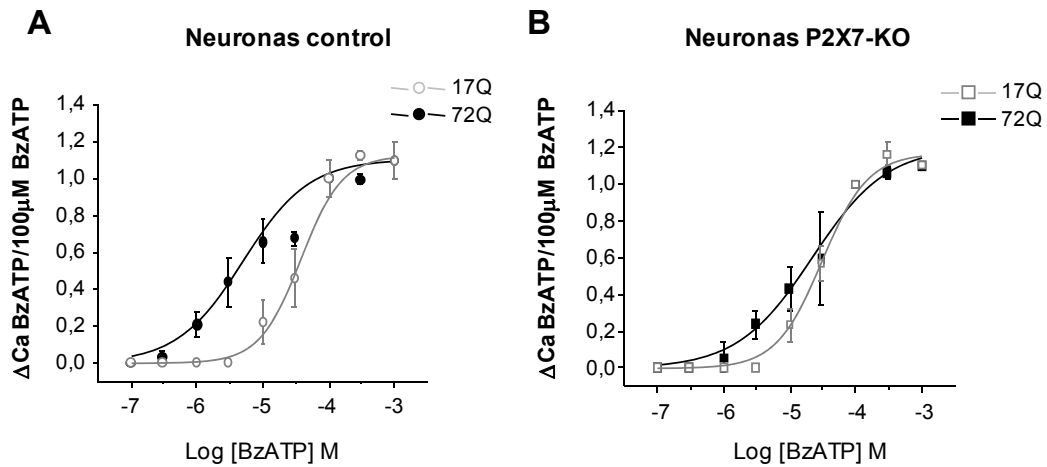


**Figura 58. Alteración de las respuestas de calcio mediadas por P2X7 en terminales sinápticos de neuronas que expresan la huntingtina con elevado número de repeticiones de CAG.** Se transfectoron cultivos primarios de neuronas de corteza de ratones control con plásmidos que expresaban la huntingtina con 17 ó 72 repeticiones de glutamina (17Q o 72Q) fusionada a la GFP. Se analizó la respuesta a BzATP (10  $\mu$ M) en los terminales sinápticos de las neuronas que expresaban la huntingtina mutada (reconocidas por la expresión de la GFP) y de las neuronas no transfectoradas, como control. A. Fluorescencia de la GFP de una neurona representativa transfectorada con 72Q. B. Imagen de fluorescencia de fura-2 del mismo campo que en A que también presenta de neuronas sin transfectar. A y B. Las flechas indican terminales nerviosas de la neurona transfectorada, mientras que las flechas de cabeza redonda señalan terminales de neuronas sin transfectar. C. Perfiles representativos de la respuesta a BzATP (10  $\mu$ M) en terminales sinápticos de neuronas control (sin transfectar) y transfectoradas con 17Q o 72Q. Las barras negras situadas sobre los perfiles indican los periodos de estimulación con Bz-ATP. Se indican también los porcentajes de terminales sinápticos que muestran cada tipo de perfil cinético. La funcionalidad de todos los terminales analizados se verificó estimulando con  $K^+$  (30mM).



**Figura 59. Alteración de las respuestas de calcio mediadas por P2X7 en somas de neuronas que expresan la huntingtina con elevado número de repeticiones.** Se transfectaron cultivos primarios de neuronas de corteza de ratones control con plásmidos que expresaban la huntingtina con 17 ó 72 repeticiones de glutamina (17Q o 72Q) fusionada a la GFP. Se analizó la respuesta a BzATP (10  $\mu\text{M}$ ) en los somas de las neuronas que expresaban la huntingtina mutada (reconocidas por la expresión de la GFP). La gráfica muestra los perfiles representativos de la respuesta a concentraciones crecientes de BzATP (1-100  $\mu\text{M}$ ) en somas de neuronas transfectadas con 17Q y 72Q. Las barras negras situadas sobre los perfiles indican los periodos de estimulación con BzATP. La funcionalidad de todos los somas se verificó estimulando con  $\text{K}^+$  (30mM).

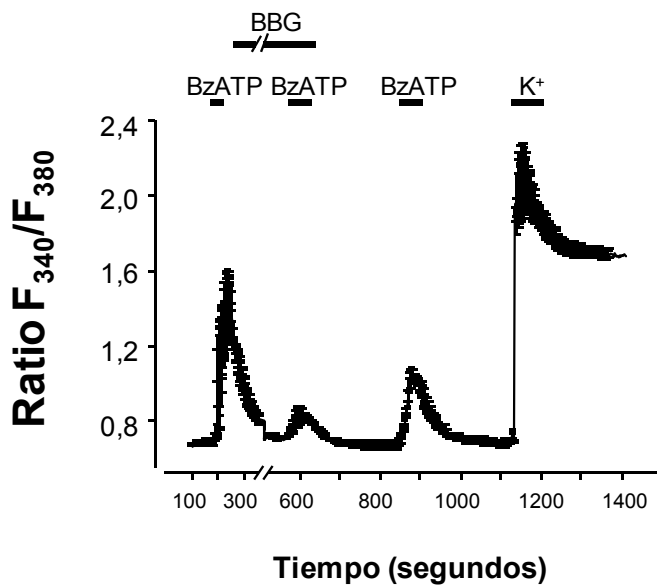
Por último, con motivo de asegurar la implicación del receptor P2X7 en las respuestas inducidas por BzATP, las neuronas (transfectadas y control) fueron preincubadas con el antagonista selectivo del receptor BBG (1  $\mu\text{M}$ ). La presencia de este antagonista disminuyó la respuesta producida por la estimulación con BzATP (Figura 61), confirmando la participación del P2X7 en estos efectos.



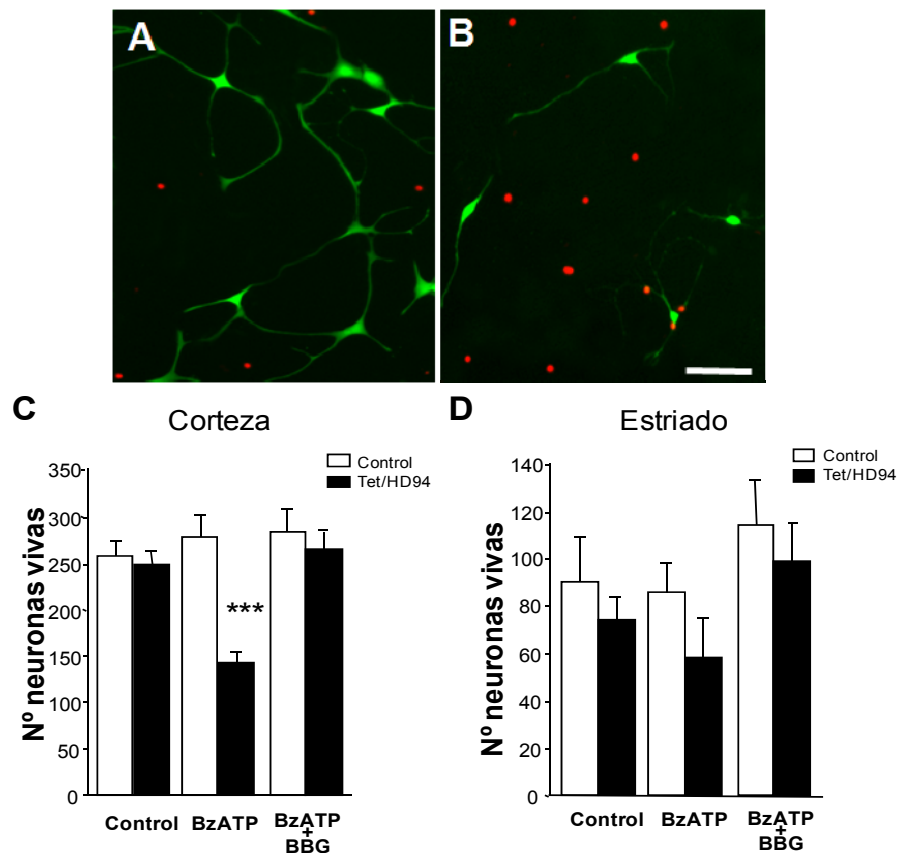
**Figura 60. Curvas dosis respuesta para el BzATP en neuronas de ratones control y P2X7 KO transfectadas con 17Q o 72Q.** Las curvas se obtuvieron mediante aplicaciones consecutivas de BzATP en ausencia de iones magnesio en el medio. Los valores de cada punto equivalen al valor medio del incremento de calcio  $\pm$  SEM para cada concentración de agonista.

### 2.5 Incremento de la vulnerabilidad a la apoptosis mediada por P2X7 de las neuronas de ratón Tet/HD94 en cultivo.

Con objeto de comprobar si las alteraciones que la htt mutada induce en la funcionalidad del receptor P2X7 sensibilizaban a las neuronas que expresaban la htt mutada frente a la apoptosis desencadenada por el ATP extracelular, se diseñaron ensayos de supervivencia en cultivos de neuronas corticales y estriales de ratones Tet/HD94 (Figura 62 A y B).



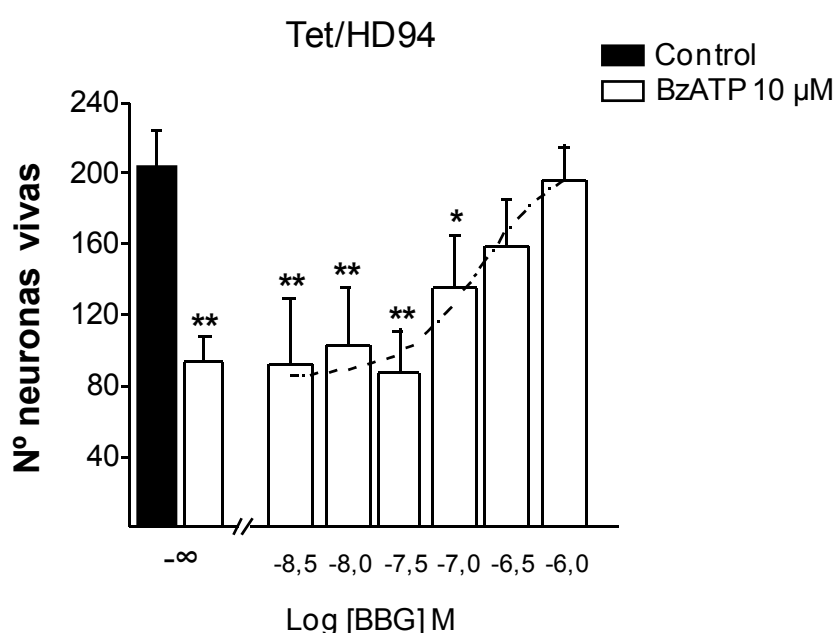
**Figura 61. El BBG inhibe la respuesta inducida por BzATP.** La preincubación con BBG (1  $\mu$ M) de los cultivos de neuronas de corteza bloqueó el incremento intracelular de calcio inducido por la estimulación con BzATP (10  $\mu$ M). Las barras negras situadas sobre los perfiles indican los periodos de incubación y estimulación con BBG y BzATP. La funcionalidad de las neuronas se verificó estimulando con  $K^+$  (30mM).



**Figura 62. Efecto del BzATP en la supervivencia de cultivos primarios de neuronas de ratones Tet/HD94.** Se trataron cultivos primarios de neuronas de corteza y estriado de ratones control y Tet/HD94 durante 2 horas con BzATP (10  $\mu$ M) y 48 horas después se analizó la supervivencia de las neuronas por el método de yoduro de propidio/calceína. A, B. Imágenes de fluorescencia de cultivos de neuronas corticales de ratones control (A) y Tet/HD94 (B). En verde se muestran las neuronas vivas (calceína) y en rojo las muertas (yoduro de propidio). Barra de escala 100  $\mu$ m. C, D. Cuantificación de las neuronas vivas control o tratadas con BzATP en presencia o ausencia de BBG (1  $\mu$ M, preincubado durante 20 minutos antes de añadir el BzATP). Los datos representan las medias  $\pm$  SEM de las neuronas analizadas en 9 campos (seleccionados aleatoriamente) por tratamiento y genotipo ( $\sim$  350 neuronas por campo) de dos experimentos independientes. \*\*\*  $p = 0,001$

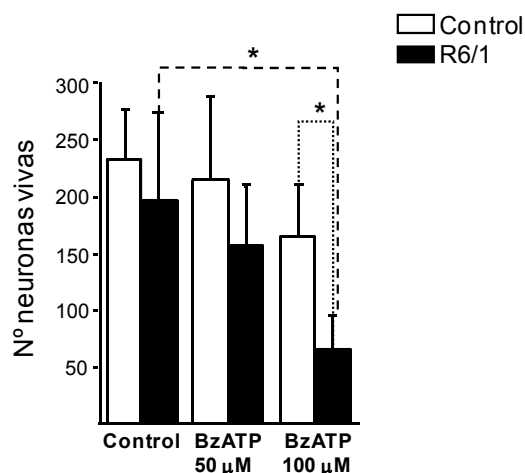
Como se había descrito previamente, la viabilidad de los cultivos de neuronas corticales y estriatales de ratones Tet/HD94 era similar a la de los cultivos de ratones control (Martin-Aparicio y cols., 2001) (Figura 62 C y D, barras blancas). Sin embargo, el tratamiento con BzATP 10  $\mu$ M disminuía de forma significativa la supervivencia de las neuronas corticales de los ratones Tet/HD94 un  $46,1 \pm 7,7\%$  (Figura 62 A-C). En el caso de las neuronas estriatales

de los ratones Tet/HD94, el tratamiento con BzATP también reducía la supervivencia, aunque no de forma significativa (Figura 62 D). No obstante, al preincubar las neuronas corticales con diferentes dosis del antagonista del P2X7 BBG (0,3 nM a 1  $\mu$ M) durante los 20 minutos previos a la adición del BzATP, se redujo de forma significativa la muerte inducida por BzATP (Figura 62 C, 63). Concretamente, la muerte neuronal observada tras el tratamiento con BzATP era totalmente inhibida con la preincubación con 1  $\mu$ M de BBG, presentando un valor de IC<sub>50</sub> de  $170,07 \pm 1,38$  nM (Figura 63).



**Figura 63.** Curva dosis respuesta del efecto protector del BBG en la muerte inducida por BzATP en cultivos primarios de neuronas de corteza de ratones Tet/HD94. En todos los casos el BBG se preincubó durante 20 minutos antes de la estimulación con el BzATP (10  $\mu$ M). \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ .

Además se realizaron cultivos de neuronas de corteza de ratones R6/1 y control y se analizó el efecto del BzATP en la supervivencia neuronal. Coincidiendo con los resultados obtenidos en los cultivos de los ratones Tet/HD94, el BzATP indujo la muerte de las neuronas de los R6/1 a dosis que no afectaban a la supervivencia de las neuronas de los ratones control (Figura 64).



**Figura 64. Efecto del BzATP en la supervivencia de en cultivos primarios de neuronas de ratones R6/1.** Se trataron cultivos primarios de neuronas de corteza durante 2 horas con BzATP (10 µM) y 48 horas después se analizó la supervivencia de las neuronas por el método de yoduro de propidio/calceína. La gráfica muestra la cuantificación de las neuronas vivas tratadas con BzATP representada como las medias  $\pm$  SEM de las neuronas analizadas en 9 campos (seleccionados aleatoriamente) por tratamiento y genotipo (~ 350 neuronas por campo) de dos experimentos independientes. \*  $p < 0,05$

## **2.6 La inhibición *in vivo* del receptor P2X7 en ratones modelo de la enfermedad de Huntington induce una mejora en el déficit motor y disminuye la apoptosis neuronal.**

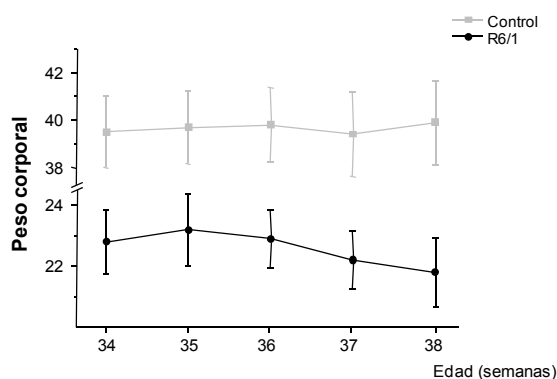
Para afrontar este estudio se seleccionó el modelo R6/1, puesto que es un modelo bien caracterizado (Mangiarini y cols., 1996) que permite seguir de forma cómoda la evolución de la enfermedad. La aparición de los síntomas en este modelo murino ocurre a las 15-21 semanas de vida aproximadamente, y la esperanza de vida máxima es de 40 semanas. Esto concede un periodo mínimo de 10 semanas para el estudio de la evolución de los síntomas.

Además, los niveles del receptor P2X7 se mantienen elevados de forma significativa en el estriado de los R6/1 a partir de los 8 meses de edad (aproximadamente a las 32 semanas), por ello se eligió la edad de 34 semanas de vida de los ratones como edad de comienzo del tratamiento.

### **Caracterización del modelo.**

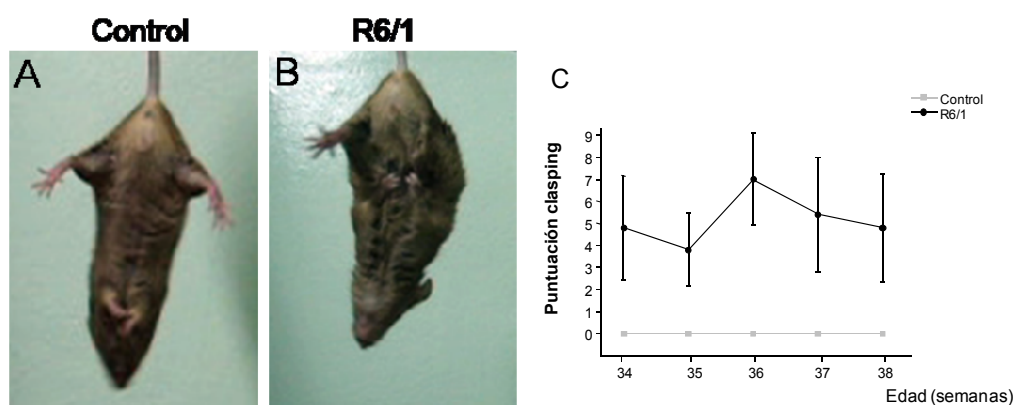
Antes de comenzar el tratamiento con el antagonista selectivo del receptor P2X7, BBG, se realizó un seguimiento exhaustivo de los ratones R6/1 desde las 34 hasta las 38 semanas, sometiéndolos a diferentes tests (apartado 12, Métodos).

Fenotípicamente los ratones R6/1 de 34 semanas mostraban menor tamaño corporal, debilidad motora y enlentecimiento del movimiento. Como se muestra en la Figura 65, los ratones R6/1 partían de casi la mitad de peso que los control y continuaban perdiendo peso con el tiempo, mientras que los control se mantenían.

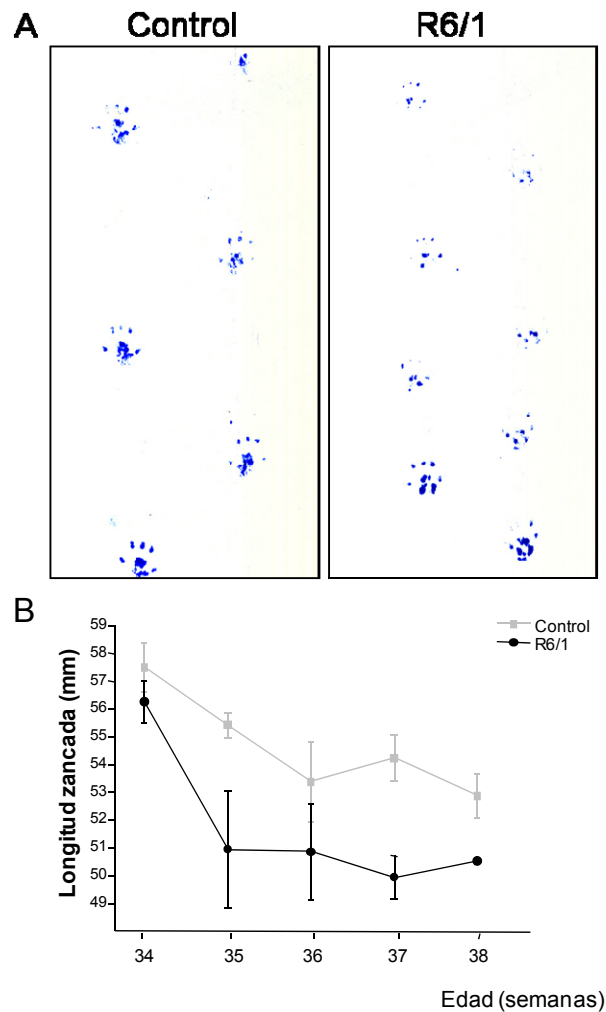


**Figura 65. Evolución del peso corporal de los ratones R6/1 en estadios de avanzada enfermedad.** Los valores de cada punto equivalen a la media  $\pm$  SEM del peso de 9 a 11 ratones de cada genotipo.

En el test de claspings y de longitud de la zancada, la disfunción motora de los ratones R6/1 era bastante evidente, como se observa en las Figuras 66 y 67. Los ratones R6/1 presentaban retracción en las patas al suspenderlos por la cola (Figura 66 B) y menor longitud en sus zancadas (Figura 67 A y B), pero, salvo un empeoramiento en la primera semana, se mantenían con el tiempo.

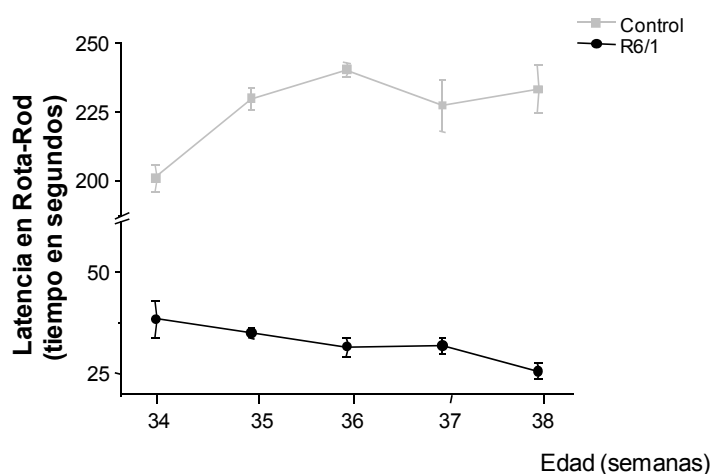


**Figura 66. Evolución de la puntuación de claspings de los ratones R6/1 en estadios de avanzada enfermedad.** A, B. Imágenes representativas del test de suspensión de la cola de ratones control (A) y R6/1 (B) de 38 semanas de edad. C. La gráfica muestra la media  $\pm$  SEM de la puntuación del claspings de 9 a 11 ratones de cada genotipo.



**Figura 67. Evolución de la longitud de la zancada de los ratones R6/1 en estadios de avanzada enfermedad.** A. Imágenes representativas de la longitud de la zancada de ratones control y R6/1 de 38 semanas de edad. B. Los valores de cada punto equivalen a la media  $\pm$  SEM de la longitud de la zancada de 9 a 11 ratones de cada genotipo.

Por último, en el test del Rota-Rod para analizar la coordinación motora, al igual que ocurría con el peso corporal, las diferencias entre ratones control y R6/1 eran extremadamente evidentes (Figura 68). Mientras que los ratones control aguantaban más de 200 segundos sobre el aparato y aumentaba progresivamente su tiempo de permanencia en el Rota-Rod cada semana, los ratones R6/1 no superaban los 40 segundos y empeoraban progresivamente con la edad.



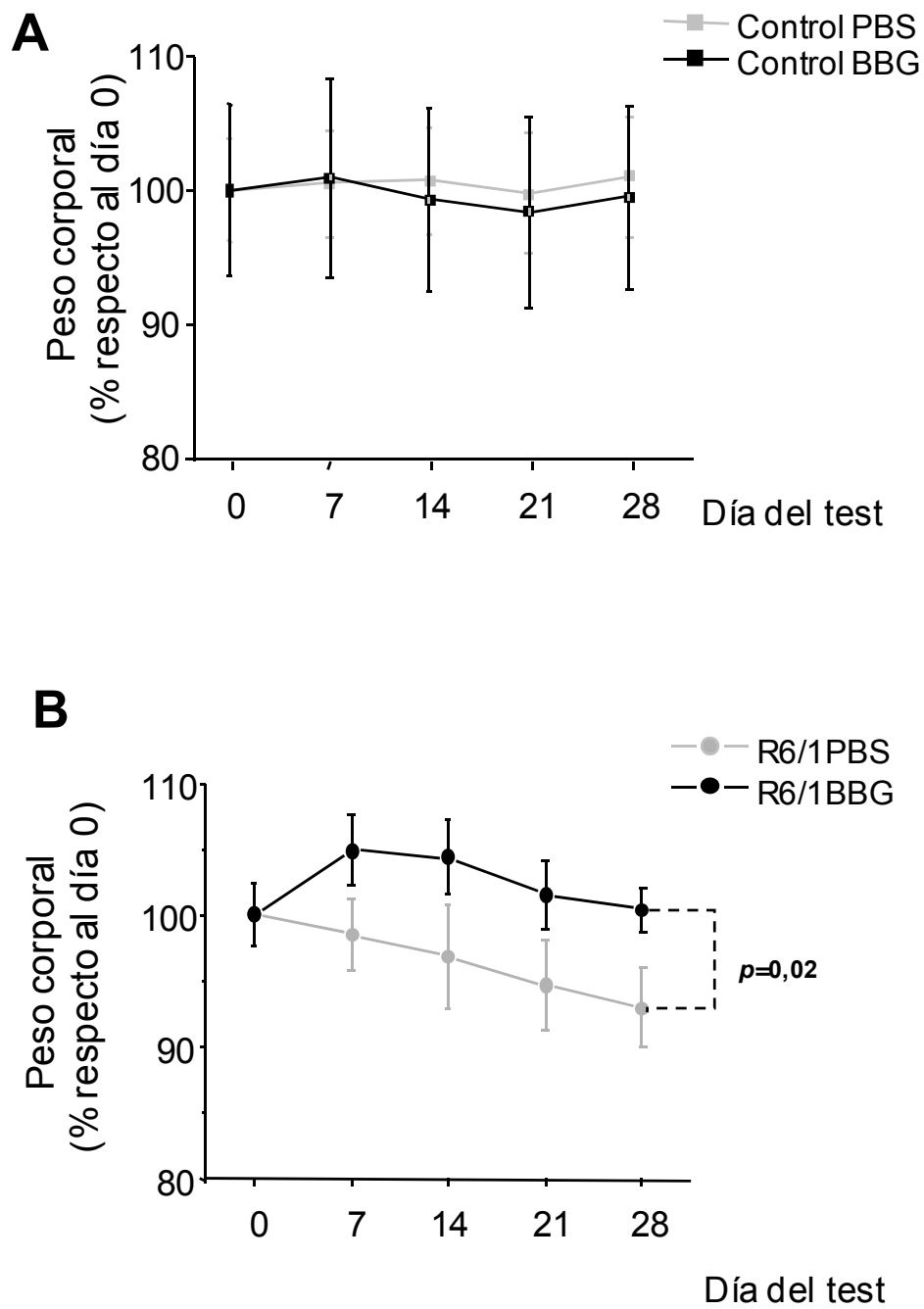
**Figura 68. Evolución de la latencia en el Rota-Rod de los ratones R6/1 en estadios de avanzada enfermedad.** Los valores de cada punto equivalen a la media  $\pm$  SEM del tiempo de permanencia en el Rota-Rod de 9 a 11 ratones de cada genotipo.

#### **Tratamiento con BBG de ratones adultos que reproducen la enfermedad de Huntington.**

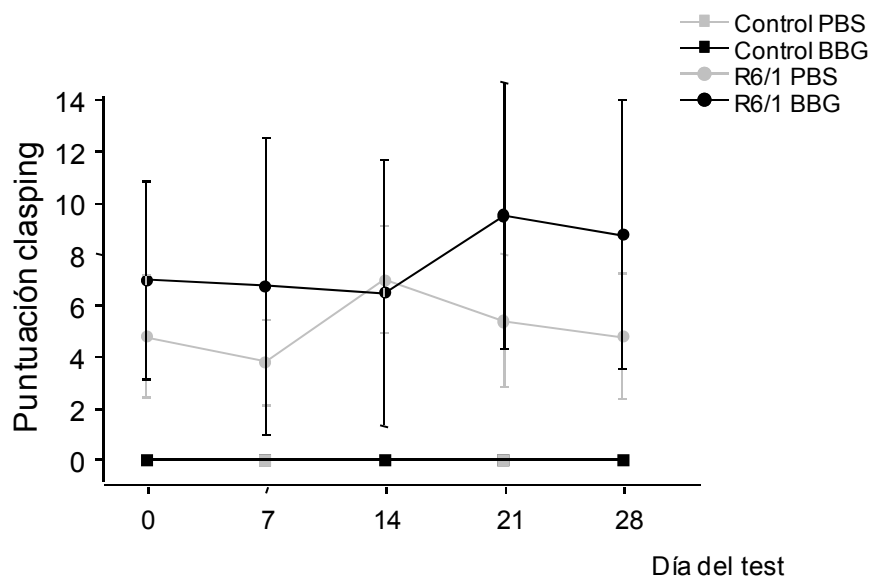
El tratamiento consistió en la administración vía intraperitoneal de 45,5 mg de BBG por kg de peso corporal (45,5 mg/kg) cada 48 horas durante 4 semanas. El tratamiento se administró tanto a ratones R6/1 como a ratones control de 34 semanas de vida. Esta dosis permitía alcanzar una concentración cerebral en los ratones tratados de  $152,6 \pm 2,56$  nM (ver Métodos apartado 12.2), que se encontraba en el rango de concentración como antagonista del BBG (10-200nM) (Jiang y cols., 2000b).

Los ratones R6/1 tratados con la solución vehículo (PBS) presentaron una disminución progresiva del peso corporal similar a la descrita para los ratones R6/1 sin tratar (Figura 65 y 69 B). Sin embargo, la administración de BBG previno completamente esta pérdida de peso (Figura 69 B). Además, ninguno de los tratamientos, vehículo o BBG, provocó cambios evidentes en el peso corporal de los ratones control (Figura 69 A).

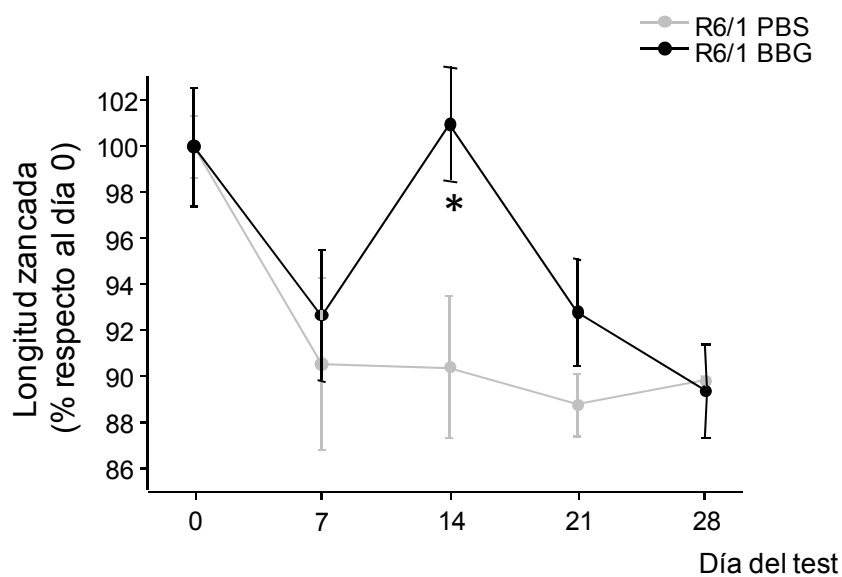
Por otro lado, como se muestra en las Figuras 70 y 71, no se observaron modificaciones significativas en la evolución del clamping y de la longitud de la zancada de los animales control y R6/1 tratados con BBG, con respecto a los tratados con la solución vehículo.



**Figura 69. Evolución del peso corporal de ratones control y R6/1 de avanzada edad tratados con BBG.** Los valores de cada punto equivalen al porcentaje de la media  $\pm$  SEM del peso corporal de 9 a 11 ratones de cada genotipo.



**Figura 70. Evolución de la puntuación en el test de clasping de ratones control y R6/1 de avanzada edad tratados con BBG.** Los valores de cada punto equivalen a la media  $\pm$  SEM de 9 a 11 ratones de cada genotipo.

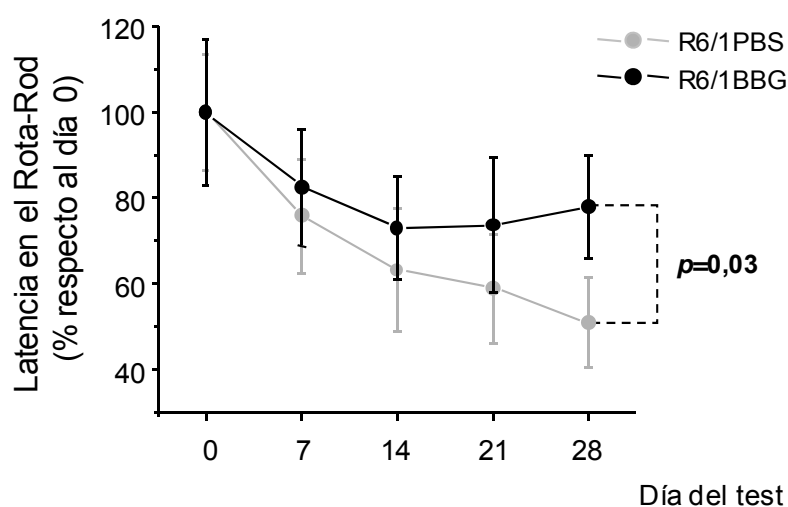


**Figura 71. Análisis de la longitud de la zancada en ratones R6/1 de avanzada edad tratados con BBG.** Los valores de cada punto equivalen al porcentaje de la media  $\pm$  SEM de 9 a 11 ratones de cada genotipo. \*  $p < 0,05$ .

Por último se analizó la coordinación motora de los animales en el Rota-Rod. Los ratones R6/1 tratados con la solución vehículo mostraron un deterioro significativo en su capacidad motora en la cuarta semana del tratamiento

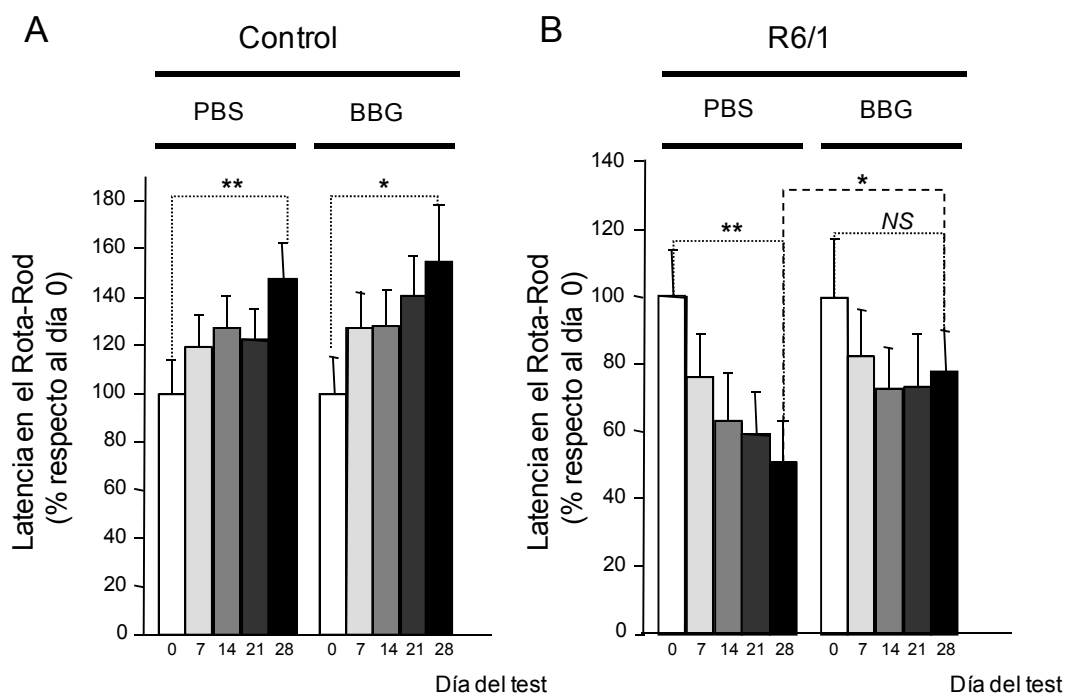
## Resultados

( $p=0,009$ ), mientras que en los ratones tratados con BBG no ocurrió así (Figuras 72 y 73 B). Al final del ensayo los animales en tratamiento con BBG realizaban la prueba significativamente mejor que aquellos animales tratados con la solución vehículo ( $p= 0,03$ ; Figura 72 y 73). Sin embargo, el tratamiento no afectó a la coordinación motora de los ratones control, dado que tanto los tratados con PBS como con BBG, independientemente del tratamiento recibido, mostraron una mejoría progresiva en el desarrollo del test ( $p=0,01$  y  $p=0,03$ ) (Figura 73).



**Figura 72. Análisis de la coordinación motora en el test de aceleración del Rota-Rod de ratones R6/1 de avanzada edad tratados con BBG.** Los valores de cada punto equivalen al porcentaje de la media  $\pm$  SEM del tiempo de latencia hasta la caída de 9 a 11 ratones de cada genotipo.

En vista de la mejora observada en los ratones R6/1 con el antagonista de P2X7, BBG, se decidió probar también un nuevo antagonista, el A-438079, cuya administración aguda en ratas es capaz de modular la nocicepción patológica (Nelson y cols., 2006; McGaraughty y cols., 2007). Conociendo la  $IC_{50}$  del antagonista en la reversión aguda de la alodinia en ratas ( $76 \mu\text{mol/kg}$ ) (Nelson y cols., 2006), decidimos administrar  $100 \mu\text{mol/kg}$  cada 24 horas a ratones control y R6/1 de 34 semanas de edad (como en el caso anterior) durante 4 semanas. Únicamente se registraron el peso y el tiempo de latencia en Rota-Rod (pruebas que el tratamiento con BBG fue capaz de mejorar), con el fin de estresar lo mínimo a los ratones.



**Figura 73. Evolución de la latencia en el Rota-Rod de ratones control y R6/1 de avanzada edad tratados con BBG.** Los valores de cada punto equivalen al porcentaje de la media  $\pm$  SEM del tiempo de permanencia en el Rota-Rod de 9 a 11 ratones de cada genotipo. \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ .

Como se muestra en la Figura 74 A, la administración de A-438079 provocó una marcada tendencia preventiva de la disminución del peso corporal de los ratones tratados con la solución vehículo (solución salina) ( $p = 0,07$ ).

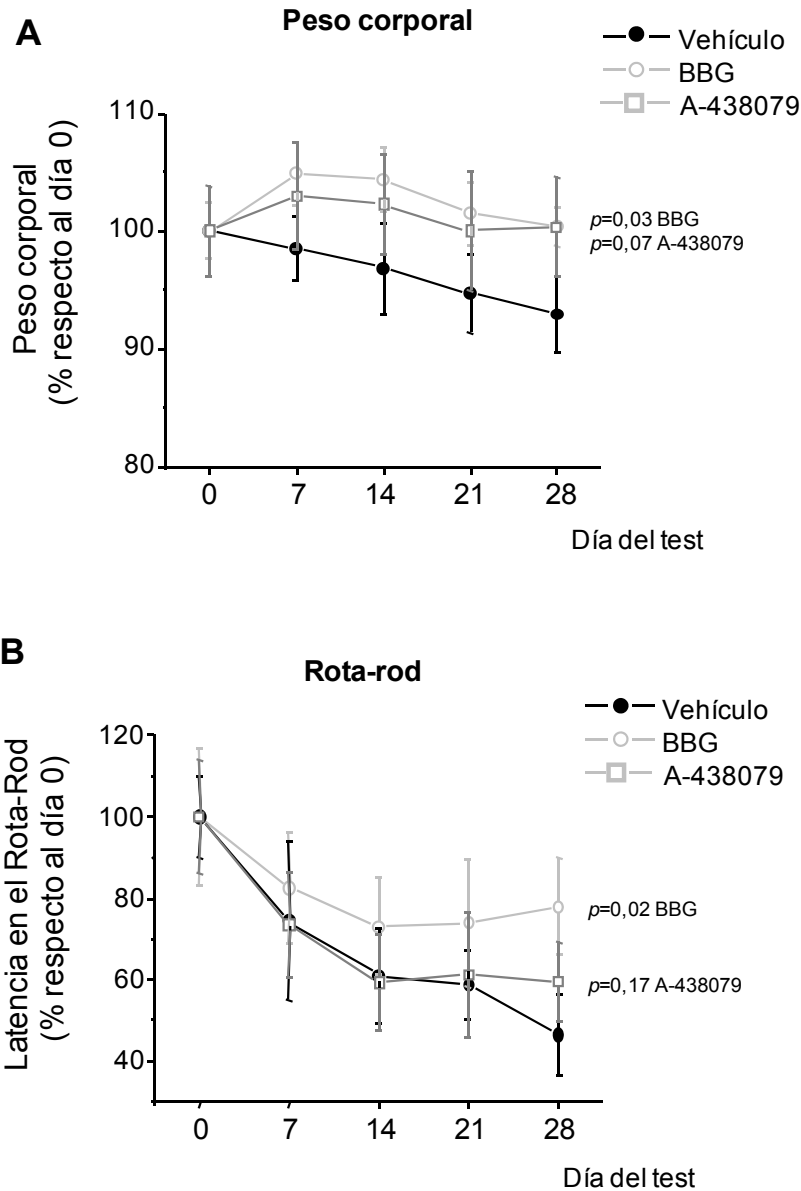
Sin embargo, en el test de Rota-Rod, la administración de este antagonista no generó una mejora significativa en el comportamiento motor de los ratones R6/1, a excepción del último día del test (tras 28 días de administración), en el cual se observaba una moderada mejora, pero no significativa (Figura 74 B).

#### **Análisis neuroanatómico de los ratones tratados con BBG**

Una vez comprobada la eficacia del tratamiento con BBG en la prevención de la pérdida de peso corporal y del empeoramiento de la coordinación motora, se analizó si el tratamiento también era eficaz frente a la muerte neuronal observada en los ratones R6/1. Como se muestra en la Figura 75 A-E, las células apoptóticas se pueden detectar en la corteza de los ratones

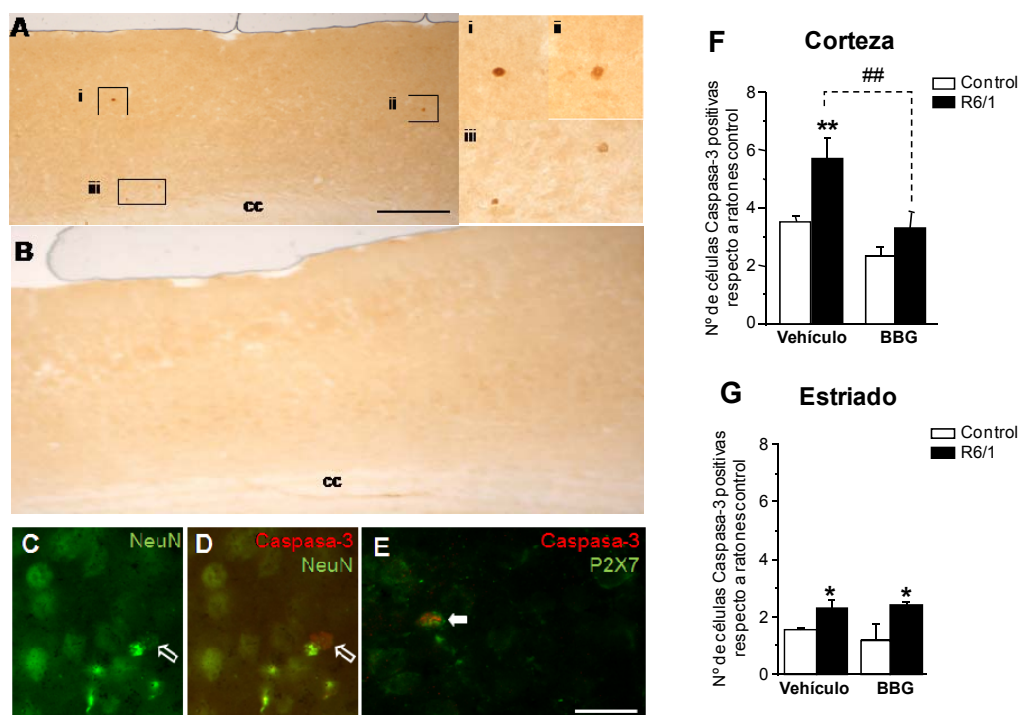
## Resultados

R6/1 de 34 semanas de vida mediante técnicas de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia empleando anticuerpos específicos anti-caspasa-3.



**Figura 74. Evolución del peso corporal y la latencia en el Rota-Rod de ratones control y R6/1 de jóvenes tratados con A438079.** Los valores de cada punto equivalen al porcentaje de la media  $\pm$  SEM de 9-11 ratones de cada genotipo.

De acuerdo con el efecto protector del BBG en cultivos de neuronas de corteza de ratones Tet/HD94, el tratamiento con dicho compuesto previno de forma significativa la muerte neuronal en la corteza de los ratones tratados (Figura 75 A, B y F), aunque no en el estriado (Figura 75 G). Además se comprobó la naturaleza neuronal de las células apoptóticas mediante el empleo de anticuerpos específicos frente al marcador neuronal NeuN y la caspasa 3 (Figura 75 C, D), y que dichas neuronas expresaban el receptor P2X7 (Figura 75 E). En resumen, estos resultados confirmaban el efecto benéfico de la inhibición de P2X7 en el peso corporal, en la coordinación motora y en la apoptosis neuronal en ratones con EH, coincidiendo con el efecto protector observado en los cultivos de neuronas.

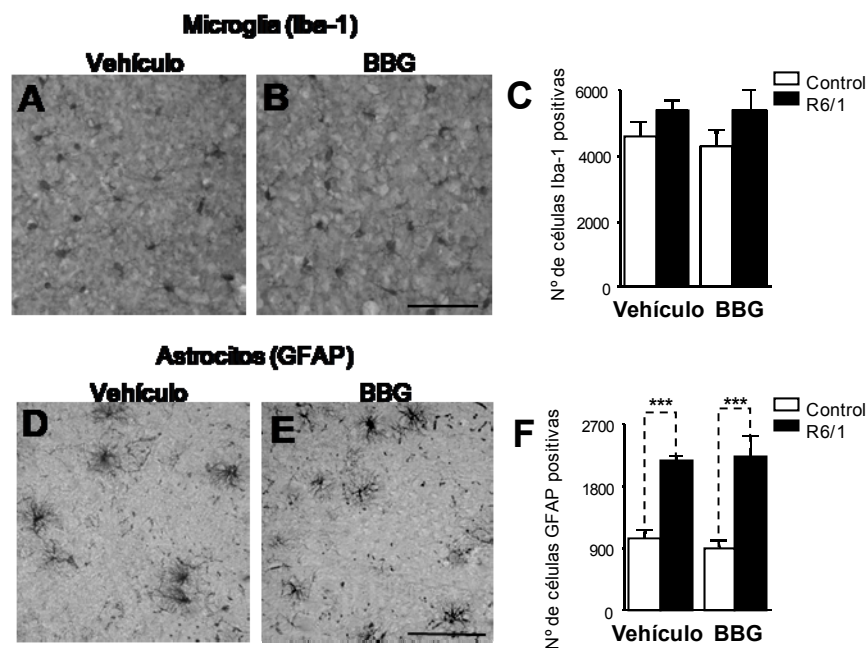


**Figura 75. Prevención de la apoptosis neuronal en corteza de ratones R6/1 de avanzada edad tratados con BBG.** Se detectó la apoptosis neuronal por inmunohistoquímica (A y B) e inmunofluorescencia (C-E) con anticuerpos frente a la caspasa-3. A. Detección de células caspasa-3 positivas en la corteza de un ratón R6/1 tratado con vehículo. Las imágenes i-iii corresponden a ampliaciones (x4) de las células apoptóticas identificadas en cuadros en la imagen A. B. Ejemplo de un ratón R6/1 tratado con BBG con una reducción de marcaje de caspasa-3. cc, cuerpo caloso. C-E. Marcaje inmunofluorescente de la corteza de ratones R6/1 tratados con vehículo con anticuerpos frente a NeuN (C y D), P2X7 (E) y caspasa 3 (D y E). F, G. Cuantificación de las células caspasa-3 positivas de corteza y estriado de ratones tratados con vehículo o BBG. Los datos se presentan como la media  $\pm$  SEM de células marcadas en secciones de 30  $\mu$ m (n=10 por tratamiento y genotipo,). Barras de escala: 200  $\mu$ m (A, B); 50  $\mu$ m (C, D, E). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; ##  $p < 0,01$

## Resultados

En vista de estos resultados obtenidos con el tratamiento *in vivo* y con los cultivos primarios de neuronas, el efecto protector de la administración de antagonistas de P2X7 parecía actuar sobre neuronas. Sin embargo, conociendo que el receptor P2X7 también se encuentra en células gliales, se analizó si el tratamiento con BBG también afectaba a la gliosis que padecen los ratones que reproducen la EH.

Como se muestra en la Figura 76 C, la detección de las células microgliales mediante el marcador Iba-1 reveló una tendencia no significativa al aumento de células microgliales en la corteza de los ratones R6/1 con respecto a los ratones control que no se veía afectada por el tratamiento con BBG (Figura 76 A-C). Del mismo modo, el análisis con anticuerpos frente a la proteína glial fibrilar ácida, GFAP, reveló una clara gliosis reactiva en la corteza de los ratones R6/1, que no resultó alterada tras el tratamiento de los ratones con el BBG (Figura 76 D-F).



**Figura 76. La administración de BBG a ratones R6/1 no afecta a la microglia ni a la astrocitosis.** A-C. Análisis inmunohistoquímico del marcador microglial Iba-1 en corteza de ratones R6/1 tratados con vehículo (A) o con BBG (B). C. Cuantificación del número de células Iba-1 positivas. D-F. Análisis inmunohistoquímico del marcador astrocítico GFAP en corteza de ratones R6/1 tratados con vehículo (D) o con BBG (E). F. La gráfica muestra la cuantificación de células GFAP positivas. Barras de escala 100 µm. \*\*\* p<0,001.

# **Discusión**



En esta Tesis Doctoral se han presentado resultados que confirman el efecto negativo que el ATP ejerce tanto sobre el crecimiento axonal, como en la progresión de una patología neurodegenerativa como es la enfermedad de Huntington.

Los estudios realizados en neuronas de hipocampo de ratón en cultivo han demostrado que la ectonucleotidasa TNAP ejerce un papel regulador en el crecimiento axonal, dado que impide la activación del receptor P2X7 hidrolizando su agonista endógeno, el ATP extracelular.

Por otro lado, en la enfermedad de Huntington, se observaron alteraciones en la expresión y funcionalidad del receptor P2X7, que incrementaban la susceptibilidad a la muerte por apoptosis desencadenada por la estimulación de dicho receptor. Además, la administración de un antagonista del P2X7 (BBG) *in vivo* a ratones que reproducen la EH (R6/1) prevenía la apoptosis neuronal, y evitaba la tendencia a la pérdida de peso y de coordinación motora observada en dichos ratones.

## **1. PAPEL DE LA FOSFATASA ALCALINA NO ESPECÍFICA DE TEJIDO EN EL CRECIMIENTO AXONAL.**

La dinámica intracelular de  $Ca^{2+}$  posee un papel central en el control de la motilidad neuronal, incluyendo el crecimiento y orientación axonal (Gomez y Zheng, 2006). Esta homeostasis del calcio puede estar regulada por varios canales iónicos, como los receptores P2X7, en ausencia de despolarización de la membrana (Khakh y North, 2006). Previamente, nuestro grupo había demostrado que el crecimiento del axón de las neuronas de hipocampo en cultivo se inhibe cuando el ATP extracelular activa el receptor P2X7. Esta activación desencadena la activación de una serie de proteínas intracelulares dependientes de calcio, como la proteína calcio-calmodulina quinasa II (CaMKII), la proteína fosfatidil inositol-3-quinasa (PI3K), o la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3), que finalmente desencadenan modificaciones en las proteínas asociadas al citoesqueleto (Diaz-Hernandez y cols., 2008). Además, este efecto negativo que el ATP ejerce sobre el crecimiento axonal también se había

descrito en el crecimiento de los axones motores del tubo embrionario neural (Cheung y cols., 2005).

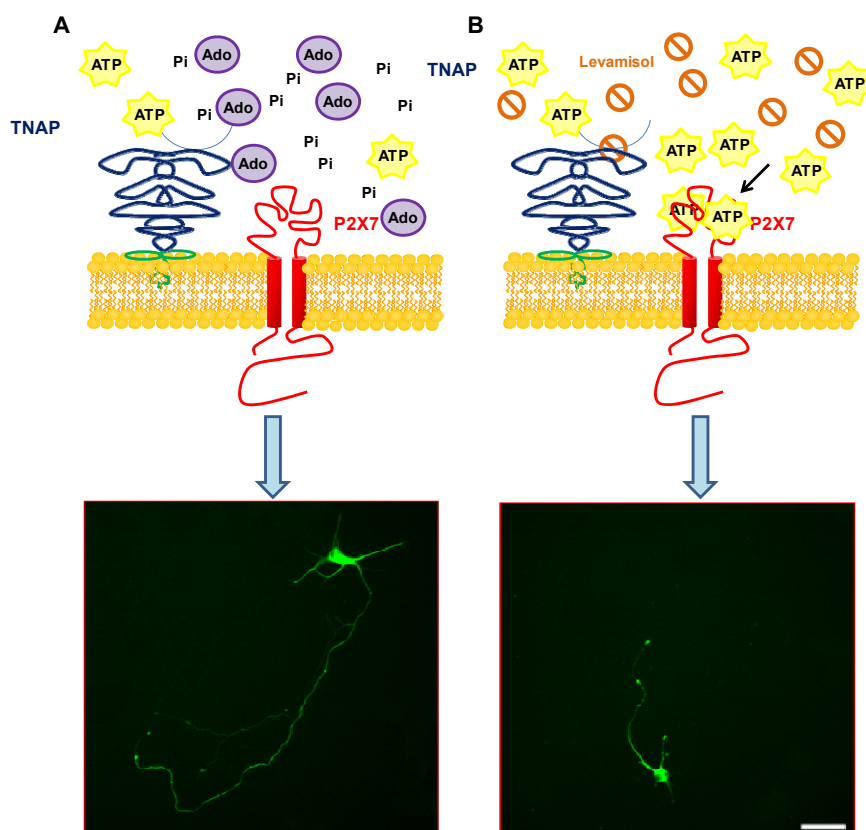
En la presente memoria de investigación se describe cómo el ATP extracelular disminuye con el paso de los días en los cultivos de neuronas de hipocampo de forma paralela a la formación y elongación de los axones. Estos resultados presentados indican, por primera vez, la implicación en el crecimiento axonal de una ectoenzima, la TNAP, que hidroliza el ATP extracelular hasta su precursor adenosina (Harkness, 1968; Miki y cols., 1986). Anteriormente, sólo la ecto-5'-nucleotidasa, ectoenzima que hidroliza los nucleósidos monofosfato hasta nucleósidos (Zimmermann y cols., 2007), había sido involucrada en un proceso de crecimiento de neuritas inducido por factores de crecimiento (Heilbronn y Zimmermann, 1995).

Cabe destacar que en estudios previos se ha descrito la asociación de la TNAP a balsas lipídicas (Ermonval y cols., 2009), estructuras que también han sido relacionadas con el crecimiento y guía axonal (Kamiguchi, 2006). De acuerdo a esta hipótesis, los estudios de localización subcelular realizados revelaron que la TNAP posee un marcaje punteado a lo largo de toda la neurona, compatible con su localización en balsas lipídicas. A su vez, la elevada actividad catalítica de la TNAP observada en los conos de crecimiento axonal apoya el papel de dicha enzima en la extensión del axón.

Por otro lado, la localización punteada del receptor P2X7, que también se ha asociado a balsas lipídicas (Gonnord y cols., 2009), es semejante y próxima a la de la TNAP, observándose incluso determinados puntos de colocalización. Este hecho predice la estrecha relación funcional entre ambas proteínas, que se traduce en la fina regulación que ejercen sobre el crecimiento axonal (Ver Figura 77).

Además, estas dos proteínas presentan una regulación transcripcional coordinada, dado que la adición de AP exógena a las neuronas de hipocampo en cultivo incrementa los niveles de ARNm de P2X7, y la inhibición del receptor P2X7 disminuye los niveles de ARNm de TNAP. Sin embargo no se registraron diferencias significativas en los niveles de proteína, lo que sugiere que las

neuronas necesitarían más tiempo para reflejar los cambios transcripcionales a nivel proteico.



**Figura 77. Esquema representativo de la acción coordinada de la TNAP y el receptor P2X7 en el crecimiento axonal.** A. La actividad de la TNAP elimina el agonista fisiológico del receptor P2X7 (ATP), impidiendo su activación y favoreciendo así la elongación axonal. B. El bloqueo de la TNAP evita la hidrólisis de ATP extracelular, lo cual favorece la activación del receptor P2X7, que se traduce en la reducción de la elongación axonal.

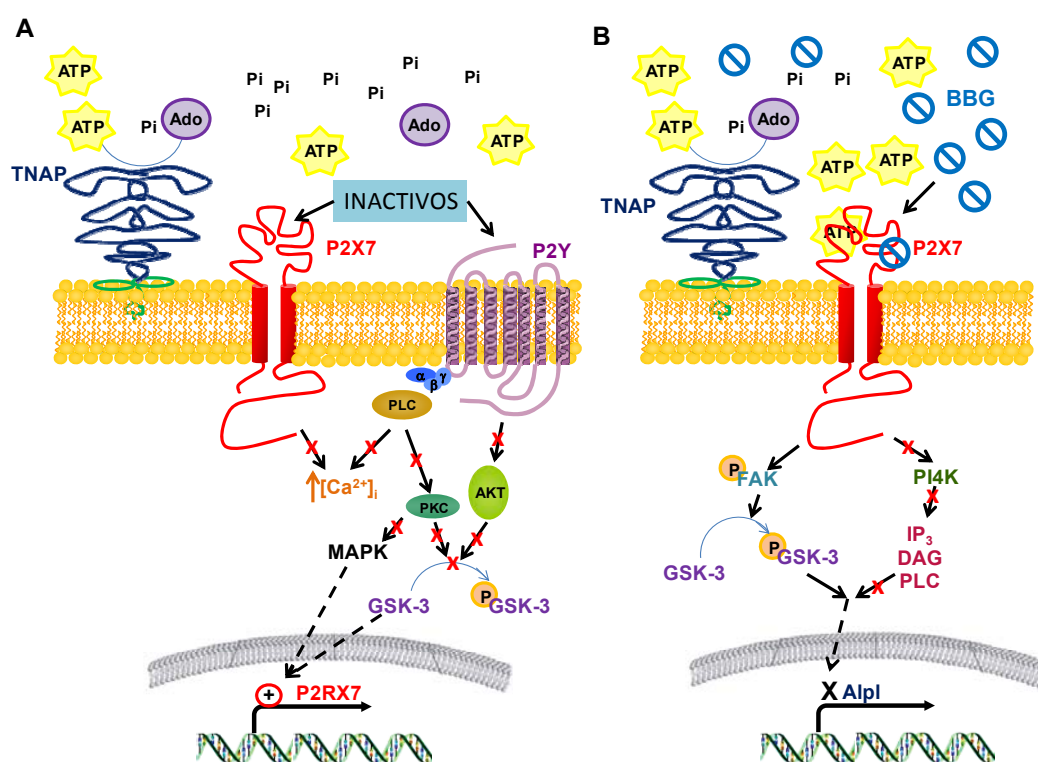
En la actualidad se conoce muy poco acerca de la regulación transcripcional de ambas moléculas. El ácido retinoico aumenta la actividad transcripcional del exón 1 de la TNAP y estabiliza las cadenas de ARNm (Zhou y cols., 1994; Escalante-Alcalde y cols., 1996). Además, en los tejidos en los que esta enzima no se expresa, las secuencias promotoras de la TNAP están altamente metiladas e inactivas (Escalante-Alcalde y cols., 1996). Por otro lado, la inhibición del P2X7 induce la fosforilación de la GSK-3 (Díaz-Hernández y cols., 2008; Gómez-Villafuertes y cols., 2009), cuya actividad catalítica puede

regular determinados factores de transcripción (Grimes y Jope, 2001; Ortega y cols., 2010). La activación del receptor P2X7, a su vez, incrementa la concentración intracelular de calcio, que podría mediar la interacción directa de proteínas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  con elementos reguladores del ADN (Naranjo y Gomez-Villafuertes, 2009).

Cabe destacar también que la actividad catalítica de la TNAP no sólo elimina el agonista fisiológico del receptor P2X7 del medio extracelular, sino que también hidroliza otros nucleótidos tri-, di- y monofosfato. Como consecuencia de esta hidrólisis la TNAP estaría impidiendo la activación de otros receptores como los receptores metabotrópicos P2Y, que podrían estar modificando la expresión de varios genes, entre ellos el del receptor P2X7 (Figura 78A). Algunos de estos receptores P2Y, como el P2Y<sub>1</sub> o el P2Y<sub>11</sub>, están acoplados a la fosfolipasa C (PLC), lo que induce incrementos en la concentración intracelular de calcio y la activación de la proteína quinasa C (PKC). A su vez, la PKC puede activar numerosas cascadas de señalización secundarias (Erb y cols., 2006), como la cascada de las MAP quinasas (Delicado y cols., 2005; Garcia y cols., 2007), que estarían influyendo sobre diversos factores de transcripción. Además, nuestro grupo ha descrito recientemente la regulación transcripcional inducida por la activación del receptor P2Y<sub>13</sub>, que conduce a la translocación al núcleo de la proteína reguladora de la transcripción,  $\beta$ -catenina. Este proceso está mediado por la inhibición, dependiente de AKT; de la glucógeno sintasa quinasa GSK-3 (Ortega y cols., 2008). Sin embargo se necesitarían más estudios para confirmar esta hipótesis e identificar los receptores responsables.

Por otro lado, la unión del antagonista al receptor podría provocar un cambio conformacional o una modificación en la señalización del receptor, que provocaría una respuesta de inhibición de la transcripción del gen de la TNAP (Figura 78B). De este modo se evitaría la hidrólisis del agonista, y se aumentarían las posibilidades de activación de los receptores que no hubieran sido bloqueados por el antagonista. Por ejemplo, la unión del antagonista al receptor podría cambiar el estado funcional de la proteína PI4K, que interacciona con el receptor P2X7 (Kim y cols., 2001). Esta quinasa cataliza la adición de un fosfato inorgánico al fosfatidilinositol (PI), primer paso en la formación de las

formas bi-, tri y tetrafosfato del PI, que proporcionan al receptor P2X7 la capacidad de activar cascadas de señalización intracelular vía inositol trifosfato, diacilglicerol y fosfolipasa C (Kim y cols., 2001), y, por tanto, de regular la transcripción. Sin embargo, la regulación de la expresión de la TNAP por esta vía no ha sido demostrada, por lo que sería necesario realizar nuevos estudios orientados a comprobar la hipótesis propuesta.



**Figura 78. Hipótesis propuesta de la regulación transcripcional de la TNAP y el receptor P2X7 en el modelo de estudio.** A. Activación de la transcripción del receptor P2X7 (P2RX7) en presencia de la actividad catalítica de la TNAP. La acción catalítica de la TNAP evitaría la activación de otros receptores, además del P2X7, como los receptores P2Y, bloqueando así las cascadas de señalización activadas por estos receptores. Este bloqueo causaría variaciones en la transcripción regulada por estas cascadas, que podrían estar provocando el aumento de la transcripción del P2RX7. Ado, Adenosina; Pi, fosfato inorgánico. B. El bloqueo farmacológico del receptor P2X7 con su antagonista específico, BBG, induciría la activación e inhibición de cascadas de señalización que conducirían a la inhibición de la transcripción del gen de la TNAP (Alpl). En ambos casos las cruces rojas indican la interrupción de los procesos que señalan las flechas sobre las que se sitúan.

En este trabajo se asocia a la TNAP con el desarrollo de axones de neuronas de hipocampo en cultivo. Esta ectoenzima se expresa en varios tejidos

(hígado, hueso, riñón y cerebro), aunque aún se conoce muy poco acerca de su función fisiológica. Sus funciones han sido principalmente investigadas en hueso, y se relacionan con su mineralización y remodelado (Kaunitz y Yamaguchi, 2008). A su vez, la actividad de la TNAP está asociada a las fibras nerviosas que emergen de la espina dorsal y el mielencéfalo del sistema nervioso de ratón en desarrollo (Narisawa y cols., 1994), y a la superficie axonal del cerebro de primates (tití común) en desarrollo (Fonta y cols., 2005). Los ratones deficientes de TNAP sufren ataques epilépticos y mueren tras ser destetados. Además presentan defectos neurales con desarrollo irregular de las raíces de los nervios lumbares y alteraciones en la fisiología intestinal (Narisawa y cols., 1997). Nuestros resultados demuestran la implicación de la TNAP en el desarrollo de los axones de neuronas de hipocampo en cultivo, coincidiendo con la localización axonal de la TNAP durante el desarrollo neural, donde la enzima podría estar involucrada de forma similar en el control de la elongación axonal.

La TNAP también se asocia a las regiones neurogénicas del cerebro durante el desarrollo embrionario temprano del ratón. Desde el día 8,5 embrionario se expresa de forma muy abundante en la membrana de las células madre neuroepiteliales del tubo neural (Narisawa y cols., 1994), y disminuye su actividad durante el desarrollo tardío, aunque permanece en las regiones ventriculares neurogénicas hasta el estado adulto (Langer y cols., 2007). La función fisiológica de la TNAP durante el desarrollo neural no ha sido investigada, pero es posible que, controlando la disponibilidad extracelular de nucleótidos, posea un papel en la migración y movilidad neuronal, puesto que en una variedad de especies diferentes de los mamíferos, las fosfatasas alcalinas se asocian a la migración y guía celular (Thibaudau y cols., 1993).

Los mecanismos que se han descrito en esta memoria de investigación mediados por la TNAP y el receptor P2X7 pueden estar implicados en procesos regenerativos en el cerebro adulto y en la plasticidad neuronal. En el sistema nervioso central dañado, los axones lesionados pueden comenzar a crecer, pero los conos de crecimiento adoptan rápidamente una morfología distrófica típica de la inhibición del crecimiento de los conos (Schnorrer y Dickson, 2004; Liu y cols., 2006). En determinadas situaciones patológicas como hipoxia o isquemia, el

ATP se libera de las células dañadas elevando la concentración extracelular de dicha molécula (Phillis y cols., 1993; Juranyi y cols., 1999), lo que podría estar inhibiendo la elongación axonal. También se ha descrito que elevados niveles de ATP pueden provocar muerte neuronal en varios modelos que reproducen estas condiciones patológicas tanto in vitro (Amadio y cols., 2002) como in vivo (Ryu y cols., 2002), lo cual podría estar provocado por la activación de los receptores P2X7 (Delarasse y cols., 2009). Estos hechos indican que la TNAP podría ser beneficiosa también eliminando el exceso de ATP extracelular liberado en los procesos patológicos favoreciendo la regeneración nerviosa.

Además, ciertos mecanismos similares podrían aplicarse a la ramificación axonal y a la plasticidad presináptica funcional y estructural. La formación de nuevas ramificaciones axonales procedentes de neuronas no dañadas sucede como un proceso de regeneración que persigue la reinervación sináptica (Frotscher y cols., 1997). La TNAP también se ha identificado asociada al neuropilo del cerebro adulto de roedores y primates, donde se localiza alrededor de los contactos sinápticos (Fonta y cols., 2005; Langer y cols., 2008). Además, la expresión a nivel sináptico de la TNAP coincide con la sinaptogénesis, implicando un posible papel en la maduración y actividad sinápticas (Fonta y cols., 2005). Dado que la TNAP sináptica puede estar involucrada en la neurotransmisión (North y Verkhratsky, 2006) y en la modulación de la señalización purinérgica (Díaz-Hernández y cols., 2000), se podría concluir que la TNAP y el ATP poseen un papel importante en la remodelación sináptica inducida por la actividad neuronal (Bourne y Harris, 2008).

## **2. IMPLICACIONES DEL RECEPTOR P2X7 EN LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON.**

Además de la participación del ATP en procesos neurodegenerativos derivados de condiciones neuropatológicas como isquemia o hipoxia (Amadio y cols., 2002), este compuesto puede actuar como modulador de procesos inflamatorios inducidos por la microglía, los cuales están implicados en el desarrollo de numerosos procesos patológicos (Ferrari y cols., 1997b; Suzuki y

cols., 2004). En este sentido se ha descrito la presencia de reacciones inflamatorias en múltiples desórdenes neurodegenerativos, como en el infarto cerebral, o crónicas, como en la enfermedad de Alzheimer o enfermedad de Parkinson (Marchetti y Abbracchio, 2005). En muchas de estas patologías también se ha observado que la expresión de los receptores purinérgicos P2X y P2Y se encuentra alterada (Franke y cols., 2006).

En la enfermedad de Huntington también aparecen signos de neuroinflamación (Silvestroni y cols., 2009) y elevados niveles de ATP en cerebros de ratones transgénicos con EH (Olah y cols., 2008), además de alteraciones en la actividad y expresión de varios receptores de neurotransmisores pre- y postsinápticos (Li y cols., 2003b; Smith y cols., 2005a). Sin embargo, se conoce muy poco acerca del papel del ATP extracelular y del estado de los receptores de nucleótidos en dicha patología.

Recientemente se ha descrito cómo el tratamiento de dos modelos animales que reproducen la enfermedad de Huntington (*Caenorhabditis elegans* y *Drosophila*) con fármacos que inhiben la producción de ATP, reduce la muerte neuronal observada en dichos modelos (Varma y cols., 2007). En este sentido, el ATP extracelular, a través de la estimulación del receptor ionotrópico P2X7, también se ha visto implicado en la producción y liberación de interleuquina-1 $\beta$ , y en la muerte de neuronas dopaminérgicas (Le Feuvre y cols., 2002; Jun y cols., 2007). Este receptor ionotrópico P2X7 es el más abundante en cerebro medio de ratón (Miras-Portugal y cols., 2003), y necesita una concentración mucho mayor de ATP que el resto de subunidades para ser activada (Burnstock, 2007b).

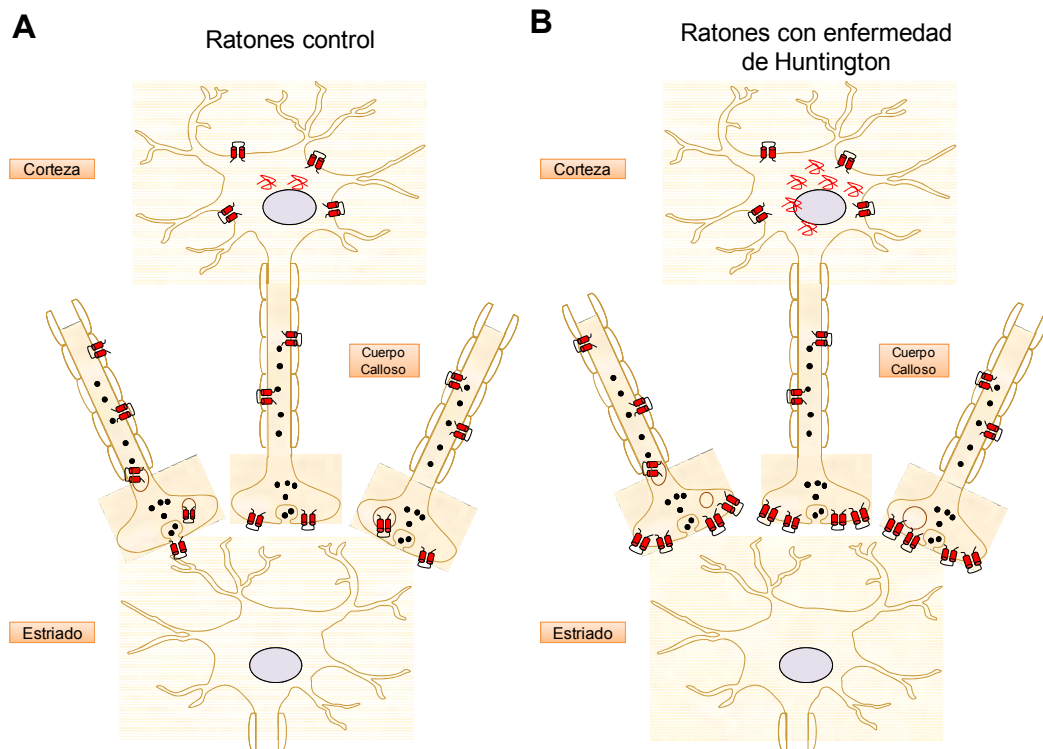
En base a estos antecedentes, en este trabajo se estudió el papel que estaba desempeñando el receptor P2X7 en la enfermedad de Huntington. Para abordar este estudio seleccionaron dos modelos transgénicos de ratón que reproducen la enfermedad de Huntington: Los ratones R6/1, que expresan el exón 1 de la huntingtina con una expansión de 115 repeticiones (Mangiarini y cols., 1996), y el modelo condicional Tet/HD94 que expresa el exón 1 de la htt con 94 repeticiones de CAG, bajo el promotor de la CaMKII (Yamamoto y cols., 2000) (ver apartado 3.2 de Materiales).

En ambos modelos de ratón aparecieron alteraciones en la expresión del receptor P2X7. Se registró un incremento en los niveles de proteína del P2X7 en el estriado de los ratones con enfermedad de Huntington, sin cambios en los niveles corticales. Sin embargo, a nivel transcripcional no se encontraron alteraciones en el estriado de los ratones R6/1 y Tet/HD94, aunque sí un aumento de los niveles de ARN mensajero del receptor P2X7 en la corteza. Además, la localización subcelular del receptor destacaba en las proyecciones córtico-estriatales y en las terminales nerviosas estriatales, confirmando una vez más la expresión neuronal del receptor P2X7 (Hervas y cols., 2003; Miras-Portugal y cols., 2003; Hervas y cols., 2005; Marin-García, 2007; Marin-García y cols., 2008). Por lo tanto, y dado que la corteza es la mayor fuente de aferencias axonales al estriado, parecía que el incremento en los niveles del receptor en el estriado era debido al aumento de la expresión del receptor en la corteza, que se traducía en un aumento de los niveles del P2X7 en las proyecciones cortico-estriatales (Figura 79).

El aumento en la expresión del receptor P2X7 también se ha descrito en la microglía tras un proceso isquémico (Cavaliere y cols., 2004), en asociación con la necrosis inducida por MCAO (oclusión de la arteria cerebral media) (Bringmann y cols., 2002), o alrededor de las placas  $\beta$ -amiloides en un modelo de ratón de la enfermedad de Alzheimer (Parvathenani y cols., 2003). En la presente memoria se añade esta enfermedad a la lista de patologías en las que se ha descrito un aumento del receptor. Sin embargo, en este trabajo se describe el aumento del receptor P2X7 a nivel neuronal, y no microglial, en dos modelos murinos de la enfermedad de Huntington.

Los pacientes de Huntington presentan atrofia estriatal (Vonsattel y DiFiglia, 1998) acompañada de una disminución de la expresión de varios receptores, como glutamatérgicos, dopaminérgicos o de adenosina (Cha y cols., 1998; Cha y cols., 1999; Glass y cols., 2000; Dunah y cols., 2002). Sin embargo, en esta memoria de investigación se describe un aumento, y no reducción, de los niveles de un receptor, el receptor ionotrópico P2X7, en dos modelos de ratón que reproducen la enfermedad de Huntington.

Como ya se ha mencionado anteriormente, las alteraciones en la regulación transcripcional desencadenadas por la expresión de la huntingtina con la expansión patogénica de poliQ han sido ampliamente estudiadas (Luthi-Carter y cols., 2002; Sugars y Rubinsztein, 2003; Riley y Orr, 2006). Este trabajo añade un nuevo miembro, el receptor P2X7, a la lista de genes cuya expresión está alterada en la enfermedad de Huntington.



**Figura 79.** Expresión del receptor P2X7, a nivel de ARN mensajero y proteína, en ratones control (A) y ratones que reproducen la enfermedad de Huntington (B).

En la región promotora del receptor P2X7 se ha descrito la presencia de 3 motivos de unión de factores de transcripción (C/EBP, GATA-1 y  $\delta$ EF-1) (Li y cols., 2002), pero no se conoce ningún tipo de interacción de la htt con dichos factores. Sin embargo, la htt\* posee la capacidad de interaccionar y secuestrar algunas proteínas debido a su expansión patogénica de poliQ. Entre estas proteínas se pueden encontrar algunos activadores de la transcripción, como CBP, inhibiendo así la expresión de los genes controlados por estos factores

(Cong y cols., 2005). Asimismo, la htt\* podría estar secuestrando represores de la transcripción e impidiendo la inhibición de la expresión de sus genes diana, entre los que se podría encontrar el receptor P2X7.

Por otro lado se ha descrito que la estimulación del receptor P2X7 activa al factor de transcripción Nf- $\kappa$ B en células microgliales (Ferrari y cols., 1997a), y a la GSK-3 en neuronas (Diaz-Hernandez y cols., 2008), los cuales podrían, a su vez, regular otros factores de transcripción, como la proteína reguladora de la transcripción,  $\beta$ -catenina, en el caso de la GSK-3 (Ortega y cols., 2010). De este modo, las cascadas de señalización activadas por la estimulación del receptor P2X7 podrían estar interviniendo en el control transcripcional. Parece posible, por lo tanto, que las alteraciones en el perfil de respuesta del receptor P2X7 podrían autorregular la propia transcripción del receptor, modulando estas cascadas de señalización, con objeto de generar nuevas subunidades P2X7 que compensasen o sustituyesen a las alteradas.

Como se ha mencionado previamente, la huntingtina mutada también puede interactuar con proteínas implicadas en el tráfico intracelular y en el reciclado de membrana y proteínas (Li y cols., 1998; Waelter y cols., 2001) alterando así dichos procesos. Por otro lado, se describió que el receptor P2X7 puede mediar su propia internalización en vesículas de clatrina, en un mecanismo dependiente de GRK-3,  $\beta$ -arrestina-2 y dinamina (Feng y cols., 2005), regulando así su presencia en la membrana plasmática y la integración de señales extracelulares. Teniendo en cuenta estos hechos se podría pensar que las alteraciones en el reciclado de proteínas y en la respuesta del receptor P2X7, que se producen en presencia de la huntingtina mutada, podrían alterar el correcto reciclaje del receptor en la enfermedad de Huntington. De este modo, estas alteraciones podrían estar favoreciendo el incremento del receptor P2X7 observado en los modelos murinos de la enfermedad de Huntington.

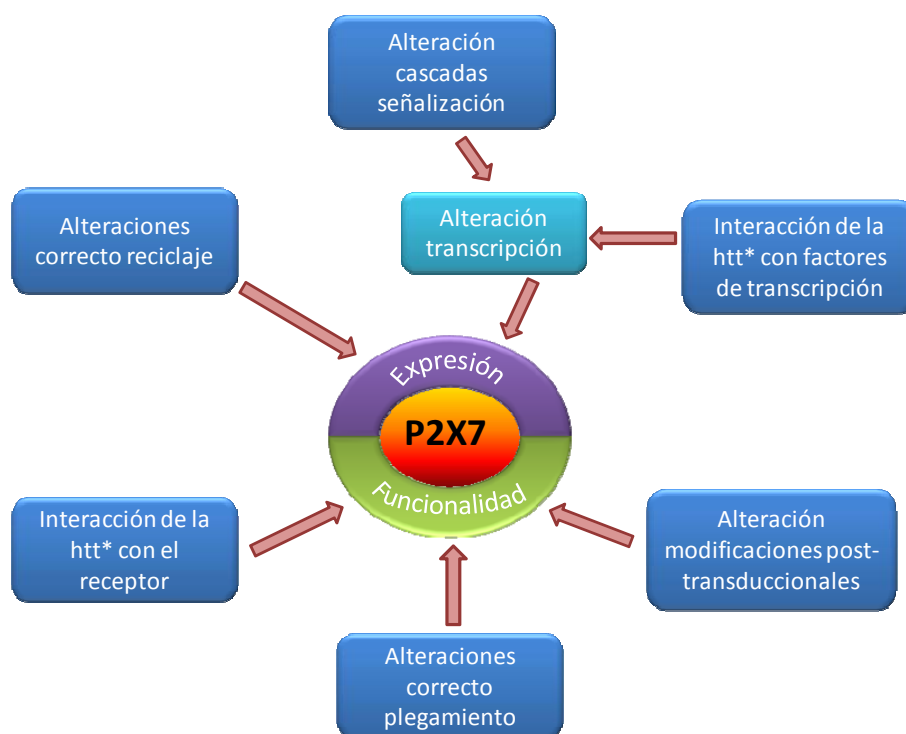
Cabe destacar que, aunque se han descrito diversos polimorfismos del receptor P2X7, incluyendo varios en la región promotora (Li y cols., 2002), ninguno de ellos altera la abundancia o actividad del receptor en las condiciones estudiadas. Además, a pesar de los estudios iniciales para caracterizar la región

promotora del receptor P2X7 realizados por Li y cols. (Li y cols., 2002), todavía no se conoce el funcionamiento de dicha región. De hecho, sería muy interesante investigar si alguno de los polimorfismos descritos para el receptor P2X7 guarda relación con la variabilidad en la edad de comienzo de la enfermedad de Huntington y de su gravedad, en pacientes con el mismo número de repeticiones de CAG.

Por otro lado, el hecho de que las terminales nerviosas de las neuronas que expresan la huntingtina mutada presentan mayor porcentaje del perfil oscilante en la respuesta inducida por P2X7, indica que la expresión de la huntingtina mutada también podría estar alterando la funcionalidad de dicha proteína. Así, el receptor P2X7 podría presentar varios estados funcionales, dependiendo de las modificaciones post-transduccionales que podría inducir la htt\*. En este sentido, registros de corrientes de canal único mediadas por P2X7 demostraron que este receptor puede mediar corrientes caracterizadas por largos o cortos periodos de apertura del canal (Riedel y cols., 2007). Dado que estos registros se observaron en canales individuales, las diferencias en la densidad del receptor no podrían explicar las diferencias en los dos perfiles cinéticos observados en la enfermedad. Estas variaciones podrían provenir de modificaciones post-transduccionales como es la fosforilación del receptor. En este sentido, se han descrito cambios en las cascadas de señalización dependientes de quinasas en células que expresan la htt\* (Borrell-Pages y cols., 2006). Además, el complejo de chaperonas HSP70/HSP90, implicado en estabilizar proteínas en estados de plegamiento parcial, como por ejemplo durante el transporte a membrana (Wegele y cols., 2004), queda secuestrado por los agregados proteicos de huntingtina mutada (Kaltenbach y cols., 2007), lo que le impide realizar correctamente su función. Estas chaperonas también pueden interactuar con el receptor P2X7 (Kim y cols., 2001), por lo que su secuestro podría modificar la respuesta del P2X7 impidiendo su correcto plegamiento y estabilidad.

Por otro lado, en la presente memoria de investigación se ha descrito cómo la huntingtina mutada induce un aumento de la afinidad del receptor por su ligando en las neuronas corticales, que no se reproduce en las neuronas

procedentes de ratones KO-P2X7 transfectadas con el fragmento patogénico de la htt de 72 repeticiones. Estos ratones poseen deletado un fragmento del extremo C-terminal del receptor P2X7, lo cual modificaría la regulación de la apertura y cierre del canal (Becker y cols., 2008), y el control de la afinidad del receptor por su ligando. Por lo tanto, podríamos pensar que la huntingtina mutada modificaría la afinidad del receptor al agonista, probablemente debido a una acción directa de la propia htt\* sobre el extremo C-terminal del receptor P2X7.



**Figura 80. Resumen de los posibles mecanismos que causan las alteraciones observadas en la expresión y funcionalidad del receptor P2X7 en dos modelos murinos de la enfermedad de Huntington.**

Como se ha descrito de forma detallada en la introducción (ver apartado 3.7), muchas son las alteraciones sinápticas que se conocen hasta el momento en la enfermedad de Huntington, tanto en la liberación de neurotransmisor, como en el tráfico y reciclado vesicular. Por este motivo, varios autores han propuesto que se podría considerar a la enfermedad de Huntington como una

sinaptopatología, dado que estas alteraciones sinápticas podrían estar mediando la sintomatología de la enfermedad (Li y cols., 2003b; Smith y cols., 2005a). En la presente memoria de investigación se describe la alteración de los receptores P2X7 en terminales nerviosas que expresan la huntingtina mutada, y cómo esta alteración interviene en la muerte neuronal apoptótica de ratones con enfermedad de Huntington. Estos resultados, por lo tanto, apoyan la hipótesis de que la enfermedad de Huntington podría englobarse dentro del grupo de las sinaptopatologías.

La población neuronal del núcleo estriado está constituida en un 90-95% por MSSN (neuronas espinosas de tamaño medio), la mayoría de las cuales expresan la proteína DARPP-32 (Ouimet y cols., 1992). En el presente trabajo se ha descrito como el receptor P2X7 está presente en el estriado de los ratones que reproducen la enfermedad de Huntington, localizado en las terminales nerviosas que rodean los somas de estas MSSN DARPP-32 positivas. Teniendo en cuenta que en la enfermedad de Huntington estas neuronas son las principales afectadas (Vonsattel y cols., 1985), parece muy claro el efecto negativo de la activación del receptor P2X7 sobre dicha población de neuronas. Este efecto negativo podría deberse a que los trastornos en la homeostasis del calcio que suceden por la activación del P2X7 alterado podrían inducir fallos en la liberación de neurotransmisor, por parte de las terminales nerviosas de las proyecciones cortico-estriatales (Atkinson y cols., 2004; Papp y cols., 2007; Sperlagh y cols., 2007; Leon y cols., 2008). Todo esto, unido a que la huntingtina mutada disminuye la producción y aporte trófico de BDNF al estriado (Zuccato y cols., 2001; Zuccato y cols., 2003), estaría favoreciendo a la degeneración del estriado, característica de la enfermedad

En esta Tesis doctoral queda reflejado que la alteración en la función del receptor P2X7, y el efecto benéfico del tratamiento con su antagonista BBG, ocurre a nivel neuronal. Sin embargo, el posible efecto benéfico derivado del bloqueo del receptor P2X7 presente en las células gliales, no puede ser excluido. En este sentido, varios autores han descrito el efecto antiinflamatorio de los antagonistas del receptor P2X7 en la microglía (Inoue, 2002; Le Feuvre y cols., 2002). Además cabe mencionar como en otros estudios ya se habían

propuesto determinados agentes antiinflamatorios, como la minociclina, para el tratamiento de la enfermedad de Huntington (Yong y cols., 2004), aunque su efecto benéfico aún no está del todo claro (Hersch y cols., 2003; Smith y cols., 2003). Aunque en este estudio no se observó reducción en la microgliosis o gliosis reactiva en los ratones tratados con el BBG, no se puede descartar que el efecto beneficioso del tratamiento con BBG sea consecuencia de la combinación del efecto antiapoptótico sobre las neuronas corticales y de un efecto antiinflamatorio. Aun así, aunque los ratones R6/1 tratados con BBG presentan una mejoría significativa en la realización del test de la longitud de la zancada a las dos semanas de tratamiento, el efecto se pierde por completo en la siguiente semana. Esto podría indicar un efecto benéfico selectivo del BBG sobre determinados síntomas de la enfermedad.

Por último, la eficacia terapéutica del BBG en los ratones con EH sugiere que los antagonistas del receptor P2X7 podrían ser empleados en el tratamiento de los pacientes con enfermedad de Huntington. El BBG es ligeramente menos potente antagonizando el receptor P2X7 humano que el de roedores (Jiang y cols., 2000b), sin embargo, existen otros antagonistas, como el KN62, que son más potentes para los receptores humanos (Humphreys y cols., 1998). En cuanto al antagonista sintetizado más recientemente, A-438079, su corta vida media (1,02 horas) y biodisponibilidad reducida (19%) (Nelson y cols., 2006), no lo hacen apropiado para los protocolos de administración crónica intraperitoneal. No obstante, dado el estudio reciente acerca de su aplicación en el tratamiento de otras patologías, como el dolor crónico (Donnelly-Roberts y Jarvis, 2007), es concebible pensar que se explorarán en un futuro temprano otras vías de administración o derivados de este compuesto, para afrontar su administración crónica. Por lo tanto, en vista de los datos expuestos en esta Tesis y del estado actual de la investigación en nuevos antagonistas de P2X7, el BBG probablemente es el antagonista con mayor potencial terapéutico para realizar posibles ensayos clínicos. En este sentido, el BBG tiene la ventaja de producir una toxicidad supuestamente baja, basada en la seguridad de su análogo Brilliant Blue-CFC, que ha sido empleado como colorante de comida durante décadas (Gross, 1961). Además, se están realizando estudios preclínicos con el

## *Discusión*

---

propio BBG en el ámbito oftalmológico, sin que se detecte ningún efecto tóxico (Hisatomi y cols., 2006; Ueno y cols., 2007).

# **Conclusiones**



1. La fosfatasa alcalina no específica de tejido (TNAP) regula el crecimiento axonal, gracias a que controla la disponibilidad local de ATP extracelular en las zonas dinámicas de crecimiento del axón.
2. La TNAP y el receptor P2X7 controlan, de forma coordinada, este proceso de elongación axonal, dado que la TNAP elimina el ligando endógeno del receptor P2X7.
3. Estas dos proteínas, TNAP y P2X7, podrían ser muy relevantes en el desarrollo del sistema nervioso, en la plasticidad sináptica y en la regeneración neuronal.
4. Los niveles del receptor P2X7 están alterados en las proyecciones cortico-estriatales de dos modelos murinos de la enfermedad de Huntington.
5. Además de un aumento de la afinidad del receptor P2X7 por su ligando, el receptor P2X7 presenta una alterada funcionalidad en presencia de la huntingtina mutada, lo cual se traduce en un incremento de la susceptibilidad a la apoptosis inducida por la estimulación de dicho receptor.
6. El bloqueo in vivo del receptor P2X7 con dos antagonistas diferentes en un modelo murino de la enfermedad de Huntington previene de la apoptosis neuronal y atenúa la pérdida de peso corporal y de coordinación motora observada en estados avanzados de la enfermedad.
7. Las alteraciones del receptor P2X7 podrían contribuir a la patogénesis de la enfermedad de Huntington, y sugieren un potencial terapéutico de los antagonistas del receptor en dicha enfermedad.



# **Bibliografía**



- Abbracchio MP, Burnstock G** (1994) Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther* 64:445-475.
- Abbracchio MP, Burnstock G, Verkhratsky A, Zimmermann H** (2009) Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends in neurosciences* 32:19-29.
- Abbracchio MP, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Miras-Portugal MT, King BF, Gachet C, Jacobson KA, Weisman GA, Burnstock G** (2003) Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y<sub>14</sub> receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. *Trends Pharmacol Sci* 24:52-55.
- Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Knight GE, Fumagalli M, Gachet C, Jacobson KA, Weisman GA** (2006) International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev* 58:281-341.
- Aga M, Johnson CJ, Hart AP, Guadarrama AG, Suresh M, Svaren J, Bertics PJ, Darien BJ** (2002) Modulation of monocyte signaling and pore formation in response to agonists of the nucleotide receptor P2X<sub>7</sub>. *J Leukoc Biol* 72:222-232.
- Ageta-Ishihara N, Takemoto-Kimura S, Nonaka M, Adachi-Morishima A, Suzuki K, Kamijo S, Fujii H, Mano T, Blaeser F, Chatila TA, Mizuno H, Hirano T, Tagawa Y, Okuno H, Bito H** (2009) Control of cortical axon elongation by a GABA-driven Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase cascade. *J Neurosci* 29:13720-13729.
- Albin RL, Young AB, Penney JB** (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends in neurosciences* 12:366-375.
- Alloisio S, Cervetto C, Passalacqua M, Barbieri R, Maura G, Nobile M, Marcoli M** (2008) Functional evidence for presynaptic P2X<sub>7</sub> receptors in adult rat cerebrocortical nerve terminals. *FEBS Lett* 582:3948-3953.
- Amadio S, D'Ambrosi N, Cavaliere F, Murra B, Sancesario G, Bernardi G, Burnstock G, Volonte C** (2002) P2 receptor modulation and cytotoxic function in cultured CNS neurons. *Neuropharmacology* 42:489-501.
- Ambrose CM, Duyao MP, Barnes G, Bates GP, Lin CS, Srinidhi J, Baxendale S, Hummerich H, Lehrach H, Altherr M, et al.** (1994) Structure and expression of the Huntington's disease gene: evidence against simple inactivation due to an expanded CAG repeat. *Somat Cell Mol Genet* 20:27-38.
- Anderson HC, Sipe JB, Hesse L, Dhanyamraju R, Atti E, Camacho NP, Millan JL** (2004) Impaired calcification around matrix vesicles of growth plate and bone in alkaline phosphatase-deficient mice. *Am J Pathol* 164:841-847.

- Arber S, Barbayannis FA, Hanser H, Schneider C, Stanyon CA, Bernard O, Caroni P** (1998) Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature* 393:805-809.
- Arrasate M, Mitra S, Schweitzer ES, Segal MR, Finkbeiner S** (2004) Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature* 431:805-810.
- Aschrafi A, Sadtler S, Niculescu C, Rettinger J, Schmalzing G** (2004) Trimeric architecture of homomeric P2X2 and heteromeric P2X1+2 receptor subtypes. *J Mol Biol* 342:333-343.
- Atkinson L, Batten TF, Moores TS, Varoqui H, Erickson JD, Deuchars J** (2004) Differential co-localisation of the P2X7 receptor subunit with vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in rat CNS. *Neuroscience* 123:761-768.
- Bahima L, Aleu J, Elias M, Martin-Satue M, Muhaisen A, Blasi J, Marsal J, Solsona C** (2006) Endogenous hemichannels play a role in the release of ATP from *Xenopus* oocytes. *J Cell Physiol* 206:95-102.
- Baliko L, Csala B, Czopf J** (2004) Suicide in Hungarian Huntington's disease patients. *Neuroepidemiology* 23:258-260.
- Bao J, Sharp AH, Wagster MV, Becher M, Schilling G, Ross CA, Dawson VL, Dawson TM** (1996) Expansion of polyglutamine repeat in huntingtin leads to abnormal protein interactions involving calmodulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:5037-5042.
- Barbacid M** (1995) Neurotrophic factors and their receptors. *Curr Opin Cell Biol* 7:148-155.
- Barden N, Harvey M, Gagne B, Shink E, Tremblay M, Raymond C, Labbe M, Villeneuve A, Rochette D, Bordeleau L, Stadler H, Holsboer F, Muller-Myhsok B** (2006) Analysis of single nucleotide polymorphisms in genes in the chromosome 12Q24.31 region points to P2RX7 as a susceptibility gene to bipolar affective disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 141B:374-382.
- Barrera NP, Ormond SJ, Henderson RM, Murrell-Lagnado RD, Edwardson JM** (2005) Atomic force microscopy imaging demonstrates that P2X2 receptors are trimers but that P2X6 receptor subunits do not oligomerize. *J Biol Chem* 280:10759-10765.
- Barth K, Weinhold K, Guenther A, Young MT, Schnittler H, Kasper M** (2007) Caveolin-1 influences P2X7 receptor expression and localization in mouse lung alveolar epithelial cells. *FEBS J* 274:3021-3033.
- Becker D, Woltersdorf R, Boldt W, Schmitz S, Braam U, Schmalzing G, Markwardt F** (2008) The P2X7 carboxyl tail is a regulatory module of P2X7 receptor channel activity. *J Biol Chem* 283:25725-25734.

- Beigi RD, Kertesy SB, Aquilina G, Dubyak GR** (2003) Oxidized ATP (oATP) attenuates proinflammatory signaling via P2 receptor-independent mechanisms. *Br J Pharmacol* 140:507-519.
- Benn CL, Slow EJ, Farrell LA, Graham R, Deng Y, Hayden MR, Cha JH** (2007) Glutamate receptor abnormalities in the YAC128 transgenic mouse model of Huntington's disease. *Neuroscience* 147:354-372.
- Bennett EJ, Bence NF, Jayakumar R, Kopito RR** (2005) Global impairment of the ubiquitin-proteasome system by nuclear or cytoplasmic protein aggregates precedes inclusion body formation. *Mol Cell* 17:351-365.
- Benowitz LI, Jing Y, Tabibiazar R, Jo SA, Petrusch B, Stuermer CA, Rosenberg PA, Irwin N** (1998) Axon outgrowth is regulated by an intracellular purine-sensitive mechanism in retinal ganglion cells. *J Biol Chem* 273:29626-29634.
- Berardelli A, Noth J, Thompson PD, Bollen EL, Curra A, Deuschl G, van Dijk JG, Topper R, Schwarz M, Roos RA** (1999) Pathophysiology of chorea and bradykinesia in Huntington's disease. *Mov Disord* 14:398-403.
- Bianchi BR, Lynch KJ, Touma E, Niforatos W, Burgard EC, Alexander KM, Park HS, Yu H, Metzger R, Kowaluk E, Jarvis MF, van Biesen T** (1999) Pharmacological characterization of recombinant human and rat P2X receptor subtypes. *Eur J Pharmacol* 376:127-138.
- Bibb JA, Yan Z, Svenningsson P, Snyder GL, Pieribone VA, Horiuchi A, Nairn AC, Messer A, Greengard P** (2000) Severe deficiencies in dopamine signaling in presymptomatic Huntington's disease mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6809-6814.
- Bigonnesse F, Levesque SA, Kukulski F, Lecka J, Robson SC, Fernandes MJ, Seigny J** (2004) Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8. *Biochemistry* 43:5511-5519.
- Bo X, Jiang LH, Wilson HL, Kim M, Burnstock G, Surprenant A, North RA** (2003) Pharmacological and biophysical properties of the human P2X5 receptor. *Mol Pharmacol* 63:1407-1416.
- Bobanovic LK, Royle SJ, Murrell-Lagnado RD** (2002) P2X receptor trafficking in neurons is subunit specific. *J Neurosci* 22:4814-4824.
- Bodin P, Burnstock G** (2001) Purinergic signalling: ATP release. *Neurochem Res* 26:959-969.
- Borrell-Pages M, Zala D, Humbert S, Saudou F** (2006) Huntington's disease: from huntingtin function and dysfunction to therapeutic strategies. *Cell Mol Life Sci* 63:2642-2660.
- Boue-Grabot E, Archambault V, Seguela P** (2000) A protein kinase C site highly conserved in P2X subunits controls the desensitization kinetics of P2X(2) ATP-gated channels. *J Biol Chem* 275:10190-10195.
- Bourne JN, Harris KM** (2008) Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annu Rev Neurosci* 31:47-67.

- Bradke F, Dotti CG** (1999) The role of local actin instability in axon formation. *Science* 283:1931-1934.
- Bringmann A, Pannicke T, Uhlmann S, Kohen L, Wiedemann P, Reichenbach A** (2002) Membrane conductance of Muller glial cells in proliferative diabetic retinopathy. *Can J Ophthalmol* 37:221-227.
- Brose K, Tessier-Lavigne M** (2000) Slit proteins: key regulators of axon guidance, axonal branching, and cell migration. *Current opinion in neurobiology* 10:95-102.
- Buell GN, Talabot F, Gos A, Lorenz J, Lai E, Morris MA, Antonarakis SE** (1998) Gene structure and chromosomal localization of the human P2X7 receptor. *Receptors Channels* 5:347-354.
- Buettner R, Papoutsoglou G, Scemes E, Spray DC, Dermietzel R** (2000) Evidence for secretory pathway localization of a voltage-dependent anion channel isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3201-3206.
- Buisman HP, Steinberg TH, Fischbarg J, Silverstein SC, Vogelzang SA, Ince C, Ypey DL, Leijh PC** (1988) Extracellular ATP induces a large nonselective conductance in macrophage plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:7988-7992.
- Burke JR, Enghild JJ, Martin ME, Jou YS, Myers RM, Roses AD, Vance JM, Strittmatter WJ** (1996) Huntingtin and DRPLA proteins selectively interact with the enzyme GAPDH. *Nat Med* 2:347-350.
- Burnstock G** (1997) The past, present and future of purine nucleotides as signalling molecules. *Neuropharmacology* 36:1127-1139.
- Burnstock G** (2007a) Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev* 87:659-797.
- Burnstock G** (2007b) Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci* 64:1471-1483.
- Burnstock G** (2008) Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nat Rev Drug Discov* 7:575-590.
- Burnstock G, Knight GE** (2004) Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int Rev Cytol* 240:31-304.
- Burnstock G, Dumsday B, Smythe A** (1972) Atropine resistant excitation of the urinary bladder: the possibility of transmission via nerves releasing a purine nucleotide. *Br J Pharmacol* 44:451-461.
- Burnstock G, Campbell G, Satchell D, Smythe A** (1970) Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *Br J Pharmacol* 40:668-688.
- Cabrini G, Falzoni S, Forchap SL, Pellegatti P, Balboni A, Agostini P, Cuneo A, Castoldi G, Baricordi OR, Di Virgilio F** (2005) A His-155 to Tyr

- polymorphism confers gain-of-function to the human P2X7 receptor of human leukemic lymphocytes. *J Immunol* 175:82-89.
- Canals JM, Pineda JR, Torres-Peraza JF, Bosch M, Martin-Ibanez R, Munoz MT, Mengod G, Ernfors P, Alberch J** (2004) Brain-derived neurotrophic factor regulates the onset and severity of motor dysfunction associated with enkephalinergic neuronal degeneration in Huntington's disease. *J Neurosci* 24:7727-7739.
- Carrasquero LM, Delicado EG, Sanchez-Ruiloba L, Iglesias T, Miras-Portugal MT** (2010) Mechanisms of protein kinase D activation in response to P2Y(2) and P2X7 receptors in primary astrocytes. *Glia*.
- Carrasquero LM, Delicado EG, Bustillo D, Gutierrez-Martin Y, Artalejo AR, Miras-Portugal MT** (2009) P2X7 and P2Y13 purinergic receptors mediate intracellular calcium responses to BzATP in rat cerebellar astrocytes. *J Neurochem* 110:879-889.
- Cavaliere F, Amadio S, Sancesario G, Bernardi G, Volonte C** (2004) Synaptic P2X7 and oxygen/glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures. *J Cereb Blood Flow Metab* 24:392-398.
- Collingridge GL, Olsen RW, Peters J, Spedding M** (2009) A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology* 56:2-5.
- Collo G, Neidhart S, Kawashima E, Kosco-Vilbois M, North RA, Buell G** (1997) Tissue distribution of the P2X7 receptor. *Neuropharmacology* 36:1277-1283.
- Communi D, Gonzalez NS, Detheux M, Brezillon S, Lannoy V, Parmentier M, Boeynaems JM** (2001) Identification of a novel human ADP receptor coupled to G(i). *J Biol Chem* 276:41479-41485.
- Cong SY, Pepers BA, Evert BO, Rubinsztein DC, Roos RA, van Ommen GJ, Dorsman JC** (2005) Mutant huntingtin represses CBP, but not p300, by binding and protein degradation. *Mol Cell Neurosci* 30:560-571.
- Craufurd D, Dodge A** (1993) Mutation size and age at onset in Huntington's disease. *J Med Genet* 30:1008-1011.
- Cristalli G, Costanzi S, Lambertucci C, Lupidi G, Vittori S, Volpini R, Camaioni E** (2001) Adenosine deaminase: functional implications and different classes of inhibitors. *Med Res Rev* 21:105-128.
- Cha JH, Kosinski CM, Kerner JA, Alsdorf SA, Mangiarini L, Davies SW, Penney JB, Bates GP, Young AB** (1998) Altered brain neurotransmitter receptors in transgenic mice expressing a portion of an abnormal human huntington disease gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:6480-6485.
- Cha JH, Frey AS, Alsdorf SA, Kerner JA, Kosinski CM, Mangiarini L, Penney JB, Jr., Davies SW, Bates GP, Young AB** (1999) Altered neurotransmitter receptor expression in transgenic mouse models of Huntington's disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354:981-989.

- Chambers LJ, Stevens AJ, Moses AP, Michel AD, Walter DS, Davies DJ, Livermore DG, Fonfria E, Demont EH, Vimal M, Theobald PJ, Beswick PJ, Gleave RJ, Roman SA, Senger S** (2010) Synthesis and structure-activity relationships of a series of (1H-pyrazol-4-yl)acetamide antagonists of the P2X(7) receptor. *Bioorg Med Chem Lett*.
- Chaumont S, Jiang LH, Penna A, North RA, Rassendren F** (2004) Identification of a trafficking motif involved in the stabilization and polarization of P2X receptors. *J Biol Chem* 279:29628-29638.
- Cheewatrakoolpong B, Gilcrest H, Anthes JC, Greenfeder S** (2005) Identification and characterization of splice variants of the human P2X7 ATP channel. *Biochem Biophys Res Commun* 332:17-27.
- Chen CC, Akopian AN, Sivilotti L, Colquhoun D, Burnstock G, Wood JN** (1995) A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature* 377:428-431.
- Chen X, Pierce B, Naing W, Grapperhaus ML, Phillion DP** (2010) Discovery of 2-chloro-N-((4,4-difluoro-1-hydroxycyclohexyl)methyl)-5-(5-fluoropyrimidin-2-yl)benzamide as a potent and CNS penetrable P2X(7) receptor antagonist. *Bioorg Med Chem Lett*.
- Chessell IP, Hatcher JP, Bountra C, Michel AD, Hughes JP, Green P, Egerton J, Murfin M, Richardson J, Peck WL, Grahames CB, Casula MA, Yiangou Y, Birch R, Anand P, Buell GN** (2005) Disruption of the P2X7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain. *Pain* 114:386-396.
- Cheung KK, Chan WY, Burnstock G** (2005) Expression of P2X purinoceptors during rat brain development and their inhibitory role on motor axon outgrowth in neural tube explant cultures. *Neuroscience* 133:937-945.
- Da Silva JS, Medina M, Zuliani C, Di Nardo A, Witke W, Dotti CG** (2003) RhoA/ROCK regulation of neuriteogenesis via profilin Ila-mediated control of actin stability. *The Journal of cell biology* 162:1267-1279.
- Dahl R, Sergienko EA, Su Y, Mostofi YS, Yang L, Simao AM, Narisawa S, Brown B, Mangravita-Novo A, Vicchiarelli M, Smith LH, O'Neill WC, Millan JL, Cosford ND** (2009) Discovery and validation of a series of aryl sulfonamides as selective inhibitors of tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP). *J Med Chem* 52:6919-6925.
- De Rooij KE, Dorsman JC, Smoor MA, Den Dunnen JT, Van Ommen GJ** (1996) Subcellular localization of the Huntington's disease gene product in cell lines by immunofluorescence and biochemical subcellular fractionation. *Hum Mol Genet* 5:1093-1099.
- Delarasse C, Gonnord P, Galante M, Auger R, Daniel H, Motta I, Kanellopoulos JM** (2009) Neural progenitor cell death is induced by extracellular ATP via ligation of P2X7 receptor. *J Neurochem* 109:846-857.

- Delicado EG, Jimenez AI, Carrasquero LM, Castro E, Miras-Portugal MT** (2005) Cross-talk among epidermal growth factor, Ap(5)A, and nucleotide receptors causing enhanced ATP Ca(2+) signaling involves extracellular kinase activation in cerebellar astrocytes. *J Neurosci Res* 81:789-796.
- DeLong MR** (1990) Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends in neurosciences* 13:281-285.
- DeLong MR, Wichmann T** (2007) Circuits and circuit disorders of the basal ganglia. *Arch Neurol* 64:20-24.
- Denlinger LC, Sommer JA, Parker K, Gudipaty L, Fiset PL, Watters JW, Proctor RA, Dubyak GR, Bertics PJ** (2003) Mutation of a dibasic amino acid motif within the C terminus of the P2X7 nucleotide receptor results in trafficking defects and impaired function. *J Immunol* 171:1304-1311.
- Denlinger LC, Coursin DB, Schell K, Angelini G, Green DN, Guadarrama AG, Halsey J, Prabhu U, Hogan KJ, Bertics PJ** (2006) Human P2X7 pore function predicts allele linkage disequilibrium. *Clin Chem* 52:995-1004.
- Di Maio L, Squitieri F, Napolitano G, Campanella G, Trofatter JA, Conneally PM** (1993) Suicide risk in Huntington's disease. *J Med Genet* 30:293-295.
- Di Virgilio F** (1995) The P2Z purinoceptor: an intriguing role in immunity, inflammation and cell death. *Immunol Today* 16:524-528.
- Di Virgilio F** (2003) Novel data point to a broader mechanism of action of oxidized ATP: the P2X7 receptor is not the only target. *Br J Pharmacol* 140:441-443.
- Di Virgilio F** (2007) Liaisons dangereuses: P2X(7) and the inflammasome. *Trends Pharmacol Sci* 28:465-472.
- Diaz-Hernandez M, Pintor J, Miras-Portugal MT** (2000) Modulation of the dinucleotide receptor present in rat midbrain synaptosomes by adenosine and ATP. *Br J Pharmacol* 130:434-440.
- Diaz-Hernandez M, Sanchez-Nogueiro J, Miras-Portugal MT** (2006) Role of CaMKII in the cross talk between ionotropic nucleotide and nicotinic receptors in individual cholinergic terminals. *J Mol Neurosci* 30:177-180.
- Diaz-Hernandez M, Pintor J, Castro E, Miras-Portugal MT** (2001) Independent receptors for diadenosine pentaphosphate and ATP in rat midbrain single synaptic terminals. *Eur J Neurosci* 14:918-926.
- Diaz-Hernandez M, Pintor J, Castro E, Miras-Portugal MT** (2002a) Co-localisation of functional nicotinic and ionotropic nucleotide receptors in isolated cholinergic synaptic terminals. *Neuropharmacology* 42:20-33.
- Diaz-Hernandez M, Sanchez-Nogueiro J, Pintor J, Miras-Portugal MT** (2004a) Interaction between dinucleotide and nicotinic receptors in individual cholinergic terminals. *J Pharmacol Exp Ther* 311:954-967.
- Diaz-Hernandez M, Pereira MF, Pintor J, Cunha RA, Ribeiro JA, Miras-Portugal MT** (2002b) Modulation of the rat hippocampal dinucleotide

- receptor by adenosine receptor activation. *J Pharmacol Exp Ther* 301:441-450.
- Diaz-Hernandez M, Torres-Peraza J, Salvatori-Abarca A, Moran MA, Gomez-Ramos P, Alberch J, Lucas JJ** (2005) Full motor recovery despite striatal neuron loss and formation of irreversible amyloid-like inclusions in a conditional mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci* 25:9773-9781.
- Diaz-Hernandez M, del Puerto A, Diaz-Hernandez JI, Diez-Zaera M, Lucas JJ, Garrido JJ, Miras-Portugal MT** (2008) Inhibition of the ATP-gated P2X7 receptor promotes axonal growth and branching in cultured hippocampal neurons. *J Cell Sci* 121:3717-3728.
- Diaz-Hernandez M, Hernandez F, Martin-Aparicio E, Gomez-Ramos P, Moran MA, Castano JG, Ferrer I, Avila J, Lucas JJ** (2003) Neuronal induction of the immunoproteasome in Huntington's disease. *J Neurosci* 23:11653-11661.
- Diaz-Hernandez M, Moreno-Herrero F, Gomez-Ramos P, Moran MA, Ferrer I, Baro AM, Avila J, Hernandez F, Lucas JJ** (2004b) Biochemical, ultrastructural, and reversibility studies on huntingtin filaments isolated from mouse and human brain. *J Neurosci* 24:9361-9371.
- Dickson BJ** (2002) Molecular mechanisms of axon guidance. *Science* 298:1959-1964.
- DiFiglia M, Sapp E, Chase KO, Davies SW, Bates GP, Vonsattel JP, Aronin N** (1997) Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* 277:1990-1993.
- DiFiglia M, Sapp E, Chase K, Schwarz C, Meloni A, Young C, Martin E, Vonsattel JP, Carraway R, Reeves SA, et al.** (1995) Huntingtin is a cytoplasmic protein associated with vesicles in human and rat brain neurons. *Neuron* 14:1075-1081.
- Donnelly-Roberts DL, Jarvis MF** (2007) Discovery of P2X7 receptor-selective antagonists offers new insights into P2X7 receptor function and indicates a role in chronic pain states. *Br J Pharmacol* 151:571-579.
- Donnelly-Roberts DL, Namovic MT, Faltynek CR, Jarvis MF** (2004) Mitogen-activated protein kinase and caspase signaling pathways are required for P2X7 receptor (P2X7R)-induced pore formation in human THP-1 cells. *J Pharmacol Exp Ther* 308:1053-1061.
- Dotti CG, Sullivan CA, Banker GA** (1988) The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 8:1454-1468.
- Drury AN, Szent-Gyorgyi A** (1929) The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol* 68:213-237.

- Dubyak GR, el-Moatassim C** (1993) Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am J Physiol* 265:C577-606.
- Dunah AW, Jeong H, Griffin A, Kim YM, Standaert DG, Hersch SM, Mouradian MM, Young AB, Tanese N, Krainc D** (2002) Sp1 and TAFII130 transcriptional activity disrupted in early Huntington's disease. *Science* 296:2238-2243.
- Duyao MP, Auerbach AB, Ryan A, Persichetti F, Barnes GT, McNeil SM, Ge P, Vonsattel JP, Gusella JF, Joyner AL, et al.** (1995) Inactivation of the mouse Huntington's disease gene homolog Hdh. *Science* 269:407-410.
- Edwards FA, Gibb AJ, Colquhoun D** (1992) ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system. *Nature* 359:144-147.
- Eickhorst AN, Berson A, Cockayne D, Lester HA, Khakh BS** (2002) Control of P2X(2) channel permeability by the cytosolic domain. *J Gen Physiol* 120:119-131.
- Eltzschig HK, Eckle T, Mager A, Kuper N, Karcher C, Weissmuller T, Boengler K, Schulz R, Robson SC, Colgan SP** (2006) ATP release from activated neutrophils occurs via connexin 43 and modulates adenosine-dependent endothelial cell function. *Circ Res* 99:1100-1108.
- Ennion SJ, Evans RJ** (2002) Conserved cysteine residues in the extracellular loop of the human P2X(1) receptor form disulfide bonds and are involved in receptor trafficking to the cell surface. *Mol Pharmacol* 61:303-311.
- Erb L, Liao Z, Seye CI, Weisman GA** (2006) P2 receptors: intracellular signaling. *Pflugers Arch* 452:552-562.
- Ermonval M, Baudry A, Baychelier F, Pradines E, Pietri M, Oda K, Schneider B, Mouillet-Richard S, Launay JM, Kellermann O** (2009) The cellular prion protein interacts with the tissue non-specific alkaline phosphatase in membrane microdomains of bioaminergic neuronal cells. *PLoS One* 4:e6497.
- Escalante-Alcalde D, Recillas-Targa F, Hernandez-Garcia D, Castro-Obregon S, Terao M, Garattini E, Covarrubias L** (1996) Retinoic acid and methylation cis-regulatory elements control the mouse tissue non-specific alkaline phosphatase gene expression. *Mech Dev* 57:21-32.
- Evans RJ, Lewis C, Buell G, Valera S, North RA, Surprenant A** (1995) Pharmacological characterization of heterologously expressed ATP-gated cation channels (P2x purinoceptors). *Mol Pharmacol* 48:178-183.
- Feng YH, Li X, Wang L, Zhou L, Gorodeski GI** (2006) A truncated P2X7 receptor variant (P2X7-j) endogenously expressed in cervical cancer cells antagonizes the full-length P2X7 receptor through hetero-oligomerization. *J Biol Chem* 281:17228-17237.

- Feng YH, Wang L, Wang Q, Li X, Zeng R, Gorodeski GI** (2005) ATP stimulates GRK-3 phosphorylation and beta-arrestin-2-dependent internalization of P2X7 receptor. *Am J Physiol Cell Physiol* 288:C1342-1356.
- Fernagut PO, Diguët E, Labattu B, Tison F** (2002) A simple method to measure stride length as an index of nigrostriatal dysfunction in mice. *J Neurosci Methods* 113:123-130.
- Ferrari D, Wesselborg S, Bauer MK, Schulze-Osthoff K** (1997a) Extracellular ATP activates transcription factor NF-kappaB through the P2Z purinoreceptor by selectively targeting NF-kappaB p65. *The Journal of cell biology* 139:1635-1643.
- Ferrari D, Chiozzi P, Falzoni S, Dal Susino M, Collo G, Buell G, Di Virgilio F** (1997b) ATP-mediated cytotoxicity in microglial cells. *Neuropharmacology* 36:1295-1301.
- Ferrari D, Pizzirani C, Adinolfi E, Lemoli RM, Curti A, Idzko M, Panther E, Di Virgilio F** (2006) The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. *J Immunol* 176:3877-3883.
- Fischer W, Krugel U** (2007) P2Y receptors: focus on structural, pharmacological and functional aspects in the brain. *Curr Med Chem* 14:2429-2455.
- Fonta C, Negyessy L, Renaud L, Barone P** (2005) Postnatal development of alkaline phosphatase activity correlates with the maturation of neurotransmission in the cerebral cortex. *J Comp Neurol* 486:179-196.
- Franke H, Illes P** (2006) Involvement of P2 receptors in the growth and survival of neurons in the CNS. *Pharmacol Ther* 109:297-324.
- Franke H, Krugel U, Illes P** (2006) P2 receptors and neuronal injury. *Pflugers Arch* 452:622-644.
- Fredholm BB, AP IJ, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J** (2001) International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 53:527-552.
- Frotscher M, Heimrich B, Deller T** (1997) Sprouting in the hippocampus is layer-specific. *Trends in neurosciences* 20:218-223.
- Fumagalli M, Brambilla R, D'Ambrosi N, Volonte C, Matteoli M, Verderio C, Abbracchio MP** (2003) Nucleotide-mediated calcium signaling in rat cortical astrocytes: Role of P2X and P2Y receptors. *Glia* 43:218-203.
- Garcia A, Shankar H, Murugappan S, Kim S, Kunapuli SP** (2007) Regulation and functional consequences of ADP receptor-mediated ERK2 activation in platelets. *Biochem J* 404:299-308.
- Gargett CE, Wiley JS** (1997) The isoquinoline derivative KN-62 a potent antagonist of the P2Z-receptor of human lymphocytes. *Br J Pharmacol* 120:1483-1490.
- Garrido JJ, Diaz-Hernandez M** (2009) Mecanismos implicados en la axonogénesis, el crecimiento axonal y la localización de proteínas en el

- axón. In: *Avances en Neurociencia: Neurotransmisores y Patologías Nerviosas*, pp 19-48. Madrid: Instituto de España. Real Academia Nacional de Farmacia.
- Garrido JJ, Simon D, Varea O, Wandosell F** (2007) GSK3 alpha and GSK3 beta are necessary for axon formation. *FEBS Lett* 581:1579-1586.
- Gauthier LR, Charrin BC, Borrell-Pages M, Dompierre JP, Rangone H, Cordelieres FP, De Mey J, MacDonald ME, Lessmann V, Humbert S, Saudou F** (2004) Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell* 118:127-138.
- Gendron FP, Neary JT, Theiss PM, Sun GY, Gonzalez FA, Weisman GA** (2003) Mechanisms of P2X7 receptor-mediated ERK1/2 phosphorylation in human astrocytoma cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 284:C571-581.
- Gever JR, Cockayne DA, Dillon MP, Burnstock G, Ford AP** (2006) Pharmacology of P2X channels. *Pflugers Arch* 452:513-537.
- Gil JM, Rego AC** (2008) Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease. *Eur J Neurosci* 27:2803-2820.
- Glass M, Dragunow M, Faull RL** (2000) The pattern of neurodegeneration in Huntington's disease: a comparative study of cannabinoid, dopamine, adenosine and GABA(A) receptor alterations in the human basal ganglia in Huntington's disease. *Neuroscience* 97:505-519.
- Goding JW, Grobбен B, Slegers H** (2003) Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. *Biochim Biophys Acta* 1638:1-19.
- Gomez-Villafuertes R, Gualix J, Miras-Portugal MT** (2001) Single GABAergic synaptic terminals from rat midbrain exhibit functional P2X and dinucleotide receptors, able to induce GABA secretion. *J Neurochem* 77:84-93.
- Gomez-Villafuertes R, Pintor J, Gualix J, Miras-Portugal MT** (2003) GABAB receptor-mediated presynaptic potentiation of ATP ionotropic receptors in rat midbrain synaptosomes. *Neuropharmacology* 44:311-323.
- Gomez-Villafuertes R, Pintor J, Gualix J, Miras-Portugal MT** (2004) GABA modulates presynaptic signalling mediated by dinucleotides on rat synaptic terminals. *J Pharmacol Exp Ther* 308:1148-1157.
- Gomez-Villafuertes R, del Puerto A, Diaz-Hernandez M, Bustillo D, Diaz-Hernandez JI, Huerta PG, Artalejo AR, Garrido JJ, Miras-Portugal MT** (2009) Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II signalling cascade mediates P2X7 receptor-dependent inhibition of neuritogenesis in neuroblastoma cells. *Febs J* 276:5307-5325.
- Gomez TM, Spitzer NC** (1999) In vivo regulation of axon extension and pathfinding by growth-cone calcium transients. *Nature* 397:350-355.

- Gomez TM, Zheng JQ** (2006) The molecular basis for calcium-dependent axon pathfinding. *Nat Rev Neurosci* 7:115-125.
- Gonnord P, Delarasse C, Auger R, Benihoud K, Prigent M, Cuif MH, Lamaze C, Kanellopoulos JM** (2009) Palmitoylation of the P2X7 receptor, an ATP-gated channel, controls its expression and association with lipid rafts. *FASEB J* 23:795-805.
- Gonzales EB, Kawate T, Gouaux E** (2009) Pore architecture and ion sites in acid-sensing ion channels and P2X receptors. *Nature* 460:599-604.
- Gordon-Weeks PR** (2004) Microtubules and growth cone function. *Journal of neurobiology* 58:70-83.
- Gordon JL** (1986) Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochem J* 233:309-319.
- Graveland GA, Williams RS, DiFiglia M** (1985) Evidence for degenerative and regenerative changes in neostriatal spiny neurons in Huntington's disease. *Science* 227:770-773.
- Grimes CA, Jope RS** (2001) CREB DNA binding activity is inhibited by glycogen synthase kinase-3 beta and facilitated by lithium. *J Neurochem* 78:1219-1232.
- Gross E** (1961) [On induction of sarcomas with specially purified triphenylmethane dyes, Light Green SF and Patent Blue AE, following repeated subcutaneous injection in rats.]. *Z Krebsforsch* 64:287-304.
- Group HS** (2006) Tetrabenazine as antichorea therapy in Huntington disease: a randomized controlled trial. *Neurology* 66:366-372.
- Gu BJ, Rathsam C, Stokes L, McGeachie AB, Wiley JS** (2009) Extracellular ATP dissociates nonmuscle myosin from P2X(7) complex: this dissociation regulates P2X(7) pore formation. *Am J Physiol Cell Physiol* 297:C430-439.
- Gu BJ, Zhang W, Worthington RA, Sluyter R, Dao-Ung P, Petrou S, Barden JA, Wiley JS** (2001) A Glu-496 to Ala polymorphism leads to loss of function of the human P2X7 receptor. *J Biol Chem* 276:11135-11142.
- Gu BJ, Sluyter R, Skarratt KK, Shemon AN, Dao-Ung LP, Fuller SJ, Barden JA, Clarke AL, Petrou S, Wiley JS** (2004) An Arg307 to Gln polymorphism within the ATP-binding site causes loss of function of the human P2X7 receptor. *J Biol Chem* 279:31287-31295.
- Gualix J, Pintor J, Miras-Portugal MT** (1999) Characterization of nucleotide transport into rat brain synaptic vesicles. *J Neurochem* 73:1098-1104.
- Gualix J, Gomez-Villafuertes R, Diaz-Hernandez M, Miras-Portugal MT** (2003) Presence of functional ATP and dinucleotide receptors in glutamatergic synaptic terminals from rat midbrain. *J Neurochem* 87:160-171.

- Gualix J, Fideu MD, Pintor J, Rotllan P, Garcia-Carmona F, Miras-Portugal MT** (1997) Characterization of diadenosine polyphosphate transport into chromaffin granules from adrenal medulla. *Faseb J* 11:981-990.
- Guidetti P, Charles V, Chen EY, Reddy PH, Kordower JH, Whetsell WO, Jr., Schwarcz R, Tagle DA** (2001) Early degenerative changes in transgenic mice expressing mutant huntingtin involve dendritic abnormalities but no impairment of mitochondrial energy production. *Exp Neurol* 169:340-350.
- Guo C, Masin M, Qureshi OS, Murrell-Lagnado RD** (2007) Evidence for functional P2X4/P2X7 heteromeric receptors. *Mol Pharmacol* 72:1447-1456.
- Gusella JF, McNeil S, Persichetti F, Srinidhi J, Novelletto A, Bird E, Faber P, Vonsattel JP, Myers RH, MacDonald ME** (1996) Huntington's disease. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 61:615-626.
- Gutekunst CA, Levey AI, Heilman CJ, Whaley WL, Yi H, Nash NR, Rees HD, Madden JJ, Hersch SM** (1995) Identification and localization of huntingtin in brain and human lymphoblastoid cell lines with anti-fusion protein antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:8710-8714.
- Gutekunst CA, Li SH, Yi H, Mulroy JS, Kuemmerle S, Jones R, Rye D, Ferrante RJ, Hersch SM, Li XJ** (1999) Nuclear and neuropil aggregates in Huntington's disease: relationship to neuropathology. *J Neurosci* 19:2522-2534.
- Haddad MS, Cummings JL** (1997) Huntington's disease. *Psychiatr Clin North Am* 20:791-807.
- Haines WR, Migita K, Cox JA, Egan TM, Voigt MM** (2001) The first transmembrane domain of the P2X receptor subunit participates in the agonist-induced gating of the channel. *J Biol Chem* 276:32793-32798.
- Hansson O, Guatteo E, Mercuri NB, Bernardi G, Li XJ, Castilho RF, Brundin P** (2001) Resistance to NMDA toxicity correlates with appearance of nuclear inclusions, behavioural deficits and changes in calcium homeostasis in mice transgenic for exon 1 of the huntington gene. *Eur J Neurosci* 14:1492-1504.
- Harkness DR** (1968) Studies on human placental alkaline phosphatase. II. Kinetic properties and studies on the apoenzyme. *Arch Biochem Biophys* 126:513-523.
- Harper PS** (1992) The epidemiology of Huntington's disease. *Hum Genet* 89:365-376.
- Heilbronn A, Zimmermann H** (1995) 5'-nucleotidase activates and an inhibitory antibody prevents neuritic differentiation of PC12 cells. *Eur J Neurosci* 7:1172-1179.
- Heine C, Heimrich B, Vogt J, Wegner A, Illes P, Franke H** (2006) P2 receptor-stimulation influences axonal outgrowth in the developing hippocampus in vitro. *Neuroscience* 138:303-311.

- Heinsen H, Strik M, Bauer M, Luther K, Ulmar G, Gangnus D, Jungkunz G, Eisenmenger W, Gotz M** (1994) Cortical and striatal neurone number in Huntington's disease. *Acta Neuropathol* 88:320-333.
- Heinsen H, Rub U, Bauer M, Ulmar G, Bethke B, Schuler M, Bocker F, Eisenmenger W, Gotz M, Korr H, Schmitz C** (1999) Nerve cell loss in the thalamic mediodorsal nucleus in Huntington's disease. *Acta Neuropathol* 97:613-622.
- Henthorn PS, Raducha M, Fedde KN, Lafferty MA, Whyte MP** (1992) Different missense mutations at the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene locus in autosomal recessively inherited forms of mild and severe hypophosphatasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:9924-9928.
- Hersch S, Fink K, Vonsattel JP, Friedlander RM** (2003) Minocycline is protective in a mouse model of Huntington's disease. *Ann Neurol* 54:841; author reply 842-843.
- Hervas C, Perez-Sen R, Miras-Portugal MT** (2003) Coexpression of functional P2X and P2Y nucleotide receptors in single cerebellar granule cells. *J Neurosci Res* 73:384-399.
- Hervas C, Perez-Sen R, Miras-Portugal MT** (2005) Presence of diverse functional P2X receptors in rat cerebellar synaptic terminals. *Biochem Pharmacol* 70:770-785.
- Hisatomi T, Enaida H, Matsumoto H, Kagimoto T, Ueno A, Hata Y, Kubota T, Goto Y, Ishibashi T** (2006) Staining ability and biocompatibility of brilliant blue G: preclinical study of brilliant blue G as an adjunct for capsular staining. *Arch Ophthalmol* 124:514-519.
- Hollopeter G, Jantzen HM, Vincent D, Li G, England L, Ramakrishnan V, Yang RB, Nurden P, Nurden A, Julius D, Conley PB** (2001) Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* 409:202-207.
- Honore P, Donnelly-Roberts D, Namovic MT, Hsieh G, Zhu CZ, Mikusa JP, Hernandez G, Zhong C, Gauvin DM, Chandran P, Harris R, Medrano AP, Carroll W, Marsh K, Sullivan JP, Faltynek CR, Jarvis MF** (2006) A-740003 [N-(1-[(cyanoimino)(5-quinolinylamino) methyl]amino)-2,2-dimethylpropyl)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetamide], a novel and selective P2X7 receptor antagonist, dose-dependently reduces neuropathic pain in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 319:1376-1385.
- Hoogeveen AT, Willemsen R, Meyer N, de Rooij KE, Roos RA, van Ommen GJ, Galjaard H** (1993) Characterization and localization of the Huntington disease gene product. *Hum Mol Genet* 2:2069-2073.
- Hou ST, Jiang SX, Smith RA** (2008) Permissive and repulsive cues and signalling pathways of axonal outgrowth and regeneration. *Int Rev Cell Mol Biol* 267:125-181.
- Housley GD, Luo L, Ryan AF** (1998) Localization of mRNA encoding the P2X2 receptor subunit of the adenosine 5'-triphosphate-gated ion channel in the

- adult and developing rat inner ear by in situ hybridization. *J Comp Neurol* 393:403-414.
- Hoylaerts MF, Manes T, Millan JL** (1997) Mammalian alkaline phosphatases are allosteric enzymes. *J Biol Chem* 272:22781-22787.
- Hu B, Senkler C, Yang A, Soto F, Liang BT** (2002) P2X<sub>4</sub> receptor is a glycosylated cardiac receptor mediating a positive inotropic response to ATP. *J Biol Chem* 277:15752-15757.
- Humphreys BD, Dubyak GR** (1996) Induction of the P2z/P2X<sub>7</sub> nucleotide receptor and associated phospholipase D activity by lipopolysaccharide and IFN- $\gamma$  in the human THP-1 monocytic cell line. *J Immunol* 157:5627-5637.
- Humphreys BD, Virginio C, Surprenant A, Rice J, Dubyak GR** (1998) Isoquinolines as antagonists of the P2X<sub>7</sub> nucleotide receptor: high selectivity for the human versus rat receptor homologues. *Mol Pharmacol* 54:22-32.
- Huntington G** (1872) On Chorea. *Medical and Surgical Reporter* 26:320-321.
- Hutchins BI, Kalil K** (2008) Differential outgrowth of axons and their branches is regulated by localized calcium transients. *J Neurosci* 28:143-153.
- Illes P, Alexandre Ribeiro J** (2004) Molecular physiology of P<sub>2</sub> receptors in the central nervous system. *Eur J Pharmacol* 483:5-17.
- Inoue K** (2002) Microglial activation by purines and pyrimidines. *Glia* 40:156-163.
- Jacobson KA, Jarvis MF, Williams M** (2002) Purine and pyrimidine (P<sub>2</sub>) receptors as drug targets. *J Med Chem* 45:4057-4093.
- Jahr CE, Jessell TM** (1983) ATP excites a subpopulation of rat dorsal horn neurones. *Nature* 304:730-733.
- Jeste DV, Barban L, Parisi J** (1984) Reduced Purkinje cell density in Huntington's disease. *Exp Neurol* 85:78-86.
- Jiang LH, Rassendren F, Surprenant A, North RA** (2000a) Identification of amino acid residues contributing to the ATP-binding site of a purinergic P2X receptor. *J Biol Chem* 275:34190-34196.
- Jiang LH, Mackenzie AB, North RA, Surprenant A** (2000b) Brilliant blue G selectively blocks ATP-gated rat P2X<sub>7</sub> receptors. *Mol Pharmacol* 58:82-88.
- Jin M, Guan CB, Jiang YA, Chen G, Zhao CT, Cui K, Song YQ, Wu CP, Poo MM, Yuan XB** (2005) Ca<sup>2+</sup>-dependent regulation of rho GTPases triggers turning of nerve growth cones. *J Neurosci* 25:2338-2347.
- Jin R, Banke TG, Mayer ML, Traynelis SF, Gouaux E** (2003) Structural basis for partial agonist action at ionotropic glutamate receptors. *Nature neuroscience* 6:803-810.
- Jo YH, Schlichter R** (1999) Synaptic corelease of ATP and GABA in cultured spinal neurons. *Nature neuroscience* 2:241-245.

- Jo YH, Role LW** (2002) Cholinergic modulation of purinergic and GABAergic co-transmission at in vitro hypothalamic synapses. *J Neurophysiol* 88:2501-2508.
- Jovanovic JN, Czernik AJ, Fienberg AA, Greengard P, Sihra TS** (2000) Synapsins as mediators of BDNF-enhanced neurotransmitter release. *Nature neuroscience* 3:323-329.
- Jun DJ, Kim J, Jung SY, Song R, Noh JH, Park YS, Ryu SH, Kim JH, Kong YY, Chung JM, Kim KT** (2007) Extracellular ATP mediates necrotic cell swelling in SN4741 dopaminergic neurons through P2X7 receptors. *J Biol Chem* 282:37350-37358.
- Juranyi Z, Sperlagh B, Vizi ES** (1999) Involvement of P2 purinoceptors and the nitric oxide pathway in [3H]purine outflow evoked by short-term hypoxia and hypoglycemia in rat hippocampal slices. *Brain Res* 823:183-190.
- Kaech S, Banker G** (2006) Culturing hippocampal neurons. *Nat Protoc* 1:2406-2415.
- Kahlenberg JM, Dubyak GR** (2004) Mechanisms of caspase-1 activation by P2X7 receptor-mediated K<sup>+</sup> release. *Am J Physiol Cell Physiol* 286:C1100-1108.
- Kaltenbach LS et al.** (2007) Huntingtin interacting proteins are genetic modifiers of neurodegeneration. *PLoS Genet* 3:e82.
- Kamiguchi H** (2006) The region-specific activities of lipid rafts during axon growth and guidance. *J Neurochem* 98:330-335.
- Kaunitz JD, Yamaguchi DT** (2008) TNAP, TrAP, ecto-purinergic signaling, and bone remodeling. *J Cell Biochem* 105:655-662.
- Kawate T, Michel JC, Birdsong WT, Gouaux E** (2009) Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state. *Nature* 460:592-598.
- Kennedy TE** (2000) Cellular mechanisms of netrin function: long-range and short-range actions. *Biochem Cell Biol* 78:569-575.
- Khakh BS, North RA** (2006) P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature* 442:527-532.
- Khakh BS, Gittermann D, Cockayne DA, Jones A** (2003) ATP modulation of excitatory synapses onto interneurons. *J Neurosci* 23:7426-7437.
- Khakh BS, Burnstock G, Kennedy C, King BF, North RA, Seguela P, Voigt M, Humphrey PP** (2001) International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacol Rev* 53:107-118.
- Kim M, Jiang LH, Wilson HL, North RA, Surprenant A** (2001) Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex. *Embo J* 20:6347-6358.
- Kim WY, Zhou FQ, Zhou J, Yokota Y, Wang YM, Yoshimura T, Kaibuchi K, Woodgett JR, Anton ES, Snider WD** (2006) Essential roles for GSK-3s

- and GSK-3-primed substrates in neurotrophin-induced and hippocampal axon growth. *Neuron* 52:981-996.
- King BF, Townsend-Nicholson A** (2003) Nucleoside and nucleotide receptors. *Tocris Review* 23:1-11.
- King BF, Liu M, Pintor J, Gualix J, Miras-Portugal MT, Burnstock G** (1999) Diinosine pentaphosphate (IP5I) is a potent antagonist at recombinant rat P2X1 receptors. *Br J Pharmacol* 128:981-988.
- King BF, Townsend-Nicholson A, Wildman SS, Thomas T, Spyer KM, Burnstock G** (2000) Coexpression of rat P2X2 and P2X6 subunits in *Xenopus* oocytes. *J Neurosci* 20:4871-4877.
- Kozlenkov A, Le Du MH, Cuniasse P, Ny T, Hoylaerts MF, Millan JL** (2004) Residues determining the binding specificity of uncompetitive inhibitors to tissue-nonspecific alkaline phosphatase. *J Bone Miner Res* 19:1862-1872.
- Krishtal OA, Marchenko SM, Pidoplichko VI** (1983) Receptor for ATP in the membrane of mammalian sensory neurones. *Neurosci Lett* 35:41-45.
- Kuhn TB, Schmidt MF, Kater SB** (1995) Laminin and fibronectin guideposts signal sustained but opposite effects to passing growth cones. *Neuron* 14:275-285.
- Kukulski F, Levesque SA, Lavoie EG, Lecka J, Bigonnesse F, Knowles AF, Robson SC, Kirley TL, Sevigny J** (2005) Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8. *Purinergic signalling* 1:193-204.
- Kullander K, Klein R** (2002) Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:475-486.
- Kyeyune-Nyombi E, Lau KH, Baylink DJ, Strong DD** (1991) 1,25-Dihydroxyvitamin D3 stimulates both alkaline phosphatase gene transcription and mRNA stability in human bone cells. *Arch Biochem Biophys* 291:316-325.
- Landwehrmeyer GB, McNeil SM, Dure LSt, Ge P, Aizawa H, Huang Q, Ambrose CM, Duyao MP, Bird ED, Bonilla E, et al.** (1995) Huntington's disease gene: regional and cellular expression in brain of normal and affected individuals. *Ann Neurol* 37:218-230.
- Langer D, Ikehara Y, Takebayashi H, Hawkes R, Zimmermann H** (2007) The ectonucleotidases alkaline phosphatase and nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2 are associated with subsets of progenitor cell populations in the mouse embryonic, postnatal and adult neurogenic zones. *Neuroscience* 150:863-879.
- Langer D, Hammer K, Koszalka P, Schrader J, Robson S, Zimmermann H** (2008) Distribution of ectonucleotidases in the rodent brain revisited. *Cell Tissue Res* 334:199-217.

- Lazarowski E** (2006) Regulated release of nucleotides and UDP sugars from astrocytoma cells. *Novartis Found Symp* 276:73-84; discussion 84-90, 107-112, 275-181.
- Lazarowski ER, Boucher RC, Harden TK** (2003) Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules. *Mol Pharmacol* 64:785-795.
- Le Feuvre R, Brough D, Rothwell N** (2002) Extracellular ATP and P2X7 receptors in neurodegeneration. *Eur J Pharmacol* 447:261-269.
- Leavitt BR, Guttman JA, Hodgson JG, Kimel GH, Singaraja R, Vogl AW, Hayden MR** (2001) Wild-type huntingtin reduces the cellular toxicity of mutant huntingtin in vivo. *Am J Hum Genet* 68:313-324.
- Lechner SG, Boehm S** (2004) Regulation of neuronal ion channels via P2Y receptors. *Purinergic signalling* 1:31-41.
- Ledent C, Vaugeois JM, Schiffmann SN, Pedrazzini T, El Yacoubi M, Vanderhaeghen JJ, Costentin J, Heath JK, Vassart G, Parmentier M** (1997) Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A2a receptor. *Nature* 388:674-678.
- Leon D, Hervas C, Miras-Portugal MT** (2006) P2Y1 and P2X7 receptors induce calcium/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation in cerebellar granule neurons. *Eur J Neurosci* 23:2999-3013.
- Leon D, Sanchez-Nogueiro J, Marin-Garcia P, Miras-Portugal MA** (2008) Glutamate release and synapsin-I phosphorylation induced by P2X7 receptors activation in cerebellar granule neurons. *Neurochem Int* 52:1148-1159.
- Li CM, Campbell SJ, Kumararatne DS, Hill AV, Lammas DA** (2002) Response heterogeneity of human macrophages to ATP is associated with P2X7 receptor expression but not to polymorphisms in the P2RX7 promoter. *FEBS Lett* 531:127-131.
- Li H, Wyman T, Yu ZX, Li SH, Li XJ** (2003a) Abnormal association of mutant huntingtin with synaptic vesicles inhibits glutamate release. *Hum Mol Genet* 12:2021-2030.
- Li JY, Plomann M, Brundin P** (2003b) Huntington's disease: a synaptopathy? *Trends Mol Med* 9:414-420.
- Li SH, Li XJ** (2004) Huntingtin-protein interactions and the pathogenesis of Huntington's disease. *Trends Genet* 20:146-154.
- Li SH, Gutekunst CA, Hersch SM, Li XJ** (1998) Interaction of huntingtin-associated protein with dynactin P150Glued. *J Neurosci* 18:1261-1269.
- Li SH, Schilling G, Young WS, 3rd, Li XJ, Margolis RL, Stine OC, Wagster MV, Abbott MH, Franz ML, Ranen NG, et al.** (1993) Huntington's disease gene (IT15) is widely expressed in human and rat tissues. *Neuron* 11:985-993.

- Lievens JC, Woodman B, Mahal A, Bates GP** (2002) Abnormal phosphorylation of synapsin I predicts a neuronal transmission impairment in the R6/2 Huntington's disease transgenic mice. *Mol Cell Neurosci* 20:638-648.
- Lin JW, Sugimori M, Llinas RR, McGuinness TL, Greengard P** (1990) Effects of synapsin I and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II on spontaneous neurotransmitter release in the squid giant synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:8257-8261.
- Liu BP, Cafferty WB, Budel SO, Strittmatter SM** (2006) Extracellular regulators of axonal growth in the adult central nervous system. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361:1593-1610.
- Liu GJ, Brockhausen J, Bennett MR** (2003) P2X1 receptor currents after disruption of the PKC site and its surroundings by dominant negative mutations in HEK293 cells. *Auton Neurosci* 108:12-16.
- Liu X, Surprenant A, Mao HJ, Roger S, Xia R, Bradley H, Jiang LH** (2008) Identification of key residues coordinating functional inhibition of P2X7 receptors by zinc and copper. *Mol Pharmacol* 73:252-259.
- Livak KJ, Schmittgen TD** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408.
- Lucae S, Salyakina D, Barden N, Harvey M, Gagne B, Labbe M, Binder EB, Uhr M, Paez-Pereda M, Sillaber I, Ising M, Bruckl T, Lieb R, Holsboer F, Muller-Myhsok B** (2006) P2RX7, a gene coding for a purinergic ligand-gated ion channel, is associated with major depressive disorder. *Hum Mol Genet* 15:2438-2445.
- Luthi-Carter R, Hanson SA, Strand AD, Bergstrom DA, Chun W, Peters NL, Woods AM, Chan EY, Kooperberg C, Krainc D, Young AB, Tapscott SJ, Olson JM** (2002) Dysregulation of gene expression in the R6/2 model of polyglutamine disease: parallel changes in muscle and brain. *Hum Mol Genet* 11:1911-1926.
- Lykissas MG, Batistatou AK, Charalabopoulos KA, Beris AE** (2007) The role of neurotrophins in axonal growth, guidance, and regeneration. *Curr Neurovasc Res* 4:143-151.
- Lynch KJ, Touma E, Niforatos W, Kage KL, Burgard EC, van Biesen T, Kowaluk EA, Jarvis MF** (1999) Molecular and functional characterization of human P2X(2) receptors. *Mol Pharmacol* 56:1171-1181.
- Mangiarini L, Sathasivam K, Seller M, Cozens B, Harper A, Hetherington C, Lawton M, Trotter Y, Lehrach H, Davies SW, Bates GP** (1996) Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* 87:493-506.
- Marchetti B, Abbracchio MP** (2005) To be or not to be (inflamed)--is that the question in anti-inflammatory drug therapy of neurodegenerative disorders? *Trends Pharmacol Sci* 26:517-525.

- Marin-Garcia P, Sanchez-Nogueiro J, Gomez-Villafuertes R, Leon D, Miras-Portugal MT** (2008) Synaptic terminals from mice midbrain exhibit functional P2X7 receptor. *Neuroscience* 151:361-373.
- Marin-García P** (2007) *Receptores de nucleótidos P2X presentes en Sistema Nervioso Central de Ratón: Caracterización y función*. In: Bioquímica y Biología Molecular IV. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.
- Markus A, Patel TD, Snider WD** (2002) Neurotrophic factors and axonal growth. *Current opinion in neurobiology* 12:523-531.
- Marquez-Klaka B, Rettinger J, Bhargava Y, Eisele T, Nicke A** (2007) Identification of an intersubunit cross-link between substituted cysteine residues located in the putative ATP binding site of the P2X1 receptor. *J Neurosci* 27:1456-1466.
- Martin-Aparicio E, Yamamoto A, Hernandez F, Hen R, Avila J, Lucas JJ** (2001) Proteasomal-dependent aggregate reversal and absence of cell death in a conditional mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci* 21:8772-8781.
- Matsuura S, Kishi F, Kajii T** (1990) Characterization of a 5'-flanking region of the human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene: two kinds of mRNA from a single gene. *Biochem Biophys Res Commun* 168:993-1000.
- McGaraughty S, Chu KL, Namovic MT, Donnelly-Roberts DL, Harris RR, Zhang XF, Shieh CC, Wismer CT, Zhu CZ, Gauvin DM, Fabiyi AC, Honore P, Gregg RJ, Kort ME, Nelson DW, Carroll WA, Marsh K, Faltynek CR, Jarvis MF** (2007) P2X7-related modulation of pathological nociception in rats. *Neuroscience* 146:1817-1828.
- McLarnon JG, Ryu JK, Walker DG, Choi HB** (2006) Upregulated expression of purinergic P2X(7) receptor in Alzheimer disease and amyloid-beta peptide-treated microglia and in peptide-injected rat hippocampus. *J Neuropathol Exp Neurol* 65:1090-1097.
- McQuillin A, Bass NJ, Choudhury K, Puri V, Kosmin M, Lawrence J, Curtis D, Gurling HM** (2009) Case-control studies show that a non-conservative amino-acid change from a glutamine to arginine in the P2RX7 purinergic receptor protein is associated with both bipolar- and unipolar-affective disorders. *Mol Psychiatry* 14:614-620.
- Michel AD, Chambers LJ, Clay WC, Condreay JP, Walter DS, Chessell IP** (2007) Direct labelling of the human P2X7 receptor and identification of positive and negative cooperativity of binding. *Br J Pharmacol* 151:103-114.
- Miki A, Tanaka Y, Ogata S, Ikehara Y** (1986) Selective preparation and characterization of membranous and soluble forms of alkaline phosphatase from rat tissues. A comparison with the serum enzyme. *Eur J Biochem* 160:41-48.

- Millan JL** (2006) Alkaline Phosphatases : Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes. *Purinergic signalling* 2:335-341.
- Miller LC, Swayne LA, Chen L, Feng ZP, Wacker JL, Muchowski PJ, Zamponi GW, Braun JE** (2003) Cysteine string protein (CSP) inhibition of N-type calcium channels is blocked by mutant huntingtin. *J Biol Chem* 278:53072-53081.
- Miras-Portugal MT, Diaz-Hernandez M, Giraldez L, Hervas C, Gomez-Villafuertes R, Sen RP, Gualix J, Pintor J** (2003) P2X7 receptors in rat brain: presence in synaptic terminals and granule cells. *Neurochem Res* 28:1597-1605.
- Modregger J, DiProspero NA, Charles V, Tagle DA, Plomann M** (2002) PACSIN 1 interacts with huntingtin and is absent from synaptic varicosities in presymptomatic Huntington's disease brains. *Hum Mol Genet* 11:2547-2558.
- Moore D, Chambers J, Waldvogel H, Faull R, Emson P** (2000) Regional and cellular distribution of the P2Y(1) purinergic receptor in the human brain: striking neuronal localisation. *J Comp Neurol* 421:374-384.
- Moore DJ, Chambers JK, Wahlin JP, Tan KB, Moore GB, Jenkins O, Emson PC, Murdock PR** (2001) Expression pattern of human P2Y receptor subtypes: a quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction study. *Biochim Biophys Acta* 1521:107-119.
- Mornet E** (2000) Hypophosphatasia: the mutations in the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene. *Hum Mutat* 15:309-315.
- Morton AJ, Edwardson JM** (2001) Progressive depletion of complexin II in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *J Neurochem* 76:166-172.
- Morton AJ, Faull RL, Edwardson JM** (2001) Abnormalities in the synaptic vesicle fusion machinery in Huntington's disease. *Brain Res Bull* 56:111-117.
- Nagai Y, Inui T, Popiel HA, Fujikake N, Hasegawa K, Urade Y, Goto Y, Naiki H, Toda T** (2007) A toxic monomeric conformer of the polyglutamine protein. *Nat Struct Mol Biol* 14:332-340.
- Nagaya N, Tittle RK, Saar N, Dellal SS, Hume RI** (2005) An intersubunit zinc binding site in rat P2X2 receptors. *J Biol Chem* 280:25982-25993.
- Nakamura K, Jeong SY, Uchihara T, Anno M, Nagashima K, Nagashima T, Ikeda S, Tsuji S, Kanazawa I** (2001) SCA17, a novel autosomal dominant cerebellar ataxia caused by an expanded polyglutamine in TATA-binding protein. *Hum Mol Genet* 10:1441-1448.
- Nakao N, Brundin P, Funa K, Lindvall O, Odin P** (1995) Trophic and protective actions of brain-derived neurotrophic factor on striatal DARPP-32-containing neurons in vitro. *Brain Res Dev Brain Res* 90:92-101.

- Nakazawa K, Ohno Y** (1999) Neighboring glycine residues are essential for P2X2 receptor/channel function. *Eur J Pharmacol* 370:R5-6.
- Nakazawa K, Inoue K, Koizumi S, Inoue K** (1994) Facilitation by 5-hydroxytryptamine of ATP-activated current in rat pheochromocytoma cells. *Pflugers Arch* 427:492-499.
- Nakazawa K, Ojima H, Ishii-Nozawa R, Takeuchi K, Ohno Y** (2004) Amino acid substitutions from an indispensable disulfide bond affect P2X2 receptor activation. *Eur J Pharmacol* 483:29-35.
- Naranjo JR, Gomez-Villafuertes R** (2009) Regulación transcripcional dependiente de calcio en el Sistema Nervioso. In: *Avances en Neurociencia: Neurotransmisores y Patologías Nerviosas*, pp 195-235. Madrid: Instituto de España. Real Academia Nacional de Farmacia.
- Narisawa S, Frohlander N, Millan JL** (1997) Inactivation of two mouse alkaline phosphatase genes and establishment of a model of infantile hypophosphatasia. *Dev Dyn* 208:432-446.
- Narisawa S, Hasegawa H, Watanabe K, Millan JL** (1994) Stage-specific expression of alkaline phosphatase during neural development in the mouse. *Dev Dyn* 201:227-235.
- Nasir J, Floresco SB, O'Kusky JR, Diewert VM, Richman JM, Zeisler J, Borowski A, Marth JD, Phillips AG, Hayden MR** (1995) Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes. *Cell* 81:811-823.
- Nelson DW, Gregg RJ, Kort ME, Perez-Medrano A, Voight EA, Wang Y, Grayson G, Namovic MT, Donnelly-Roberts DL, Niforatos W, Honore P, Jarvis MF, Faltynek CR, Carroll WA** (2006) Structure-activity relationship studies on a series of novel, substituted 1-benzyl-5-phenyltetrazole P2X7 antagonists. *J Med Chem* 49:3659-3666.
- Nicke A** (2008) Homotrimeric complexes are the dominant assembly state of native P2X7 subunits. *Biochem Biophys Res Commun* 377:803-808.
- Nicke A, Baumert HG, Rettinger J, Eichele A, Lambrecht G, Mutschler E, Schmalzing G** (1998) P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *Embo J* 17:3016-3028.
- Nicke A, Kuan YH, Masin M, Rettinger J, Marquez-Klaka B, Bender O, Gorecki DC, Murrell-Lagnado RD, Soto F** (2009) A functional P2X7 splice variant with an alternative transmembrane domain 1 escapes gene inactivation in P2X7 knock-out mice. *J Biol Chem* 284:25813-25822.
- Nobes CD, Hall A** (1995) Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81:53-62.
- Noh JY, Lee H, Song S, Kim NS, Im W, Kim M, Seo H, Chung CW, Chang JW, Ferrante RJ, Yoo YJ, Ryu H, Jung YK** (2009) SCAMP5 links

- endoplasmic reticulum stress to the accumulation of expanded polyglutamine protein aggregates via endocytosis inhibition. *J Biol Chem* 284:11318-11325.
- Norenberg W, Illes P** (2000) Neuronal P2X receptors: localisation and functional properties. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362:324-339.
- North RA** (1996) Families of ion channels with two hydrophobic segments. *Curr Opin Cell Biol* 8:474-483.
- North RA** (2002) Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 82:1013-1067.
- North RA, Verkhratsky A** (2006) Purinergic transmission in the central nervous system. *Pflugers Arch* 452:479-485.
- O'Donnell M, Chance RK, Bashaw GJ** (2009) Axon growth and guidance: receptor regulation and signal transduction. *Annu Rev Neurosci* 32:383-412.
- Ogata S, Hayashi Y, Takami N, Ikehara Y** (1988) Chemical characterization of the membrane-anchoring domain of human placental alkaline phosphatase. *J Biol Chem* 263:10489-10494.
- Ohnami S, Endo M, Hirai S, Uesaka N, Hatanaka Y, Yamashita T, Yamamoto N** (2008) Role of RhoA in activity-dependent cortical axon branching. *J Neurosci* 28:9117-9121.
- Ohtsuka T, Ryu H, Minamishima YA, Macip S, Sagara J, Nakayama KI, Aaronson SA, Lee SW** (2004) ASC is a Bax adaptor and regulates the p53-Bax mitochondrial apoptosis pathway. *Nat Cell Biol* 6:121-128.
- Olah J, Klivenyi P, Gardian G, Vecsei L, Orosz F, Kovacs GG, Westerhoff HV, Ovadi J** (2008) Increased glucose metabolism and ATP level in brain tissue of Huntington's disease transgenic mice. *FEBS J* 275:4740-4755.
- Olah ME, Stiles GL** (2000) The role of receptor structure in determining adenosine receptor activity. *Pharmacol Ther* 85:55-75.
- Orimo H, Shimada T** (2005) Regulation of the human tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene expression by all-trans-retinoic acid in SaOS-2 osteosarcoma cell line. *Bone* 36:866-876.
- Ortega F, Perez-Sen R, Miras-Portugal MT** (2008) Gi-coupled P2Y-ADP receptor mediates GSK-3 phosphorylation and beta-catenin nuclear translocation in granule neurons. *J Neurochem* 104:62-73.
- Ortega F, Perez-Sen R, Delicado EG, Miras-Portugal MT** (2009) P2X7 nucleotide receptor is coupled to GSK-3 inhibition and neuroprotection in cerebellar granule neurons. *Neurotox Res* 15:193-204.
- Ortega F, Perez-Sen R, Morente V, Delicado EG, Miras-Portugal MT** (2010) P2X7, NMDA and BDNF receptors converge on GSK3 phosphorylation and cooperate to promote survival in cerebellar granule neurons. *Cell Mol Life Sci*.

- Ouimet CC, LaMantia AS, Goldman-Rakic P, Rakic P, Greengard P** (1992) Immunocytochemical localization of DARPP-32, a dopamine and cyclic-AMP-regulated phosphoprotein, in the primate brain. *J Comp Neurol* 323:209-218.
- Pankratov Y, Castro E, Miras-Portugal MT, Krishtal O** (1998) A purinergic component of the excitatory postsynaptic current mediated by P2X receptors in the CA1 neurons of the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 10:3898-3902.
- Pankratov Y, Lalo U, Verkhatsky A, North RA** (2006) Vesicular release of ATP at central synapses. *Pflugers Arch* 452:589-597.
- Papp L, Vizi ES, Sperlagh B** (2007) P2X7 receptor mediated phosphorylation of p38MAP kinase in the hippocampus. *Biochem Biophys Res Commun* 355:568-574.
- Parvathenani LK, Tertysnikova S, Greco CR, Roberts SB, Robertson B, Posmantur R** (2003) P2X7 mediates superoxide production in primary microglia and is up-regulated in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 278:13309-13317.
- Pasterkamp RJ, Kolodkin AL** (2003) Semaphorin junction: making tracks toward neural connectivity. *Current opinion in neurobiology* 13:79-89.
- Paulsen JS, Ready RE, Hamilton JM, Mega MS, Cummings JL** (2001) Neuropsychiatric aspects of Huntington's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 71:310-314.
- Phillis JW, O'Regan MH, Perkins LM** (1993) Adenosine 5'-triphosphate release from the normoxic and hypoxic in vivo rat cerebral cortex. *Neurosci Lett* 151:94-96.
- Pintor J, Torres M, Miras-Portugal MT** (1991) Carbachol induced release of diadenosine polyphosphates--Ap4A and Ap5A--from perfused bovine adrenal medulla and isolated chromaffin cells. *Life Sci* 48:2317-2324.
- Pintor J, Rotllan P, Torres M, Miras-Portugal MT** (1992) Characterization and quantification of diadenosine hexaphosphate in chromaffin cells: granular storage and secretagogue-induced release. *Anal Biochem* 200:296-300.
- Pintor J, Porras A, Mora F, Miras-Portugal MT** (1993) Amphetamine-induced release of diadenosine polyphosphates--Ap4A and Ap5A--from caudate putamen of conscious rat. *Neurosci Lett* 150:13-16.
- Pintor J, Porras A, Mora F, Miras-Portugal MT** (1995) Dopamine receptor blockade inhibits the amphetamine-induced release of diadenosine polyphosphates, diadenosine tetraphosphate and diadenosine pentaphosphate, from neostriatum of the conscious rat. *J Neurochem* 64:670-676.
- Pintor JK, H.J.; Torres, M.; Miras-Portugal, M.T.; Zimmermann, H.** (1992) Synaptic vesicle storage of diadenosine polyphosphates in the *Torpedo* electric organ. *Neurosci Res Commun* 10:9-15.

- Portera-Cailliau C, Hedreen JC, Price DL, Koliatsos VE** (1995) Evidence for apoptotic cell death in Huntington disease and excitotoxic animal models. *J Neurosci* 15:3775-3787.
- Potucek YD, Crain JM, Watters JJ** (2006) Purinergic receptors modulate MAP kinases and transcription factors that control microglial inflammatory gene expression. *Neurochem Int* 49:204-214.
- Ralevic V, Burnstock G** (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50:413-492.
- Rathbone MP, Middlemiss PJ, Gysbers JW, Andrew C, Herman MA, Reed JK, Ciccarelli R, Di Iorio P, Caciagli F** (1999) Trophic effects of purines in neurons and glial cells. *Prog Neurobiol* 59:663-690.
- Rettinger J, Schmalzing G** (2003) Activation and desensitization of the recombinant P2X1 receptor at nanomolar ATP concentrations. *J Gen Physiol* 121:451-461.
- Rettinger J, Aschrafi A, Schmalzing G** (2000) Roles of individual N-glycans for ATP potency and expression of the rat P2X1 receptor. *J Biol Chem* 275:33542-33547.
- Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A** (2004) Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol* 22:326-330.
- Rico B, Beggs HE, Schahin-Reed D, Kimes N, Schmidt A, Reichardt LF** (2004) Control of axonal branching and synapse formation by focal adhesion kinase. *Nature neuroscience* 7:1059-1069.
- Richardson PJ, Brown SJ** (1987) ATP release from affinity-purified rat cholinergic nerve terminals. *J Neurochem* 48:622-630.
- Riedel T, Lozinsky I, Schmalzing G, Markwardt F** (2007) Kinetics of P2X7 receptor-operated single channels currents. *Biophys J* 92:2377-2391.
- Rigamonti D, Sipione S, Goffredo D, Zuccato C, Fossale E, Cattaneo E** (2001) Huntingtin's neuroprotective activity occurs via inhibition of procaspase-9 processing. *J Biol Chem* 276:14545-14548.
- Rigamonti D, Bauer JH, De-Fraja C, Conti L, Sipione S, Sciorati C, Clementi E, Hackam A, Hayden MR, Li Y, Cooper JK, Ross CA, Govoni S, Vincenz C, Cattaneo E** (2000) Wild-type huntingtin protects from apoptosis upstream of caspase-3. *J Neurosci* 20:3705-3713.
- Riley BE, Orr HT** (2006) Polyglutamine neurodegenerative diseases and regulation of transcription: assembling the puzzle. *Genes Dev* 20:2183-2192.
- Roberts JA, Evans RJ** (2004) ATP binding at human P2X1 receptors. Contribution of aromatic and basic amino acids revealed using mutagenesis and partial agonists. *J Biol Chem* 279:9043-9055.

- Roberts JA, Evans RJ** (2006) Contribution of conserved polar glutamine, asparagine and threonine residues and glycosylation to agonist action at human P2X1 receptors for ATP. *J Neurochem* 96:843-852.
- Roberts JA, Vial C, Digby HR, Agboh KC, Wen H, Atterbury-Thomas A, Evans RJ** (2006) Molecular properties of P2X receptors. *Pflugers Arch* 452:486-500.
- Robson SC, Sevigny J, Zimmermann H** (2006) The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic signalling* 2:409-430.
- Rodriguez del Castillo A, Torres M, Delicado EG, Miras-Portugal MT** (1988) Subcellular distribution studies of diadenosine polyphosphates--Ap4A and Ap5A--in bovine adrenal medulla: presence in chromaffin granules. *J Neurochem* 51:1696-1703.
- Roger S, Pelegrin P, Surprenant A** (2008) Facilitation of P2X7 receptor currents and membrane blebbing via constitutive and dynamic calmodulin binding. *J Neurosci* 28:6393-6401.
- Roger S, Mei ZZ, Baldwin JM, Dong L, Bradley H, Baldwin SA, Surprenant A, Jiang LH** (2010) Single nucleotide polymorphisms that were identified in affective mood disorders affect ATP-activated P2X7 receptor functions. *J Psychiatr Res* 44:347-355.
- Romero E, Cha GH, Verstreken P, Ly CV, Hughes RE, Bellen HJ, Botas J** (2008) Suppression of neurodegeneration and increased neurotransmission caused by expanded full-length huntingtin accumulating in the cytoplasm. *Neuron* 57:27-40.
- Roos RA, Hermans J, Vegter-van der Vlis M, van Ommen GJ, Bruyn GW** (1993) Duration of illness in Huntington's disease is not related to age at onset. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 56:98-100.
- Rosenblatt A, Leroi I** (2000) Neuropsychiatry of Huntington's disease and other basal ganglia disorders. *Psychosomatics* 41:24-30.
- Ross CA** (1997) Intranuclear neuronal inclusions: a common pathogenic mechanism for glutamine-repeat neurodegenerative diseases? *Neuron* 19:1147-1150.
- Rozas JL, Gomez-Sanchez L, Tomas-Zapico C, Lucas JJ, Fernandez-Chacon R** (2010) Presynaptic dysfunction in Huntington's disease. *Biochem Soc Trans* 38:488-492.
- Rubinsztein DC, Amos W, Leggo J, Goodburn S, Ramesar RS, Old J, Bontrop R, McMahon R, Barton DE, Ferguson-Smith MA** (1994) Mutational bias provides a model for the evolution of Huntington's disease and predicts a general increase in disease prevalence. *Nat Genet* 7:525-530.

- Ryu JK, Kim J, Choi SH, Oh YJ, Lee YB, Kim SU, Jin BK** (2002) ATP-induced in vivo neurotoxicity in the rat striatum via P2 receptors. *Neuroreport* 13:1611-1615.
- Salter MW, De Koninck Y, Henry JL** (1993) Physiological roles for adenosine and ATP in synaptic transmission in the spinal dorsal horn. *Prog Neurobiol* 41:125-156.
- Sanchez-Nogueiro J, Marin-Garcia P, Miras-Portugal MT** (2005) Characterization of a functional P2X(7)-like receptor in cerebellar granule neurons from P2X(7) knockout mice. *FEBS Lett* 579:3783-3788.
- Sanchez-Nogueiro J, Marin-Garcia P, Leon D, Leon-Otegui M, Salas E, Gomez-Villafuertes R, Gualix J, Miras-Portugal MT** (2009) Axodendritic fibres of mouse cerebellar granule neurons exhibit a diversity of functional P2X receptors. *Neurochem Int* 55:671-682.
- Sapp E, Penney J, Young A, Aronin N, Vonsattel JP, DiFiglia M** (1999) Axonal transport of N-terminal huntingtin suggests early pathology of corticostriatal projections in Huntington disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 58:165-173.
- Sapp E, Schwarz C, Chase K, Bhide PG, Young AB, Penney J, Vonsattel JP, Aronin N, DiFiglia M** (1997) Huntingtin localization in brains of normal and Huntington's disease patients. *Ann Neurol* 42:604-612.
- Saudou F, Finkbeiner S, Devys D, Greenberg ME** (1998) Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell* 95:55-66.
- Sawada K, Echigo N, Juge N, Miyaji T, Otsuka M, Omote H, Yamamoto A, Moriyama Y** (2008) Identification of a vesicular nucleotide transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:5683-5686.
- Sawynok J, Downie JW, Reid AR, Cahill CM, White TD** (1993) ATP release from dorsal spinal cord synaptosomes: characterization and neuronal origin. *Brain Res* 610:32-38.
- Schnorrer F, Dickson BJ** (2004) Axon guidance: morphogens show the way. *Curr Biol* 14:R19-21.
- Sharp AH, Loev SJ, Schilling G, Li SH, Li XJ, Bao J, Wagster MV, Kotzok JA, Steiner JP, Lo A, et al.** (1995) Widespread expression of Huntington's disease gene (IT15) protein product. *Neuron* 14:1065-1074.
- Shemon AN, Sluyter R, Fernando SL, Clarke AL, Dao-Ung LP, Skarratt KK, Saunders BM, Tan KS, Gu BJ, Fuller SJ, Britton WJ, Petrou S, Wiley JS** (2006) A Thr357 to Ser polymorphism in homozygous and compound heterozygous subjects causes absent or reduced P2X7 function and impairs ATP-induced mycobacterial killing by macrophages. *J Biol Chem* 281:2079-2086.
- Shi SH, Jan LY, Jan YN** (2003) Hippocampal neuronal polarity specified by spatially localized mPar3/mPar6 and PI 3-kinase activity. *Cell* 112:63-75.

- Shi SH, Cheng T, Jan LY, Jan YN** (2004) APC and GSK-3beta are involved in mPar3 targeting to the nascent axon and establishment of neuronal polarity. *Curr Biol* 14:2025-2032.
- Sidique S, Ardecky R, Su Y, Narisawa S, Brown B, Millan JL, Sergienko E, Cosford ND** (2009) Design and synthesis of pyrazole derivatives as potent and selective inhibitors of tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP). *Bioorg Med Chem Lett* 19:222-225.
- Silvestroni A, Faull RL, Strand AD, Moller T** (2009) Distinct neuroinflammatory profile in post-mortem human Huntington's disease. *Neuroreport* 20:1098-1103.
- Simon J, Kidd EJ, Smith FM, Chessell IP, Murrell-Lagnado R, Humphrey PP, Barnard EA** (1997) Localization and functional expression of splice variants of the P2X2 receptor. *Mol Pharmacol* 52:237-248.
- Skaper SD** (2005) Neuronal growth-promoting and inhibitory cues in neuroprotection and neuroregeneration. *Ann N Y Acad Sci* 1053:376-385.
- Smith DL, Woodman B, Mahal A, Sathasivam K, Ghazi-Noori S, Lowden PA, Bates GP, Hockly E** (2003) Minocycline and doxycycline are not beneficial in a model of Huntington's disease. *Ann Neurol* 54:186-196.
- Smith M, Weiss MJ, Griffin CA, Murray JC, Buetow KH, Emanuel BS, Henthorn PS, Harris H** (1988) Regional assignment of the gene for human liver/bone/kidney alkaline phosphatase to chromosome 1p36.1-p34. *Genomics* 2:139-143.
- Smith R, Brundin P, Li JY** (2005a) Synaptic dysfunction in Huntington's disease: a new perspective. *Cell Mol Life Sci* 62:1901-1912.
- Smith R, Petersen A, Bates GP, Brundin P, Li JY** (2005b) Depletion of rabphilin 3A in a transgenic mouse model (R6/1) of Huntington's disease, a possible culprit in synaptic dysfunction. *Neurobiol Dis* 20:673-684.
- Smith R, Klein P, Koc-Schmitz Y, Waldvogel HJ, Faull RL, Brundin P, Plomann M, Li JY** (2007) Loss of SNAP-25 and rabphilin 3a in sensory-motor cortex in Huntington's disease. *J Neurochem* 103:115-123.
- Sneddon P, Westfall TD, Todorov LD, Todorova SM, Westfall DP, Nickel P, Kennedy C** (2000) The effect of P2 receptor antagonists and ATPase inhibition on sympathetic purinergic neurotransmission in the guinea-pig isolated vas deferens. *Br J Pharmacol* 129:1089-1094.
- Sokolova E, Skorinkin A, Fabbretti E, Masten L, Nistri A, Giniatullin R** (2004) Agonist-dependence of recovery from desensitization of P2X(3) receptors provides a novel and sensitive approach for their rapid up or downregulation. *Br J Pharmacol* 141:1048-1058.
- Solle M, Labasi J, Perregaux DG, Stam E, Petrushova N, Koller BH, Griffiths RJ, Gabel CA** (2001) Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors. *J Biol Chem* 276:125-132.

- Spargo E, Everall IP, Lantos PL** (1993) Neuronal loss in the hippocampus in Huntington's disease: a comparison with HIV infection. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 56:487-491.
- Sperligh B, Heinrich A, Csolle C** (2007) P2 receptor-mediated modulation of neurotransmitter release-an update. *Purinergic signalling* 3:269-284.
- Sperligh B, Vizi ES, Wirkner K, Illes P** (2006) P2X7 receptors in the nervous system. *Prog Neurobiol* 78:327-346.
- Srivastava T, Lal V, Prabhakar S** (1999) Juvenile Huntington's disease. *Neurol India* 47:340-341.
- Stefan C, Jansen S, Bollen M** (2005) NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity. *Trends in biochemical sciences* 30:542-550.
- Stokes L, Fuller SJ, Sluyter R, Skarratt KK, Gu BJ, Wiley JS** (2010) Two haplotypes of the P2X7 receptor containing the Ala-348 to Thr polymorphism exhibit a gain-of-function effect and enhanced interleukin-1{beta} secretion. *FASEB J*.
- Strong TV, Tagle DA, Valdes JM, Elmer LW, Boehm K, Swaroop M, Kaatz KW, Collins FS, Albin RL** (1993) Widespread expression of the human and rat Huntington's disease gene in brain and nonneural tissues. *Nat Genet* 5:259-265.
- Studer M, Terao M, Gianni M, Garattini E** (1991) Characterization of a second promoter for the mouse liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase gene: cell and tissue specific expression. *Biochem Biophys Res Commun* 179:1352-1360.
- Sugars KL, Rubinsztein DC** (2003) Transcriptional abnormalities in Huntington disease. *Trends Genet* 19:233-238.
- Sun D, Samuelson LC, Yang T, Huang Y, Paliege A, Saunders T, Briggs J, Schnermann J** (2001a) Mediation of tubuloglomerular feedback by adenosine: evidence from mice lacking adenosine 1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9983-9988.
- Sun Y, Savanenin A, Reddy PH, Liu YF** (2001b) Polyglutamine-expanded huntingtin promotes sensitization of N-methyl-D-aspartate receptors via post-synaptic density 95. *J Biol Chem* 276:24713-24718.
- Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, North RA, Buell G** (1996) The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science* 272:735-738.
- Suzuki T, Hide I, Ido K, Kohsaka S, Inoue K, Nakata Y** (2004) Production and release of neuroprotective tumor necrosis factor by P2X7 receptor-activated microglia. *J Neurosci* 24:1-7.
- Takahashi T, Kikuchi S, Katada S, Nagai Y, Nishizawa M, Onodera O** (2008) Soluble polyglutamine oligomers formed prior to inclusion body formation are cytotoxic. *Hum Mol Genet* 17:345-356.

- Tang F, Kalil K** (2005) Netrin-1 induces axon branching in developing cortical neurons by frequency-dependent calcium signaling pathways. *J Neurosci* 25:6702-6715.
- Tang F, Dent EW, Kalil K** (2003a) Spontaneous calcium transients in developing cortical neurons regulate axon outgrowth. *J Neurosci* 23:927-936.
- Tang TS, Tu H, Chan EY, Maximov A, Wang Z, Wellington CL, Hayden MR, Bezprozvanny I** (2003b) Huntingtin and huntingtin-associated protein 1 influence neuronal calcium signaling mediated by inositol-(1,4,5) triphosphate receptor type 1. *Neuron* 39:227-239.
- Tang TS, Slow E, Lupu V, Stavrovskaya IG, Sugimori M, Llinas R, Kristal BS, Hayden MR, Bezprozvanny I** (2005) Disturbed Ca<sup>2+</sup> signaling and apoptosis of medium spiny neurons in Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:2602-2607.
- Terao M, Pravtcheva D, Ruddle FH, Mintz B** (1988) Mapping of gene encoding mouse placental alkaline phosphatase to chromosome 4. *Somat Cell Mol Genet* 14:211-215.
- Terao M, Studer M, Gianni M, Garattini E** (1990) Isolation and characterization of the mouse liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase gene. *Biochem J* 268:641-648.
- The Huntington's disease collaborative research group** (1993) A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell* 72:971-983.
- Thibaudeau G, Drawbridge J, Dollarhide AW, Haque T, Steinberg MS** (1993) Three populations of migrating amphibian embryonic cells utilize different guidance cues. *Dev Biol* 159:657-668.
- Todorov LD, Mihaylova-Todorova S, Westfall TD, Sneddon P, Kennedy C, Bjur RA, Westfall DP** (1997) Neuronal release of soluble nucleotidases and their role in neurotransmitter inactivation. *Nature* 387:76-79.
- Toh Y, Yamamoto M, Endo H, Misumi Y, Ikehara Y** (1989) Isolation and characterization of a rat liver alkaline phosphatase gene. A single gene with two promoters. *Eur J Biochem* 182:231-237.
- Torres GE, Egan TM, Voigt MM** (1999) Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners. *J Biol Chem* 274:6653-6659.
- Torres GE, Haines WR, Egan TM, Voigt MM** (1998) Co-expression of P2X1 and P2X5 receptor subunits reveals a novel ATP-gated ion channel. *Mol Pharmacol* 54:989-993.
- Toth-Zsomboki E, Oury C, Watanabe H, Nilius B, Vermylen J, Hoylaerts MF** (2002) The intracellular tyrosine residues of the ATP-gated P2X(1) ion channel are essential for its function. *FEBS Lett* 524:15-19.

- Turmaine M, Raza A, Mahal A, Mangiarini L, Bates GP, Davies SW** (2000) Nonapoptotic neurodegeneration in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:8093-8097.
- Ueno A, Hisatomi T, Enaida H, Kagimoto T, Mochizuki Y, Goto Y, Kubota T, Hata Y, Ishibashi T** (2007) Biocompatibility of brilliant blue G in a rat model of subretinal injection. *Retina* 27:499-504.
- Vacca F, Amadio S, Sancesario G, Bernardi G, Volonte C** (2004) P2X3 receptor localizes into lipid rafts in neuronal cells. *J Neurosci Res* 76:653-661.
- van Kesteren RE, Spencer GE** (2003) The role of neurotransmitters in neurite outgrowth and synapse formation. *Rev Neurosci* 14:217-231.
- van Vugt JP, Siesling S, Piet KK, Zwinderman AH, Middelkoop HA, van Hilten JJ, Roos RA** (2001) Quantitative assessment of daytime motor activity provides a responsive measure of functional decline in patients with Huntington's disease. *Mov Disord* 16:481-488.
- Varma H, Cheng R, Voisine C, Hart AC, Stockwell BR** (2007) Inhibitors of metabolism rescue cell death in Huntington's disease models. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:14525-14530.
- Verhoef PA, Estacion M, Schilling W, Dubyak GR** (2003) P2X7 receptor-dependent blebbing and the activation of Rho-effector kinases, caspases, and IL-1 beta release. *J Immunol* 170:5728-5738.
- Vial C, Evans RJ** (2005) Disruption of lipid rafts inhibits P2X1 receptor-mediated currents and arterial vasoconstriction. *J Biol Chem* 280:30705-30711.
- Vial C, Tobin AB, Evans RJ** (2004a) G-protein-coupled receptor regulation of P2X1 receptors does not involve direct channel phosphorylation. *Biochem J* 382:101-110.
- Vial C, Roberts JA, Evans RJ** (2004b) Molecular properties of ATP-gated P2X receptor ion channels. *Trends Pharmacol Sci* 25:487-493.
- Virginio C, Church D, North RA, Surprenant A** (1997) Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X7 receptor. *Neuropharmacology* 36:1285-1294.
- Volonte C, D'Ambrosi N** (2009) Membrane compartments and purinergic signalling: the purinome, a complex interplay among ligands, degrading enzymes, receptors and transporters. *FEBS J* 276:318-329.
- Volonte C, Amadio S, Cavaliere F, D'Ambrosi N, Vacca F, Bernardi G** (2003) Extracellular ATP and neurodegeneration. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2:403-412.
- Vollmayer P, Clair T, Goding JW, Sano K, Servos J, Zimmermann H** (2003) Hydrolysis of diadenosine polyphosphates by nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases. *Eur J Biochem* 270:2971-2978.

- von Kugelgen I** (2006) Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacol Ther* 110:415-432.
- von Kugelgen I, Starke K** (1991) Release of noradrenaline and ATP by electrical stimulation and nicotine in guinea-pig vas deferens. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 344:419-429.
- von Kugelgen I, Wetter A** (2000) Molecular pharmacology of P2Y-receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362:310-323.
- Vonsattel JP, DiFiglia M** (1998) Huntington disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 57:369-384.
- Vonsattel JP, Myers RH, Stevens TJ, Ferrante RJ, Bird ED, Richardson EP, Jr.** (1985) Neuropathological classification of Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 44:559-577.
- Waelter S, Scherzinger E, Hasenbank R, Nordhoff E, Lurz R, Goehler H, Gauss C, Sathasivam K, Bates GP, Lehrach H, Wanker EE** (2001) The huntingtin interacting protein HIP1 is a clathrin and alpha-adaptin-binding protein involved in receptor-mediated endocytosis. *Hum Mol Genet* 10:1807-1817.
- Waymire KG, Mahuren JD, Jaje JM, Guilarte TR, Coburn SP, MacGregor GR** (1995) Mice lacking tissue non-specific alkaline phosphatase die from seizures due to defective metabolism of vitamin B-6. *Nat Genet* 11:45-51.
- Wegele H, Muller L, Buchner J** (2004) Hsp70 and Hsp90--a relay team for protein folding. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 151:1-44.
- Wen Z, Guirland C, Ming GL, Zheng JQ** (2004) A CaMKII/calcineurin switch controls the direction of Ca(2+)-dependent growth cone guidance. *Neuron* 43:835-846.
- Werner P, Seward EP, Buell GN, North RA** (1996) Domains of P2X receptors involved in desensitization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:15485-15490.
- Wexler NS, Young AB, Tanzi RE, Travers H, Starosta-Rubinstein S, Penney JB, Snodgrass SR, Shoulson I, Gomez F, Ramos Arroyo MA, et al.** (1987) Homozygotes for Huntington's disease. *Nature* 326:194-197.
- Wildman SS, Brown SG, Rahman M, Noel CA, Churchill L, Burnstock G, Unwin RJ, King BF** (2002) Sensitization by extracellular Ca(2+) of rat P2X(5) receptor and its pharmacological properties compared with rat P2X(1). *Mol Pharmacol* 62:957-966.
- Wiley JS, Dao-Ung LP, Li C, Shemon AN, Gu BJ, Smart ML, Fuller SJ, Barden JA, Petrou S, Sluyter R** (2003) An Ile-568 to Asn polymorphism prevents normal trafficking and function of the human P2X7 receptor. *J Biol Chem* 278:17108-17113.
- Witte H, Bradke F** (2008) The role of the cytoskeleton during neuronal polarization. *Current opinion in neurobiology* 18:479-487.

- Witte H, Neukirchen D, Bradke F** (2008) Microtubule stabilization specifies initial neuronal polarization. *The Journal of cell biology* 180:619-632.
- Witting A, Walter L, Wacker J, Moller T, Stella N** (2004) P2X7 receptors control 2-arachidonoylglycerol production by microglial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3214-3219.
- Witting A, Chen L, Cudaback E, Straiker A, Walter L, Rickman B, Moller T, Brosnan C, Stella N** (2006) Experimental autoimmune encephalomyelitis disrupts endocannabinoid-mediated neuroprotection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:6362-6367.
- Woo S, Gomez TM** (2006) Rac1 and RhoA promote neurite outgrowth through formation and stabilization of growth cone point contacts. *J Neurosci* 26:1418-1428.
- Yaar R, Jones MR, Chen JF, Ravid K** (2005) Animal models for the study of adenosine receptor function. *J Cell Physiol* 202:9-20.
- Yamada RX, Sasaki T, Ichikawa J, Koyama R, Matsuki N, Ikegaya Y** (2008) Long-range axonal calcium sweep induces axon retraction. *J Neurosci* 28:4613-4618.
- Yamamoto A, Lucas JJ, Hen R** (2000) Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a conditional model of Huntington's disease. *Cell* 101:57-66.
- Yong VW, Wells J, Giuliani F, Casha S, Power C, Metz LM** (2004) The promise of minocycline in neurology. *Lancet Neurol* 3:744-751.
- Yoshimura T, Arimura N, Kawano Y, Kawabata S, Wang S, Kaibuchi K** (2006) Ras regulates neuronal polarity via the PI3-kinase/Akt/GSK-3beta/CRMP-2 pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 340:62-68.
- Young MT, Pelegrin P, Surprenant A** (2007) Amino acid residues in the P2X7 receptor that mediate differential sensitivity to ATP and BzATP. *Mol Pharmacol* 71:92-100.
- Yu W, Qiang L, Solowska JM, Karabay A, Korulu S, Baas PW** (2008a) The microtubule-severing proteins spastin and katanin participate differently in the formation of axonal branches. *Molecular biology of the cell* 19:1485-1498.
- Yu Y, Ugawa S, Ueda T, Ishida Y, Inoue K, Kyaw Nyunt A, Umemura A, Mase M, Yamada K, Shimada S** (2008b) Cellular localization of P2X7 receptor mRNA in the rat brain. *Brain Res* 1194:45-55.
- Zeitlin S, Liu JP, Chapman DL, Papaioannou VE, Efstratiadis A** (1995) Increased apoptosis and early embryonic lethality in mice nullizygous for the Huntington's disease gene homologue. *Nat Genet* 11:155-163.
- Zeron MM, Hansson O, Chen N, Wellington CL, Leavitt BR, Brundin P, Hayden MR, Raymond LA** (2002) Increased sensitivity to N-methyl-D-aspartate receptor-mediated excitotoxicity in a mouse model of Huntington's disease. *Neuron* 33:849-860.

- Zhou H, Manji SS, Findlay DM, Martin TJ, Heath JK, Ng KW** (1994) Novel action of retinoic acid. Stabilization of newly synthesized alkaline phosphatase transcripts. *J Biol Chem* 269:22433-22439.
- Zhou Y, Gunput RA, Pasterkamp RJ** (2008) Semaphorin signaling: progress made and promises ahead. *Trends in biochemical sciences* 33:161-170.
- Zimmermann H** (1996) Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Prog Neurobiol* 49:589-618.
- Zimmermann H** (2000) Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362:299-309.
- Zimmermann H, Mishra SK, Shukla V, Langer D, Gampe K, Grimm I, Delic J, Braun N** (2007) Ecto-nucleotidases, molecular properties and functional impact. *An r Acad Nac Farm* 73 (2):1-30.
- Zuccato C, Tartari M, Crotti A, Goffredo D, Valenza M, Conti L, Cataudella T, Leavitt BR, Hayden MR, Timmusk T, Rigamonti D, Cattaneo E** (2003) Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes. *Nat Genet* 35:76-83.
- Zuccato C, Ciammola A, Rigamonti D, Leavitt BR, Goffredo D, Conti L, MacDonald ME, Friedlander RM, Silani V, Hayden MR, Timmusk T, Sipione S, Cattaneo E** (2001) Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science* 293:493-498.