

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



TESIS DOCTORAL

Demencia frontotemporal lobar asociada al déficit de progranulina: búsqueda de nuevas dianas terapéuticas y modelos experimentales para su desarrollo preclínico

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Ana de la Encarnación Salmerón

DIRECTOR

Ángeles Martín Requero

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE BIOLOGÍA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**DEMENCIA FRONTOTEMPORAL LOBAR ASOCIADA AL
DÉFICIT DE PROGRANULINA: BÚSQUEDA DE NUEVAS
DIANAS TERAPÉUTICAS Y MODELOS EXPERIMENTALES
PARA SU DESARROLLO PRECLÍNICO**

Memoria para optar al grado de doctor presentada por:

Ana de la Encarnación Salmerón

Bajo la dirección de la doctora

Ángeles Martín Requero

Madrid, 2017

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Medicina Celular y Molecular del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC) con recursos aportados por el Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2011-28630) (2012-2014) y por la Fundación Ramón Areces (2012-2015).

Parte de esta tesis ha sido publicada (se adjuntan los artículos en el apartado de anexos):

- **de la Encarnación A**, Alquézar C, Esteras N, Martín-Requero A. Progranulin deficiency reduces CDK4/6/pRb activation and survival of human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Mol Neurobiol.* 2015 Dec;52(3):1714-25. doi: 10.1007/s12035-014-8965-5. Epub 2014 Nov 7.
- **de la Encarnación A**, Alquézar C, Martín-Requero A. Increased Wnt Signaling and Reduced Viability in a Neuronal Model of Progranulin-Deficient Frontotemporal Lobar Degeneration. *Mol Neurobiol.* 2016 Dec; 53(10):7107-7118. Epub 2015 Dec 17.

A mi madre.

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Por fin ha llegado el momento de finalizar una etapa que comenzó hace ya casi cinco años. Cinco años con sus momentos malos y sus momentos buenos, pero destacan en su mayoría los momentos buenos por supuesto. Durante todo este tiempo han pasado numerosas personas en mi vida que me han ayudado, enseñado y aguantado, por lo que a todos ellos quisiera darles las gracias.

En primer lugar, quiero dar las gracias a la Dra. Ángeles Martín Requero, mi directora de tesis, por haberme dado la oportunidad de haber trabajado en su laboratorio. Gracias por haberme ayudado en este proceso tan largo, por haberme dedicado tu esfuerzo, tu tiempo y tus enseñanzas. Y gracias por haber sido una gran directora de tesis tan generosa y cercana.

También agradecer a la Dra. Consuelo González Manchón y a Gracia Porras por ayudarme en todos esos experimentos que se volvían un poco más complicados. Gracias por permitirme aprender de vosotras.

Me gustaría también agradecer en especial a dos mis compañeras de laboratorio en mi periodo en el CIB, Carolina y Noemí. Todo lo que he aprendido en esta etapa de mi vida ha sido gracias a ellas. Han contribuido enormemente a llevar a término este trabajo, sin ayuda de ellas no hubiera sido lo mismo.

No quiero olvidar a toda esa gente del CIB que de algún modo me han ayudado a la realización de mi tesis. Todo el personal de los servicios del CIB. Sin gente tan profesional nuestro trabajo no sería posible.

A mi compañera de Master y grandísima amiga Belén, que a pesar de no continuar juntas en esta etapa, marcó el inicio de otra nueva, convirtiéndose en mi compañera de confianzas.

Gracias también a Arturo mi gran amigo y biólogo que siempre me pregunta y ha mostrado muchísimo interés en esta larga etapa. Gracias por estar ahí tanto en los buenos como en los malos momentos.

A mis amigos de toda la vida: Jessica, Marta, Ignacio y Alberto por estar ahí y que a pesar de no pertenecer a este mundo han aguantado tantos años mis anécdotas “frikis” de biología, a pesar de no lograr a entender muchas de ellas.

A mi familia, a mis padres que gracias a ellos he llegado a donde estoy, por haberse preocupado tanto por mi formación, por ser tan pesados e insistentes en que continuase haciendo lo que hago. Gracias. A mi hermana, por haber mostrado tanto interés en este mundo tan desconocido para ella, para mí ha sido un placer compartir con ella las curiosidades y misterios de la biología. A mi padre, porque a pesar de tantas riñas para que siguiera adelante en los momentos que quería tirar la toalla, si no hubiera sido por eso a lo mejor no estaría aquí. Y en especial a mi madre, porque sé que le habría encantado poder estar aquí compartiendo este momento tan importante en mi vida. Espero que estéis orgullosos de mí, os quiero.

Y por último, y no menos especial, gracias a Aitor que empezó como un amigo y compañero en toda esta historia y se ha convertido en mi marido y gran apoyo. Gracias por haber estado ahí, por aguantar y comprender mis frustraciones cuando no me salía algún experimento o por haber escuchado y compartido mis alegrías cuando todo salía bien. Gracias por haber estado a mi lado, te quiero.

ÍNDICE

ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	7
ÍNDICE	11
ABREVIATURAS	23
ABSTRACT/RESUMEN	29
INTRODUCCIÓN	39
1. DEGENERACIÓN LOBAR FRONTOTEMPORAL	41
1.1. Historia.....	41
1.2. Epidemiología.....	42
2. CLASIFICACIÓN CLÍNICA DE LA DEGENERACIÓN LOBAR FRONTOTEMPORAL	44
2.1. Demencia Frontotemporal variante conductual (DFT-vc).....	44
2.2. Demencia Semántica (DS).....	44
2.3. Afaxia primaria progresiva no fluente (APPNF)	45
2.4. Otros trastornos neurodegenerativos dentro de la DLFT	45
3. CLASIFICACIÓN HISTOPATOLOGICA DE LA DEGENERACIÓN LOBAR FRONTOTEMPORAL	46
3.1. Demencia Lobar Frontotemporal con inclusiones de proteína Tau (DLFT-tau)	46
3.2. Demencia Lobar Frontotemporal con inclusiones de proteína FUS (DLFT-FUS)	47
3.3. Demencia Lobar Frontotemporal con agregados de proteína TDP-43 (DLFT- TDP).....	47
3.4. Demencia Lobar Frontotemporal con inclusiones de Proteínas del Sistema Ubiquitina-Proteasoma (DLFT-UPS).....	51
4. DIAGNÓSTICO DE LA DEMENCIA LOBAR FRONTOTEMPORAL	53
4.1. Diagnóstico por neuroimagen.....	54
4.2. Diagnóstico mediante biomarcadores	55

5.	DEMENCIA LOBAR FRONTOTEMPORAL ASOCIADA AL DÉFICIT DE PROGRAMULINA	56
6.	MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN LA DEGENERACIÓN NEURONAL EN LA DLFT-TDP	60
6.1.	Déficit de PGRN y neurodegeneración en la DLFT-TDP	60
6.2.	Disfunción mitocondrial y neurodegeneración en la DLFT-TDP	62
6.3.	Activación del ciclo celular como causa de neurodegeneración en la DLFT	65
7.	DEMENCIA LOBAR FRONTOTEMPORAL Y APOPTOSIS	69
8.	TRATAMIENTO Y PERSPECTIVAS TERAPÉUTICAS EN LA DEMENCIA LOBAR FRONTOTEMPORAL	71
8.1.	Tratamientos:.....	71
8.1.1.	Trastornos de conducta.....	71
8.1.2.	Deterioro cognitivo.....	72
8.1.3.	Cambios en los hábitos alimenticios.	72
8.2.	Estrategias terapéuticas en estudio, para prevenir o ralentizar la DLFT.	72
8.2.1.	Estrategias basadas en la proteína tau.....	73
8.2.2.	Estrategias basadas en la proteína PGRN.	74
8.2.3.	Estrategias basadas en la proteína TDP-43	75
8.2.4.	Estrategias basadas en otras posibles dianas	76
9.	MODELOS DE ESTUDIO DE LA DEMENCIA LOBAR FRONTOTEMPORAL.....	78
9.1.	Modelos animales.....	78
9.2.	Modelos celulares	80
	OBJETIVOS	83
	MATERIAL Y MÉTODOS.....	87
1.	LÍNEA CELULAR	89
2.	ANÁLISIS INMUNOLÓGICO MEDIANTE WESTERN BLOT	89
3.	PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL.....	93
4.	ARRAY DE ANTICUERPOS	94

5.	DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR.....	94
5.1.	Mediante ensayos de MTT	94
5.2.	Mediante recuento celular	95
6.	DETERMINACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR.....	95
7.	MEDIDA DE CONSUMO DE OXÍGENO EN CÉLULAS EN CULTIVO	96
8.	ESPECIES REACTIVAS DE ROS EN CÉLULAS SH-SY5Y	96
9.	DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL DE MEMBRANA DE LAS MITOCONDRIAS	97
10.	MASA MITOCONDRIAL EN LAS CÉLULAS SH-SY5Y.....	97
11.	MICROSCOPIA LASER CONFOCAL.....	98
12.	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS CASPASAS Y APOPTOSIS	98
13.	DIFERENCIACION CELULAR.....	99
14.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	99
15.	MATERIALES.....	99
	RESULTADOS.....	101
1.	CÉLULAS SH-SY5Y DEFICIENTES EN PGRN COMO MODELO DE LA DEMENCIA LOBAR FRONTOTEMPORAL	103
1.1.	Caracterización celular.....	103
1.2.	Papel de la disfunción mitocondrial en las células <i>GRN</i> KD SH-SY5Y.....	106
1.3.	Estudio de la influencia del déficit de PGRN en la proliferación de las células SH-SY5Y	113
1.3.1.	Estudio comparativo del control de supervivencia en células controles y <i>GRN</i> KD.....	113
1.3.2.	Efecto de la progranulina extracelular en el control de supervivencia/muerte en células SH-SY5Y.....	117
1.3.3.	Relación inversa entre proliferación y viabilidad celular en células SH-SY5Y diferenciadas.....	118
2.	PAPEL DE WNT EN LA VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS SH-SY5Y DEFICIENTES EN PGRN.....	120

2.1. Alteraciones en la señalización de Wnt en las células <i>GRN</i> KD	120
2.2. Papel de las rutas canónica y no canónica Wnt en el control se supervivencia/muerte celular	125
3. LA DEFICIENCIA DE PROGRANULINA REDUCE LA SUPERVIVENCIA DE LAS CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA SH-SY5Y HUMANAS	131
3.1. Vulnerabilidad de las células <i>GRN</i> KD ante un estrés	131
3.2. La PGRN extracelular protege a las células <i>GRN</i> KD de la retirada del suero.	132
3.3. La retirada del suero produce apoptosis.	133
3.4. Papel de la vía CDK4/6/pRb en la supervivencia celular	136
3.5. Vías de señalización implicadas en la muerte por la de la retirada del suero	138
3.6. La PGRN exógena normaliza la actividad de PI3K/Akt y de ERK1/2 en las células <i>GRN</i> KD	141
3.7. Efectos de EGF y de la insulina en la supervivencia de las células neurales <i>GRN</i> KD	142
DISCUSIÓN.....	143
1. CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA SH-SY5Y COMO MODELO DE ESTUDIO DE LA DLFT-TDP.....	145
1.1. Caracterización de la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y.....	145
1.2. Neurodegeneración en la DLFT-TDP y disfunción mitocondrial.....	146
2. MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DE SUPERVIVENCIA/MUERTE DE LAS CÉLULAS SH-SY5Y <i>GRN</i> KD	149
2.1. Relación entre la deficiencia en PGRN y ciclo celular/apoptosis.....	149
2.2. Relación entre la deficiencia en PGRN y las vías de señalización canónica y no canónica de Wnt	150
3. INFLUENCIA DE LA DEFICIENCIA DE PROGRANULINA EN LA SUPERVIVENCIA DE LAS CÉLULAS SH-SY5Y <i>GRN</i> KD	155
3.1. Efecto de la Progranulina en la muerte celular	155
3.2. Mecanismos moleculares implicados en la supervivencia celular ante la retirada del suero.....	155
CONCLUSIONES.....	161

BIBLIOGRAFÍA.....	165
ANEXOS.....	193

ÍNDICE DE IMÁGENES, TABLAS Y FIGURAS

INTRODUCCIÓN	39
Imagen 1: Cerebro de un paciente de DLFT.....	41
Imagen 2: Cronología de la evolución de la DLFT.....	42
Imagen 3: Cerebro de un paciente de DLFT.....	46
Imagen 4: Diagrama esquemático de la proteína TDP-43.....	48
Imagen 5: Estructura de la proteína TDP-43.....	48
Imagen 6: Distribución fisiológica y fisiopatológica de la proteína TDP-43	49
Tabla 1.....	51
Imagen 7: Ejemplo de imágenes obtenidas mediante técnicas de neuroimagen.....	54
Imagen 8: Representación esquemática de la localización cromosómica, genómica y estructura protéica de PGRN.....	57
Imagen 9: Representación esquemática de PGRN y los dominios GRN ...	58
Imagen 10: Visión general de las mutaciones de PGRN en la DLFT.....	59
Imagen 11: Representación esquemática de las distintas fases del ciclo celular.....	67
Tabla 2.....	74
Tabla 3.....	75
MATERIAL Y MÉTODOS	87
Tabla 4.....	92
Tabla 5.....	93
RESULTADOS	101
Figura 1: Caracterización de las células SH-SY5Y controles y <i>GRN</i> KD..	103
Figura 2: Influencia de la deficiencia de PGRN en la fosforilación y fragmentación de TDP-43.....	104

Figura 3: Viabilidad de las células SH-SY5Y controles y <i>GRN</i> KD	105
Figura 4: Consumo de oxígeno de las células SH-SY5Y controles y <i>GRN</i> KD	107
Figura 5: Porcentaje del consumo de oxígeno de las células SH-SY5Y controles y <i>GRN</i> KD	108
Figura 6: Acidificación celular de las células SH-SY5Y controles y <i>GRN</i> KD	109
Figura 7: Determinación de los niveles de ROS, del potencial de membrana mitocondrial.....	110
Figura 8: Determinación de la masa mitocondrial en las células SH-SY5Y <i>GRN</i> KD.....	112
Figura 9: Efecto de la deficiencia de PGRN en la proliferación de las células SH-SY5Y	114
Figura 10: Proteínas reguladoras en el la proliferación de las células <i>GRN</i> KD y las células controles	115
Figura 11: Efecto de la deficiencia de PGRN en la apoptosis de las células	116
Figura 12: Efecto de la PGRN en la viabilidad de las células SH-SY5H deficientes en progranulina.....	117
Figura 13: Diferenciación de las células neuronales SH-SY5Y a neuronas maduras.....	119
Tabla 5.....	121
Tabla 6.....	121
Figura 14: Sobre activación de la vía de señalización canónica de Wnt en las células de neuroblastoma SH-SY5Y <i>GRN</i> KD	123
Figura 15: Señalización no canónica de Wnt en las células controles y <i>GRN</i> KD de neuroblastoma SH-SY5Y	124
Figura 16: Efectos de Wnt1 y Wnt5a exógenos en la actividad proliferativa de las células control y <i>GRN</i> KD SH-SY5Y	126

Figura 17: Efectos del bloqueo de la señalización de Wnt en la incorporación de Brdu en el ADN	128
Figura 18: Efecto de los ligando y antagonistas de las vías de señalización Wnt en la viabilidad de las células control y <i>GRN</i> KD.....	129
Figura 19: Efecto del medio condicionado de las células <i>GRN</i> KD sobre las células control SH-SY5Y en la viabilidad	130
Tabla 7.....	131
Figura 20: Las células SH-SY5Y deficientes en PGRN reducen su supervivencia ante la retirada del suero	132
Figura 21: La progranulina exógena restaura la supervivencia de las células <i>GRN</i> KD.....	133
Figura 22: La deficiencia de progranulina sensibiliza a las células <i>GRN</i> KD a la apoptosis inducida por la retirada del suero.....	134
Figura 23: Liberación del citocromo c al citosol en las células <i>GRN</i> KD SH-SY5Y privadas de suero	135
Figura 24: Efectos del butirato de sodio y PD332991 en los niveles de las proteínas CDK4/6, el estado de fosforilación de pRb y la supervivencia celular.....	137
Figura 25: Efectos de los inhibidores de PI3K/Akt y MEK1/2 en la viabilidad celular en ausencia de suero	139
Figura 26: Efectos de los inhibidores de PI3K/Akt y MEK1/2 en los niveles de CDK4/6 y la fosforilación de pRb en la células control y <i>GRN</i> KD	140
Figura 27: Efectos de rhPGRN en las vías PI3K/Akt, ERK1/2 y CDK4/6/pRb	141
Figura 28: Efectos de EGF y la insulina en la supervivencia de células de neuroblastoma SH-SY5Y <i>GRN</i> KD.....	142
DISCUSIÓN.....	143
Imagen 12: Vías principales de señalización de Wnt	152

Imagen 13: Influencia de la deficiencia de PGRN en la activación de las
vías de supervivencia en ausencia de suero 158

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

2dRib: 2-deoxiRibosa

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ADNmt: ADN mitocondrial

ADNn: ADN nuclear

AIF: *Apoptosis-inducing factor*

APC: *Adenomatous polyposis coli*

APPNF: Afaxia primaria progresiva no fluente

AR: Ácido retinoico

ARN: Ácido Ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ATP: Adenosin trifosfato

Bax: *Bcl-2-like protein 4*

Bcl2: *B-cell lymphoma 2*

Bcl-x: *B-cell lymphoma-extra large*

BDNF: *Brain-derived neurotrophic factor*

BrdU: *5-bromo-2'-deoxyuridine*

BSA: Albumina de suero bovino

C9orf72: *Chromosome 9 open readingframe 72*

CamKII: Calmodulina kinasa II

CDC7: *Cell division kinase 7*

CDK: Kinasa dependiente de ciclina

CHMP2B: *Chromatin-modifying protein 2B*

Cip/Kip: *Cdk Interacting Protein/Kinase Inhibitory Protein*

CM: Medio condicionado

CM-H₂DCFDA: *5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester*

CNA: Calcineurina

CQ: Cloroquina

CRISPR: *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*

Cyc: Ciclina

Cyt: Citocromo

DAG: Diacylglycerol
DAPI: 4,6-diamidino-2-phenylindol
DF: Demencia tipo Frontal
DFT: Demencia Frontotemporal
DFT-EMN: Demencia Frontotemporal asociada a motoneuronas
DFTP-17: Demencia Frontotemporal y Parkinsonismo ligado al cromosoma 17
DFT-vc: Demencia Frontotemporal variante conductual
DKK1: Proteína Dickkopf
DLFT: Demencia Lobar Frontotemporal
DLFT-FUS: Demencia Lobar Frontotemporal con inclusiones de proteína FUS
DLFT-tau: Demencia Lobar Frontotemporal con inclusiones de proteína Tau
DLFT-TDP: Demencia Lobar Frontotemporal con agregados de proteína TDP-43
DLFT-UPS: Demencia Lobar Frontotemporal con inclusiones de Proteínas UPS
DMSO: Dimetilsulfóxido
DS: Demencia Semántica
DTT: Ditioneitol
DVL: *Dishevelled*
E2F: Factor de elongación 2
E2F: Factor de elongación 2
EA: Enfermedad de Alzheimer
EDTA: Etilendiaminotetraacético
EEM: Error estándar de la media
EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EGTA: Etilenglicol tetraacético
ELA: Esclerosis Lateral Amiotrófica
ERK1/2: *Extracellular signal regulated kinase 1/2*
FBS: Suero fetal bovino
FCCP: *Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone*
FCE: Fluido Cerebroespinal
FUS: *Fused in Sarcoma*
FZ: *Frizzled*
GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GE: Gránulos de estrés

GRN: Granulina
GSK: Glucógeno sintasa quinasa
GSP: Gliosis Subcortical Progresiva
H₂O₂: Agua oxigenada
HDAC: Histonas deacetilasas
hiN: *Human-induced neuronal cells*
HSP90: *Heat-shock protein 9*
INK4: *Inhibitors of Cyclin D-dependent Kinase 4*
IP₃: Inositol trifosfato
iPSC: Células madre con pluripotencialidad inducida
JNK: Quinasa c-Jun N-terminal
KN-62: (1-(N-O-bis[5-isoquinolinesulfonil]-N-metil-Ltyrosyl)-4-fenilpiperazina))
LRP: *Lipoprotein receptor-related protein*
MAPK: *Mitogen-activated Protein kinases*
MAPT: Proteína Tau Asociada a Microtúbulos
MRI: *Magnetic Resonance Imaging*
MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio
NFAT: *Nuclear factor of activated T-cells*
NMD: *Nonsense mediated decay*
NPI: *Neuropsychiatric Inventory*
OXPHOS: Fosforilación oxidativa
PET: *Positron emission tomography*
PGRN: Progranulina
PI3K: *Fosfatidil inositol kinasa 3*
PKC: Proteína quinasa C
PLC: Fosfolipasa C
PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
pRb: Proteína de retinoblastoma
PSP: Parálisis Supranuclear Progresiva
rhDKK1: Recombinante de la proteína Dickkopf
rhPGRN: Recombinante de Progranulina
rhWnt: Recombinante de Wnt
ROS: Especies reactivas de oxígeno

SAHA: *Suberoylanilide hydroxamic acid*
SB: Butirato de sodio
SCB: Síndrome Corticobasal
SDS: Dodecil sulfato sódico
SNC: Sistema Nervioso Central
SORT1: Sortilina
SPECT: *Single Photon Emission Computed Tomography*
TARDBP: Gen *TARDNA-Binding Protein 43*
TDP-43: *TARDNA-Binding Protein 43*
TMRE: Tetrametylrodamina, ethyl ester
TNFR: Receptor del factor de necrosis tumoral
TNF α : Factor de necrosis tumoral α
UPS: Proteínas del Sistema Ubiquitina-Proteasoma
UPS: Sistema ubiquitina-proteasoma
VCP: Valosina
Wnt: *Wingless/Int*

ABSTRACT/RESUMEN

ABSTRACT

1. Introduction

Frontotemporal Lobar Degeneration (FTLD) describes a spectrum of clinically, pathologically and genetically heterogeneous disease with a common feature, the relatively selective degeneration of frontal and temporal lobes. FTLD is a leading cause of early-onset dementia.

FTLD is also characterized by progressive changes in behavior, personality and/or language impairment with early preservation of memory. The main clinical presentations of FTLD are: behavioral variant of frontotemporal dementia (bv-FTD), primary progressive aphasia (PPA), and semantic dementia [SD].

Recent advances in molecular biology and immunohistochemical staining techniques have further classified the FTLD disorders based upon the predominant inclusion protein into three main categories: microtubule-associated protein tau (FTLD-tau), fused in sarcoma protein (FTLD-FUS) and TAR DNA-binding protein-43 (FTLD-TDP). Mutations in genes *MAPT*, *GRN*, *TARDBP*, *VCP*, *CHMP2B* and *C9ORF72* have been associated with FTLD. Particularly mutations in *GRN* encoding progranulin protein (PGRN) have been identified as a major cause of autosomal dominant FTLD-TDP, leading to TAR DNA binding protein 43 (TDP-43) inclusions by a haploinsufficiency mechanism. PGRN plays important roles in cellular functions including malignancy, inflammation and cell migration and also has been related to viability and survival maintenance in neurons. While the mechanisms by which PGRN haploinsufficiency leads to neurodegeneration remained speculative, increasing evidence support the hypothesis that cell cycle reentry of postmitotic neurons precedes many instances of neuronal death. It has been reported that PGRN can regulate cellular signaling pathways involved in neuronal survival. On the other hand, mitochondrial dysfunction may be an important factor in neuronal death. Alterations in the major mitochondrial functions, such as Ca²⁺ buffering, energy production, generation of ROS, and control of the intrinsic pathway of apoptosis may contribute to neuronal loss.

This work was undertaken to further study the pathogenic role of PGRN deficiency in FTLD-TDP, by studying how the regulation of survival/death mechanisms is perturbed, using as experimental model GRN knockdown neuroblastoma SH-SY5Y cells (*GRN* KD)

2. Aims

- To characterize the neuroblastoma cell line SH-SY5Y *GRN* KD as a model cell study for the FTLD-TDP associated with PGRN deficiency.
- To elucidate the relationship between mitochondrial dysfunction and PGRN deficiency in *GRN* KD cells.
- To study the molecular mechanisms involved in the perturbation of cell cycle and apoptosis regulation, induced by PGRN deficiency.

3. Results

We found that neuroblastoma *GRN* KD cells recapitulate essential FTLD features in addition to reduced PGRN levels, such as increased TDP-43 phosphorylation, cell signalling alterations, and reduced viability. An inverse relationship was observed between the rate of BrdU incorporation and cell viability. Moreover, PGRN deficiency results in reduced basal and stimulated respiration leading to reduced mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) and lower ATP levels, together with a significant decrease in the spare capacity and an increase of ROS generation. Additionally, *GRN* KD cells showed increased mitochondrial mass that could be a compensatory mechanism for reduced energy production.

Our data show both canonical and non-canonical Wnt signaling cascades are overactivated in *GRN* KD cells. We detected increased expression levels of Wnt1 and Wnt5a ligands of the Frizzled receptors, as well as evidence for increased signaling of the Wnt/ β -catenin and Wnt/ Ca^{2+} cascades in PGRN deficient cells. The overactivation of these signaling cascades stimulated DNA synthesis and increased cell death.

Compared with control cells, survival of *GRN* KD SH-SY5Y cells was severely reduced in serum-free medium. Cell death showed features of apoptosis such as increased activation of executive caspases and cytochrome c released from the mitochondria. Our results suggest that alterations in the CDK4/6/pRb pathway secondary to changes in the activity of the PI3K/Akt and ERK1/2 pathways induced by PGRN deficiency are involved in the control of serum deprivation-induced apoptosis. Addition of exogenous PGRN or conditioned medium from control cells to *GRN* KD cells rescue the normal cell responses to serum addition or withdrawals.

In summary, our data indicate a neuroprotective role for PGRN and provide further support for the premise that chronic PGRN deficiency in FTLD results in the perturbation of important signaling pathways and increase rates of neuronal cell death. It is suggested that increasing PGRN levels or alternatively modulating the Wnt cascades or the PI3k/Akt and ERK1/2 pathways may be useful for designing new therapeutic treatment for FTLD-TDP.

4. Conclusion

- *GRN* KD cells recapitulate the most important pathological features of FTLD-TDP, such as PGRN deficiency, TDP-43 hyperphosphorylation and increased neuronal vulnerability. This cellular model can be considered a good experimental model for the study of FTLD.
- *GRN* KD cells exhibit significant alterations in mitochondrial function related to neurodegeneration, such as mitochondrial membrane depolarization, decrease in respiration rate and energy production, as well as a significant increase in the generation of ROS.
- PGRN plays a neuroprotective role in SH-SY5Y cells, as the PGRN deficiency causes changes in the regulation of the cell cycle. Our results suggest that the activation of Wnt signaling pathway in the pathogenesis of FTLD-TDP culminates in cell cycle activation and apoptosis.

- PGRN deficiency induces significant alterations in the stimulation of the PI3K/Akt-ERK1/2/CDK4/6/pRb pathway that determines the cell fate, survival/death, under serum deprivation.
- The results of this thesis provide some clues about FTLD-TDP pathogenesis. The identification of potential therapeutic targets allows to consider GRNKD cell a suitable platform for the preclinical evaluation of novel treatments for this disease

RESUMEN

1. Introducción

La Demencia Lobar Frontotemporal (DLFT) describe un espectro de enfermedades neurodegenerativas, clínica, patológica y genéticamente heterogéneas con una característica común, la degeneración relativamente selectiva de lóbulos frontales y temporales.

La DLFT también se caracteriza por cambios progresivos en el comportamiento, la personalidad y/o el deterioro del lenguaje, con preservación inicial de la memoria y puede diferenciarse clínicamente en tres grupos clínicos principales: la Demencia Frontotemporal variante conductual (DLFT-vc), la Demencia Semántica (DS) y la Afasia primaria progresiva no fluente (APPNF), entre otros.

Los recientes avances en la biología molecular y en técnicas inmunohistoquímicas han permitido la clasificación de la DLFT basándose en la naturaleza de las proteínas de inclusión predominantes en el cerebro de pacientes, en tres categorías principales: con inclusiones de la proteína tau asociada a microtúbulos (DLFT-tau), con inclusiones de la proteína FUS (DLFT-FUS) y con agregados de la proteína TAR DNA-Binding Protein 43 (TDP-43) (DLFT-TDP), entre otros. Las mutaciones en los genes *MAPT*, *GRN*, *TARDBP*, *VCP*, *CHMP2B* y *C9ORF72* se han asociado con la DLFT. Particularmente, las mutaciones en *GRN* que codifican la proteína Progranulina (PGRN) han sido identificadas como una causa principal de DLFT-TDP, conduciendo a inclusiones de la proteína TDP-43, por un mecanismo de haploinsuficiencia. PGRN juega un papel importante en las funciones celulares, incluyendo la malignidad, la inflamación y la migración celular y también se ha relacionado con la viabilidad y el mantenimiento de la supervivencia en las neuronas. Si bien, los mecanismos por los que la haploinsuficiencia en PGRN conducen a la neurodegeneración siguen siendo especulativos, cada vez más pruebas apoyan la hipótesis de que la reentrada de las neuronas postmitóticas en el ciclo celular precede en muchos casos a una muerte neuronal. Se ha visto que la PGRN puede regular las vías de señalización celular importantes para la supervivencia neuronal. Por otra parte, la disfunción mitocondrial puede ser un

factor importante en la muerte neuronal. Alteraciones en las principales funciones mitocondriales, tales como el tamponamiento del Ca^{2+} , la producción de energía, la generación de ROS y el control de la vía intrínseca de apoptosis, pueden contribuir a la pérdida neuronal.

El objetivo fundamental de este trabajo fue elucidar el papel patogénico de la deficiencia de PGRN en la DLFT-TDP, estudiando qué papel que juega en la regulación de los mecanismos de supervivencia/muerte celular, usando como modelo experimental células de neuroblastoma SH-SY5Y en las que se silenció el gen *GRN*.

2. Objetivos

- Caracterizar la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y *GRN* KD como modelo de estudio celular para la DLFT-TDP asociada con la deficiencia de PGRN.
- Analizar la relación entre la disfunción mitocondrial y la deficiencia de PGRN en nuestras células SH-SY5Y *GRN* KD.
- Estudiar la perturbación de los mecanismos moleculares implicados en el control del ciclo celular y en la apoptosis, inducida por la deficiencia de PGRN.

3. Resultados

Observamos que las células *GRN* KD recapitulan las características patológicas más importantes de DLFT-TDP como la deficiencia de PGRN, la hiperfosforilación TDP-43, la viabilidad reducida, y alteraciones en algunas cascadas de señalización intracelular. Demostramos la existencia de una relación inversa en la incorporación de BrdU y la viabilidad celular. Las células *GRN* KD mostraron cambios en la función mitocondrial, tales como una disminución en la respiración basal y estimulada que conduce a una reducción del potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$) y a los niveles de ATP más reducidos, junto con una importante reducción de la capacidad respiratoria de reserva y un aumento en la generación de ROS. Estos

cambios se acompañaban de un aumento de la masa mitocondrial, lo que podría constituir un mecanismo para intentar compensar la menor producción de energía.

Nuestros resultados mostraron una sobreactivación tanto de la vía canónica como no canónica de Wnt en las células *GRN* KD. Detectamos un aumento en los niveles de expresión de los ligandos de los receptores Frizzled, Wnt1 y Wnt5a, así como evidencias de la estimulación de las cascadas Wnt/ β -catenina y Wnt/ Ca^{2+} en las células *GRN* KD, que resultaba en un aumento de la síntesis de ADN, asociada con mayor muerte celular.

En comparación con las células control, las células *GRN* KD presentaron una mayor susceptibilidad a la muerte inducida por la privación del suero. La retirada del suero produce la estimulación de la apoptosis como indica la liberación del citocromo c desde la mitocondria, y/o la activación de las caspasas ejecutoras. Nuestros resultados sugieren que las alteraciones de la vía de señalización CDK4/6/pRb, secundarias a cambios en la activación de PI3K/Akt y ERK1/2 inducidos por deficiencia de PGRN, están implicadas en el control de la apoptosis inducida por la privación del suero. La adición de PGRN recombinante o medio condicionado por las células control a las células *GRN* KD, fue capaz de rescatar la respuesta celular normal a la presencia o ausencia de suero.

En resumen, nuestros resultados demuestran el papel neuroprotector de PGRN y apoya la idea de que la deficiencia crónica de PGRN resulta en la perturbación de mecanismos de señalización, que en último término producen la muerte neuronal. Se sugiere que el aumento de los niveles de expresión de PGRN, o alternativamente la modulación de la actividad de las vías de señalización Wnt, PI3K/Akt y ERK1/2, podría tener interés para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de la DLFT.

4. Conclusiones

- Las células *GRN* KD recapitulan las características patológicas más importantes del DLFT-TDP, tales como la deficiencia de PGRN, la hiperfosforilación TDP-43 y el aumento de la vulnerabilidad neuronal. Este

modelo celular puede ser considerado un buen modelo experimental para el estudio de DLFT.

- Las células SH-SY5Y deficientes en PGRN presentan alteraciones significativas en la función mitocondrial, relacionadas con la neurodegeneración como la despolarización de la membrana mitocondrial, la disminución de la tasa de respiración y la producción de energía, así como un aumento significativo en la generación de ROS.
- La PGRN juega un papel neuroprotector en las células SH-SY5Y, ya que su déficit provoca cambios en la regulación del ciclo celular. Nuestros resultados sugieren que la activación de las vías de señalización de Wnt en la patogénesis de la DLFT-TDP culmina en la activación del ciclo celular y la apoptosis.
- La deficiencia de PGRN induce alteraciones significativas en la estimulación de la vía de señalización PI3K/Akt-ERK1/2/CDK4/6/pRb que determina el destino celular, supervivencia/muerte, en ausencia de suero.
- Los resultados de esta tesis aportan algunas claves para el esclarecimiento de la patogénesis de la DLFT-TDP. La identificación de posibles dianas terapéuticas permite considerar a las células *GRN* KD una plataforma útil para la evaluación preclínica de nuevos tratamientos para esta enfermedad.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. DEGENERACIÓN LOBAR FRONTOTEMPORAL

La Demencia Lobar Frontotemporal (DLFT) es un término patológico usado para referirse a un grupo de enfermedades o trastornos neurodegenerativos progresivos y de aparición temprana, que implican una degeneración de áreas específicas del cerebro que regulan el comportamiento, la personalidad, la conducta social y el lenguaje; lo que provoca alteraciones en estos ámbitos. Estos trastornos tienen características clínicas, patológicas y genéticas muy heterogéneas, la única característica común es la degeneración relativamente selectiva de los lóbulos frontales y temporales [9].



Imagen 1: Cerebro de un paciente de DLFT. Se muestran secciones macroscópicas dorsolateral y medial, mostrando atrofia y deterioro de los lóbulos frontal y temporal medio. Adaptado de [4].

1.1. Historia

En 1892 Arnold Pick describió al que podría ser el primer paciente con Demencia Frontotemporal (DFT), un varón de 71 años con un cuadro de deterioro progresivo mental muy marcado en cuya necropsia se pudo constatar una marcada atrofia del lóbulo temporal izquierdo. Por primera vez se planteaba la posibilidad de un tipo de demencia originado por una atrofia cerebral focalizada y no generalizada. En los siguientes años se hicieron numerosos estudios y descripciones de la enfermedad hasta que cayó en el olvido, agrupándola dentro de la Enfermedad de Alzheimer (EA). No fue hasta un siglo después cuando la DLFT tuvo de nuevo interés (Imagen 2). En 1911 Alois Alzheimer describe por primera vez las características

histopatológicas de la DFT. En los años 90 se encontraron que las inclusiones intraneuronales, denominadas cuerpos de Pick por Alois Alzheimer, eran positivas para la proteína tau. Fue entonces cuando se la empezó a definir como Demencia Lobar Frontotemporal (DLFT) o Demencia tipo Frontal (DF) [10-12]. En 1998 se encontraron mutaciones en el gen de la proteína tau (*MAPT*, Proteína Tau Asociada a Microtúbulos) vinculadas a la DFT familiar [13].

En los últimos 20 años se han logrado grandes avances en el estudio y conocimiento de la DLFT, gracias principalmente al descubrimiento de técnicas genéticas que han permitido conocer mutaciones que causan las DLFT hereditarias [14, 15], a la identificación de las proteínas que forman las inclusiones neuronales [16], y al desarrollo de nuevas técnicas de neuroimagen [17].

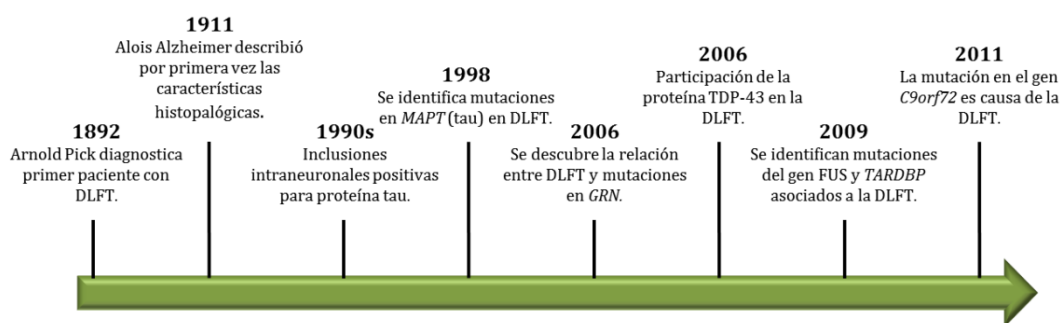


Imagen 2: Cronología de la evolución de la DLFT.

1.2. Epidemiología

La DLFT se considera la segunda causa más común de demencia presenil [18]. Afecta tanto a hombres como a mujeres iniciando sus síntomas generalmente antes de los 65 años de edad, representando el 5-10% de los pacientes con demencia [19, 20]. La prevalencia mundial de la DLFT está subestimada debido a la dificultad del diagnóstico por la heterogeneidad de la clínica, la neuropatología y la genética; a pesar de esto, se estima una prevalencia de 10-15 por 100.000 individuos de edades entre 45-65 años [18, 21, 22]. Esta enfermedad tiene un componente familiar muy alto, pueden encontrarse antecedentes familiares en un 30-45% de los casos [23-25], sin embargo, la mayoría de los enfermos de DLFT (50-80%) padecen la forma esporádica o no familiar [25]. Se ha descrito que hay genes que

suelen ser causantes de DLFT familiar, los más comunes el gen *MAPT*, que codifica para la proteína Tau [26] y el gen (*GRN*) que codifica para la Progranulina (PGRN) [14].

La estimación media de supervivencia de los pacientes es de 6-11 años desde que empiezan los síntomas y 3-4 años desde su diagnóstico [27]. Algunos estudios incluso sugieren que la DLFT tiene mayor mortalidad que la Enfermedad de Alzheimer [28].

2. CLASIFICACIÓN CLÍNICA DE LA DEGENERACIÓN LOBAR FRONTOTEMPORAL

Como ya he dicho, la Demencia Lobar Frontotemporal es un concepto que engloba distintos trastornos neurodegenerativos con características y síntomas comunes. En función de los síntomas predominantes y del momento de aparición de los mismos a lo largo de la enfermedad, podemos clasificarlos en tres grupos clínicos principales: la Demencia Frontotemporal variante conductual (DFT-vc), la Demencia Semántica (DS) y la Afaxia primaria progresiva no fluente (APPNF) [29].

2.1. Demencia Frontotemporal variante conductual (DFT-vc)

La Demencia Frontotemporal variante conductual (DFT-vc) es el síndrome más frecuente y de aparición precoz, entorno a los 58 años [30]. Aparecen cambios de la personalidad y cambios en la conducta social. Se comportan de manera socialmente inapropiada e impulsiva, muestran apatía sin llegar a depresión, pierden la empatía y muestran comportamientos repetitivos compulsivos. Los pacientes de DFT-vc tienen atrofia de los lóbulos frontal y temporal anterior, pero existen 3 subtipos en función de las áreas prefrontales del cerebro afectadas: dorsolateral, orbitomedial y mediofrontal. Algunos de estos pacientes también pueden padecer Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) [31].

2.2. Demencia Semántica (DS)

Los pacientes con Demencia Semántica (DS) padecen alteraciones en el lenguaje y la memoria semántica, son incapaces de reconocer objetos, hechos, palabras y su significado. Tienen un lenguaje espontáneo y fluente pero con escaso contenido informativo [32, 33]. La DS suele estar asociada a la atrofia del lóbulo temporal y los síntomas varían en función de que parte del lóbulo esté afectado. Cuando la atrofia aparece en la parte izquierda del lóbulo suelen tener más trastornos del lenguaje sin afectación de la memoria, y cuando tienen afectada la parte derecha del lóbulo presentan trastornos en el comportamiento llegando a confundirse con la DFT-vc. La memoria semántica se ve afectada más adelante dentro de la evolución de la enfermedad [34].

2.3. Afaxia primaria progresiva no fluente (APPNF)

En los pacientes que sufren Afasia primaria progresiva no fluente (APPNF) existe una alteración a nivel del lenguaje, en aspectos fonológicos y sintácticos, afectando a la fluidez verbal de manera marcada. La comprensión de las palabras por el contrario se conserva al inicio de la enfermedad. Según evoluciona la enfermedad se puede ver afectada la memoria, aunque menos marcada que en los otros dos tipos de Demencia Lobar Frontotemporal [35, 36]. Dentro de la APPNF existen tres subtipos en función de los aspectos del lenguaje que se vean afectados, son: la forma agramatical/no fluente, la forma semántica y la forma logopénica [37].

2.4. Otros trastornos neurodegenerativos dentro de la DLFT

Además de estos tres grupos principales hay otros subgrupos menos comunes pero que están dentro de la clasificación de la DLFT. Estos son la Parálisis Supranuclear Progresiva (PSP), la Demencia Frontotemporal asociada a motoneuronas (DFT-EMN), el Síndrome Corticobasal (SCB), la Gliosis Subcortical Progresiva (GSP), la Demencia Frontotemporal y Parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (DFTP-17) y la Enfermedad de Pick y entre otras [38].

3. CLASIFICACIÓN HISTOPATOLOGICA DE LA DEGENERACIÓN LOBAR FRONTOTEMPORAL

El signo neuropatológico de la DLFT es la degeneración de los lóbulos frontal y temporal, mencionado anteriormente, así como la acumulación de inclusiones de proteínas en las células neuronales y las células de la glía [39, 40]. La clasificación de la DFLT se puede determinar en función de las proteínas encontradas en dichas inclusiones celulares, hay varios subtipos pero podemos establecer cuatro categorías principales [21, 41, 42].

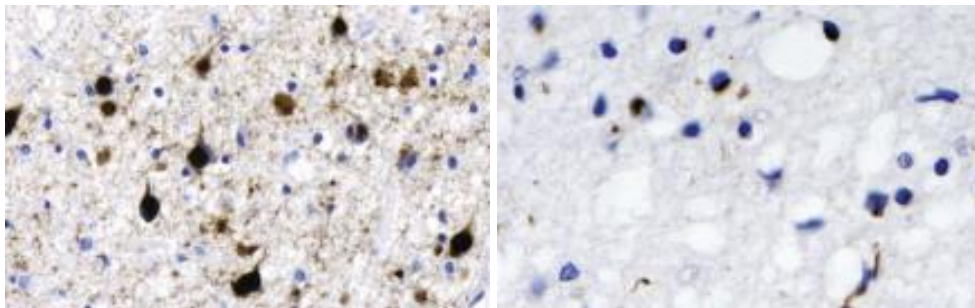


Imagen 3: Cerebro de un paciente de DLFT. Se muestran cortes histológicos del cerebro de un paciente con DLFT. Se puede apreciar teñidas las inclusiones intraneuronales, a la derecha Tau positivas y a la izquierda TDP-43 positivas [4].

3.1. Demencia Lobar Frontotemporal con inclusiones de proteína Tau (DLFT-tau)

La DLFT-tau está asociada a la acumulación anómala de esta proteína en las células neuronales (Imagen 3). Como hemos dicho, la DLFT-tau pertenece a uno de los grupos más comunes de la Demencia Lobar Frontotemporal [43]. La proteína tau está asociada a los microtúbulos de manera normal encargándose de la estabilización de los mismos. Tiene un papel importante en el mantenimiento del transporte neuronal y la señalización, pero cuando se hiperfosforila pierde su función y se disocia de los microtúbulos. La proteína tau se hace resistente a la degradación y se agrega en grupos [44]. Algunos pacientes con DLFT presentan mutaciones en el gen que codifica la proteína tau (Microtubule-Associated Protein Tau o *MAPT*) que se encuentra en el cromosoma 17. Dicha mutación de *MAPT* da lugar a la hiperfosforilación anormal de la proteína.

Los pacientes con la patología DLFT tau-positiva (DLFT-tau) pueden presentar parkinsonismo atípico además de DFT-vc y APPNF [43].

3.2. Demencia Lobar Frontotemporal con inclusiones de proteína FUS (DLFT-FUS)

Es el subtipo menos común dentro de la Demencia Lobar Frontotemporal, entre un 5%-20% de los casos de DLFT. En este caso las inclusiones que aparecen en las células neuronales afectadas son agregados de una proteína de unión a ADN/ARN, *Fused in Sarcoma* (FUS). Esta proteína se expresa tanto en el núcleo como en el citoplasma con un transporte continuo entre las dos zonas, encargándose del splicing del pre-ARNm y la exportación del mismo al citoplasma para ser procesado. Las mutaciones en el gen *FUS* se asocian con la agregación de la proteína en el citoplasma de las células neuronales, aunque parte de estas proteínas se mantiene en el núcleo de las células neuronales afectadas [45, 46].

La mayoría de los casos de DLFT-FUS aparecen en casos esporádicos y también están asociados a los casos familiares de ELA [47]. La DLFT-FUS se caracteriza por una aparición muy temprana en los pacientes (menos de 40 años de edad) [48].

3.3. Demencia Lobar Frontotemporal con agregados de proteína TDP-43 (DLFT-TDP)

Es la patología más común en la Demencia Lobar Frontotemporal, que representa un 40%-65% de los casos, y que se caracteriza por la presencia de inclusiones citoplasmáticas y neuronales de la proteína TDP-43 (TARDNA-Binding Protein 43) [16, 49], denominándola DLFT-TDP [41].

La proteína TDP-43 está compuesta por 414 aminoácidos y un peso molecular de 43 kDa, codificada por el gen *TARDBP* (*TARDNA-Binding Protein 43*) que se encuentra en el cromosoma 1 [50]. Es una ribonucleoproteína heterogénea altamente conservada que en condiciones fisiológicas se encuentra en el núcleo y se expresa en múltiples tejidos. La expresión de la proteína TDP-43 está estrechamente controlada por mecanismos de autorregulación [6]. La TDP-43 está compuesta por un dominio N-terminal, dos motivos en tándem de reconocimiento

de ARN (RRM1 y RRM2) y un dominio C-terminal rico en glicinas (Imagen 4) [6]. Ambos dominios de reconocimiento de ARN tienen propiedades para ello, pero sólo el dominio RRM1 parece esencial para el empalme a ARN [51].

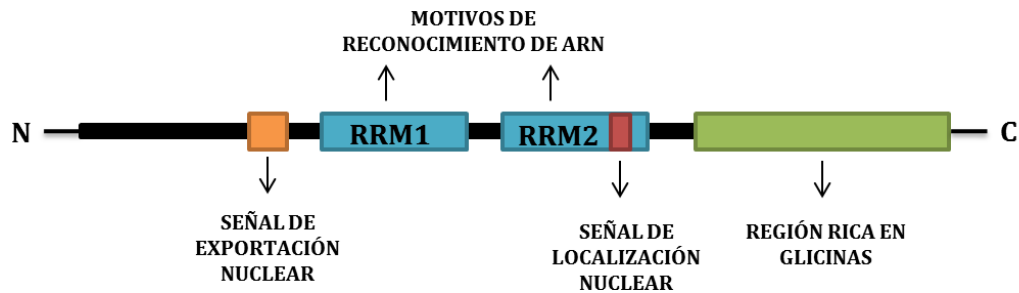


Imagen 4: Diagrama esquemático de la proteína TDP-43. Se muestran las características funcionales de cada dominio. Adaptado de [6].

La función principal de la proteína TDP-43 es la represión de la expresión génica y el splicing alternativo de ARNm gracias a su dominio carboxilo-terminal rico en glicinas (Imagen 4) [52-54]. En los estados patológicos la TDP-43 sufre varias modificaciones postraduccionales que causan hiperfosforilación de residuos de serina, ubiquitinación, oxidación, acetilación de lisina y división en fragmentos c-terminales (Imágenes 5 y 6).

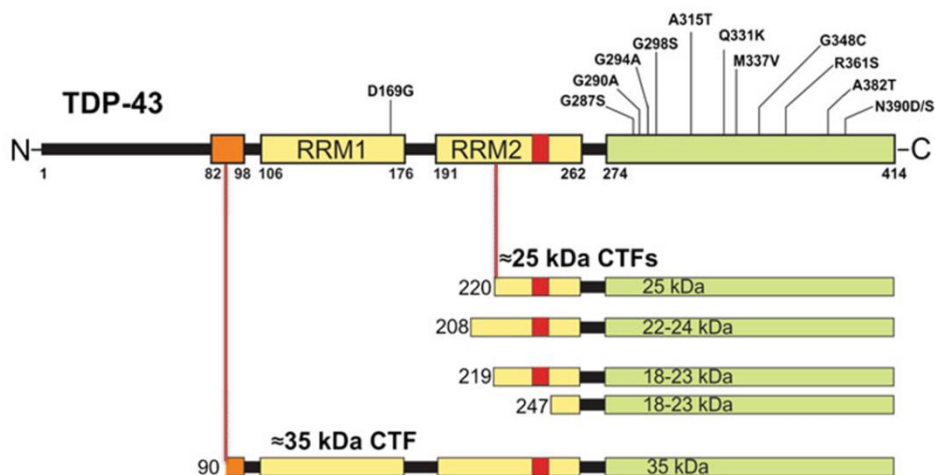


Imagen 5: Estructura de la proteína TDP-43. Además de los diferentes dominios de la proteína, se muestran las diferentes mutaciones mayoritarias localizadas principalmente en la zona rica en glicina en C-terminal. En la parte inferior vemos los procesamientos de TDP-43 por la escisión de caspasas identificados en distintos pacientes de DLFT [6].

La patogenia asociada a esta proteína puede deberse tanto a una pérdida de función nuclear como de ganancia de función tóxica en el citoplasma. El tránsito de esta proteína entre núcleo y citoplasma parece estar alterado en la DLFT (Imagen 6) [5, 21, 55, 56]. La presencia de inclusiones TDP-43 en el citoplasma de ciertas neuronas sugiere que se puede haber perdido alguna función esencial nuclear o la ganancia de nuevas funciones tóxicas en el citosol [16, 49, 57]. Por otro lado también se han encontrado inclusiones TDP-43 en células de la glía, lo que sugiere que puede perturbar la función de soporte y neuroprotección de estas células.

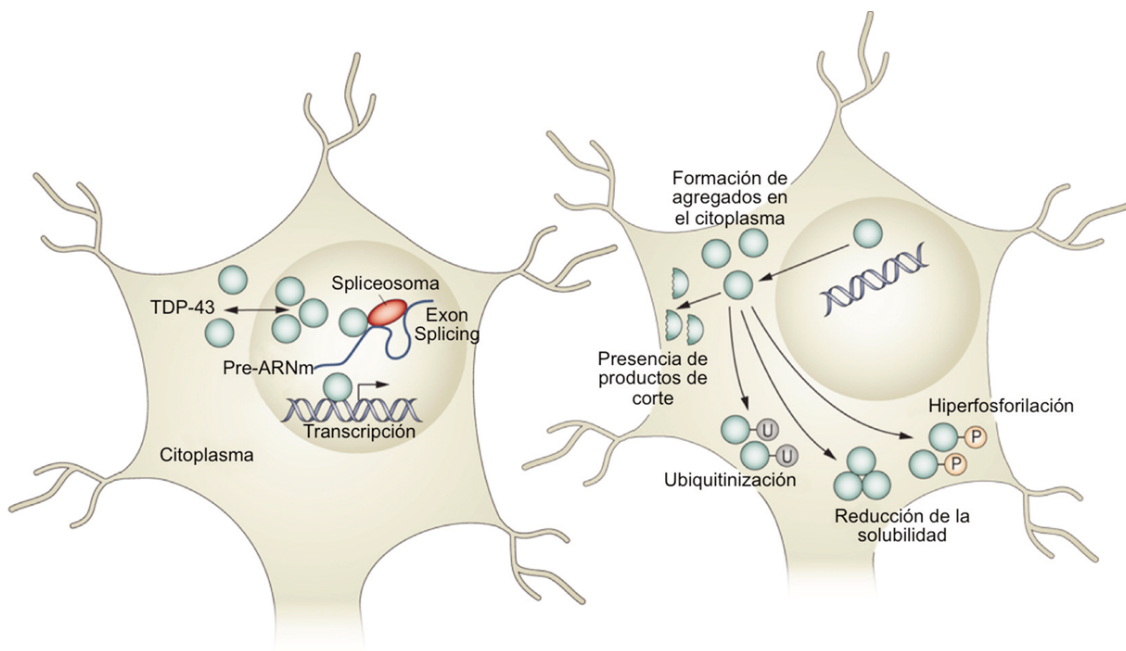


Imagen 6: Distribución fisiológica y fisiopatológica de la proteína TDP-43. A la izquierda vemos la distribución normal de la TDP-43. Reside principalmente en el núcleo, aunque también hace intercambios entre núcleo y citoplasma. A la derecha vemos la distribución de la proteína TDP-43 ante situaciones fisiopatológicas. TDP-43 pierde su comportamiento nuclear y se acumula en el citoplasma, bien por fragmentación, ubiquitinación o hiperfosforilación. Esto genera una agregación de la proteína y una pérdida además de la solubilidad de la misma. Adaptado de [5].

Recientemente se ha descubierto un nuevo papel importante de la TDP-43, se encarga de evitar que secuencias de ARN que son perjudiciales (llamadas exones crípticos) sean usadas por las células y sintetizar a su vez proteínas perjudiciales [58]. Cuando la TDP-43 forma agregados dentro de las células, ésta deja de funcionar de forma apropiada y los exones crípticos no son eliminados, dando lugar a la síntesis de otras proteínas que perjudican el funcionamiento adecuado

de las células neuronales generando una cadena de eventos que mata a dichas células.

Dentro de los tipos de Demencia Lobar Frontotemporal, la DLFT-TDP se encuentra en los casos familiares y esporádicos de la enfermedad asociada tanto a la DFT-vc como a las SCB y DS [59]. También encontramos inclusiones de la TDP-43 en otras enfermedades relacionadas con la DLFT como la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), asociado a mutaciones en los genes *TARDBP*.

La DLFT-TDP está asociada a mutaciones en los genes de la proteína Progranulina (PGRN, gen *GRN*), y en menor medida en el gen de la proteína que contiene Valosina (gen *VCP*) [14, 15, 60, 61]. Aunque también se ha visto asociada a mutaciones de otros genes como *CHMP2B* (*chromatin-modifying protein 2B*), *C9orf72* (*chromosome 9 open readingframe 72*) e incluso a el propio gen *TARDBP* que codifica para TDP-43 [21, 61-64].

En función del tipo de lesión predominante y el tipo de inclusiones patológicas y su distribución existen cuatro subtipos de DLFT-TDP [65] (Tabla 1).

La DLFT-TDP tipo A se caracteriza por presentar numerosas inclusiones citoplasmáticas, neuronas distróficas y un número variable de inclusiones intranucleares. El tipo B se caracteriza por numerosas inclusiones citoplasmáticas en las zonas corticales y puede tener neuronas distróficas de manera ocasional. El tipo C de la DLFT-TDP se asocia a neuronas distróficas abundantes a lo largo de las capas corticales [66]. Y la del tipo D se caracteriza por numerosas inclusiones intranucleares y neuronas distróficas, rara vez presentan inclusiones citoplasmáticas [56].

Tabla 1

Correlación entre los subtipos de DLFT-TDP, los genes y la presentación clínica.

TIPO DLFT-TDP	MUTACIÓN GEN	PRESENTACIÓN CLÍNICA
Tipo A	<i>GRN, C9orf72</i>	DFT-vc, DFT-EMN, APPNF, SCB
Tipo B	<i>C9orf72</i>	DFT-vc, DFT-EMN, APPNF
Tipo C	<i>C9orf72</i>	DFT-vc, DS
Tipo D	<i>VCP</i>	DFT-vc

DFT-vc: Demencia Frontotemporal variante conductual, DFT-EMN: Demencia Frontotemporal asociada a motoneuronas, APPNF: Afasia primaria progresiva no fluente, SCB: Síndrome Corticobasal, DS: Demencia Semántica, *GRN*: gen Progranulina, *VCP*: gen de la Valosina, *C9orf72*: *chromosome 9 open readingframe 72*. Interpretación de [65].

En los casos de tipo A la morfología característica eran mutaciones en el gen *GRN* y en ocasiones en el gen *C9orf72*. Aunque este gen *C9orf72* era típico de la patología tipo B y en pocas ocasiones en el caso del tipo C. En la DLFT-TDP tipo D las mutaciones se limitaban al gen *VCP* [62, 67, 68].

Habría que destacar además que en otros trastornos neurodegenerativos puede aparecer la patología de TDP-43 de manera secundaria, como por ejemplo es el caso del 20-50% aproximado de los pacientes que sufren tautopatías o la enfermedad de Alzheimer, lo que conduce a un empeoramiento de dicha enfermedad [69, 70].

La relación clínico-patológica que existe entre la EA y la DLFT crea una necesidad urgente de encontrar biomarcadores que permitan el diagnóstico precoz y diferencial de la DLFT. Un biomarcador bien caracterizado es la disminución de la concentración de PGRN, en la DLFT-TDP relacionada con la mutación en *GRN* [71]. Recientemente se ha identificado la propia TDP-43 como biomarcador de la DLFT-TDP, candidato idóneo para detectar dicha enfermedad [72].

3.4. Demencia Lobar Frontotemporal con inclusiones de Proteínas del Sistema Ubiquitina-Proteasoma (DLFT-UPS)

La DLFT-UPS es la menos común y más rara en los casos de Demencia Lobar Frontotemporal. En estos casos las inclusiones son negativas a proteínas tau, proteínas TDP-43 y proteínas FUS, pero son reconocidas por anticuerpos frente a

proteínas del Sistema Ubiquitina-Proteasoma (UPS) [41]. Se ha visto que tiene relación con mutaciones en el gen *CHMP2B* (*chromatin-modifying protein 2B*) [73]. La proteína CHMP2B tiene un papel en la vía de degradación de las proteínas.

Los pacientes con este tipo de DLFT presentan también una atrofia del lóbulo parietal del cerebro, además del lóbulo frontotemporal [74].

4. DIAGNÓSTICO DE LA DEMENCIA LOBAR FRONTOTEMPORAL

La exclusión de otras causas potencialmente tratables de la demencia es el primer paso en el diagnóstico de la DLFT. Gracias a los avances de la genética molecular y la bioquímica se puede llegar a una aproximación clínico-patológica y genética para facilitar el diagnóstico de la enfermedad. Lo primero es excluir enfermedades vasculares, trastornos endocrinos o metabólicos, neoplasias o síndromes paraneoplásicos, infecciones del SNC, deficiencias nutricionales, abuso de fármacos e intoxicación, ya que pueden presentar una semejanza fenotípica con DLFT [75]. El estudio cuidadoso del historial médico de los pacientes permite realizar un primer diagnóstico basándose en obtener datos de los cambios en el comportamiento, la cognición y el afecto [76]. El diagnóstico secundario se lleva a cabo mediante técnica de neuroimagen y análisis de biomarcadores específicos de la enfermedad. El diagnóstico siempre será aproximado hasta que se pueda hacer una evaluación post mortem del cerebro de los pacientes. Un método alternativo para diagnosticar las enfermedades neurodegenerativas es el uso de biopsias del cerebro de los pacientes. Este método es muy invasivo y peligroso por lo que sólo es útil en una minoría de los casos.

La heterogeneidad clínica e histopatológica de la DLFT supuso una dificultad para definir unos criterios diagnósticos precisos que permitiesen distinguir los diferentes tipos de DLFT. En 1994 Lund y Manchester [77] elaboraron los primeros criterios clínico-patológicos que facilitaron la discriminación de la DFT con la Enfermedad de Alzheimer (EA). Más tarde, se establecieron nuevos criterios definiendo las características clínicas de los tres síndromes principales de la DFT: Demencia frontotemporal variante conductual (DFT-vc), Afasia primaria no Progresiva Fluente (APPNF) y la Demencia Semántica (DS) [78]. En 2001, MacKhan y colaboradores [79] establecieron unos criterios más simples que permiten asociar las características fenotípicas del individuo a un síndrome clínico concreto aunque frecuentemente se necesitan otras pruebas más objetivas, como el uso de técnicas de neuroimagen o estudios genéticos (en el caso de DLFT familiar) para poder hacer un diagnóstico más exacto. Los recientes avances en la genética molecular, la bioquímica y la neuropatología permitieron establecer nuevos

criterios de diagnóstico basándose en marcas neuropatológicas de la enfermedad [21]. Estos autores propusieron una clasificación en taupatías (DLFT-tau) y ubiquitinopatías (DLFT-UPS), asociadas a los síndromes clínicos.

4.1. Diagnóstico por neuroimagen

Las técnicas de neuroimagen permiten la identificación en etapas tempranas de la enfermedad de las marcas anatómicas características de la DLFT. Estas técnicas de neuroimagen permiten además diferenciar entre la DLFT y otras enfermedades neurodegenerativas como la EA (Imagen 7) [1, 80, 81].

Las técnicas más usadas son las de imagen funcional y metabólica como la tomografía por emisión de positrones o PET (de inglés *Positron emission tomography*), la tomografía computarizada de emisión monofotónica o SPECT (del inglés *Single Photon Emission Computed Tomography*) y la resonancia magnética de imagen o MRI (del inglés, *Magnetic Resonance Imaging*). La técnica que ha demostrado ser más precisa en el diagnóstico de la DLFT la imagen por PET con una precisión del 70 al 90% [80].

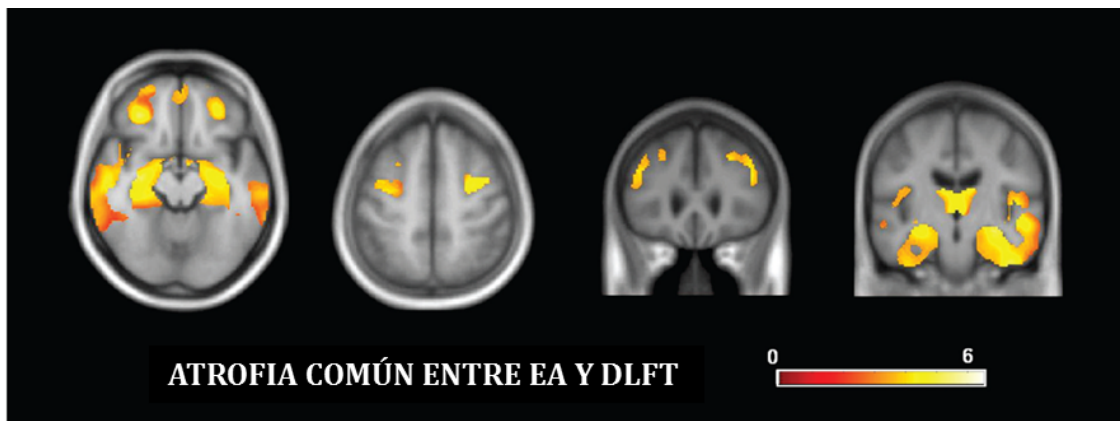


Imagen 7: Ejemplo de imágenes obtenidas mediante técnicas de neuroimagen. Secciones obtenidas por MRI en las que se observa el grado de atrofia común entre la DLFT y la EA. Tomado de [1].

4.2. Diagnóstico mediante biomarcadores

Debido a las dificultades para realizar un diagnóstico preciso de la DLFT, existe la necesidad de buscar biomarcadores específicos a partir del estudio de dianas terapéuticas para la DLFT. Un marcador biológico o biomarcador es un método objetivo de medida que representa un proceso celular normal o patogénico. Para que un biomarcador sea efectivo es necesario que sea sensible y muy específico, reproducible, simple de analizar y no invasivo. La gran heterogeneidad clínica, histopatológica y genética de la DLFT, dificulta la búsqueda de biomarcadores. Los recientes avances en la genética ofrecen un gran potencial para identificación de marcadores biológicos para un diagnóstico y pronóstico efectivo.

Los estudios actuales se centran en dos tipos de marcadores biológicos: los que provienen del Fluido Cerebroespinal (FCE) o los que provienen del plasma de sangre periférica. El FCE se considera una fuente prometedora de proteínas que funcionan como biomarcadores para la detección de patologías del SNC [82]. Algunos de estos biomarcadores son el péptido β -amiloide y la proteína tau como marcadores específicos de la EA que permite diferenciarla de la DLFT [83]. El problema del uso de biomarcadores que provienen del FCE es que su obtención es demasiado invasiva, por lo que recientemente se ha despertado interés por identificar marcadores biológicos del plasma obtenido de sangre periférica [84]. Desde que se conoce la base genética de la DLFT se han propuesto como biomarcadores de la misma, mutaciones asociadas a MAPT o a PGRN. La PGRN es una proteína que se expresa de manera ubicua en el SNC y tejidos periféricos [85], por lo que es fácil de detectar en plasma y tejido periféricos sin necesidad de utilizar otros métodos invasivos. Basándose en las mutaciones de pérdida de función de la PGRN que resultan de una haploinsuficiencia de la misma, varios estudios han investigado el uso de los niveles de PGRN en plasma como biomarcador para la detección de paciente de DLFT-TDP [71, 86, 87].

5. DEMENCIA LOBAR FRONTOTEMPORAL ASOCIADA AL DÉFICIT DE PROGRANULINA

En esta tesis nos centraremos en el estudio de la Demencia Lobar Frontotemporal asociada a mutaciones en el gen de la Progranulina (DLFT-TDP).

Como ya he dicho, se ha identificado que las mutaciones en el gen de la Progranulina (PGRN) son la principal causa de la DLFT-TDP y representan un 13-25% de los casos de DLFT familiar [14, 15]. La clínica común de la DLFT-TDP asociada a mutaciones en *GRN* son la DFT-vc y la APPNF [88].

La Progranulina (PGRN) es una glicoproteína que forma parte de una familia de factores de crecimiento ricos en cisteínas que está ampliamente expresada de manera constitutiva en la mayoría de tejidos e involucrada en múltiples procesos incluyendo factor de crecimiento neuronal autocrino, tumorigénesis, reparación de heridas e inflamación [85, 89-92]. El papel de PGRN en el Sistema Nervioso Central (SNC) no se conoce bien y se expresa tanto en neuronas como en la microglía. Sin embargo, el descubrimiento de que las mutaciones que causan pérdida de función en el gen de la Progranulina (*GRN*) causa Demencia como resultado de la atrofia neuronal de los lóbulos frontal y temporal [14, 15, 56, 93], indica que la PGRN ejerce funciones neurotróficas [94-96]. La PGRN posee funciones importantes en la supervivencia neuronal, la formación de sinapsis y diferenciación neuronal, entre otros, por lo que mutaciones de esta proteína producen una patología neuronal [97].

Durante el desarrollo embrionario el ARN mensajero (ARNm) de la PGRN se distribuye por todo el neuroepitelio y posteriormente se limita a regiones del prosencefalo, lóbulos olfatorios y médula espinal [98]. En el cerebro adulto el ARNm de la PGRN aparece en neuronas del neocortex e hipocampo [99]. En estudios posteriores se vio que la PGRN estaba restringida a poblaciones celulares de neuronas y microglía [14, 92, 100].

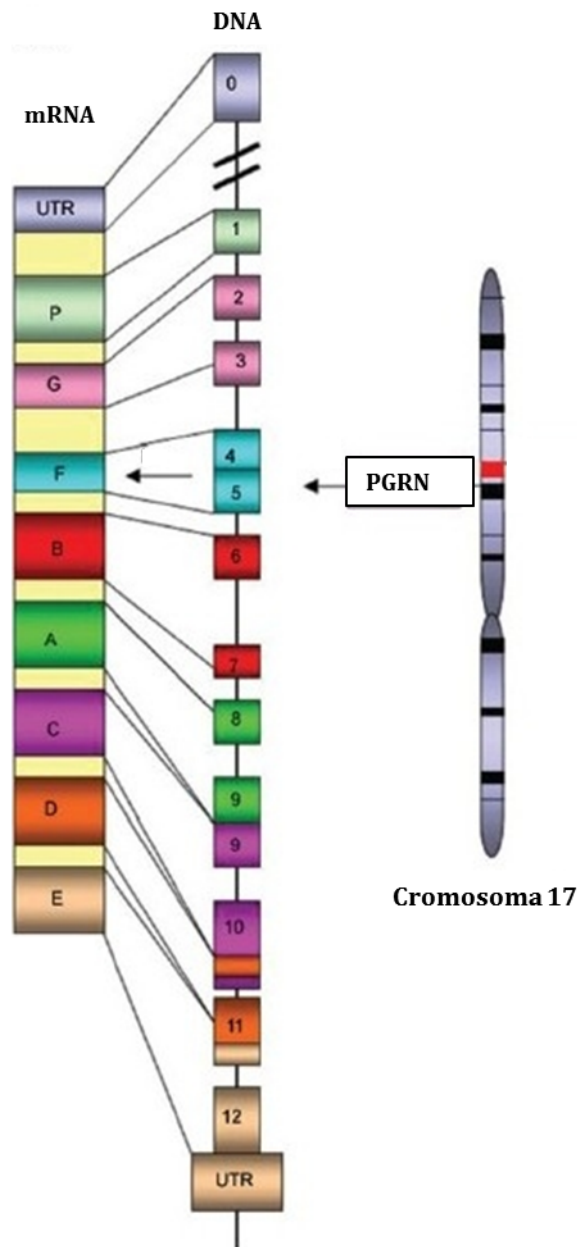


Imagen 8: Representación esquemática de la localización cromosómica, genómica y estructura proteica de PGRN. El gen para PGRN (*GRN*) está localizado en el cromosoma 17 y consta de 12 exones codificantes. Todos los genes codificantes se transcriben en ARNm que codificará la proteína precursora de PGRN. Adaptado de [3].

El gen que codifica para PGRN, gen *GRN*, se localiza en el cromosoma 17 en la región 17q21.32. Este gen comprende 12 exones que cubren aproximadamente 3700 pb que codifican para PGRN (Imagen 8), una glicoproteína precursora rica en cisteína de 593 aminoácidos y de 63,5 kDa. Esta proteína contiene un péptido señal y 7,5 repeticiones de motivos de granulina altamente conservados. Cuando la

PGRN es secretada y escindida estos motivos son cortados por elastasas dando lugar a las granulinas maduras (GRN) de 6 KDa (Imagen 9) [89]. Cada dominio de la granulina en tándem de la proteína está codificado por dos exones no equivalentes que dará lugar a las granulinas maduras (Imagen 9) [91, 101, 102]. Tanto PGRN completa como las GRN maduras tienen propiedades mitogénicas relacionadas con la regulación del crecimiento celular y la progresión del ciclo celular. La función de PGRN es esencial en gran cantidad de procesos biológicos como el desarrollo y la reparación de tejidos. PGRN y GRN tienen efectos opuestos en estos procesos, sugiriendo que el mantenimiento de un equilibrio entre PGRN y los diferentes péptidos de GRN es importante en la homeostasis de los tejidos [94].

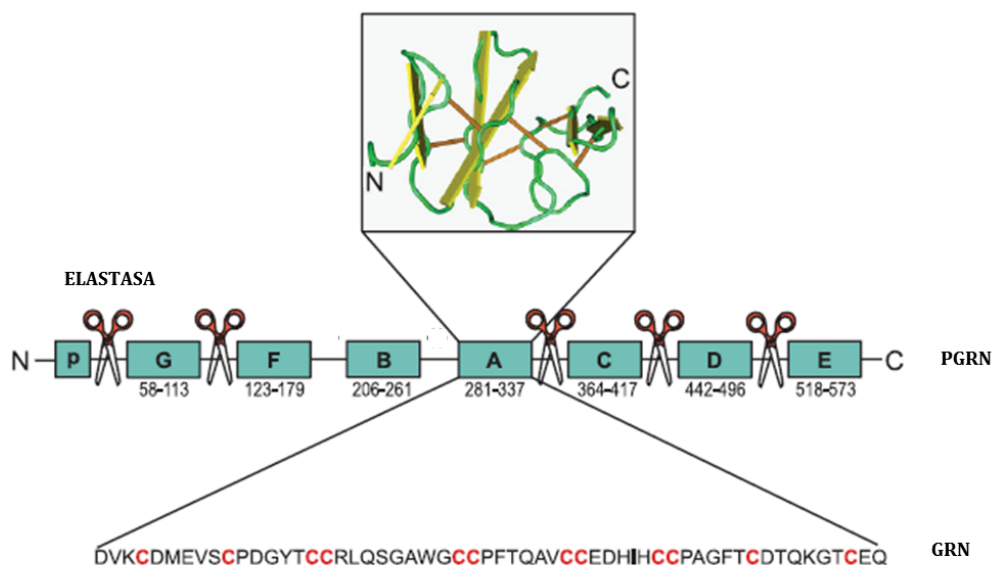


Imagen 9: Representación esquemática de PGRN y los dominios GRN. Podemos ver los dominios granulina que forman la PGRN y las zonas de corte por las elastasas (tijeras) según Zhu J. Arriba está la estructura tridimensional de la Granulina y abajo la secuencia de aminoácidos. Adaptación de [7].

La PGRN y la GRN tienen también papeles opuestos en procesos inflamatorios; PGRN tiende a suprimir la inflamación y la GRN promueve el proceso de inflamación [89].

Hasta ahora se han identificado más de 60 mutaciones de *GRN* en pacientes con DLFT-TDP [2, 103]. Se han descrito diferentes tipos de mutaciones en *GRN*: mutaciones de desfase del marco de lectura (*frameshift* en inglés), mutaciones que

afectan al *splicing* del ARN mensajero, mutaciones sin sentido (*nonsense* en inglés), mutaciones en el péptido señal, mutaciones que provocan alteraciones en la secuencia Kozak del ARN mensajero y mutaciones de cambio de sentido (*missense* en inglés) [104]. Con independencia del mecanismo, la mayoría de las mutaciones descritas se encuentran en heterocigosis y son consecuencia de la aparición de un codón de terminación prematuro en el ARN mensajero del alelo mutante induciendo la rápida degradación de éste mediante el proceso de NMD (del inglés *nonsense mediated decay*). El resultado final es la pérdida del 50% de la proteína, siendo así la haploinsuficiencia de PGRN el mecanismo que causa la enfermedad [14, 15, 97, 105]. Algunas mutaciones patogénicas sin sentido dan lugar a una proteína no funcional o inestable generando una haploinsuficiencia funcional [106]. Por otro lado, existen mutaciones de *GRN* que no están relacionadas con la patogénesis de la DLFT y cuyo efecto aún es desconocido [107]. En la Imagen 10 se detallan las mutaciones en *GRN* que se conocen hasta ahora.

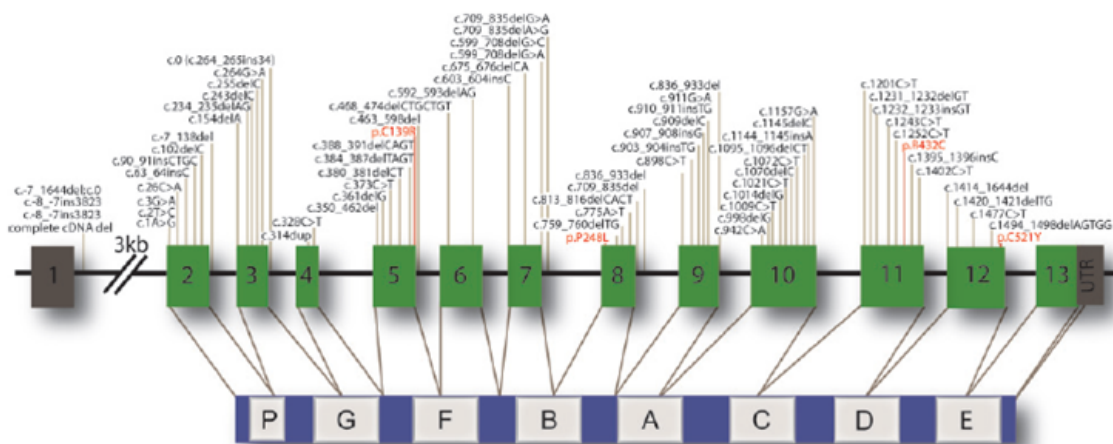


Imagen 10: Visión general de las mutaciones de PGRN en la DLFT. Representación esquemática de *GRN* arriba y de PGRN abajo con las mutaciones patogénicas de pérdida de función y potencialmente patogénicas de la PGRN [2].

6. MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN LA DEGENERACIÓN NEURONAL EN LA DLFT-TDP

Las causas de la muerte neuronal en la DLFT asociada al déficit de PGRN no son del todo conocidas. En primer lugar hay que destacar que la deficiencia de PGRN conlleva la pérdida de las funciones tróficas y neuroprotectoras que se atribuyen a la molécula [94-96]. Como era de esperar desde que se observó la presencia de TDP-43 en neuronas degeneradas de pacientes con DLFT [16], se ha descrito que las alteraciones en la fosforilación de la proteína, cambios en la localización subcelular de TDP-43, así como deficiencias en los mecanismos de degradación de la proteína pueden jugar un papel relevante en la patogénesis de la enfermedad [16, 49, 57]. Otros mecanismos destacados implican, una respuesta inflamatoria crónica, alteraciones en la función mitocondrial y una posible desregulación de los mecanismos que controlan el ciclo celular.

6.1. Déficit de PGRN y neurodegeneración en la DLFT-TDP

La función de PGRN es esencial en gran cantidad de procesos biológicos como el desarrollo y la reparación de tejidos. Tanto la PGRN como los péptidos que se forman tras la hidrólisis por elastasa, las granulinas (GRN), tienen efectos opuestos en estos procesos, sugiriendo que el mantenimiento de un equilibrio entre PGRN y GRN es importante en la homeostasis de los tejidos [94].

La expresión PGRN es particularmente alta en tejidos que requieren gran regeneración como la piel o el tracto gastrointestinal. En tejidos en los que no hay renovación celular, como en el pulmón, la expresión es mucho menor [108]. En el cerebro se ha observado que los niveles también son bajos tal y como era de esperar, sin embargo, se ha observado que la expresión es más alta de lo esperado en ciertos grupos de neuronas como las piramidales corticales, las células de Purkinje cerebelares y las neuronas piramidales del hipocampo [92], si bien se ha podido comprobar una pérdida progresiva en la expresión de esta proteína en el cerebro humano desde su etapa de embrión (células neuroepiteliales) y feto (tronco del encéfalo, bulbo olfatorio, retina y médula espinal) a la de adulto, lo que sugiere un papel como factor estimulante del desarrollo y diferenciación del

sistema nervioso central. Esto apoya el hecho de que la PGRN tiene un papel importante en el desarrollo del cerebro y en la diferenciación de las células del SNC. Es importante mencionar que la PGRN está también presente en las células de la microglía, las cuales se activan en casos de daño cerebral. Cuando se produce un daño neuronal la microglía se activa liberando sustancias proinflamatorias y por otra parte aumenta la actividad de la elastasa, que procesa la PGRN aumentando los niveles de granulinas, contribuyendo al proceso neuroinflamatorio y neurodegenerativo [109].

La PGRN, además de actuar como factor de crecimiento, podría ejercer un papel neuroprotector en el SNC. Así por ejemplo, se ha descrito que la PGRN recombinante promueve la supervivencia neuronal y estimula el crecimiento de neuritas en neuronas corticales y motoras [94]. A nivel molecular, se ha descrito que la PGRN puede regular vías de señalización celular importantes para la supervivencia neuronal, tales como PI3K/Akt y MAPK, y Wnt [110-114]. No obstante, la función de PGRN en el SNC es poco conocida y se ignora cómo la haploinsuficiencia en PGRN contribuye al procesamiento anómalo de la proteína TDP-43 y a la degeneración neuronal en la DLFT-TDP.

Se sabe que la PGRN actúa intra y extracelularmente, pero aún queda por identificar a qué receptores se une. La PGRN es una proteína que se secreta asociada a exosomas, un tipo de vesículas de origen endosomal, y a las que se atribuye un importante papel para transferir biomoléculas entre las células. Un trabajo reciente ha demostrado que las mutaciones en *GRN* en pacientes de DLFT inducen una menor liberación de exosomas y alteraciones en la composición de los mismos [115]. Por tanto, en estos pacientes, no solo los niveles circulantes de PGRN disminuyen, sino también se compromete la comunicación intercelular. Se cree que los efectos intracelulares de PGRN están mediados por la unión de PGRN con receptores aún no completamente identificados, aunque se ha sugerido que los receptores de sortilina (SORT1) o TNF α (factor de necrosis tumoral α) podrían servir como receptores de PGRN eficaces [116, 117]. Más recientemente se ha identificado el receptor de tirosina EphA2 como un candidato importante para mediar los efectos de PGRN [118]. SORT1 es un receptor multiligando capaz de

endocitar proteínas para su procesamiento y/o degradación [119]. El extremo C-terminal de la PGRN se une a SORT1 causando la endocitosis de PGRN hacia los lisosomas, regulando de esta forma los niveles circulantes de PGRN [120]. Se ha descrito que la PGRN exógena es capaz de aumentar la supervivencia de células carentes de SORT1; esto sugiere que SORT1 debe tener un papel limitado en la endocitosis de PGRN, sin interferir con los efectos neurotróficos y neuroprotectores de PGRN, por lo que puede haber algún que otro receptor [121]. Se ha identificado otro receptor con el que podría competir SORT1 por la unión a PGRN, este es el receptor a TNF α . Cuando PGRN se une al receptor de TNF α bloquea la iniciación de las cascadas de señalización iniciadas por TNF α [117], aunque se ha visto que PGRN puede modular la inflamación sin necesidad de unirse a este receptor de TNF α [122]. Trabajos recientes de nuestro laboratorio han podido demostrar la interacción física de PGRN con los receptores TNFRI y TNFRII [113]. Además pudimos comprobar la existencia de una interacción funcional entre PGRN y TNF α que resulta en la modulación de los niveles y funciones de NF- κ B y eventualmente la sobreactivación de la vía de señalización a través de Wnt [113]. En consonancia con estos resultados, se ha descrito que los ratones GRN $^{-/-}$ desarrollan una artritis inflamatoria, en respuesta al colágeno, mayor que los ratones controles de la misma camada, sugiriendo una competición entre PGRN y TNF α por señalizar a través de los receptores TNFR [117]. En base a estas observaciones, cabe pensar que el déficit de PGRN que padecen los enfermos de DLFT podría facilitar la acción del TNF α en neuronas y/o microglía conduciendo a una inflamación persistente a lo largo de la vida que podría concluir en un proceso neurodegenerativo. Por otro lado, la unión de PGRN al receptor EphA2 parece activar la vía de señalización MAPK (de inglés *Mitogen-activated protein kinase*) y facilitar la activación de otros receptores como EFGR (receptor del factor de crecimiento epidérmico) [118].

6.2. Disfunción mitocondrial y neurodegeneración en la DLFT-TDP

Las mitocondrias son orgánulos celulares que desempeñan funciones esenciales para la para el desarrollo y supervivencia celular. La existencia de alteraciones de la función mitocondrial se ha asociado frecuentemente con la aparición de diversas patologías, entre las que destacan enfermedades neurodegenerativas, [123]. En las

mitocondrias se genera la mayor parte del ATP que necesita la célula, en el proceso de la fosforilación oxidativa (OXPHOS). La dependencia de las células neuronales del ATP mitocondrial es superior al de otros tipos celulares, ya que las neuronas tienen una capacidad muy limitada para generar ATP en el proceso de la glucólisis.

La disfunción mitocondrial puede originarse por mutaciones en el ADN mitocondrial (ADNmt) o nuclear (ADNn) o por otras causas que afectan secundariamente al metabolismo mitocondrial. La consecuencia es la incapacidad de las mitocondrias afectadas de generar suficiente ATP mediante la fosforilación oxidativa y la producción aumentada de “especies reactivas de oxígeno” (ROS, por sus siglas en inglés).

La cadena respiratoria se compone de cuatro complejos proteicos (I-IV) y es responsable de la generación de un potencial electroquímico a través de la membrana mitocondrial, que es utilizado por el complejo V para producir ATP [124]. Este sistema depende de la transferencia de electrones mediada por distintos transportadores como la ubiquinona y el citocromo c, hasta el oxígeno que es el aceptor final en la cadena respiratoria. Debido al papel que juegan las mitocondrias en el proceso de transferencia de electrones, éstas constituyen la principal fuente de ROS [125-127].

Además del papel mitocondrial en la producción de energía y de ROS, las mitocondrias tienen funciones importantes para la fisiología celular como la regulación de la homeostasis de Ca^{2+} , la señalización intracelular y el control del destino celular supervivencia/muerte [128, 129].

Las mitocondrias son unos orgánulos altamente dinámicos, que cambian la morfología, su número, y función en respuesta a situaciones fisiopatológicas. Las mitocondrias pueden migrar, dividirse y fusionarse formando una red tubular interconectada. De esta manera su morfología puede ser heterogénea, esto está regulado por procesos de fusión y fisión dinámicos que son críticos para la regulación de la muerte celular [130]. Para el mantenimiento de la calidad e integridad de las mitocondrias, las células disponen de mecanismos para

monitorizar su función y sustituir las mitocondrias no funcionales por orgánulos nuevos, para lo cual se dispone de los mecanismos de replicación y transcripción del ADNmt, seguido de acontecimientos en el citoplasma que incluyen los procesos de biogénesis mitocondrial, procesos de autofagia y mecanismos de fusión/fisión mitocondrial [131].

Existen numerosas evidencias en la literatura que indican la importancia de la disfunción mitocondrial en la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas [132, 133], además, se han descrito asociaciones entre las mitocondrias y las proteínas mutadas en ciertas enfermedades neurodegenerativas [134]. Es evidente por tanto, que es importante un mayor conocimiento de los mecanismos que controlan la función mitocondrial en las enfermedades neurodegenerativas para el mejor diseño de estrategias terapéuticas. Las funciones mitocondriales como el tamponamiento de Ca^{2+} , la producción de energía, la generación de ROS y el control de la vía intrínseca de la apoptosis contribuyen a la pérdida neuronal [135]. Además, hay que considerar que la interrupción del equilibrio entre fusión y fisión de las mitocondrias parece ser una característica común en enfermedades neurodegenerativas como la EA, el Parkinson o ELA [136-138].

Los estudios que consideran la posibilidad de que la disfunción mitocondrial juegue un papel clave en la patogénesis de la DFT son mucho menos numerosos que los referidos a la EA o al Parkinson. Sin embargo, empieza a ser más frecuente que se describan alteraciones en la función mitocondrial en pacientes afectados de DLFT, como por ejemplo, cambios en el potencial de membrana mitocondrial y consumo de oxígeno en fibroblastos de pacientes que portan la mutación *C9orf72* [139], desacoplamiento mitocondrial y disminución en los niveles de ATP en modelos celulares deficientes en VCP [140], o cambios en la morfología mitocondrial tales como alteraciones en la formación de crestas mitocondriales observadas en un modelo murino de TDP-43 [141].

Por otro lado, y aunque la localización de TPD-43 es principalmente nuclear, recientemente se ha revelado un posible papel de esta proteína que puede jugar en

la mitocondria. Se ha demostrado que es capaz de unirse a los ARN transcritos en la mitocondria, como los que codifican para algunas de las subunidades del complejo I de la cadena respiratoria [142]. Estos autores demostraron también que la supresión de esta proteína en la mitocondria bloquea los efectos de TDP-43 induciendo disfunción mitocondrial y pérdida neuronal en un modelo murino de TDP-43 [143]. Esto pone de manifiesto la relación existente entre los efectos tóxicos de TDP-43 y la bioenergética mitocondrial en las proteínopatías de TDP-43 como la DLFT-TDP o ELA, y por tanto, abre nuevas vías para el diseño de nuevas estrategias que involucren a la regulación de los niveles y localización sub-celular de esta proteína.

Dado los antecedentes, en esta tesis estudiaremos la posible relación entre la DLFT y la disfunción mitocondrial como causa de la apoptosis neuronal.

6.3. Activación del ciclo celular como causa de neurodegeneración en la DLFT

En los últimos años, ha ganado peso la hipótesis que sugiere que alteraciones en la maquinaria del ciclo celular pueden jugar un papel relevante en la patogénesis y progresión de procesos neurodegenerativos [144-147]. Las evidencias que apoyan la activación indeseada del ciclo celular en los lóbulos frontal y temporal en la DLFT se refieren principalmente a los casos de DLFT-tau [148]. Así por ejemplo, se ha descrito la presencia de pRb fosforilada y otros marcadores mitóticos en cortes histopatológicos de taupatías relacionadas con la DLFT como la PSP y la DFTP-17 [149, 150]. Además la fosforilación de tau en Thr231 se ha vinculado con la activación de la ruta de señalización p44/42 MAPK y con la eventual activación del ciclo celular [151]. La relación existente entre activación del ciclo celular en neuronas en áreas selectivas del cerebro y la neurodegeneración se ha estudiado extensivamente en la enfermedad de Alzheimer. Así por ejemplo, se ha descrito la presencia de proteínas reguladoras del ciclo en corteza e hipocampo de pacientes de EA [152], y lo que es más importante evidencias de duplicación del ADN que demuestran que la neurona es capaz de completar la fase S. El laboratorio de Herrup, empleando técnicas de hibridación in situ con sondas fluorescentes, demostró que una fracción importante de neuronas piramidales del hipocampo en

EA, había replicado cuatro loci genéticos en tres cromosomas diferentes [153]. Además, diferentes estudios han mostrado que en condiciones fisiológicas, en el cerebro existe una pequeña tasa de neuronas aneuploides, aproximadamente del 10%, que son bien toleradas [154, 155], y que esta frecuencia aumenta en las enfermedades neurodegenerativa [156].

La re-entrada en el ciclo celular para neuronas maduras es un evento letal, por ello el control del ciclo de división es considerado un factor crítico en la prevención de la neurodegeneración, ya que disminuye la susceptibilidad neuronal a distintos mecanismos neurodegenerativos.

El ciclo celular es una serie de eventos ordenados por los que pasan las células para su crecimiento y división en dos células hijas. Las etapas o eventos del ciclo celular son cuatro (G1-S-G2-M) y está regulado por ciclinas/quinasa dependiente de ciclina (CDK) (Imagen 11). La etapa G1 es la de crecimiento, durante esta fase intervienen ciclinas y CDKs que desencadenan su activación, estas con la ciclina D y la CDK4/6. La ciclina D se une a CDK4/6 para la fosforilación de la proteína de retinoblastoma (pRb), esta pRb está unida a un factor de transcripción de genes para la progresión del ciclo celular (E2F-1), al fosforilarse deja libre a E2F-1 activando la transcripción de dichos genes. La fase S está regulada por la activación de la ciclina E y CDK2, y a posteriori la ciclina A. En esta fase es el complejo ciclina A/CDK2 lo que activa la replicación del DNA. En la etapa G2 las células se preparan para su división mediada por el complejo ciclina A/CDK1. Por último, en la fase M ocurre la mitosis, en la cual los cromosomas se separan y se dirigen a los polos de cada célula hija que después se terminarán de dividir. El complejo ciclina B/CDK1 es el que se encarga de la regulación de la mitosis.

La actividad de las CDKs que controlan el proceso se regula también con inhibidores específicos de CDKs que se organizan en dos familias, INK4 y Cip/Kip. La familia INK4 (del inglés *Inhibitors of Cyclin D-dependent Kinase 4*) está formada por p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} y p19^{INK4d}, mientras que la familia Cip/Kip (del inglés *Cdk Interacting Protein/Kinase Inhibitory Protein*) está formada por p21^{Cip1}, p27^{Kip1} y p57^{Kip2} [157]. Existen dos puntos importantes de control del ciclo en las

transiciones G₁/S y G₂/M. En el primer punto de control, la célula decide si está preparada para comenzar la división celular o regresa a la fase G₀. En el segundo punto de control el principal problema suelen ser daños en el ADN. La célula debe decidir si continúa con la progresión del ciclo, si se produce un arresto para poner en marcha mecanismos de reparación o si, en el caso de que no sea posible la reparación, se induce la apoptosis [158].

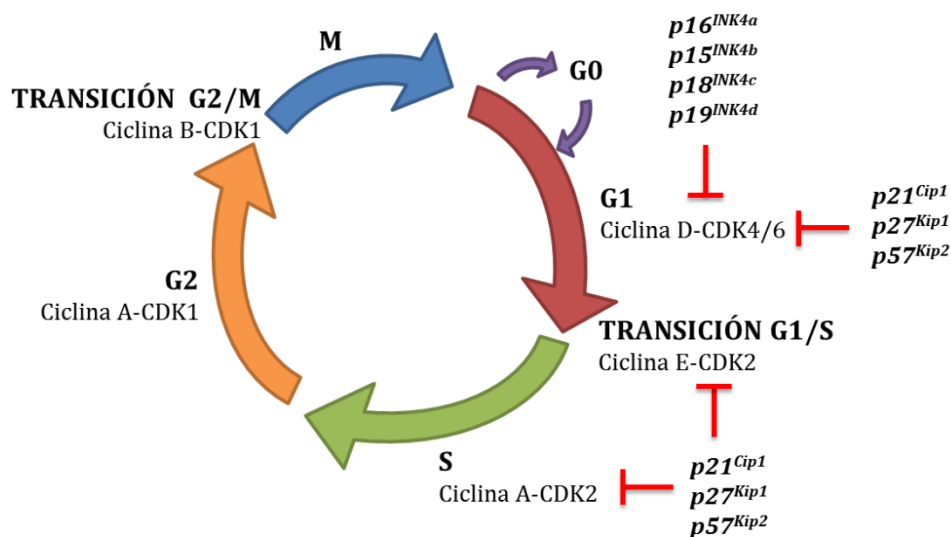


Imagen 11: Representación esquemática de las distintas fases del ciclo celular. Se detalla las distintas ciclinas, CDKs e inhibidores que intervienen en el funcionamiento correcto del ciclo celular.

En lo que se refiere a la DLFT asociada al déficit de PGRN, hay que considerar que la pérdida de propiedades mitogénicas y neurotróficas por la deficiencia de PGRN pudiera inducir alteraciones en el control del ciclo celular en las neuronas afectadas de pacientes de DLFT-TDP [94]. La PGRN es capaz de activar las principales cascadas de señalización relacionadas con la proliferación celular como la ruta de las p44/42 MAPK y PI3K, tanto en células no neuronales [159] como en el SNC [160-162]. Además hay mencionar que el análisis de la expresión diferencial de genes en el cerebro de pacientes de DLFT con mutaciones en *GRN*, destacan fundamentalmente genes relacionados con la señalización vía TGF α y genes reguladores del ciclo celular [163]. Así mismo, trabajos recientes de nuestro laboratorio han demostrado la existencia de alteraciones en el control del ciclo

celular y la regulación de apoptosis en líneas linfoblásticas de pacientes de DLFT-TDP, que son portadores de la mutación *c.709-1G>A* en el gen *GRN* [164, 165]. Estas observaciones apoyan por un lado, la hipótesis de que las alteraciones en el control del ciclo celular en los procesos neurodegenerativos no son privativas del SNC, y por otro, que también la DLFT-TDP como otras enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer o el Parkinson tienen manifestaciones a nivel sistémico [166-168].

En 2008, un trabajo del grupo de Ayala desveló un posible vínculo entre el déficit de PGRN y la desregulación del ciclo celular que podría depender de TDP-43. En este trabajo se describe que la pérdida de función nuclear de TDP-43, inhibiendo la transcripción de CDK6, produce un aumento de la actividad de los complejos ciclina/CDK y de la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (pRb), que controla el tránsito entre las fases G₁ y S del ciclo celular [169]. Como ya hemos visto, la fosforilación de la proteína TDP-43 parece influir en el balance entre los niveles de TDP-43 nucleares y citosólicos de TDP-43, disminuyendo los niveles de TDP-43 en el núcleo. La disminución de la fosforilación de TDP-43 utilizando inhibidores selectivos de CK-1δ, normaliza la respuesta proliferativa de linfoblastos de pacientes de DLFT-TDP [170]. Por otro lado, se ha descrito que la proteína CDC7 (del inglés *cell division kinase 7*) participa en la fosforilación de TDP-43 en *C. elegans* y que su inhibición no solo previene la fosforilación de la proteína, sino que también frena el proceso neurodegenerativo [171, 172]. En pacientes con DLFT-TDP también se ha observado un aumento de la expresión neuronal de CDC7. Por otra parte algunas quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) también contribuyen a la fosforilación de TDP-43, de manera que inhibidores específicos de CDKs son capaces de bloquear la acumulación de TDP-43 en diversos modelos celulares.

En conjunto estas observaciones apoyan la idea de que alteraciones en el control del ciclo celular pueden jugar un papel relevante en el proceso neurodegenerativo de la DLFT-TDP alterando el procesamiento de TDP-43.

7. DEMENCIA LOBAR FRONTOTEMPORAL Y APOPTOSIS

La apoptosis o muerte celular programada, se postula como el principal mecanismo de muerte neuronal en las enfermedades neurodegenerativas. Este proceso se caracteriza morfológicamente por la condensación de la cromatina, fragmentación del ADN y del núcleo de la célula y formación de cuerpos apoptóticos [173, 174] y activación de caspasas [175]. La integridad de las membranas celular y mitocondrial permanece intacta en los estadios iniciales. El periodo de tiempo entre la iniciación del proceso y la ejecución de apoptosis puede durar horas o días y los cuerpos apoptóticos son fagocitados rápidamente por las células adyacentes o por macrófagos [176, 177]. Por tanto, en una enfermedad neurodegenerativa crónica, solo se detecta un número pequeño de neuronas apoptóticas en un momento dado ([178, 179]).

Entre los estímulos que pueden inducir la apoptosis neuronal en las enfermedades neurodegenerativas cabe destacar los efectos tóxicos de acúmulos de proteínas, la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo, o la entrada no deseada en ciclo celular. El proceso apoptótico se puede iniciar activando receptores de muerte en la membrana celular, la llamada vía extrínseca o produciendo y/o activando ciertas proteínas como p53, Bax, Bcl2, Bcl-Cl, etc, que son capaces de inducir cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial (vía intrínseca). La mitocondria libera citocromo c y AIF (del inglés apoptosis-inducing factor), dando lugar a la formación del complejo apoptosoma y la activación de las caspasas. Ambas vías se han asociado a condiciones patológicas neurodegenerativas [180, 181].

La pérdida neuronal característica de la DLFT presenta características de apoptosis, ya que por ejemplo se ha observado fragmentación de ADN y activación de caspasa 3 en neuronas y astrocitos de pacientes de DLFT [182]. La activación de la apoptosis en la DLFT se ha relacionado con la haploinsuficiencia de PGRN [160] debido a la pérdida del papel neuroprotector de la proteína. Se ha descrito además, que la administración de PGRN exógena es un potente factor anti-apoptótico extracelular en distintos tipos celulares entre los que se encuentran las neuronas [183, 184]. Por tanto, cabe esperar que la deficiencia de PGRN pudiera reducir la

supervivencia neuronal y sensibilizar a las neuronas a la apoptosis inducida por ciertas formas de estrés celular [183, 185, 186].

Por otro lado, existen evidencias que relacionan el funcionamiento defectuoso de la TDP-43 con la pérdida de neuronas por apoptosis. Se ha descrito que la sobreexpresión de TDP-43 provoca cambios en los niveles de proteínas pro y anti-apoptóticas que regulan la apoptosis, dando lugar a la muerte neuronal [187]. Se ha visto que fallos en el propio procesamiento de la proteína TDP-43 está relacionada con una muerte celular programada [188]. Como ya sabemos, el acúmulo de agregados de la proteína TDP-43 genera una toxicidad en las células que podría ser una señal desencadenante de apoptosis neuronal [189]. Además, existen evidencias experimentales de que las caspasas pueden llevar a cabo la propia fragmentación de la proteína en fragmentos C-terminales de la TDP-43 [190], lo que sugiere que el aumento de actividad de las caspasas necesario para el corte patológico de TDP-43 podría desencadenar la apoptosis en las neuronas vulnerables [191]. No obstante, otros autores no han encontrado evidencias de activación significativa de caspasas y apoptosis en un modelo de pez cebra con la proteinopatía de TDP-43 [192] ni en ratones nulos Grn^{-/-} [193].

En cualquier caso se cree que los agregados de TDP-43 hiperfosforilados regulan de algún modo el destino celular supervivencia/apoptosis. Se ha descrito que la TDP-43 colocaliza con los llamados gránulos de estrés (GE) [194], que son capaces de secuestrar proteínas reguladoras de apoptosis, probablemente para prevenir su interacción con otros factores que pudieran inducir la muerte celular en condiciones normales [195]. Sin embargo, en condiciones de estrés severo y crónico, como en la DLFT-TDP, la presencia de agregados de TDP-43 fosforilada y ubiquitinizada, podría causar la sobreactivación de los GE y una respuesta apoptótica exacerbada.

8. TRATAMIENTO Y PERSPECTIVAS TERAPÉUTICAS EN LA DEMENCIA LOBAR FRONTOTEMPORAL

La heterogeneidad clínica y patológica de la DLFT ha dificultado encontrar tratamientos óptimos. Hasta el momento no existen medicamentos aprobados para el tratamiento específico de la DLFT, de manera, que los pacientes son tratados con medicamentos que se utilizan en otras enfermedades psiquiátricas para paliar algunos de los síntomas. Los registros americano y europeo de los diferentes ensayos clínicos, que se están llevando a cabo con distintos agentes farmacológicos para la DLFT, pueden encontrarse en www.clinicaltrial.gov y www.clinicaltrialsregister.eu, respectivamente. En general, los ensayos clínicos se dirigen al tratamiento de los síntomas, teniendo en cuenta su presentación clínica y los trastornos de conducta, o pretenden intervenir en el curso de la enfermedad, actuando sobre los mecanismos moleculares de la patogénesis. En este caso, la identificación de biomarcadores asociados al proceso neurodegenerativo es imprescindible para probar la eficacia de drogas que puedan modificar la aparición y/o la progresión de la enfermedad [196].

8.1. Tratamientos:

8.1.1. Trastornos de conducta.

Los cambios de conducta en los pacientes de DLFT, son a menudo embarazosos para los cuidadores. Algunos de ellos, fundamentalmente los cambios de personalidad y empatía son difíciles de tratar, pero otros como la desinhibición, comportamiento sexual inapropiado, comportamiento obsesivo compulsivo, cambios en la dieta etc., responden razonablemente bien a la farmacoterapia. Algunos pacientes muestran déficit en los sistemas serotoninérgico y dopaminérgico [197]. Por esta razón, se han utilizado inhibidores de la captación de serotonina, incluyendo fluoxetina, fluvoxamina, sertralina y paroxetina, con mejoría en la escala de evaluación de la conducta (Neuropsychiatric Inventory (NPI) [198]). También se han realizado ensayos con Memantina, un antagonista de los receptores de glutamato, basándose en los aparentemente buenos resultados

obtenidos en el tratamiento del Alzheimer. Sin embargo, los resultados obtenidos no parecen ofrecer mejoras significativas para los pacientes de y DLFT [199-201].

8.1.2. Deterioro cognitivo

Hasta el momento no se han encontrado tratamientos para estabilizar o mejorar el déficit cognitivo en alguno de los síndromes de la DLFT. En algunos casos se ha utilizado inhibidores de acetilcolinesterasa como el Donepezil, aunque no se ha descrito déficit colinérgico en la DLFT [202].

8.1.3. Cambios en los hábitos alimenticios.

Los pacientes afectados por la variante de DLFT que implica cambios de conducta, presentan una menor saciedad y deseos irrefrenables por los alimentos dulces y ganancia de peso. Estos trastornos se consideran parte de la desinhibición [203]. Sin embargo, en los pacientes con DS, son más frecuentes las manías sobre ciertos alimentos que conducen, a veces, a una pérdida de peso. Los trastornos en la alimentación son difícilmente tratables, aunque responden en cierta medida a los inhibidores de la captación de serotonina [204].

8.2. Estrategias terapéuticas en estudio, para prevenir o ralentizar la DLFT.

En este caso, la búsqueda de nuevos tratamientos se dirige a intervenir en los mecanismos moleculares que subyacen a la patología. En los últimos años, se ha producido un importante avance en el conocimiento de las causas genéticas y características neuropatológicas de la DLFT, y consecuentemente han surgido potenciales estrategias moleculares para el tratamiento de la DLFT. Aproximadamente el 10% de los casos muestra una herencia autosómica dominante, aunque el 40% de los pacientes presenta antecedentes familiares de DLFT o de otras condiciones neuropsiquiátricas [205]. Como ya sabemos, los tres principales genes asociados a la DLFT son los que codifican para las proteínas tau (MAPT) [206], PGRN [14, 15] o TDP-43 [16]. Las mutaciones en tau y PGRN dan cuenta de la mayoría de los casos de DLFT familiar (<http://www.molgen.ua.ac.be/FTDMutations>). Los principales subgrupos ya

sabemos que se denominan DLFT-tau y DLFT-TDP en función de la proteína de sus depósitos.

8.2.1. Estrategias basadas en la proteína tau.

Las inclusiones patológicas en el SNC, asociadas a mutaciones en el gen tau son depósitos de la proteína tau hiperfosforilada. Los depósitos de tau también se observan en otras enfermedades neurodegenerativas como el alzhéimer, que en conjunto forman el grupo de las llamadas taupatías. Las mutaciones en tau pueden alterar el proceso de “splicing”, así como a la degradación y la fosforilación de la proteína, modificando la función y promoviendo la formación de agregados insolubles en neuronas y células de la glía. Respecto al mecanismo patogénico de las mutaciones en tau, se ha considerado tanto que se produce una pérdida de la función fisiológica, como una ganancia de una nueva función tóxica [207], o una combinación de ambas. Las estrategias terapéuticas en estudio están dirigidas a impedir los cambios en la expresión, degradación y modificación de la proteína, e incluyen la inhibición de las tau-quinasas, modificadores del proceso de splicing, prevención del proceso de agregación, modificación de chaperonas y agentes estabilizadores de microtúbulos. La Tabla 2 recoge la utilización de algunas de estas drogas. Hay que considerar, sin embargo que algunos de estos agentes tienen propiedades químicas o biológicas que dificultan su uso “in vivo”. Esto hace que sea imprescindible identificar compuestos, que además de ser capaces de atravesar la barrera hematoencefálica, tengan buena tolerancia y una vida media razonable que permita estudios de varios meses en modelos murinos de taupatías.

Tabla 2

Agentes moduladores de la actividad de la proteína tau

DROGA	MECANISMO DE ACCIÓN	REFERENCIA
Neomycin	Modulación del splicing de <i>tau</i>	[208]
Mitoxantrone	Modulación del splicing de <i>tau</i>	[209]
Davunetde (NAP)	Estabilización de microtúbulos	[210]
Inhibidores de GSK-3 β (litio, valproato) y de ERK1/2	Inhibición de la fosforilación de tau	[211, 212]
Fenotiazina	Inhibición de la agregación de tau	[213]
Antraquinonas	Inhibición de la agregación de tau	[214]
Rodamina	Inhibición de la agregación de tau	[215]
PU24FcI (inhibidor de HSP90)	Activación de la degradación de tau en el proteasoma	[216]
Rapamicina	Activación de autofagia	[217]

GSK3 β , glucógeno sintasa quinasa; HSP90, del inglés heat-shock protein 9; ERK1/2, del inglés Extracellular signal regulated kinase 1/2.

8.2.2. Estrategias basadas en la proteína PGRN.

La mayoría de las mutaciones conocidas en el gen *GRN*, asociadas a la DLFT-TDP, introducen un codon de terminación prematuro que conduce a la degradación del mensajero y a la haploinsuficiencia de la proteína. Los posibles mecanismos por los que el déficit de PGRN causa neurodegeneración incluyen la falta prolongada de soporte neuroprotector, así como una respuesta defectuosa al daño neuronal. Las estrategias en estudio están encaminadas a impedir la degradación del mensajero o a aumentar los niveles de PGRN. En el primer caso, hay que destacar que existen en la actualidad dos ensayos clínicos en fase II y III para el tratamiento de la distrofia de Duchenne y la fibrosis quística, respectivamente, con el compuesto PTC124, un estabilizador del ARNm, que se puede suministrar por vía oral [218] que ha llevado a algunos autores a considerar esta alternativa para la DLFT-TDP [202].

En el año 2011 aparecieron dos trabajos importantes, que han abierto nuevas vías para aumentar los niveles de PGRN. En primer lugar Capell y colegas [219] realizaron un estudio de cribado de moléculas capaces de inhibir la degradación proteolítica de PGRN. La adición de alguno de estos compuestos al medio de cultivo incrementaba efectivamente el contenido celular de PGRN. El compuesto BafA1,

inhibidor de la ATP-asa vacuolar (v-ATP-asa) fue uno de los más efectivos incrementando los niveles de PGRN. Aparentemente, el impedir la acidificación vesicular es importante, ya que otras drogas alcalinizantes, como cloroquina o amiodarona también aumentan los niveles de PGRN. Se ha postulado que los cambios de pH intracelular, producido por estas drogas, modifican los niveles de PGRN a nivel post-transduccional. Por otra parte Cenik y colegas [220] identificaron algunos agentes capaces de aumentar los niveles de PGRN a nivel de la transcripción, como *suberoylanilide hydroxamic acid* (SAHA) o *trichostatin A*. Es importante destacar que algunas de estas drogas ya se están utilizando en la clínica para el tratamiento de otras enfermedades. Así por ejemplo, la cloroquina se usa para el tratamiento de la malaria, y la amiodarona es útil en el tratamiento de la angina de pecho. Las alteraciones en la actividad de las deacetilasas de histonas parecen ser comunes a algunas enfermedades neurodegenerativas [221]. En la Tabla 3 se recogen alguno de los estudios realizados con estas drogas.

Tabla 3

Drogas capaces de aumentar los niveles de PGRN

DROGA	MECANISMO DE ACCIÓN	REFERENCIA
BafA1	Inhibidor de la v-ATPasa	[219]
Concamycin A, apiculare A	Inhibidores de v-ATPasa	[222]
Cloroquina, amiodarona	Agentes alcalinizantes	[219]
SAHA	Inhibidor de las desacetilasas de histonas	[220]
Trichostatin A	Inhibidor de las desacetilasas de histonas	[220]

SAHA, *suberoylanilide hydroxamic acid*.

Por último, la identificación de receptores para PGRN ha abierto nuevas vías de investigación para buscar nuevas terapias para la DLFT-TDP. Tanto sortilina 1 como los receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) parecen ser capaces de interactuar con PGRN [117, 120].

8.2.3. Estrategias basadas en la proteína TDP-43

El principal componente de los agregados proteicos en el cerebro de personas afectados por la DLFT es la proteína TDP-43. Como ya hemos visto la principal función fisiológica de TDP3 es la regulación de transcripción. En la DLFT, se ha

considerado como causa patogénica una pérdida de función de la TDP-43 como consecuencia de la alteración del tránsito de esta proteína entre núcleo y citosol [223]. Además también se ha sugerido la ganancia de una función tóxica, que sería secundaria a los procesos de fosforilación, ubiquitinación [16] y fragmentación de la proteína, mediada por caspasas [190], que facilitaría la formación de agregados [224]. La búsqueda de aproximaciones terapéuticas se centra, fundamentalmente, en la modificación farmacológica de los mecanismos que controlan la distribución sub-celular de la proteína, así como la fosforilación y procesamiento anómalo de TDP-43.

8.2.4. Estrategias basadas en otras posibles dianas

La reciente identificación de una repetición patogénica de hexanucleótidos en el marco de lectura del gen *C9orf72* en casos de ELA-DFT asociada a cromosoma 9 ha abierto nuevas vías para entender la etiopatogenia de la DFT [225]. Se ha sugerido que esta alteración genética perturba el metabolismo de ARNm, induciendo su acumulación y toxicidad.

Por otra parte, mutaciones en la proteína FUS se han descrito en casos de ELA y DFT familiar, caracterizados por presentar agregados citoplasmáticos de esta proteína y translocación núcleo-citoplasma de FUS [47]. Es interesante destacar que tanto la proteína FUS como la TDP-43 presentan un dominio similar al de los priones, que conduce a la transmisión del plegamiento anómalo de la proteína a las células vecinas [194]. Se han descrito evidencias de la expansión de la patología a otras áreas del cerebro [226]. Estas observaciones sugieren la necesidad de que los tratamientos terapéuticos contemplen la forma de prevenir la extensión de la enfermedad [227].

Adicionalmente, hay que considerar las mutaciones patogénicas en otros genes como el *VCP* o el *CHMP2B*. La proteína VCP es una ATPasa del tipo II, que participa en muchas funciones celulares y particularmente en los mecanismos de degradación de proteínas en el proteasoma y en el retículo endoplásmico. Se ha descrito que las mutaciones patogénicas en este gen alteran el equilibrio de estos mecanismos en favor de la autofagia [228, 229]. Es por ello que tanto el

proteasoma como la maquinaria autofágica se consideren como posibles dianas terapéuticas para este subgrupo de pacientes. Las mutaciones en *CHMP2B* son causa de una variante poco frecuente de DFT, que se caracteriza por presentar inclusiones de FUS con grandes vacuolas [230]. La proteína CHMP2B forma parte del complejo ESCORTIII [231], en el que convergen las vías endosomal-lisosomal y autofagia.

9. MODELOS DE ESTUDIO DE LA DEMENCIA LOBAR FRONTOTEMPORAL

Un problema fundamental en el estudio de la fisiopatología de las enfermedades neurodegenerativas como la DLFT, es el hecho de que el tejido nervioso disponible para el estudio provenga de material de autopsia, frecuentemente procedente de casos terminales de patología avanzada, que dificulta el estudio de procesos patológicos iniciales a nivel celular y/o molecular. En estos casos, es imposible separar aquellos eventos causales de otros inespecíficos, o que se deriven de la destrucción celular que provoca la enfermedad. Estas consideraciones ponen de manifiesto la importancia de disponer de modelos animales y celulares para el estudio de la DFT, y en particular la DLFT-TDP asociada a la deficiencia e PGRN.

9.1. Modelos animales

El estudio de la DLFT ha pasado por el desarrollo de diferentes tipos de modelos animales. El modelo más usado para el estudio de la enfermedad es el nematodo *Caenorhabditis elegans*, contribuyendo en gran medida a la comprensión de procesos fisiológicos básicos de la neurodegeneración. Se han desarrollado este tipo de nematodos capaces de expresar la proteína humana de TDP-43 pudiendo estudiar los agregados patogénicos y tóxicos [232, 233]. Gracias a la cutícula transparente de este modelo animal de nematodo se pudieron observar a tiempo real los eventos de muerte celular causado por la ausencia de PGRN [234].

Otro poderoso modelo animal de estudio para estas enfermedades neurodegenerativas es *Drosophila Melanogaster*. Es un importante modelo de estudio ya que son muy útiles en ensayos de memoria y aprendizaje, además tienen un ciclo rápido de vida y son fáciles de generar. Este modelo animal se ha usado, entre otras cosas, para el estudio de la formación de la memoria y la regulación dinámica de la fosforilación de proteínas como Tau [235]. En *Drosophila* además, se han identificado homólogos de muchos de los genes que causan los síndromes autosómicos de la DLFT como *VCP*, *TARDBP* y *MAPT*. Estos modelos han sido muy útiles para el estudio de los mecanismos patogénicos de mutaciones puntuales.

El pez cebra (*Danio rerio*) es otro modelo animal utilizado ampliamente para el estudio del desarrollo del sistema nervioso central (SNC) en vertebrados, así como enfermedades neurodegenerativas. Muchos genes de estas enfermedades en humanos tienen sus ortólogos en pez cebra [236]. Se ha conseguido que *Danio rerio* exprese la proteína Tau humana pudiendo estudiar los aspectos bioquímicos, histopatológicos y neuroconductuales de la DFT [237].

En un intento de entender el papel de la TDP-43 y PGRN se generaron ratones transgénicos como modelo animal de la enfermedad. Hasta la fecha se han generado líneas transgénicas de casi todas las mutaciones implicadas en enfermedades neurodegenerativas, una lista de todos estos ratones se puede encontrar en la página de Alzforum (<http://www.alzforum.org/res/com/tra/>). En los ratones transgénicos para la TDP-43 se ha visto que la delección total es letal y la heterogeneidad presenta niveles normales de TDP-43 sin presentar una neuropatología clara, este hecho limita el estudio adecuado [238]. El uso de promotores heterólogos para expresar TDP-43 humana en ratones genera un fenotipo con fallos motores severos y una muerte temprana [239], además presentan inclusiones neuronales positivas en ubiquitina y pérdida neuronal en la corteza frontal [240]. También existen líneas de ratones transgénicos que expresan altos niveles de TDP-43 en sus neuronas presentando signos de neurodegeneración y alteraciones en el comportamiento [241, 242]. Estos modelos son importantes para el estudio de la DLFT-TDP por su fenotipo tan parecido a humanos, aunque con prudencia ya que no muestran la totalidad del déficit funcional.

Estudios en los que se usan ratones transgénicos knockout para la PGRN se han visto anomalías tempranas en el comportamiento presentando características parecidas a la depresión, desinhibición y problemas de aprendizaje [243]. Estos ratones no presentaban un deterioro en la salud a edades tempranas, pero en edades más avanzadas comenzaban a presentar proteínas ubiquitinizadas, lipofuscinosis, microgliosis y astrocitosis [193]. El único problema para este tipo de modelo animal es que tienen que ser nulos en PGRN para que muestren síntomas similares a la DLFT, en cambio este tipo de mutaciones nulas en humanos

generan una enfermedad totalmente distinta llamada lipofuscinosis ceroide neuronal [244].

9.2. Modelos celulares

Uno de los principales problemas en el estudio de la DLFT y el desarrollo de nuevas terapias ha sido que los modelos animales no siempre presentan las características fenotípicas propias de la enfermedad. Por ello, se recurre a la experimentación con líneas celulares establecidas en las cuales se inducen características comunes a la DLFT. Por ejemplo, el uso de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y en las cuales se reproduce la enfermedad de DLFT-tau [245] o TDP-43 [246]. Algunas veces también se utilizan las células extraneurales como HEK [247] o células HeLa [248]. Otro de los principales obstáculos para el estudio molecular y funcional de la enfermedad está en las diferencias significativas entre la fisiología y toxicología ante fármacos entre modelos animales y los humanos. Por ello lo más certero es el uso de células humanas.

Debido a la dificultad de extraer tejido nervioso de los pacientes, una alternativa es utilizar sus células periféricas que son más accesibles, y permiten estudiar características fisiológicas sistémicas que se ven afectadas con la enfermedad. Siendo las células más utilizadas para ello las plaquetas, los linfocitos y los fibroblastos [164, 245]. El uso de este tipo de células está justificado por los estudios que demuestran que las enfermedades neurológicas tienen manifestaciones a nivel sistémico [249-253].

En relación con la DLFT, se ha descrito el uso de linfocitos o fibroblastos para identificar mutaciones en genes asociados a la DLFT como por ejemplo *MAPT* [251, 252], *TARDBP* [253] y *GRN* [219, 254]. Trabajos recientes de nuestro laboratorio han demostrado la utilidad de líneas linfoblásticas generadas a partir de pacientes de DLFT-TDP, portadores de una mutación en *GRN c.7091G>A* para estudiar aspectos fisiopatológicos de la enfermedad y como plataforma para evaluar a nivel pre-clínico la eficacia de candidatos a fármacos [113, 164, 170].

Los fibroblastos obtenidos de pacientes son la base de un nuevo modelo para el estudio de la enfermedad, como son las células madre con pluripotencialidad inducida (iPSC). Estas células se consiguen reprogramando los fibroblastos hasta un estado indiferenciado por medio la transfección mediada por retrovirus de distintos factores de transcripción. Posteriormente, las iPSC se diferencian a neuronas, que han mostrado reproducir las características de la enfermedad y que constituyen una nueva estrategia para su estudio [255-257]. Además, y dado que la obtención de células neuronales derivadas de las iPSCs es un proceso largo y que se asocia con tumorigénesis e inestabilidad del ADN, se está trabajando en la generación de células neuronales directamente a partir de fibroblastos sin que sea necesario convertirlas primeramente en células pluripotentes [256]. Estos autores lograron generar las llamadas hiN (del inglés human-induced neuronal cells), a partir de fibroblastos de pacientes de EA con características morfológicas, electrofisiológica y similar perfil de expresión génica que las neuronas glutaminérgicas de la corteza.

Para el estudio de la DLFT, diversos laboratorios han generado neuronas a partir de células iPS de pacientes portadores de las mutaciones patogénicas asociadas a este síndrome [258-262]. En general, se ha observado que las neuronas derivadas de iPS de pacientes son más vulnerables que las células controles a distintos tipos de estrés. En concreto, neuronas derivadas a partir de iPS deficientes en PGRN se han utilizado por ejemplo para estudiar el potencial terapéutico de los inhibidores de histonas deacetilasas, para corregir la deficiencia de PGRN, que causa la mutación en *GRN S116X*, e incrementar la viabilidad celular. En otros casos, se ha podido demostrar una función de PGRN desconocida hasta la fecha como es la de regular la corticogénesis, ya que falla en estas células la diferenciación a neuronas corticales [259]. Además estos autores encontraron fallos en la señalización a través de Wnt.

Por otro lado, es importante mencionar que el desarrollo de la tecnología CRISPR/Cas9 [263] permite corregir con gran eficiencia el gen defectuoso, de tal manera que estas células, editadas genéticamente, constituyen el control ideal al ser isogénicas con las células derivadas de pacientes.

En conjunto estos trabajos ponen de manifiesto el gran potencial de la reprogramación celular para obtener modelos neuronales para el estudio de la DLFT, así como para evaluar la eficacia de los tratamientos farmacológicos.

OBJETIVOS

OBJETIVOS, JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

El objetivo fundamental de esta tesis ha sido estudiar los mecanismos que regulan el destino celular, supervivencia/muerte, en la Demencia Lobar Frontotemporal asociada al déficit de Progranulina. El papel de la PGRN en el SNC es poco conocido y se ignora de qué manera una disminución en los niveles de esta proteína conlleva la muerte neuronal en los lóbulos frontal y temporal del cerebro de los pacientes con DLFT-TDP.

En este trabajo hemos considerado las posibilidades de que el déficit de PGRN pudiera inducir cambios en la bioenergética celular, alteraciones en el control del ciclo celular y apoptosis. Así como, hemos intentado elucidar posibles cambios en los mecanismos de transducción de señales, y particularmente la vía Wnt, que pudieran dar cuenta de la vulnerabilidad neuronal en las áreas cerebrales afectadas por esta patología.

Uno de los factores que pueden producir la muerte neuronal es la disfunción mitocondrial, ya que compromete la producción de energía y aumenta el estrés oxidativo. Aunque alteraciones mitocondriales tales como defectos en los componentes o ensamblaje de la cadena respiratoria, el aumento de la generación de ROS, y cambios morfológicos en la red mitocondrial, son características comunes a la mayoría de enfermedades neurodegenerativas. El posible papel de la deficiencia de PGRN en estos procesos ha sido, hasta la fecha, poco estudiado.

En los últimos años ha ganado peso la hipótesis de que la reactivación del ciclo celular en neuronas postmitóticas precede a la muerte neuronal. La relación causa-efecto entre proliferación y muerte celular en las enfermedades neurodegenerativas, podría encontrarse en que las neuronas diferenciadas carezcan de la maquinaria necesaria para completar con éxito un ciclo de división celular. De esta forma, cualquier señal persistente que indujera a las células a entrar en ciclo conduciría inevitablemente a su muerte. Las propiedades mitogénicas y neuroprotectoras de la PGRN inducen a pensar que la deficiencia de

PGRN podría inducir alteraciones en el control del ciclo celular y/o apoptosis en las neuronas de las regiones afectadas en la DLFT-TDP.

El interés en el estudio de la influencia del déficit de PGRN en la señalización vía Wnt viene justificada por trabajos recientes de nuestro y de otros laboratorios que sugieren la existencia de una relación inversa entre niveles de PGRN y expresión de Wnt en la DLFT, sugiriendo un posible papel patogénico de la sobreactivación de Wnt.

Hemos utilizado como modelo experimental células de neuroblastoma humano SH-SY5Y en las que se ha silenciado parcialmente el gen que codifica para PGRN (*GRN*) con objeto de simular la haploinsuficiencia de los pacientes de DLFT-TDP, portadores de mutaciones en este gen. Pensamos que este estudio puede aportar algunas claves en relación a la patogénesis de esta enfermedad y la oportunidad de identificar posibles dianas terapéuticas.

Los objetivos concretos que se plantean para el desarrollo de esta tesis son los siguientes:

1. Caracterizar la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y con haploinsuficiencia en PGRN como modelo celular de estudio para la DLFT-TDP asociada al déficit de PGRN.
2. Analizar la relación entre la disfunción mitocondrial y el déficit de PGRN en células *GRN* KD.
3. Estudio de la influencia del déficit de PGRN en los mecanismos moleculares implicados en el control del ciclo celular y apoptosis.
 - 3.1. Analizar de forma comparativa en células controles y *GRN* KD, el efecto de la activación de Wnt en el control del ciclo celular, y su relación con la muerte celular.
 - 3.2. Analizar el efecto de la deficiencia de PGRN en la vulnerabilidad que induce la retirada del suero.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1. LÍNEA CELULAR

En el estudio hemos usado una línea celular establecida de neuroblastomas, SH-SY5Y, deficiente en PGRN (clon #207). La línea celular SH-SY5Y con deficiencia en PGRN se realizó en el laboratorio de los doctores Joselin y Wu en el Center for Genetic Medicine (Northwestern University, Chicago Il, EEUU). Estas células tienen el gen de la PGRN silenciado mediante un vector pSUPERIOR (OligoEngine) que contiene una construcción de ARNsh diseñada contra una secuencia diana de 19 nucleótidos, del 207–226 (#207) del ARNm del gen *GRN* humano [185]. Las secuencias sentido y antisentido de los primers fueron:

5'-gatccccggcactcctgcatctttattcaagagataaagatgcaggagtggccttttggaaa-3' y

5'-agcttttccaaaaggcactcctgcatctttatctcttgaataaagatgcaggagtggccggg-3'.

Como células control utilizamos las SH-SY5Y transfectadas con el vector pSUPERIOR vacío.

El mantenimiento celular se realizó en medio DMEM que contiene glutamina (2 mM), 10% de suero fetal bovino (FBS), 1% de penicilina/streptomycin y geneticina (G418), este último lo utilizamos para la selección de las células con el vector ya que era resistente a la geneticina.

Las células SH-SY5Y se dejaban crecer en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37°C durante dos días, posteriormente se levantaban con Trypsina+EDTA y se volvían a repartir en varias placas para dejarlas crecer.

2. ANÁLISIS INMUNOLÓGICO MEDIANTE WESTERN BLOT

Para la obtención de los extractos celulares totales, se sembraron 1x10⁶ células en placas de 6 pocillos y se dejaban en ausencia o presencia de suero durante varios días (24, 48 o 72 horas), en función del experimento. Las células se recogieron, se lavaron en PBS y luego se lisaron en tampón de lisis enfriado con hielo (Tris 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 Mm, NaF 50 Mm, Nonidet P-40 al 1%), al que se le añadió además ortovanadato sódico a 1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo a 1 Mm

(PMSF), pirofosfato de sodio 1 mM e inhibidor de proteasas (Complete Mini Mixture de Roche, Mannheim, Alemania). Estas muestras se centrifugan en frío a 14.000 rpm unos 15 minutos a 4°C para eliminar los restos celulares (pellet) y quedarnos el sobrenadante que es donde están los extractos celulares, se almacenan a -80°C.

Para la extracción diferencial de proteínas nucleares y citosólicas se usó un buffer hipotónico (Hepes 10 mM, pH 7,9, KCl 10 mM, ácido etilendiaminotetraacético 0,1 mM (EDTA), ditioneitol 1 Mm (DTT), ácido etilenglicol tetraacético 0,1 mM (EGTA)), al que se le añadió también ortovanadato sódico a 1 mM, PMSF 1 Mm, pirofosfato de sodio 1 mM e inhibidor de proteasas (Complete Mini Mixture de Roche). Después de la extracción en hielo durante 15 minutos, se añadió Nonidet P-40 al 0,5% y se centrifugaron las células durante 10 minutos a 4.000 rpm. Los sobrenadantes que contenían las proteínas citosólicas se centrifugaron 10 minutos a 14.000 rpm a 4°C. El pellet que contenía los núcleos se lavaron dos veces con el mismo tampón hipotónico y luego se lisaron con un tampón hipertónico (Hepes 20 mM, pH 7,9, NaCl 0,4 M, EDTA 1 Mm, EGTA 1 mM, DTT 1 Mm), al que se le añadió de nuevo ortovanadato sódico a 1 mM, PMSF 1 Mm, pirofosfato de sodio 1 mM e inhibidor de proteasas (Complete Mini Mixture de Roche). Después de la extracción durante 30 minutos, se centrifugaron las muestras a 14.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Para evaluar la pureza de estas fracciones se utilizaron anticuerpos para α -tubulina y lamina B.

La liberación del citocromo c (Cyt c) de las mitocondrias se evaluó después del fraccionamiento celular para obtener la parte de las proteínas citosólicas y las proteínas mitocondriales como se describe en (Samali A et al 1999), utilizando ApoTrack™ Cytochrome c Apoptosis Antibody Cocktail. La especificidad del anticuerpo se comprobó omitiendo el anticuerpo primario correspondiente en el medio de incubación. Para evaluar el control de carga de estas proteínas citosólicas o mitocondriales se usaron GAPDH y C-V- α o PDH-E1- α , respectivamente.

En el caso de la detección de las proteínas secretadas en el medio condicionado (CM). Se incubaron las células de neuroblastoma en medio DMEM sin FBS durante

24 horas. El medio CM se recogió y se centrifugó para eliminar los residuos y luego se concentraron las proteínas mediante unos filtros Amicon Ultra cell 30K centrifugal filter devices (Millipore, Madrid, España), al que se le añadió también ortovanadato sódico a 1 mM, PMSF 1 Mm, pirofosfato de sodio 1 mM e inhibidor de proteasas (Complete Mini Mixture de Roche).

La cuantificación de la concentración proteica de las muestras fue determinada con los kits de análisis de proteínas BCA™ (Illinois, Estados Unidos). Se fraccionaron entre 20 y 50 µg, para extractos celulares totales, y entre 40 y 60 µg, para extractos celulares diferenciados, en un gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS) y se transfirió en una membrana de PVDF (Immobilon-P) (Sigma-Aldrich, Alcobendas, España). Las membranas se bloquearon a continuación con Albumina de Suero Bovino (BSA) (Sigma-Aldrich) o leche en polvo y se incubaron con anticuerpos primarios, indicados en la Tabla 4.

Las señales de los anticuerpos primarios se amplificaron usando antisueros específicos de la especie conjugados con peroxidasa de rábano picante (Bio-Rad, California, Estados Unidos) y detectada con un sistema de detección de sustratos quimioluminiscentes ECL (Amersham, Barcelona, España). Las densidades de las bandas de proteínas obtenidas se cuantificaron utilizando el software Image J (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA), después de escanear las imágenes con un densitómetro GS-800 de Bio-Rad, y normalizamos los datos con los datos obtenidos de las bandas de β -actina, α -tubulina, Lamina B o en el caso de los fraccionamientos diferenciales por los ya comentados anteriormente.

Tabla 4

Resumen de los anticuerpos usados en los Western blot.

NOMBRE DEL ANTICUERPO	CASA COMERCIAL	DILUCIÓN
Granulina (ERP3781)	Abcam (ab108608)	1:500
Cytochrome c Apoptosis Antibody Cocktail	Abcam (ab110415)	1:250
β -actina	Santa Cruz (sc-81178)	1:500
CDK4 (C-22)	Santa Cruz (sc-260)	1:500
CDK6 (C-21)	Santa Cruz (sc-177)	1:1000
CDK2	Santa Cruz (sc-748)	1:500
Rb (C-15)	Santa Cruz (sc-50)	1:500
α -tubulina (b-5-1-2)	Santa Cruz (sc-23948)	1:1000
Phospho-Akt (Ser473) (D9E) XP	Cell Signaling (#4060)	1:1000
Akt (C-20)	Santa Cruz (sc-1618)	1:1000
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) XP	Cell Signaling (#4370)	1:2000
P44/42 MAP kinase	Cell Signaling (#9102)	1:2000
p-TDP43	Proteintech	1:500
TDP43 C-terminal	Proteintech	1:1000
TDP43 N-terminal	Proteintech	1:1000
p107 (C-18)	Santa Cruz (sc-318)	1:500
p130	Santa Cruz (sc-317)	1:500
Ciclina E	Santa Cruz (sc-198)	1:500
Ciclina D1 (A-12)	Santa Cruz (sc-8396)	1:1000
Ciclina D2	Cell Signaling	1:500
Ciclina D3	Santa Cruz	1:2000
Bcl-2	Santa Cruz (sc-509)	1:2000
Bcl-xL	Cell Signaling (#2762)	1:500
Bax (N-20)	Santa Cruz (sc-493)	1:500
Wnt1 (H-89)	Santa Cruz (sc-5630)	1:500
p-GSK3 β (Ser9)	Santa Cruz (sc-11757)	1:500
p-GSK3 β (pY216)	BD Bioscience (#612312)	1:500
GSK3 β (H-76)	Santa Cruz (sc-9166)	1:500
Wnt5a	Abcam (ab72583)	1:500
β -Catenina (H-102)	Santa Cruz (sc-7199)	1:500
NFAT1 (D43B1) XP	Cell Signaling (#5861)	1:500
Lamina B (101-B7)	Calbiochem (NA12)	1:500

TDP-43, TARDNA-Binding Protein 43; *GSK3 β* , glucógeno sintasa quinasa; *NFAT1*, factor nuclear de activación de células T.

3. PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL

Se extrajo el ARN total de los cultivos celulares utilizando el reactivo Trizol® (Invitrogen, Madrid, España). Los rendimientos del ARN se cuantificaron con espectrofotometría y la calidad del ARN se verificó mediante la relación A260/A280 y se realizó un gel de agarosa al 1,2% para determinar la integridad del ARN ribosómico 18S y 28S. El ARN se trató entonces con DNase I Amplification Grade (Invitrogen, Madrid, España) para eliminar el posible ADN genómico presente. Mediante el kit de la retrotranscriptasa Superscript III (Invitrogen, Madrid, España) se retrotranscribió 1µg. Se realizó una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (PCR) por triplicado usando el reactivo TaqMan® Universal PCR MasterMix No Amperase UNG (Applied Biosystems, Alcobendas, Madrid, España) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los primers fueron diseñados en Universal Probe Library for Human (Roche Applied Science, Madrid, España) y se usaron a una concentración final de 20 µM. Los primers forward y reverse utilizados están reflejados en la Tabla 5.

Tabla 5

Secuencias de los primer utilizados en la PCR cuantitativa a tiempo real.

GEN	PRIMER FORWARD (5'-3')	PRIMER REVERSE (5'-3')
<i>GRN</i>	TCTGTAGTCTGAGCGCTACCC	AGGGTCCACATGGTCTGC
β -actina	CCAACCGCGAGAAGATGA	CCAGAGCGGTACAGGGATAG

GRN, Granulina.

La PCR cuantitativa a tiempo real se realizó en el sistema Bio-Rad iQ5 (Bio-Rad, Estados Unidos) utilizando un perfil térmico de un paso inicial de fusión de 5 minutos a 95°C, seguidos de 40 ciclos a 95°C de 10 segundos y a 60°C durante 60 segundos. Los niveles relativos de ARN mensajero (ARNm) de los genes de interés se normalizaron con la expresión de β -actina como gen constitutivo (housekeeping) de cada muestra usando el método ($2^{-[\Delta\text{CT GRN} - \Delta\text{CT Actin}]}$).

4. ARRAY DE ANTICUERPOS

Para determinar el perfil de las fosfoproteínas relacionadas con las vías de señalización de Wnt se utilizó un array (PNT277) de Full Moon Biosystems Inc. (Sunnyvale, California) que contiene 227 anticuerpos de las fosfoproteínas de las vías de señalización de Wnt. Estos 227 anticuerpos se encuentran marcados en seis repeticiones en un portaobjetos de vidrio recubierto de polímero 3D. El experimento del array de anticuerpos se realizó según las instrucciones del fabricante. En resumen, los lisado de las células SH-SY5Y controles y *GRN* KD obtenidos se biotinilaron con el kit de ensayo de array de anticuerpos (Full Moon Biosystems, Inc.). Los portaobjetos de microarrays de anticuerpos se bloquearon primero con una solución de bloqueo (Full Moon Biosystems, Inc.) durante 30 minutos a temperatura ambiente, se lavaron con agua Mili-Q 3-5 minutos y se secaron por centrifugación. Los portaobjetos se incubaron después con los lisados celulares marcados con biotina (50 µg de proteína) en solución de acoplamiento (Full Moon Biosystems, Inc.) a temperatura ambiente durante 2 horas. Las placas del array se lavaron de 4 a 5 veces con 1x Wash Solution (Full Moon Biosystems, Inc.) y se aclararon con agua Mili-Q. La detección de las proteínas unidas biotiniladas se hizo mediante estreptavidina conjugada con Cy3. Las diapositivas obtenidas se escanearon con GenePix Pro6.0 (Molecular Devices, Sunnyvale, California). La señal de fluorescencia de cada anticuerpo se obtuvo a partir de la intensidad del punto del anticuerpo después de la sustracción de la señal en blanco (punto en ausencia de anticuerpo).

5. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR

Para determinar la viabilidad celular de las células de neuroblastoma SH-SY5Y realizamos dos métodos.

5.1. Mediante ensayos de MTT

Las mitocondrias activas de las células vivas pueden reducir el MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) convirtiéndolo en cristales de formazán, cuya cantidad es directamente

proporcional al número de células vivas. La supervivencia celular se evaluó esencialmente como se describe en (Mitsiades N et al 2002). Las células (30.000-60.000) se incubaron con 0,25 µg/µl de MTT en un volumen de reacción de 200 µl. Después de la incubación se añadió DMSO (dimetilsulfóxido) para disolver los cristales de formazán. La absorbancia del colorante en las células vivas se midió a una longitud de onda de 559 nm en un espectrofotómetro Labsystems iEMS Reader MF.

5.2. Mediante recuento celular

La viabilidad células se determinó mediante el recuento total de las células, usando el contador TC10™ Automated Cell Counter de Bio-Rad Laboratories, SA. (Madrid, España). Las células de neuroblastoma SH-SY5Y se sembraron a una concentración de 1×10^6 células por pocillo en placa de 6 pocillos y se contaron a las 48 horas. Para diferenciar entre las células vivas y muestras se utilizó azul de Tripán.

6. DETERMINACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

La proliferación celular se evaluó mediante el método de incorporación de 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) en el ADN usando un kit de inmunoensayo con entintado enzimático obtenido en Roche (Madrid, España). Se sembraron 15.000 células SH-SY5Y por pocillo en placas de 96 pocillos. Cuatro horas antes del final del intervalo de medición, se añadió el BrdU (10 µM). Las células se fijaron con etanol al 70% pre-enfriado durante 30 minutos a -20°C y se incubaron con nucleasas siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las células se trataron entonces durante 30 minutos a 37°C con un anticuerpo anti-BrdU conjugado con peroxidasa. El exceso de anticuerpo se eliminó lavando las células tres veces seguido de la adición de la solución de sustrato. La absorbancia se midió a 405 nm con una longitud de onda de referencia de 492 nm usando un espectrofotómetro Labsystems iEMS Reader MF.

7. MEDIDA DE CONSUMO DE OXÍGENO EN CÉLULAS EN CULTIVO

Para la determinación del consumo de oxígeno (OCR-ECAR) de las células de neuroblastoma SH-SY5Y se sembraron 20.000 células por pocillo en placas Seahorse de 24 pocillos 48 horas antes de la medida de OCER-ECAR. 24 horas antes de la medida hay que hidratar los cartuchos con los inyectores a 37°C y con 1 ml por pocillo de medio Seahorse equilibrado. El día de la medida sustituimos el medio de cultivo de la células por un medio nuevo DMEM no tamponado a pH 7,4, atemperado a 37°C y suplementado con glucosa 25 Mm, piruvato sódico 1 mM y suero al 2%. Se deja la placa incubando durante 1 hora a 37°C sin CO₂. Los cartuchos con los inyectores se rellenarán con loa reactivos de Seahorse XF Cell Mito Stress Test (Aligent Technologies, Madrid, España). Se utilizó oligomicina 1 µM, FCCP 3 µM y rotenona + antimicina 1 µM. Las medidas de OCR y ECAR se hacen con el Analizador Seahorse XF24 (Aligent Technologies, Madrid, España). Para normalizar los datos se realizó una cuantificación de la concentración protéica de las células mediante los kits de análisis de proteínas BCA™ (Illinois, Estados Unidos).

8. ESPECIES REACTIVAS DE ROS EN CÉLULAS SH-SY5Y

Para la detección de las especies reactivas de oxígeno (ROS) de las células se incubaron unas 50.000 por pocillo en placa de 96 pocillos y se incubaron con 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H₂DCFDA) según el kit Reactive Oxygen Species (ROS) Detection Reagents de Invitrogen (Madrid, España) de acuerdo con el protocolo del fabricante. CM-H₂DCFDA es un colorante que se une a ROS y se detectaron mediante un fluorímetro. Los datos se normalizaron con la concentración protéica de las células cuantificadas mediante los kits de análisis de proteínas BCA™ (Illinois, Estados Unidos).

9. DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL DE MEMBRANA DE LAS MITOCONDRIAS

El potencial de membrana ($\Delta\psi_m$) de las mitocondrias de las células SH-SY5Y controles y *GRN* KD se determinó utilizando tetramethylrodamina, ethyl ester (TMRE). Sembramos 15.000 células por pocillo en placa de 96 pocillos y se trataron con TMRE-Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit (ab113852) (Abcam, Cambridge, Reino Unido) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se añade el TMRE a una concentración de 200- 1000 nM y se incuba 20 minutos a 37°C. Después se lavan las células 1 vez con PBS 0,2% de BSA. TMRE es un colorante rojo-naranja permeable a las células y cargado positivamente, que se acumula fácilmente en las mitocondrias activas debido a su carga negativa relativa. La señal de TMRE se detectó mediante un fluorímetro (pico de excitación a 549 nm y pico de emisión a 575 nm).

10. MASA MITOCONDRIAL EN LAS CÉLULAS SH-SY5Y

Se determinó la masa mitocondrial de las células SH-SY5Y *GRN* KD y controles mediante el kit MitoTracker Green FM (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España). MitoTracker Green FM es un tinte mitocondrial de fluorescencia verde que se incorpora en la mitocondria de las células vivas. Sembramos 15.000 células por pocillo en placa de 96 pocillos y tratamos con MitoTracker Green FM según las instrucciones del fabricante. Añadimos el MitoTracker Green FM a una concentración de 20 nM e incubamos durante 30 minutos a 37°C. Sustituir el medio con la tinción por medio nuevo y detectamos la señal mediante un fluorímetro (pico de excitación a 490 nm y pico de emisión a 516 nm).

11. MICROSCOPIA LASER CONFOCAL

Se sembraron células SH-SY5Y controles y deficientes en PGRN en cover slips hasta una confluencia adecuada, en medio DMEM con un 10% de FBS durante 48 horas. Retiramos el medio y lo sustituimos por medio DMEM sin suero y añadimos el MitoTracker Green FM (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España) a una concentración de 20 nM e incubamos durante 30 minutos a 37°C. Las células se fijaron durante 15 minutos en paraformaldehído al 4 % en PBS. Se permeabilizaron con 0.1% de Tritón X-100 en PBS 1% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Para teñir el núcleo se utilizó medio de montaje con DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) (ProLong® Gold Antifade Mountant) las muestras se observaron con el sistema de microscopio confocal Leica TCS-SP2-AOBS (Heidelberg, Alemania).

12. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS CASPASAS Y APOPTOSIS

La apoptosis se caracterizó por la condensación y fragmentación de la cromatina, determinada por fijación celular seguida de tinción con DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) (Life Technologies, Eugene, Oregon, Estados Unidos) y su examen por microscopía de fluorescencia.

La actividad de las caspasas activas se determinó usando Vybrant® FAM Caspase-3 and 7 Kit (Invitrogen, Carlsbad, California, Estados Unidos), incubándolas también con el reactivo FLICA que se retiene dentro de la célula si se une a la caspasa activa. Las células SH-SY5Y *GRN* KD y controles se resuspendieron en 300 µl de DMEM con 10 µl de FLICA y se incubaron 1 hora a 37°C con un 5% de CO₂. Las células se lavaron y se suspendieron en el tampón de lavado proporcionado por el kit. Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo.

13. DIFERENCIACION CELULAR

Se cultivaron las células SH-SY5Y controles y *GRN* KD a una concentración de 1×10^6 en medio DMEM con 10% de suero. A estas células se les añadió ácido retinoico (AR) durante tres días. Tras los tres días se incorporó el factor neutrófico BDNF (50ng/ml) durante dos días más. Finalmente se podían observar células neuronales diferenciadas maduras con sus prolongaciones de las dendritas, al microscopio de campo claro.

14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos se realizaron en Graph Pad Prism 5 para Windows (La Jolla, California, Estados Unidos). Todos los datos estadísticos se representan como la media \pm el error estándar de la media (EEM). La significación estadística fue estimada por t-student y el análisis de varianza (ANOVA) seguido por el test de Bonferroni para comparaciones múltiples. Las diferencias se consideraron significativas a un nivel de $p < 0,05$.

15. MATERIALES

Todo el material usado para el cultivo de las células se obtuvo de Invitrogen (Barcelona, España). La Progranulina recombinante humana se obtuvo de Enzo (Zandhoven, Bélgica), la recombinante humana/ratón Wnt5a de R & D Systems (Madrid, España), la recombinante humana Wnt 1 de Life technologies (Carlsbad, California, Estados Unidos) y la recombinante humana de la proteína Dickkopf (DKK1) de Peprotech (Rocky Hill, Estados Unidos). KN-62 (1-(N-O-bis[5-isoquinolinesulfonil]-N-metil-Ltyrosyl)-4-fenilpiperazina)), se obtuvo de Sigma Aldrich (Alcobendas, España), las elastasas de leucocitos humanos y el inhibidor de histona deacetilasas, butirato de sodio (SB) se obtuvieron de Sigma Aldrich (Tres Cantos, España). LY294002 y PD98059 se obtuvieron de Calbiochem (Darmstadt, Alemania). El inhibidor de la actividad quinasa asociada a CDK6/CDK4, PD332991, se obtuvo de Pfizer (Granton, Connecticut, Estados Unidos). El resto de

compuestos están detallados a lo largo del material y métodos o eran de biología molecular.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. CÉLULAS SH-SY5Y DEFICIENTES EN PGRN COMO MODELO DE LA DEMENCIA LOBAR FRONTOTEMPORAL

1.1. Caracterización celular

Para el estudio de la Demencia Lobar Frontotemporal usamos como modelo las células generadas por el Dr. Wu y Joselin. Estas células tienen un ARN de interferencia pSUPERIOR que contienen la construcción correspondiente a la secuencia de nucleótidos del 207 al 226 para el gen *GRN* humano [185].

La efectividad del silenciamiento del gen *GRN* se analizó mediante RT-PCR (Figura 1A) y Western blot (Figura 1B). Pudimos observar que las células *GRN* KD presentan niveles reducidos de ARNm y de la proteína. El contenido celular de PGRN en estas células es aproximadamente el 50% del que presentan las células controles (Fig. 1B), por lo que podemos concluir que reflejan la haploinsuficiencia de PGRN en la DLFT-TDP.

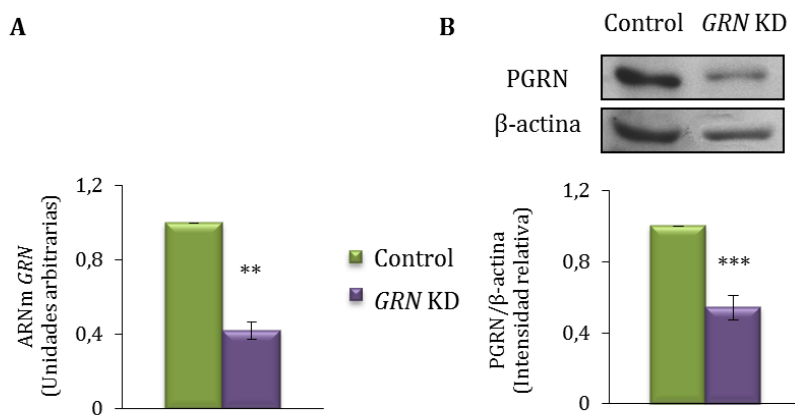


Figura 1: Caracterización de las células SH-SY5Y controles y *GRN* KD. 1×10^6 células controles y deficientes se incubaron durante 24 horas en medio de cultivo DMEM con 10% de suero. Analizamos la expresión del ARNm de *GRN* tanto en las células SH-SY5Y controles como las células *GRN* KD, mediante RT-PCR cuantitativa (A), y los niveles de proteína a partir de extractos de estas células, por Western blot con anticuerpos específicos (B). Los niveles de β -actina se usaron como control de carga. Los valores mostrados del análisis densitométrico representan la media \pm el error estándar de la media (EEM) de cuatro experimentos. ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ significativamente diferente a las células control.

Por otro lado, como ya hemos visto, la DLFT-TDP se asocia a una serie de alteraciones de la proteína TDP-43. Los pacientes de DLFT-TDP presentan una hiperfosforilación y fragmentación anómala en la región C-terminal de la proteína TDP-43, entre otros [16]. Para analizar estas características analizamos por Western blot tanto la fosforilación de la proteína TDP-43, utilizando un anticuerpo fosfo-específico, como la fragmentación de su extremo C-terminal, mediante un anticuerpo que solo reconoce esta región. Se observó tanto en las células *GRN* KD como en las controles una banda entorno a 43KDa y una serie de fragmentos entorno a los 30KDa (Figura 2A). El análisis densitométrico de los resultados muestra un aumento significativo de la fosforilación del fragmento de 30KDa en las células *GRN* KD (Figura 2A). Paralelamente analizamos los niveles de TDP-43 con un anticuerpo anti la región C-terminal de la proteína (Figura 2B). Se puede apreciar que mientras los niveles de la proteína completa no cambian significativamente en las células *GRN* KD, aumentan los niveles del fragmento de 30 KDa (Figura 2B), en consonancia con el hecho de la que la fosforilación de TDP-43 precede a la fragmentación de la proteína.

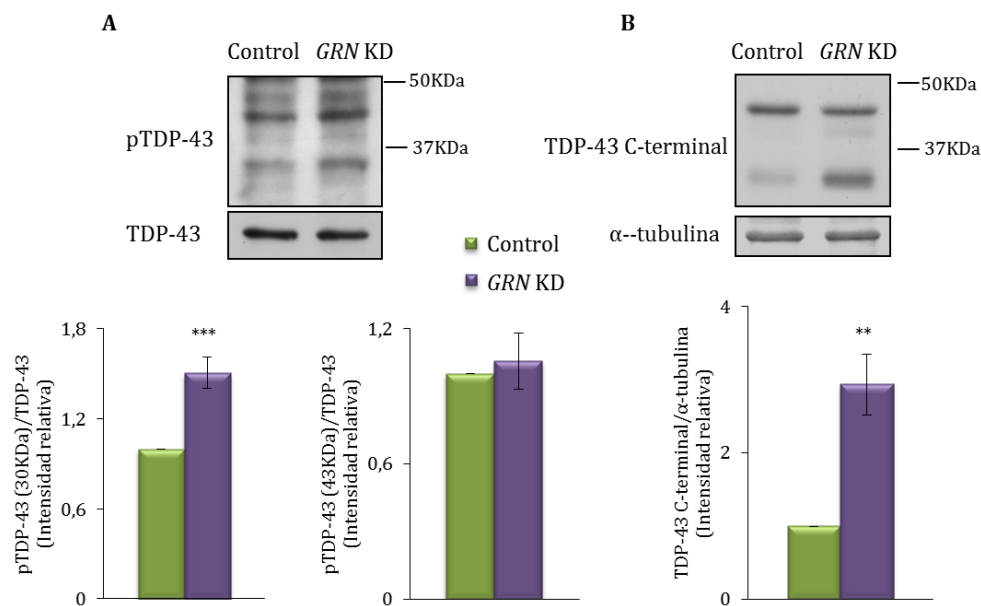


Figura 2: Influencia de la deficiencia de PGRN en la fosforilación y fragmentación de TDP-43. Se sembraron 1×10^6 células controles y *GRN* KD y se cultivaron durante 24 horas en medio DMEM con suero. Se prepararon extractos celulares que se analizaron mediante Western blot. (A) Se muestran los niveles de pTDP-43 normalizados por TDP-43 N-terminal como control de carga. (B) Western blot representativo del contenido celular de TDP-43 C-terminal. Se utilizó α -tubulina como control de carga. El análisis densitométrico representa la media \pm EEM de ocho experimentos. ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ significativamente diferente respecto a las células control.

La DFTL-TDP se asocia con la pérdida neuronal en los lóbulos frontal y temporal [88], por lo que decidimos realizar un estudio comparativo de la viabilidad de las células *GRN* KD y células controles por ensayos de MTT y mediante el recuento celular. En la Figura 3 comprobamos una disminución significativa de la viabilidad de las células *GRN* KD a lo largo del tiempo (panel izquierdo) que se refleja también en una disminución del número de células en los cultivos a las 48 horas de la administración del suero (panel derecho).

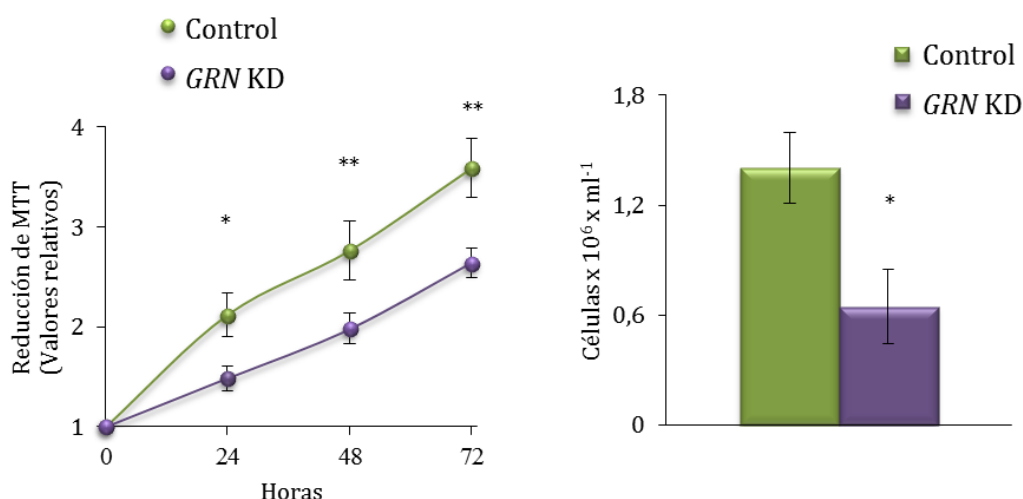


Figura 3: Viabilidad de las células SH-SY5Y controles y *GRN* KD. Se sembraron en una placa de 96 pocillos unas 30.000 células por pocillo para determinar la viabilidad celular mediante MTT (gráfica izquierda). Los datos muestran la media \pm EEM de ocho experimentos. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ significativamente diferentes a las células control. En la gráfica de la derecha se representa el número total de células determinadas por el recuento de células vivas, excluyendo las células muertas teñidas con azul de Tripán. Se sembraron alrededor de 1×10^6 células por pocillo en medio DMEM durante 48 horas y se realizó el recuento utilizando un contador TC10TM Automated Cell Counter. * $p < 0,05$ significativamente diferentes a las células control.

En conjunto, estas observaciones indican que las células *GRN* KD recapitulan las características patológicas más importantes de la DLFT-TDP como la deficiencia de PGRN, la hiperfosforilación de TDP-43 y la mayor vulnerabilidad neuronal, y por tanto, pueden considerarse un buen modelo experimental para el estudio de esta demencia.

1.2. Papel de la disfunción mitocondrial en las células *GRN KD SH-SY5Y*

Se sabe que las mitocondrias están involucradas en procesos esenciales de la función neuronal y su disfunción es causa de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson, entre otras [123]. Por esta razón nos pareció interesante investigar si el déficit de PGRN conlleva alteraciones en la función mitocondrial que explicase, al menos en parte, la mayor vulnerabilidad de las células *GRN KD*. Para estos experimentos utilizamos la tecnología de Seahorse Bioscience XF Analyzer, que permite monitorizar de forma continua la tasa del consumo de oxígeno (OCR), como índice de la función mitocondrial, y registrar la tasa de acidificación extracelular (ECAR), que es un reflejo de la actividad glucolítica de las células.

La Figura 4 muestra el perfil bioenergético de las células control y *GRN KD* en condiciones basales y tras la administración secuencial de oligomicina, para inhibir la ATP sintasa, el desacoplante FCCP y una mezcla de antimicina y rotenona para inhibir el complejo I de la cadena respiratoria. Como puede apreciarse, las células *GRN KD* tienen una respiración basal (OCR) menor que la de las células control (Figura 4). La disminución en OCR tras la administración de oligomicina indica la fracción de oxígeno acoplado a la síntesis de ATP en la mitocondria. Este parámetro disminuye considerablemente en las células *GRN KD* (Figura 4, panel inferior). El uso del desacoplante carboxyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP) permite calcular la capacidad respiratoria máxima así como la capacidad de reserva ante un aumento de la demanda de ATP. La capacidad respiratoria máxima se calcula como la diferencia entre los valores de OCR alcanzados tras la administración de FCCP y la tasa de respiración tras la adición de oligomicina. Y la capacidad de reserva máxima es el aumento de OCR después de la adición de FCCP. La Figura 4 (panel inferior) muestra una disminución significativa tanto de la máxima capacidad respiratoria como la capacidad de reserva respiratoria de las células *GRN KD*, que indica que el déficit de PGRN reduce alarmantemente la capacidad de respuesta de estas células para generar ATP en el caso de que aumentase la demanda. La adición conjunta de rotenona y antimicina disminuye los valores de OCR hasta valores de 10

pmol/min/μg en ambos tipos de células (Figura 4). Esta tasa residual representa el consumo de oxígeno no asociado a los procesos mitocondriales

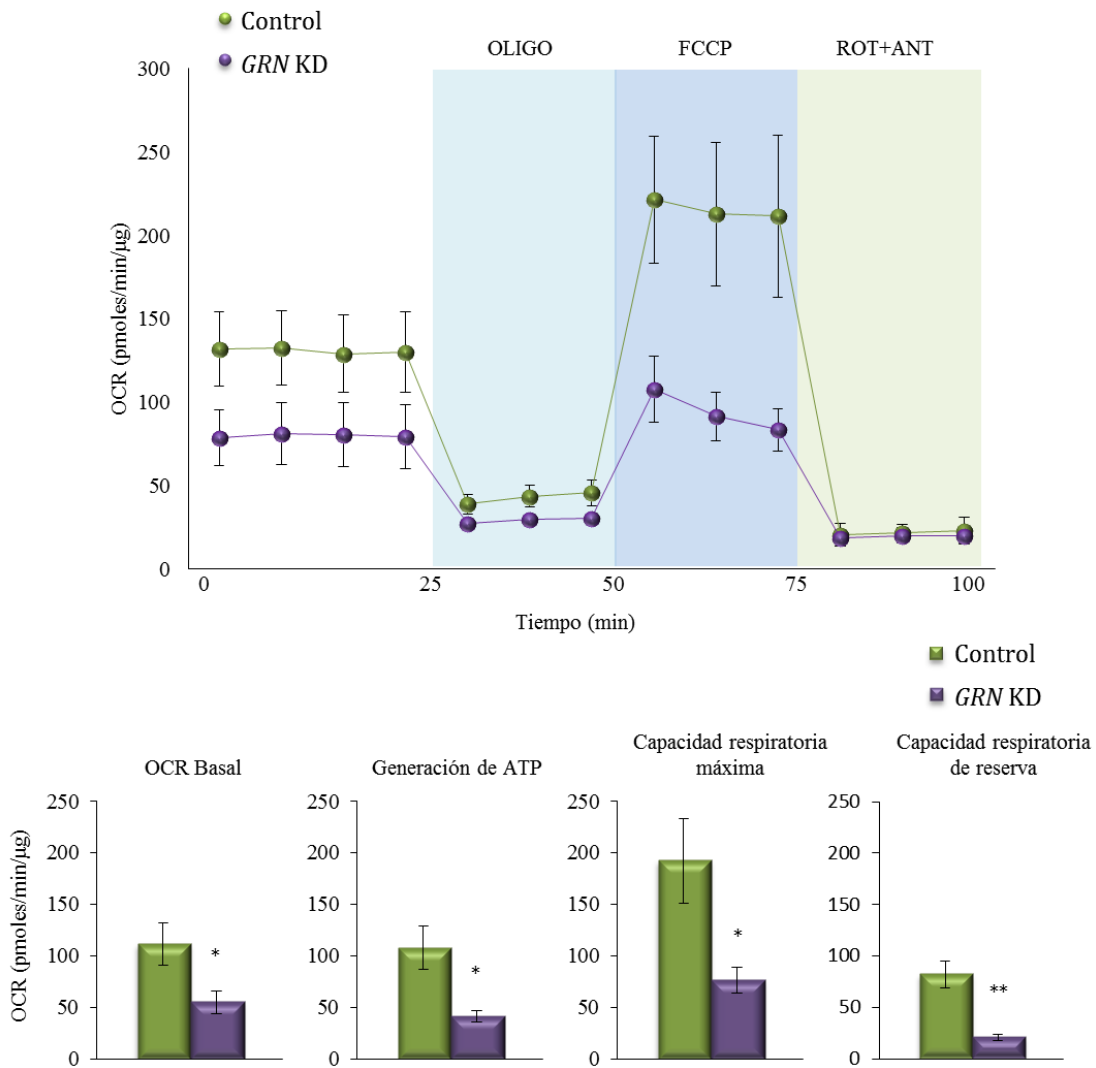


Figura 4: Consumo de oxígeno de las células SH-SY5Y controles y GRN KD. Sembramos 20.000 células control y GRN KD por pocillo en una placa especial de 24 pocillos para medir la respiración de las células el Analizador Seahorse XF24. Las células fueron cultivadas durante 24h antes de hacer las mediciones en un medio DMEM no tamponado a pH 7,4 y en presencia de piruvato a 1μM y glucosa a 25 μM. En la gráfica de arriba se representa la respiración de las células controles y de las células GRN KD a lo largo del tiempo y el efecto de la adición de oligomicina 10μM, FCCP 3μM y rotenona 10μM+antimicina 10μM. En las gráficas de abajo se representa los niveles de respiración basal de ambas células, los niveles de generación de ATP, la capacidad respiratoria máxima y la capacidad de reserva de ambas células. Los datos muestran la media ± EEM de cinco experimentos. * p<0,05, ** p<0,01 significativamente diferentes a las células control.

En la Figura 5 se recogen los cambios en la tasa de consumo de oxígeno tras la administración de los diferentes inhibidores, expresados como porcentaje del basal. Observamos que, la adición de oligomicina reduce la tasa de consumo de oxígeno en aproximadamente un 75% tanto en las células controles como en las *GRN* KD, sugiriendo que la deficiencia de PGRN no es consecuencia de alteraciones en el acoplamiento de la cadena respiratoria. De nuevo, la alteración más evidente en las células *GRN* KD es la que se refiere a la capacidad respiratoria de reserva, estimada como el cambio sobre la respiración basal tras desacoplar a la mitocondria (Figura 5).

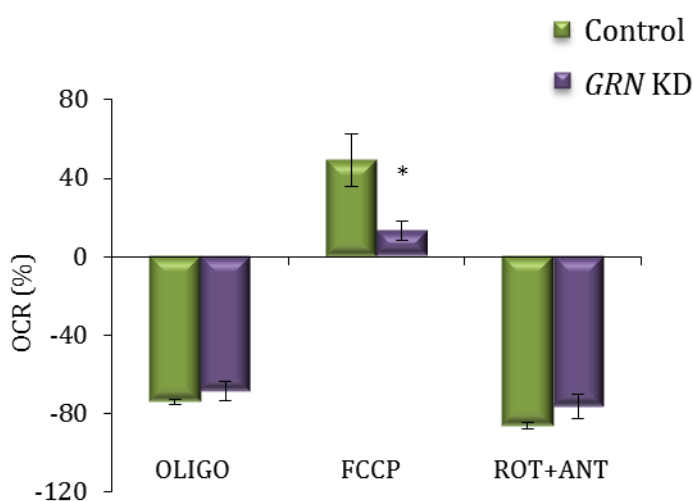


Figura 5: Porcentaje del consumo de oxígeno de las células SH-SY5Y controles y *GRN* KD. En la gráfica se representa la respiración de las células controles y de las células *GRN* KD en porcentaje tras la adición de oligomicina 10 μ M, FCCP 3 μ M y rotenona 10 μ M+antimicina 10 μ M. Los datos muestran la media \pm EEM de cinco experimentos. * $p < 0,05$ significativamente diferentes a las células control.

La acidificación extracelular (medida como ECAR) es un índice de la actividad glucolítica, ya que el transporte de lactato al medio extracelular conlleva la salida de protones. La Figura 6 muestra una ligera disminución en la tasa basal de ECAR en las células *GRN* KD en comparación con la de las células controles. Como era de esperar aumenta la acidificación en el medio extracelular tras la administración de oligomicina (Figura 6). Este aumento refleja el hecho de que en estas condiciones, la síntesis de ATP depende fundamentalmente de la glucólisis. Como se puede

apreciar en la Figura 6 el aumento de ECAR tras la administración de oligomicina es mucho menor en las células *GRN* KD que en las células control.

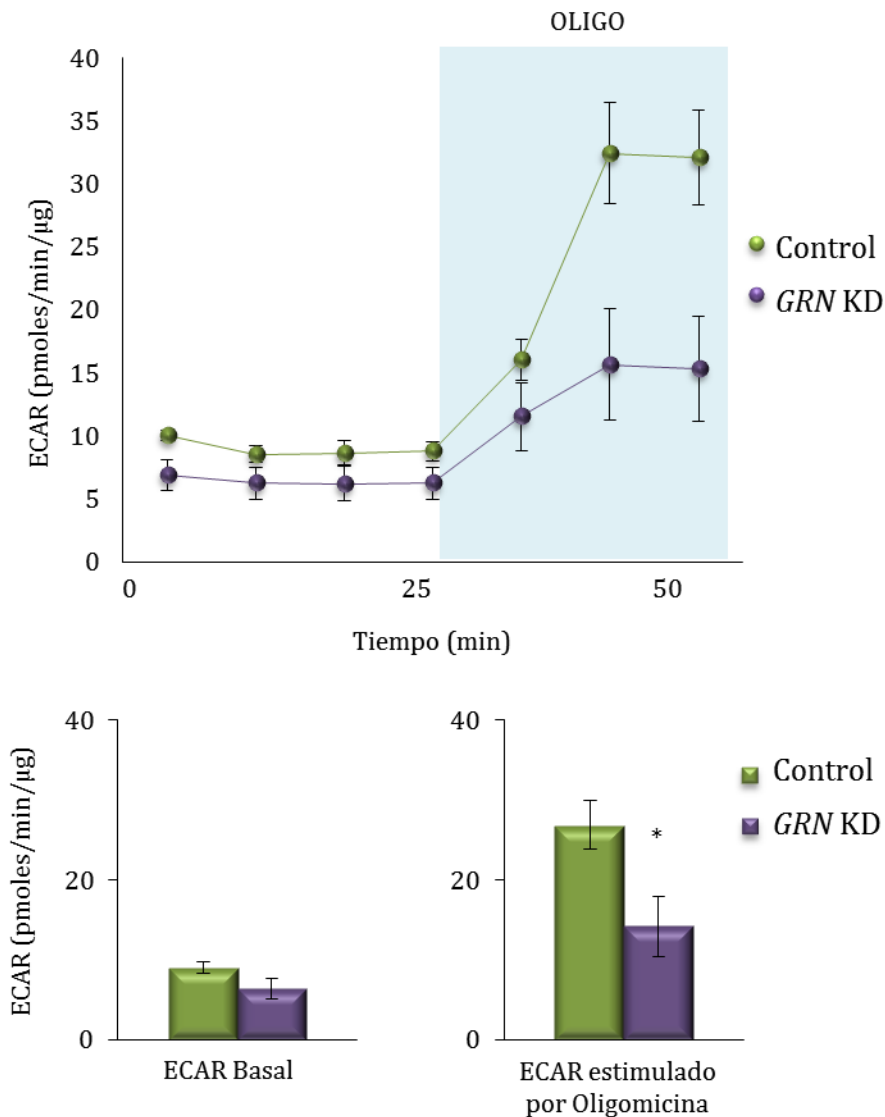


Figura 6: Acidificación celular de las células SH-SY5Y controles y *GRN* KD. Se sembraron 20.000 células por pocillo en una placa especial de 24 pocillos para medir la respiración de las células el Analizador Seahorse XF24. Las células fueron cultivadas durante 24h antes de hacer las mediciones en un medio DMEM no tamponado a pH 7,4 y en presencia de piruvato a 1μM y glucosa a 25 μM. Los datos muestran la media ± EEM de tres experimentos. * p<0,05 significativamente diferentes a las células control. En la gráfica de arriba se representa la acidificación celular (ECAR) de las células controles y de las *GRN* KD a lo largo del tiempo y el efecto de la adición de Oligomicina. En las gráficas de abajo se representa los niveles de acidificación celular (ECAR) de ambas células y el efecto de la adición de Oligomicina. Como vemos es significativamente mayor es mayor en las células controles con respecto las deficientes al añadir Oligomicina.

En conjunto, los resultados indican que la deficiencia de PGRN disminuyó significativamente la actividad glucolítica y respiratoria de las células de neuroblastoma.

También estudiamos el estado de las mitocondrias de las células SH-SY5Y mediante la detección de especies reactivas de oxígeno y el potencial de membrana mitocondrial, posibles indicadores de la disfunción mitocondrial.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) se detectaron fluorimétricamente con 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H₂DCFDA). La Figura 7A muestra un aumento significativo en la generación de ROS en las células *GRN* KD cuando se compara con las células controles.

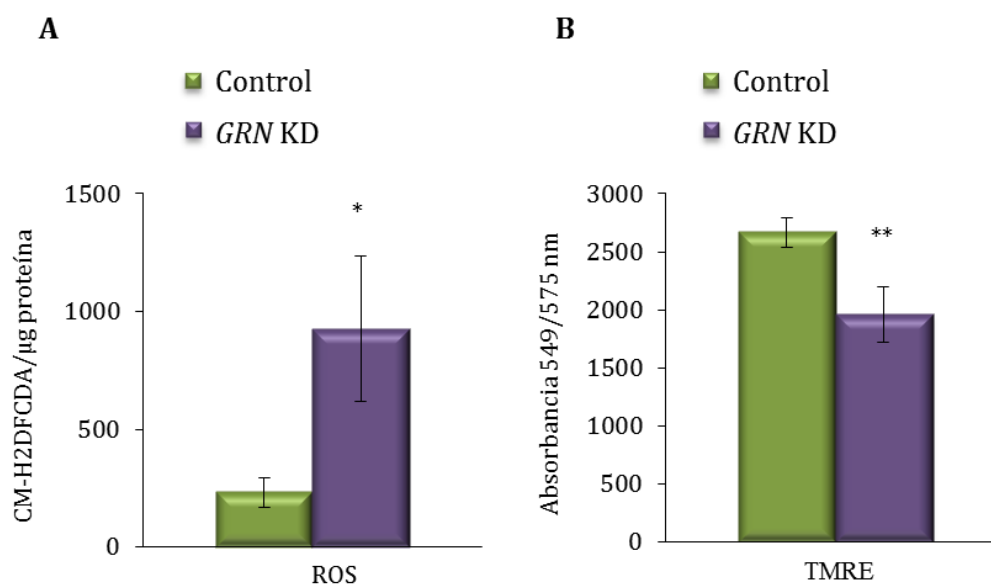


Figura 7: Determinación de los niveles de ROS, del potencial de membrana mitocondrial.

(A) Se recogieron las células controles y *GRN* KD y se incubaron unas 50.000 células de cada con 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H₂DCFDA). (B) Muestra los niveles del potencial de membrana ($\Delta\psi_m$) de 15.000 células cultivadas detectado por tetrametyrodamina, ethyl ester (TMRE). Los datos de los dos estudios muestran la media \pm EEM de cuatro experimentos distintos. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ significativamente diferentes a las células control.

El potencial de membrana mitocondrial se detectó a través del kit “TMRE-Mitochondrial Membrane Potential Assay”. Esta sonda permite evaluar el grado de polarización de la membrana mitocondrial. La Figura 7B muestra la importante reducción de la señal de TMRE en las células *GRN* KD, indicando la disipación del potencial de membrana mitocondrial.

Para explorar si la reducción de la capacidad respiratoria de las células *GRN* KD podría explicarse por las diferencias en la masa mitocondrial, se utilizó una sonda específica (MitoTracker Green FM) que se une a la membrana mitocondrial, independientemente al potencial de membrana mitocondrial. El análisis fluorimétrico reveló mayor intensidad de la señal en las células *GRN* KD con respecto a las células controles (Figura 8A) lo que indica una mayor masa mitocondrial. Coincidiendo con los datos del fluorímetro, pudimos observar mediante microscopia confocal un aumento de señal de MitoTracker Green FM en las células SH-SY5Y *GRN* KD (Figura 8B). Un aumento de masa mitocondrial podría ser quizás un mecanismo compensatorio causado por la menor capacidad energética de las células *GRN* KD.

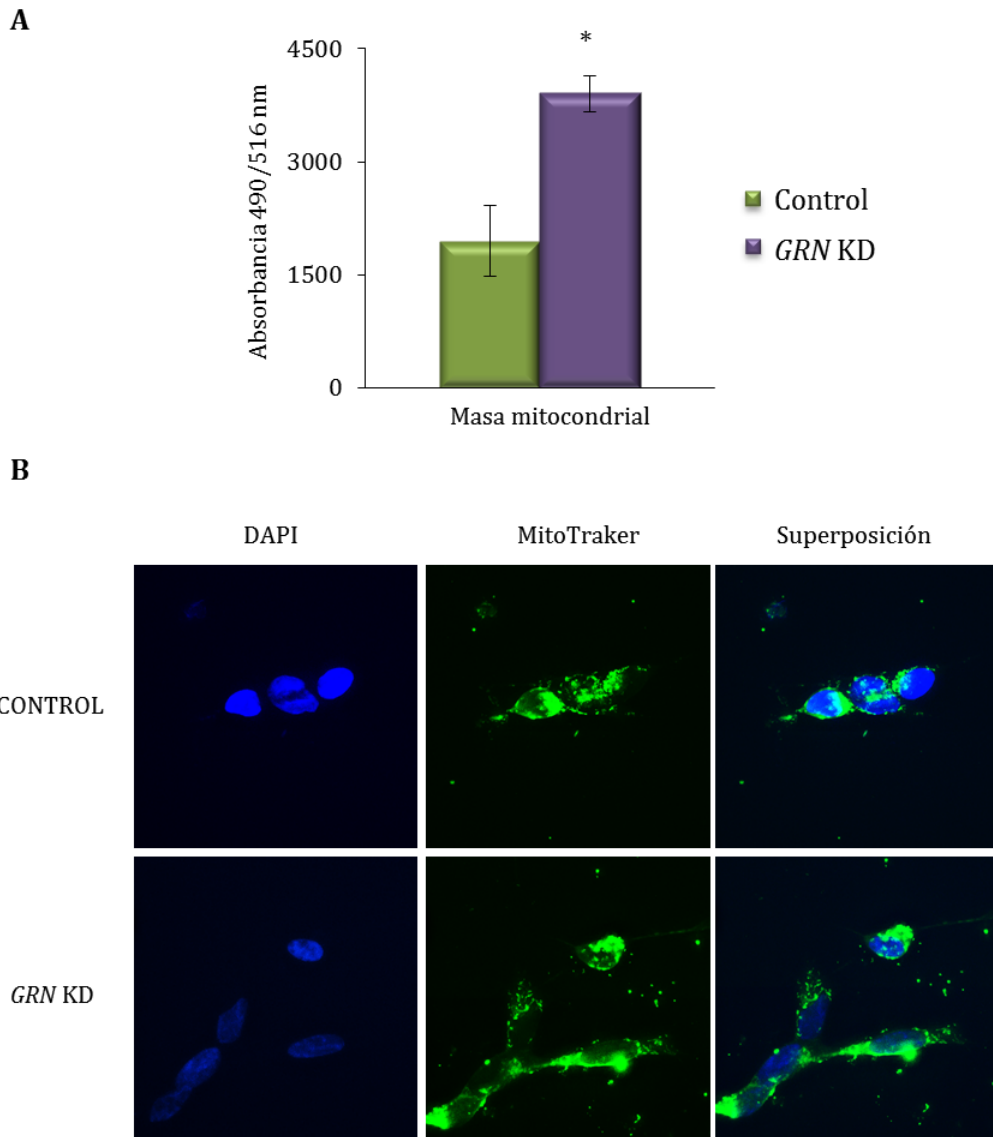


Figura 8: Determinación de la masa mitocondrial en las células SH-SY5Y GRN KD. (A) Se cultivaron 15.000 en presencia del colorante MitoTraker Green FM y se midió la absorbancia a 490/516 nm en un fluorímetro. En la gráfica se muestran los niveles de absorbancia. Los datos muestran la media \pm EEM de cuatro experimentos distintos. * $p < 0,05$ significativamente diferentes a las células control. (B) Fotomicrografías representativas de las células marcadas con MitoTraker Green FM. Las células se sembraron a una concentración inicial de $0,1 \times 10^6 \text{ x ml}^{-1}$ y se incubaron durante 48 horas. Se incubaron con MitoTraker Green FM y fijaron, para marcar el núcleo se utilizó DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol). Detectamos la fluorescencia del MitoTraker Green FM mediante microscopía láser confocal a un aumento de 63X.

1.3. Estudio de la influencia del déficit de PGRN en la proliferación de las células SH-SY5Y

1.3.1. Estudio comparativo del control de supervivencia en células controles y *GRN* KD

Trabajos previos de nuestro laboratorio y de otros demostraron que alteraciones en el control del ciclo celular podría ser una de las causas de la neurodegeneración en la demencia frontotemporal [149, 165]. Aparentemente las neuronas vulnerables en el cerebro de pacientes podrían iniciar un ciclo de división no deseable, que en último término conduce a la muerte de la célula por apoptosis [144, 153, 264]. Por esta razón hemos estudiado la influencia del déficit de PGRN en la regulación del ciclo celular y su relación con el control de supervivencia/muerte celular. Para este fin determinamos en primer lugar la incorporación de 5-bromo-2'-deoxyuridina (BrdU) en el ADN de células control y *GRN* KD. Como se puede apreciar en la Figura 9A, la incorporación de BrdU fue considerablemente mayor en las células *GRN* KD que en las células controles, en contraste con la disminución en la viabilidad celular a lo largo del tiempo que habíamos observado (Figura 3). Es decir, parece existir una relación inversa entre ambos procesos. Dado que la regulación del ciclo celular en los procesos neurodegenerativos parece tener lugar a nivel de la transición entre las etapas G1-S del ciclo celular [265], decidimos estudiar el efecto del déficit de PGRN en los niveles y estado de fosforilación de las proteínas de la familia de retinoblastoma (pRb, p107 y p130), ya que ellas controlan este proceso [266, 267]. La Figura 9B muestra un aumento significativo en el estado de fosforilación de estas proteínas, determinado mediante Western blot usando anticuerpos que son capaces de reconocer las formas hipo e hiperfosforiladas de las distintas proteínas.

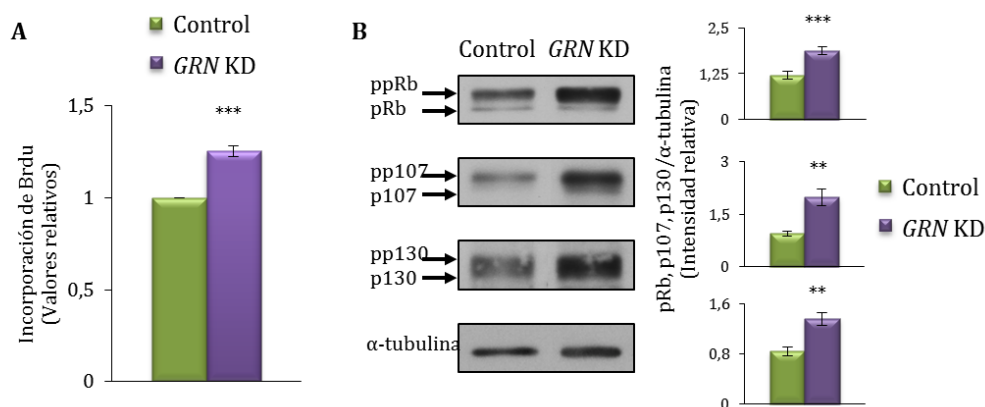


Figura 9: Efecto de la deficiencia de PGRN en la proliferación de las células SH-SY5Y. (A) La proliferación de las células se determinó por la incorporación de BrdU en el ADN. Se cultivaron 15000 células en placas de 96 pocillos; 24h después, las células se incubaron con BrdU durante 4 horas. Los datos muestran la media \pm EEM de cuatro experimentos. * $p < 0,05$ significativamente diferentes a las células control. (B) Ambas células se incubaron a una concentración de 1×10^6 durante 24 horas en medio de cultivo DMEM con 10% de suero y se obtuvieron los extractos. Las proteínas de la familia de pRb se analizaron mediante Western blot y se utilizó como control de carga la α -tubulina. Los valores mostrados del análisis densitométrico representan la media \pm EEM de siete experimentos. ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ significativamente diferente a las células control.

Las proteínas pRb, p107 y p130 hipofosforiladas inhiben el factor de transcripción E2F formando complejos, pero cuando se hiperfosforilan se disocia el complejo quedando libre el factor de transcripción E2F. El factor de transcripción E2F permite la transcripción de genes implicados en el ciclo celular [268].

Las proteínas de la familia de retinoblastoma son fosforiladas por los complejos ciclina D/CDK4/CDK6 y ciclina E/CDK2 [267], razón por la cual también estudiamos los cambios en los niveles de algunas de estas proteínas por Western blot entre las células control y deficientes en PGRN. Como podemos apreciar en la Figura 10A encontramos aumentadas en las células GRN KD la Ciclina E (CycE) y las Ciclinas D1 y D2 (CycD1/D2) en cambio la Ciclina D3 no (CycD3), lo que de nuevo nos podría explicar la mayor capacidad proliferativa de las células GRN KD. Por otro lado, vemos que las CDKs no parecen que cambien significativamente entre las células control y deficientes. (Figura 10B).

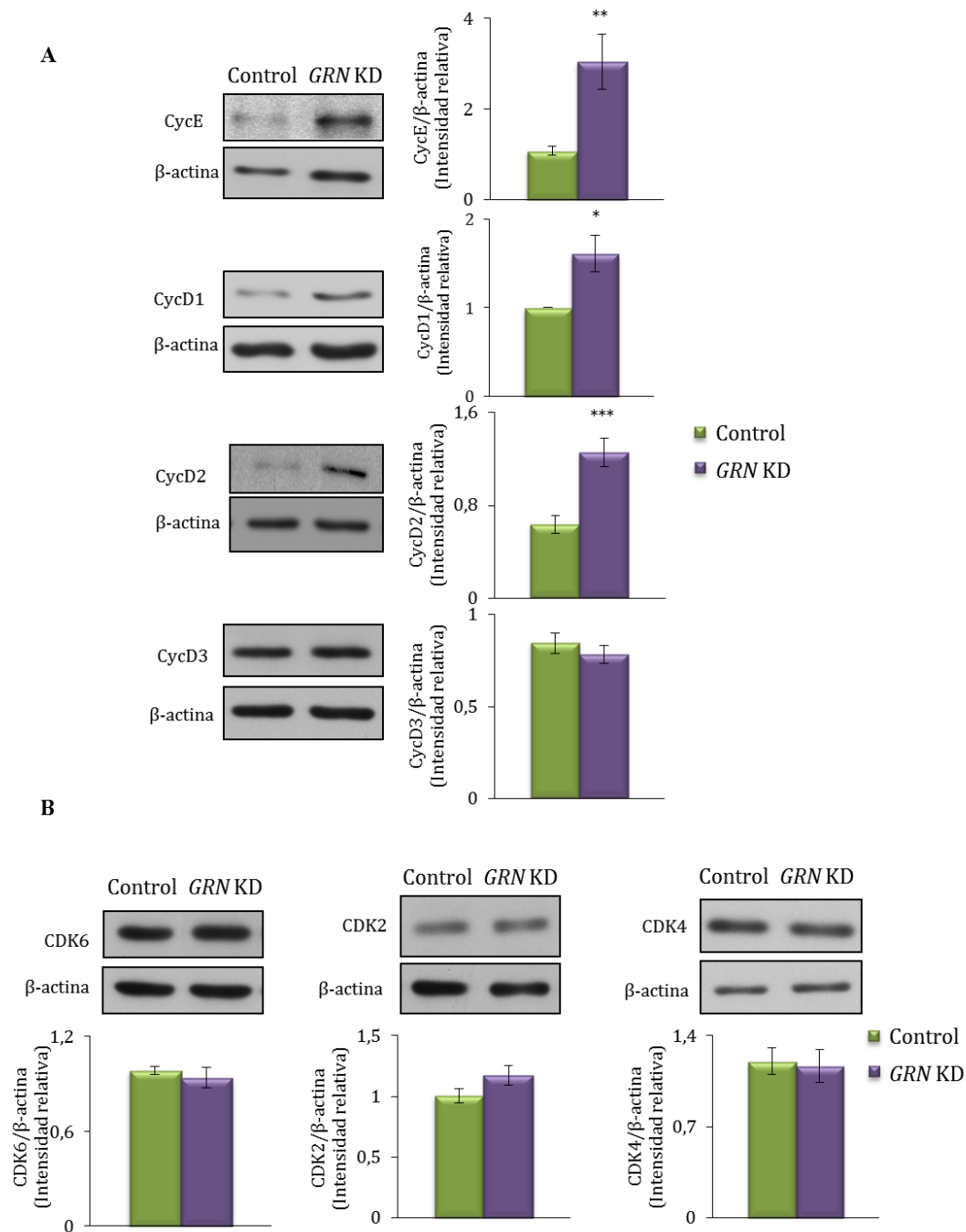


Figura 10: Proteínas reguladoras en el la proliferación de las células GRN KD y las células controles. Las células SH-SY5Y controles y GRN KD fueron cultivadas durante 24 horas a una densidad inicial de 1×10^6 en medio DMEM con 10% de suero. Tras recogerlas como extractos se analizaron las proteínas correspondientes mediante Western blot con anticuerpos específicos. Se utilizó β -actina como control de carga (A) Se muestran Western blot representativos de las proteínas correspondientes. El análisis densitométrico representa la media \pm EEM de diez, cuatro y seis experimentos respectivamente. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ significativamente diferentes a las células control. (B) Muestra Western blot representativos de los niveles de las CDKs.

Como ya se ha mencionado, la mayor incorporación de BrdU se acompaña de una mayor vulnerabilidad celular. Con objeto de determinar si la muerte celular se debe a la activación de la apoptosis, estudiamos el balance entre proteínas pro- y anti-apoptóticas (Bcl2, Bcl-xL y Bax) de las células *GRN* KD y controles. Como podemos ver en la Figura 11A hay una disminución significativa en los cocientes Bcl2/Bax y Bcl-xL/Bax en las células *GRN* KD respecto a los controles. Además pudimos confirmar la mayor presencia de células apoptóticas en los cultivos *GRN* KD, por microscopía de fluorescencia tras la tinción de los núcleos con 4,6-diamino-2-fenylindol (DAPI). La figura 11B muestra un experimento tipo, en el que es posible apreciar la aparición de núcleos picnóticos y condensación de la cromatina, típica de apoptosis especialmente en las células *GRN* KD (flechas).

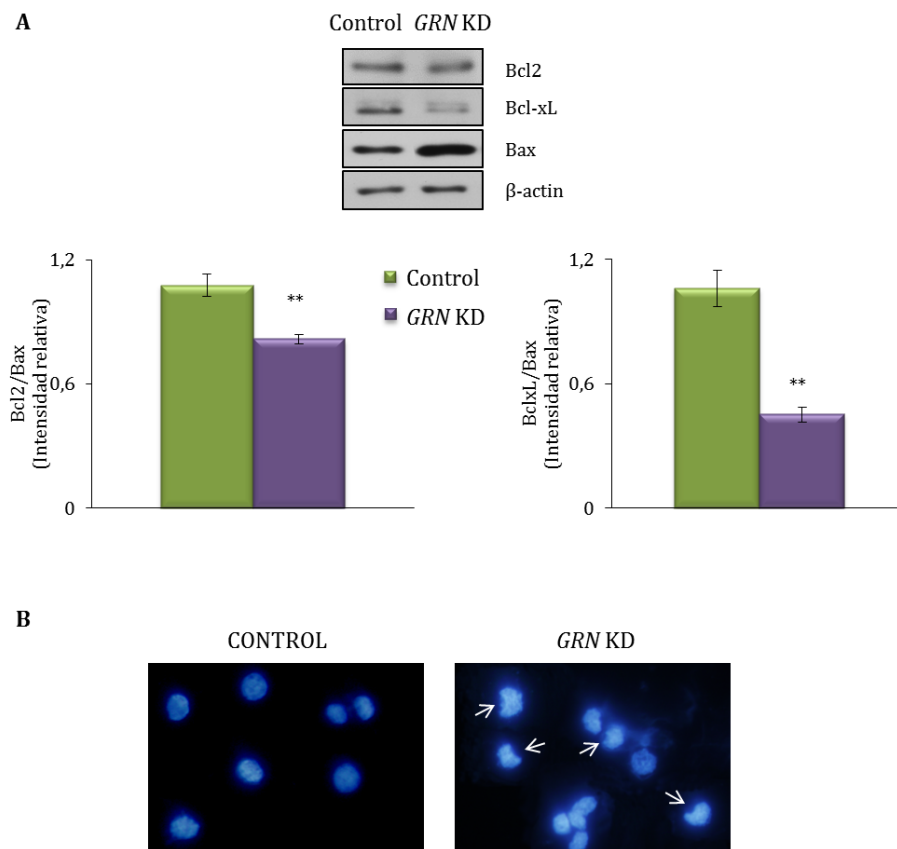


Figura 11: Efecto de la deficiencia de PGRN en la apoptosis de las células. (A) Se muestran Western blot representativos de las proteínas pro- y anti-apoptóticas. Para la detección de Bcl2, Bcl-xL y Bax se utilizaron extractos de 1×10^6 células cultivadas durante 24 horas en medio DMEM con 10% de suero. Se utilizó como control de carga las β -actina. El análisis densitométrico representa la media \pm EEM de cuatro experimentos. ** $p < 0,01$ significativamente diferentes a las células control. (B) Fotomicrografías representativas de los núcleos teñidos con 4,6-diamino-2-fenylindol (DAPI) de las células de neuroblastoma SH-SY5Y, después de ser cultivadas durante 72 horas en medio DMEM con 10% de suero. Las flechas indican la cromatina de los núcleos condensada y fragmentada de las células *GRN* KD.

Esto nos confirma que a pesar de que las células deficientes en PGRN intentan proliferar, mueren, de ahí la disminución de la viabilidad de estas células.

1.3.2. Efecto de la progranulina extracelular en el control de supervivencia/muerte en células SH-SY5Y

La influencia de la PGRN extracelular en la supervivencia de las células *GRN* KD se investigó por un lado incubando las células deficientes con el medio condicionado por las células controles, y por otro añadiendo al medio de incubación PGRN recombinante humana (rhPGRN).

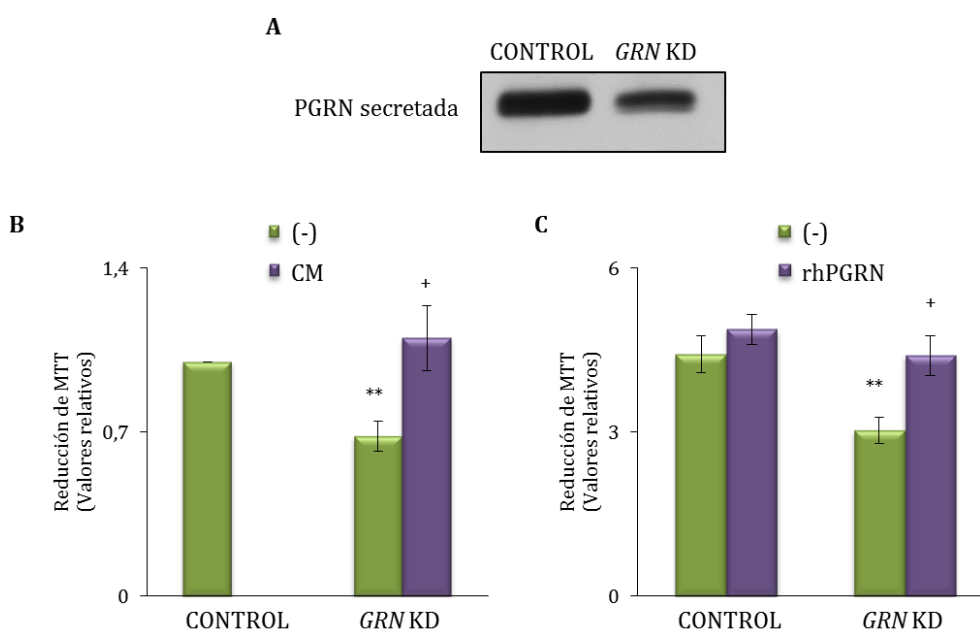


Figura 12: Efecto de la PGRN en la viabilidad de las células SH-SY5H deficientes en progranulina. (A) Se analizó mediante Western blot la cantidad de PGRN secretada por las células en el medio de cultivo. (B) Las células *GRN* KD fueron incubadas en medio condicionado (CM) de las células controles SH-SY5Y durante 72 horas y se analizó la viabilidad por un ensayo MTT. Se muestra la media \pm EEM de cinco experimentos. ** $p < 0,01$ significativamente diferentes a las células control; + $p < 0,05$ significativamente diferentes a las células sin tratar. (C) Se sembraron en una placa de 96 pocillos unas 30.000 células por pocillo también durante 72 horas y se determinó la viabilidad celular mediante un ensayo de MTT. Los datos muestran la media \pm EEM de cuatro experimentos. ** $p < 0,01$ significativamente diferentes a las células control; + $p < 0,05$ significativamente diferentes a las células sin tratar.

En primer lugar, pudimos confirmar que efectivamente la PGRN secretada al medio es claramente superior en las células controles que en las *GRN* KD (Figura 12A).

Cuando se añadió el medio condicionado (CM) por las células controles a las células *GRN* KD, se observó un aumento significativo de la viabilidad de las células deficientes en PGRN, alcanzando valores similares a los de las células control (Figura 12B). Por otra parte, la adición de rhPGRN, a dosis similares a las encontradas en el plasma de individuos sanos [269] incrementa la viabilidad de las células deficientes a niveles parecidos a las células control (Figura 12C).

Estos datos nos muestran la importancia de los niveles de PGRN en la viabilidad de las células neurales *GRN* KD.

1.3.3. Relación inversa entre proliferación y viabilidad celular en células SH-SY5Y diferenciadas

Con objeto de descartar que el incremento de la actividad proliferativa de las células *GRN* KD pudiera estar relacionada con el hecho de que son una línea celular establecida de neuroblastos indiferenciados, se realizó un estudio comparativo en células controles y *GRN* KD tras diferenciarlas a neuronas adultas.

La Figura 13A se muestra que el tratamiento con 5 μ M de ácido retinoico (AR) durante tres días y la posterior adición del factor neutrófico BDNF (50ng/ml) durante dos días, induce la aparición de neuronas maduras. A continuación se determinó la incorporación de BrdU en el ADN y se realizaron ensayos de viabilidad celular en dichas células maduras. Como puede apreciarse en la Figura 13B, también en neuronas adultas se observa la relación inversa entre actividad proliferativa y viabilidad.

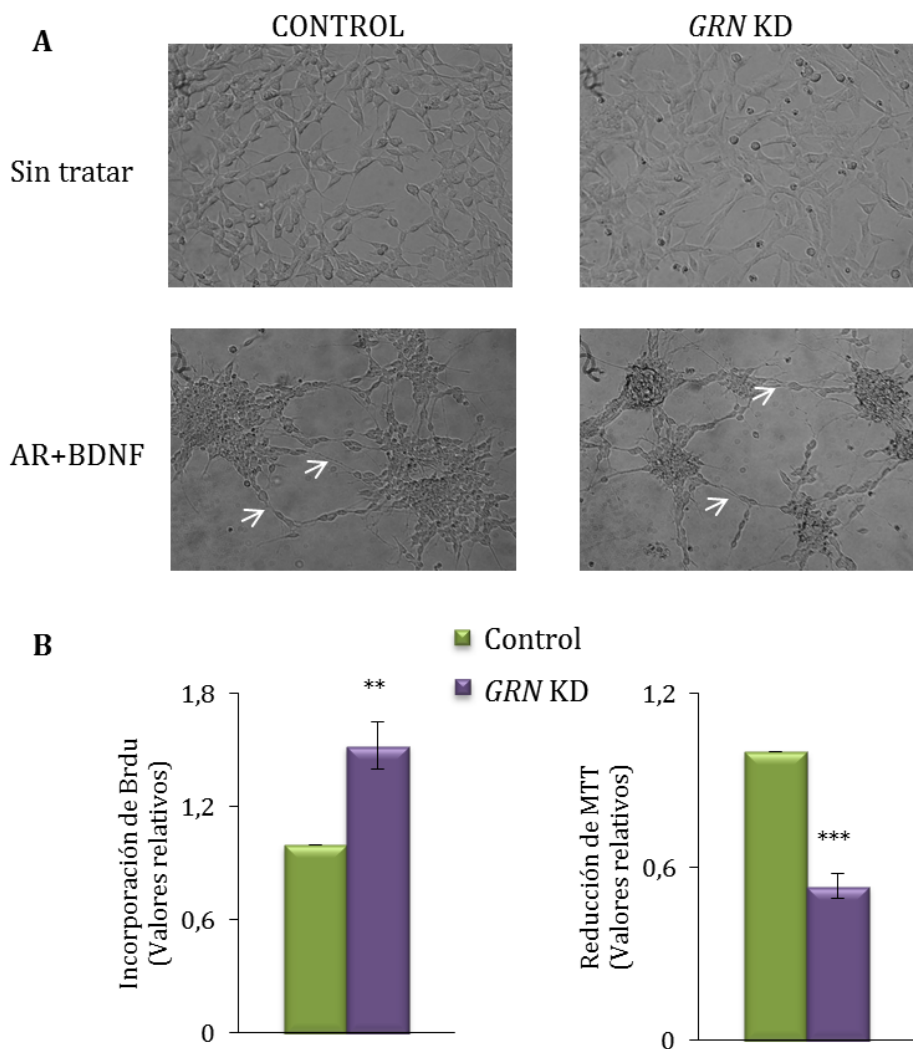


Figura 13: Diferenciación de las células neuronales SH-SY5Y a neuronas maduras. Se cultivaron 1×10^6 células en presencia de $5 \mu\text{M}$ de ácido retinoico (AR) durante tres días. Pasados estos tres días, a las células cultivadas en presencia de ácido retinoico se les añadió 50 ng/ml del factor de neutrófico BDNF durante dos días. (A) Fotos al microscopio de campo claro con objetivo 20X dónde se ve que las células tratadas con AR y BDNF han diferenciado a células maduras (las flechas marcan las prolongaciones de las dendritas). (B) En la gráfica de la izquierda tenemos los datos de la proliferación de las células neuronales diferenciadas, determinado por la incorporación de Brdu en el ADN de las células. Los datos muestran la media \pm EEM de seis experimentos. ** $p < 0,01$ significativamente diferentes a las células control diferenciadas. En la gráfica de la derecha se muestran los datos de la viabilidad de las células diferenciadas mediante MTT. Los datos muestran la media \pm EEM de cuatro experimentos. *** $p < 0,001$ significativamente diferentes a las células control diferenciadas.

En conjunto estas observaciones suponen un apoyo a la hipótesis que sostiene que la entrada en ciclo celular en neuronas post-mitóticas puede contribuir al proceso neurodegenerativo de la DLFT.

2. PAPEL DE WNT EN LA VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS SH-SY5Y DEFICIENTES EN PGRN

2.1. Alteraciones en la señalización de Wnt en las células *GRN* KD

Trabajos previos de nuestro laboratorio pusieron de manifiesto la existencia de alteraciones en la actividad proliferativa de células periféricas derivadas de pacientes de DLFT-TPD, portadores de una mutación en el gen *GRN* (c.709-1G>A), que causa la haploinsuficiencia de la proteína [165]. Estos cambios en el control del ciclo celular pudieron atribuirse a una sobreactivación de la vía de señalización Wnt asociada al déficit en PGRN [269]. En base a estos antecedentes, en este trabajo hemos estudiado de forma comparativa la actividad de esta cascada de señalización vía Wnt en células controles y *GRN* KD. Para ello realizamos en primer lugar un análisis de cambios en el estado de fosforilación de proteínas implicadas en la vía Wnt utilizando un array de 227 anticuerpos fosfo-específicos de Full Moon Biosystems Inc. (Sunnyvale, CA).

En la Tabla 5 podemos ver una lista parcial de las proteínas cuya fosforilación está aumentada o disminuida en las células *GRN* KD, mientras que en la Tabla 6 se muestra una lista parcial de las moléculas de señalización cuyos niveles aumentan en las células *GRN* KD.

El aumento de la fosforilación tanto de PKC como de CaMKII sugiere una sobreactivación de la vía no canónica de Wnt en las células deficientes en PGRN, así como por la disminución en la fosforilación del factor de transcripción NFAT (Tabla 5). De acuerdo con el trabajo previo de nuestro laboratorio [269], se detectó un aumento en los niveles celulares de Wnt5a (Tabla 6).

Tabla 5

Lista parcial de moléculas de señalización cuya fosforilación aumentó o disminuyó en las células de neuroblastoma SH-SY5Y *GRN* KD.

SITIO DE FOSFORILACIÓN	RATIO <i>GRN</i> KD/CONTROL	FUNCIÓN
p85-PI3K Tyr467/Tyr199	2.4	Activación
PKCa Thr638	3.8	Aumenta la duración de la activación
PKCa Tyr 657	3.8	Activación
MEK1 Ser 298	2.2	Activación
p38 Tyr 182	5.1	Activación
JNK 1 Thr183/Tyr184	2.2	Activación
CaMKII Thr305	2.3	Activación
Src Tyr 418	4.2	Activación
β -catenina Ser37	3.4	Inicia la degradación de β -catenina
β -catenina Thr 41/45	2.0	Inicia la degradación de β -catenina
GSK α/β Tyr216/279	0.5	Activación
JNK Thr183/185	0.5	Activación
NFAT3 Ser 507	0.5	Inhibición
APC1 Ser 688	0.5	Activación

Se determinaron las intensidades de señal de las formas fosforiladas y totales de cada proteína, y la relación (fosfo/total) de cada proteína se calculó entre *GRN* KD y las células control. Se muestra el impacto de sitios específicos de fosforilación sobre la función biológica de estas proteínas.

Tabla 6

Lista parcial de proteínas señalización cuyos niveles aumentaron en las células de neuroblastoma SH-SY5Y *GRN* KD.

PROTEÍNA	RATIO <i>GRN</i> KD/CONTROL	FUNCIÓN
α -catenina (C-term)	3.6	Señalización de Cadherina
Wnt5A	1.3	Ligandos de receptores Frizzled
Wnt1	17	Ligandos de receptores Frizzled
β -catenina (inter)	6.2	Activador transcripcional de la señalización de Cadherina
Cadherina (C-term)	3.5	Adhesión celular
E-Cadherina (N-term)	2.8	Adhesión celular
Ubiquitina (inter)	3.6	Degradación de las proteínas

Se calculó el aumento se calculó como la relación de intensidades de señal de células *GRN* KD y células control de neuroblastoma. Se muestra la función biológica de estas proteínas.

A pesar de que la fosforilación de β -catenina en los residuos Ser37 y Thr41/45 aumenta en las células *GRN* KD (Tabla 5), la actividad de GSK3 β parece estar inhibida por la fosforilación del residuo Tyr disminuyendo en las células deficientes. En consonancia con esto, el contenido total en las células de β -catenina aumenta (Tabla 6). Este hecho y el aumento significativo de los niveles de Wnt1 en las células deficientes en PGRN (Tabla 6), sugieren que la señalización canónica de Wnt puede estar también alterada por el déficit de PGRN.

Para validar estos resultados, determinamos por Western blot los niveles celulares de Wnt1 y Wnt5a así como los distintos mediadores downstream de la señalización de Wnt.

Como se puede ver en la Figura 14, el incremento del contenido de Wnt1 en las células SH-SY5Y *GRN* KD está acompañado por un aumento significativo en la fosforilación de GSK3 β y la acumulación de β -catenina en el núcleo, junto con cambios significativos, como ya habíamos visto antes, en los niveles celulares de ciclina D1.

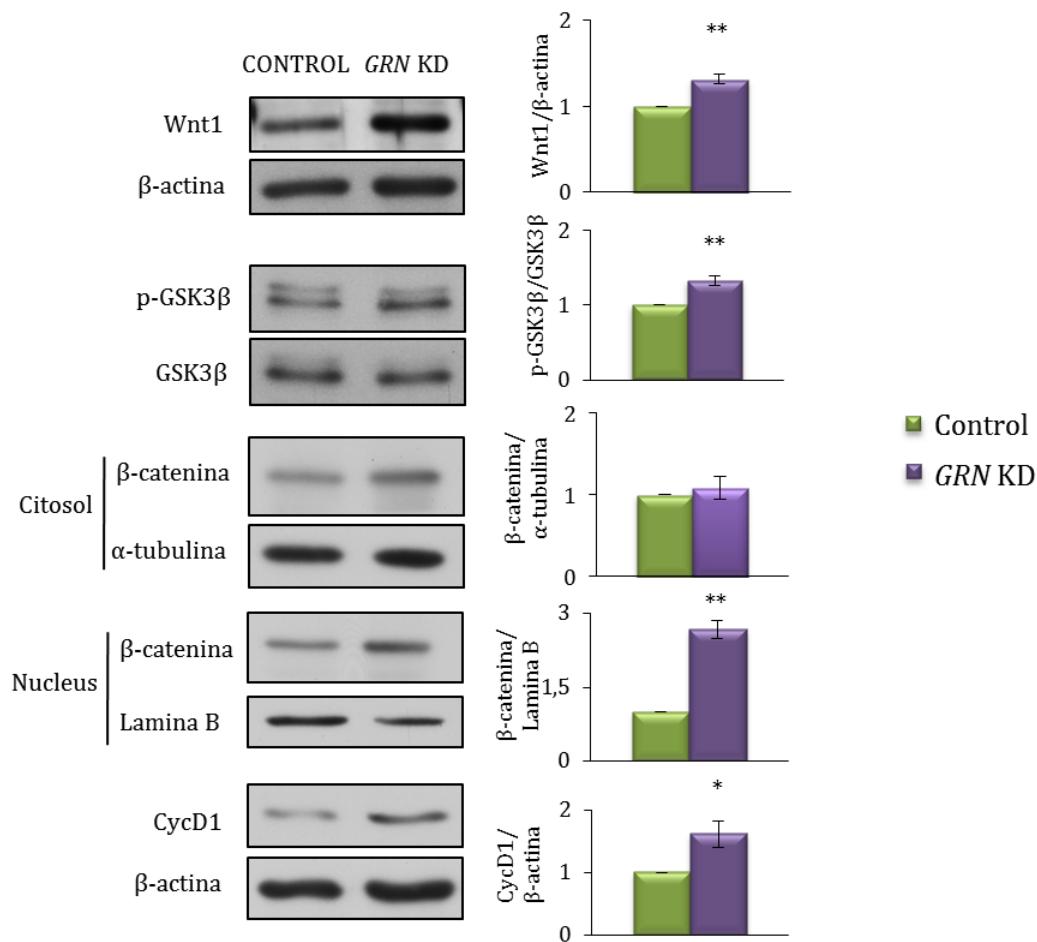


Figura 14: Sobre activación de la vía de señalización canónica de Wnt en las células de neuroblastoma SH-SY5Y GRN KD. 1×10^6 células controles y deficientes se incubaron durante 24 horas en medio de cultivo DMEM con 10% de suero. Se utilizaron extractos de estas células para la determinación de los niveles relativos Wnt1, fosfo-GSK3 β y ciclina D1 mediante Western blot. Se utilizó β -actina como control de carga. Para los niveles de β -catenina subcelulares, los extractos celulares fueron fraccionados para preparar los extractos citosólicos y los nucleares. Se utilizaron anticuerpos anti- α -tubulina y anti-Lamina B como control de pureza y carga de los extractos. Se muestran Western blot representativos. Los datos mostrados del análisis densitométrico representan la media \pm EEM de cuatro experimentos. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ significativamente diferente a las células control.

Por otro lado, las evidencias de la sobre-activación de la vía no canónica de Wnt en las células deficientes en PGRN se pueden ver en la Figura 15. Primero vemos un aumento del contenido celular de Wnt5a en las células GRN KD comparado con las células control. Además, detectamos un aumento de los niveles totales de NFAT1 en las células deficientes en PGRN (Figura 15B). NFAT1 pertenece a la familia de factores de transcripción NFAT regulados por Ca^{2+} /calcineurina [270]. Como la

forma fosforilada inactiva de NFAT1 se encuentra en el citosol, mientras que la forma activa, no fosforilada se trasloca en el núcleo, hemos realizado experimentos de fraccionamiento celular. Encontramos pues un aumento significativo en el contenido nuclear (forma activa, no fosforilada) de NFAT1 en las células *GRN* KD (Figura 15C).

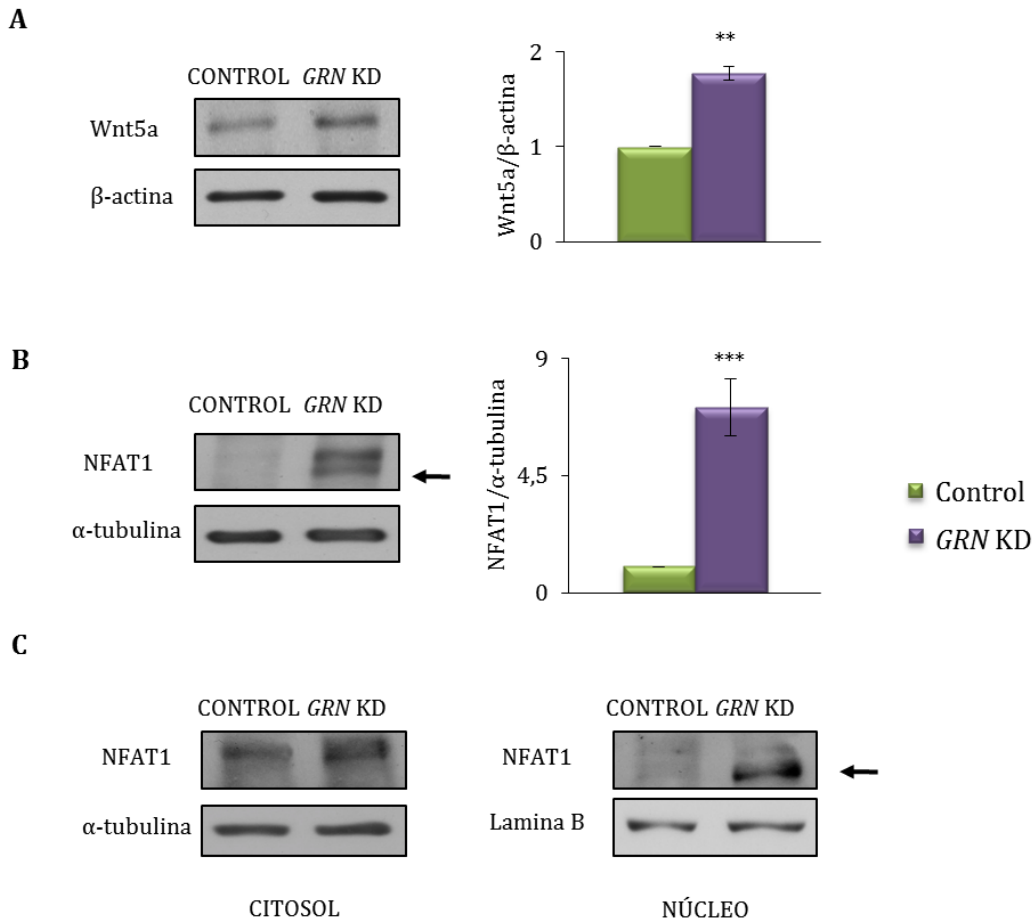


Figura 15: Señalización no canónica de Wnt en las células controles y *GRN* KD de neuroblastoma SH-SY5Y. (A, B) Las células controles y *GRN* KD (1×10^6) se incubaron durante 24 horas en medio de cultivo DMEM con 10% de suero y el contenido relativo de Wnt5a y NFAT1 fue determinado por Western blot. Se muestran Western blot representativos, mientras que los análisis densitométricos a continuación representan la media \pm EEM de cuatro experimentos. ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ significativamente diferente a las células control. (C) Se muestra la distribución subcelular de NFAT1. Los anticuerpos anti- α -tubulina y anti-Lamina B confirmaron la de pureza y el control de carga de los extractos. Se muestran Western blot representativos. Las flechas indican la forma activa de la proteína, NFAT1 no fosforilada.

2.2. Papel de las rutas canónica y no canónica Wnt en el control de supervivencia/muerte celular

Para evaluar la posible implicación de la señalización Wnt en la regulación del destino celular de las células neuronales deficientes en PGRN se trataron las células controles y *GRN* KD con los ligandos Wnt1 y Wnt5a, en presencia o ausencia de inhibidores específicos de la señalización canónica y no canónica de Wnt.

Como se muestra en la Figura 16A, tanto la adición de Wnt1 recombinante (rhWnt1) como la de Wnt5a recombinante (rhWnt5a) estimulan la incorporación de BrdU en el ADN de las células controles, alcanzando valores similares a los de las células *GRN* KD. Ninguno de estos ligandos tiene efectos significativos en las células *GRN* KD, en consonancia con el hecho de que estas células expresan y probablemente secretan mayores niveles de Wnt1 y Wnt5a (Tabla 6). Los efectos estimulantes de Wnt1 y Wnt5a se asociaron a un aumento de los niveles de β -catenina o de los niveles de NFAT1 respectivamente (Figura 16B) y en los niveles de fosforilación de pRb (Figura 16C). La adicción simultánea de ambos ligandos no tuvo efectos aditivos en la incorporación de BrdU en el ADN (Figura 16A), ni en los niveles de fosforilación de la pRb en las células controles (Figura 16C).

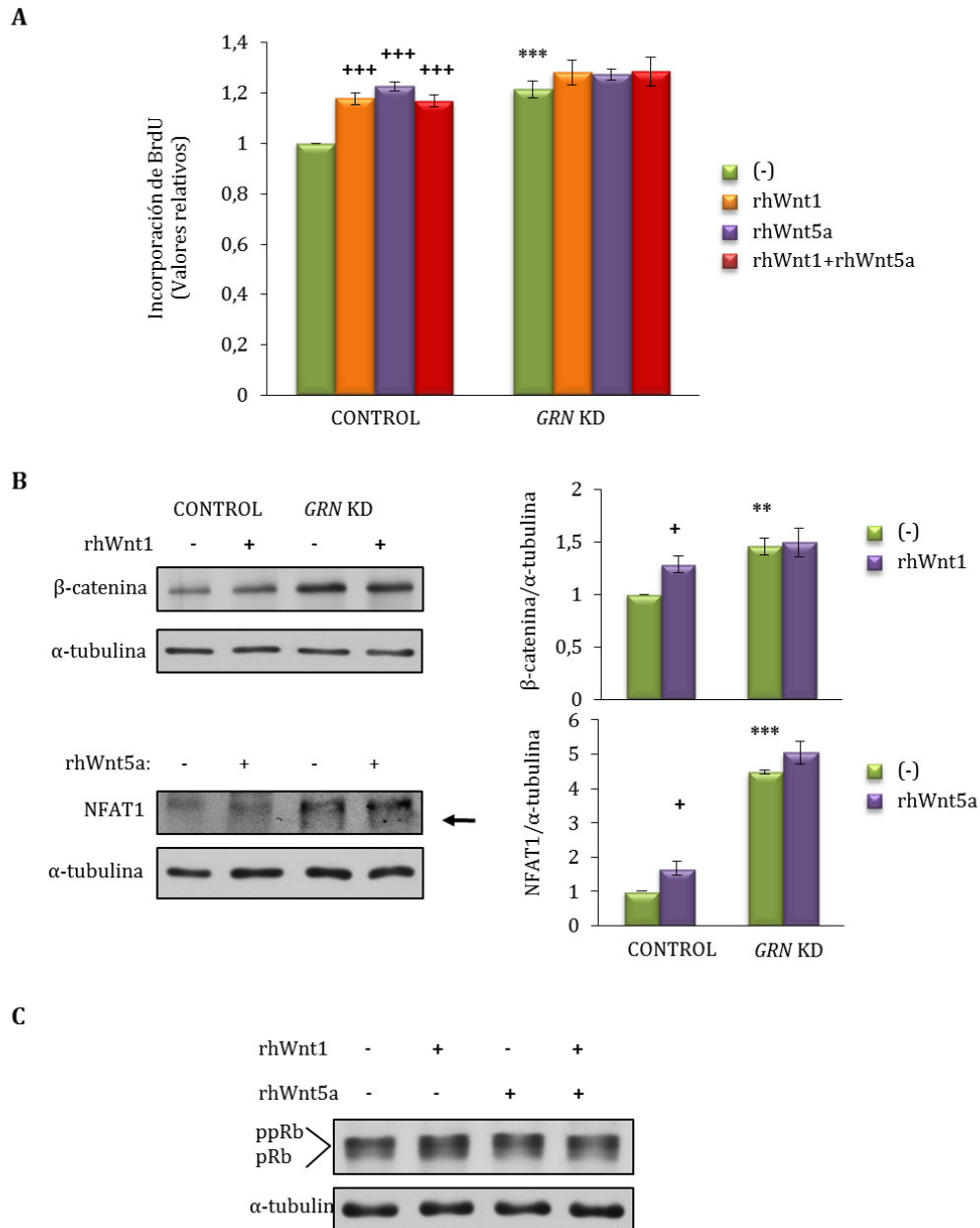


Figura 16: Efectos de Wnt1 y Wnt5a exógenos en la actividad proliferativa de las células control y GRN KD SH-SY5Y. (A) 15.000 células controles y GRN KD SH-SY5Y se incubaron durante 24 horas en medio de cultivo DMEM con 10% de suero en ausencia y presencia de 0,1 µg/ml de rhWnt1 o 0,05 µg/ml de rhWnt5a. La síntesis de ADN se detectó por la incorporación de BrdU. Los valores relativos representan la media ± EEM de seis experimentos. *** p<0,001 significativamente diferente a las células control; +++ p<0,001 significativamente diferentes a las células sin tratar. (B) Western representativos donde se ven los efectos de rhWnt1 y rhWnt5a sobre β-catenina y NFAT1 respectivamente. La flecha indica la forma activa, NFAT1 no fosforilada. α-tubulina se utiliza como control de carga control. Los análisis densitométricos representan la media ± EEM de tres experimentos. **p<0,01 y *** p<0,001 significativamente diferente a las células control; + p<0,05 significativamente diferentes a las células sin tratar. (c) Se muestra Western blot representativo del efecto de rhWnt1 y rhWnt5a sobre el estado de fosforilación de pRb.

Para bloquear selectivamente las vías Wnt1/ β -catenina o Wnt5a/ Ca^{2+} , se utilizaron inhibidores tales como la proteína Dickkopf (DKK1), que actúa impidiendo la unión de Wnt1 al correceptor LRP5/6 [271], y para bloquear la vía no canónica, utilizamos KN-62, un inhibidor muy selectivo de la Calmodulina quinasa II [272]. Los resultados de estos experimentos se recogen en la Figura 15. Puede apreciarse que la adición de DKK1 recombinante (rhDKK1) a las células controles no afecta a la tasa de incorporación de BrdU, pero sin embargo impide la estimulación mediada por la administración de Wnt1 exógena (Figura 17A). En las células *GRN* KD, la adición de rhDKK1 impide la estimulación de la incorporación de BrdU en el ADN, sin que este efecto pueda ser reparado por la administración conjunta de Wnt1 (Figura 17A). De forma similar, la inhibición de la señalización Wnt5a/ Ca^{2+} con KN-62, revierte el incremento en la incorporación de BrdU inducido por Wnt5a en las células controles (Figura 17B) e impide la sobre activación de la síntesis de ADN característica de las células *GRN* KD (Figura 17B).

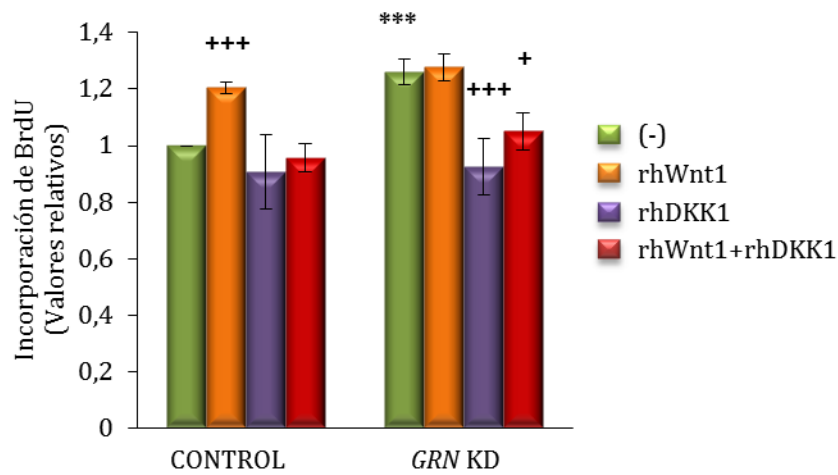
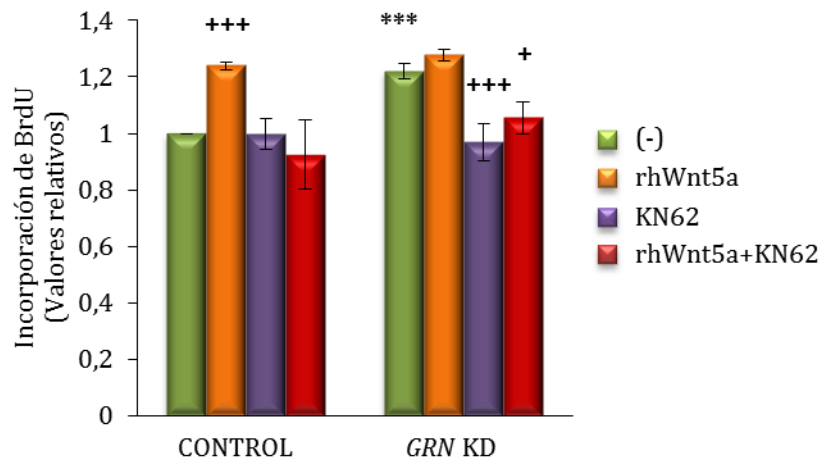
A**B**

Figura 17: Efectos del bloqueo de la señalización de Wnt en la incorporación de Brdu en el ADN. (A) Se incubaron 15.000 células controles y *GRN* KD SH-SY5Y por pocillo durante 24 horas en medio de cultivo DMEM con 10% de suero en ausencia y presencia de 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de rhWnt1 o 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de rhDKK1 para bloquear la vía Wnt/ β -catenina. Mediante la incorporación de Brdu en el ADN se evaluó la síntesis del ADN. Los valores relativos representan la media \pm EEM de cuatro experimentos. *** $p < 0,001$ significativamente diferente a las células control; + $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$ significativamente diferentes a las células sin tratar. (B) Las células SH-SY5Y *GRN* KD SH-SY5Y fueron incubadas en ausencia o presencia de 0,05 $\mu\text{g/ml}$ de rhWnt5a y 1 μM KN-62 para bloquear la señalización vía Wnt/ Ca^{2+} . Los valores relativos representan la media \pm EEM de cuatro experimentos. *** $p < 0,001$ significativamente diferente a las células control; + $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$ significativamente diferentes a las células sin tratar.

A continuación evaluamos la influencia de bloquear la señalización Wnt1/ β -catenina o Wnt5a/ Ca^{2+} en la viabilidad celular. La Figura 18A muestra que o bien rhWnt1 o rhWnt5a reducen la viabilidad de las células controles, mientras que el

bloqueo de la sobre activación de la señalización vía Wnt por rhDKK1 o KN-62 restaura parcialmente la viabilidad de las células *GRN* KD (Figura 18B).

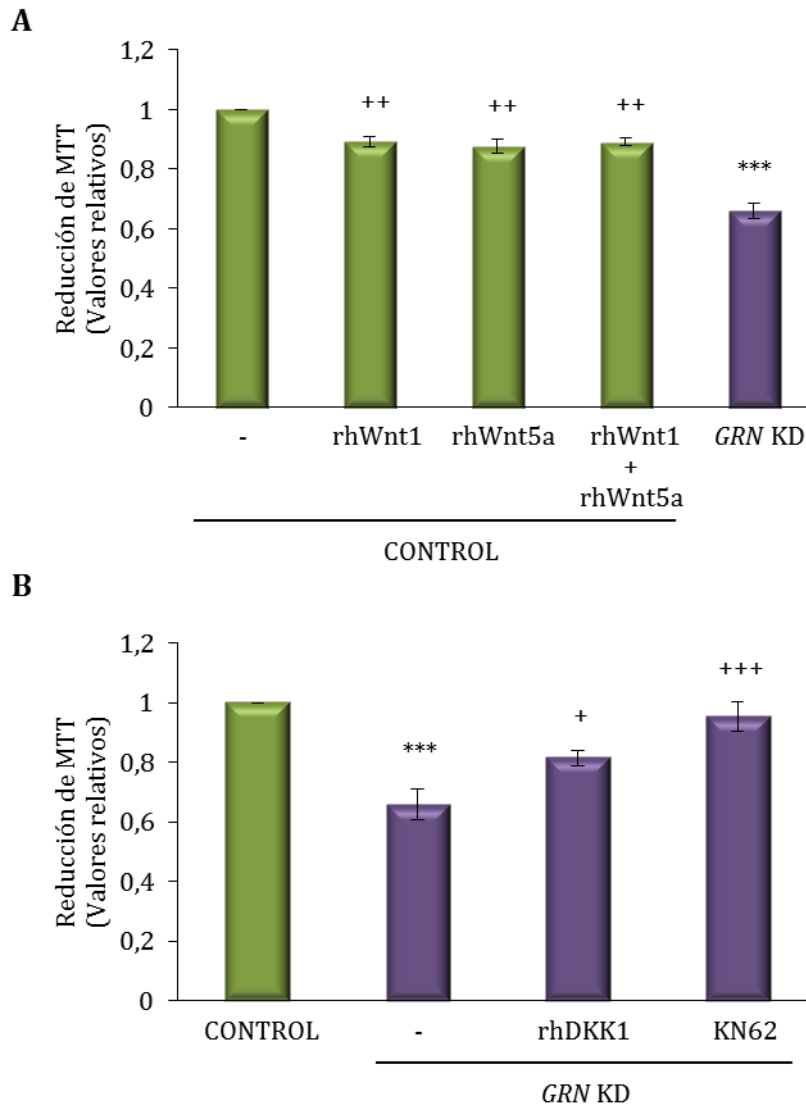


Figura 18: Efecto de los ligando y antagonistas de las vías de señalización Wnt en la viabilidad de las células control y *GRN* KD. Se sembraron en una placa de 96 pocillos unas 30.000 células por pocillo para determinar la viabilidad celular mediante MTT. (A) Las células controles fueron tratadas con rhWnt1 (0,1 µg/ml) y Wnt5a (0,05 µg/ml), solos y combinados. (B) Las células *GRN* KD fueron tratadas con el antagonista de la vía canónica de Wnt rhDKK (0,5 µg/ml) o el antagonista de la vía Wnt/Ca²⁺ KN-62 (1Mm). Los valores relativos representan la media ± EEM de cinco experimentos independientes. *** p<0,001 significativamente diferente a las células control; + p<0,05, ++ p<0,01 y +++ p<0,001 significativamente diferentes a las células sin tratar.

Todos estos resultados en conjunto sugieren que la deficiencia de PGRN induce la sobre activación de la señalización vía Wnt1/ β -catenina y Wnt5a/ Ca^{2+} , lo que conduce a una mayor incorporación de BrdU en el ADN, que en último término resulta en una disminución de la viabilidad neuronal.

Como ya vimos en experimentos anteriores, las células deficientes en PGRN presentaban niveles bajos de esta proteína en su medio de cultivo, y si sustituíamos este medio de cultivo por el medio condicionado (CM) de las células controles, que tenían niveles de PGRN normalizados, conseguíamos restaurar la viabilidad de las células *GRN* KD (Figura 12B). Sabiendo esto, para demostrar aún más la importancia del balance de las proteínas de Wnt y PGRN en el control de la supervivencia celular, tratamos a las células controles con el medio condicionado de las células *GRN* KD. Como podemos ver en la Figura 19A, la adición del CM de las células deficientes en PGRN a las células controles muestran una disminución de la viabilidad. Esta disminución de la viabilidad en las células controles podría deberse al aumento de los niveles de las proteínas Wnt1 y Wnt5a en el medio condicionado de las células *GRN* KD (Figura 19B).

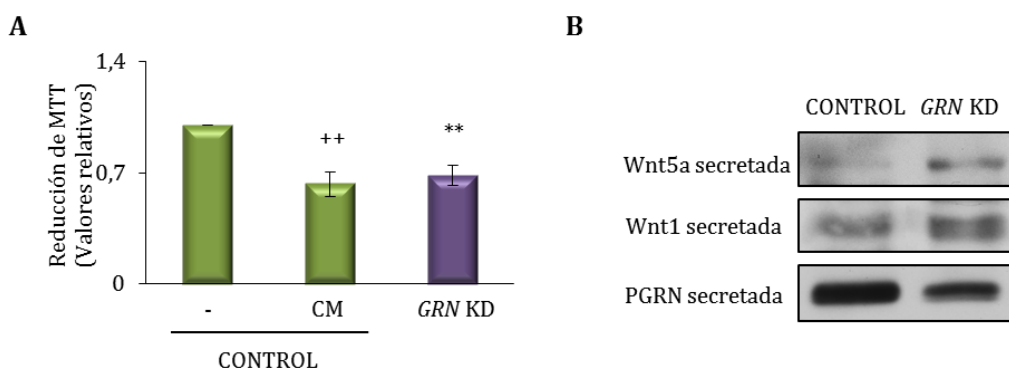


Figura 19: Efecto del medio condicionado de las células *GRN* KD sobre las células control SH-SY5Y en la viabilidad. (A) Las células controles fueron cultivadas durante 72 horas en ausencia o presencia del medio condicionado (CM) de las células *GRN* KD y se determinó la viabilidad mediante MTT. Los valores relativos representan la media \pm EEM de siete experimentos. ** $p < 0,01$ significativamente diferente a las células control; ++ $p < 0,01$ significativamente diferentes a las células sin tratar. (B) Se muestran Western blot representativos de los niveles de Wnt1, Wnt5a y PGRN secretadas al medio condicionado de las células *GRN* KD.

3. LA DEFICIENCIA DE PROGRANULINA REDUCE LA SUPERVIVENCIA DE LAS CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA SH-SY5Y HUMANAS

3.1. Vulnerabilidad de las células *GRN* KD ante un estrés

Para estudiar si la Progranulina (PGRN) protege a las células SH-SY5Y las sometimos a distintos tratamientos de estrés que se sabe que causan muerte celular, como son el agua oxigenada (H₂O₂), 2-deoxiRibosa (2dRib) [273, 274] o la retirada del suero.

Tabla 7

Respuesta de las células SH-SY5Y ante distintos tratamientos.

CONDICIONES	VIABILIDAD CELULAR (%)	
	CONTROL	<i>GRN</i> KD
H ₂ O ₂ (100 μM)	71 ± 1	73 ± 6
2dRib (30 mM)	19 ± 4	16 ± 4
Sin Suero	85 ± 7	38 ± 8**

Las células de neuroblastoma SH-SY5Y controles y *GRN* KD fueron sembradas a una concentración de 60.000 células por pocillo y se incubaron en DMEM sin suero durante 72h o con 10% de suero en presencia de H₂O₂ o 2dRib durante 24h. La viabilidad celular se determinó mediante ensayos de MTT y expresado en porcentaje. Los datos representan media ± EEM de cuatro experimentos distintos. ** p<0,01 significativamente diferente a las células control.

Como vemos en la Tabla 7 el H₂O₂ y la 2dRib producen la misma muerte en las células controles y las deficientes en PGRN. En contraste, el tratamiento con la retirada de suero produce una significativa disminución de la supervivencia de las células *GRN* KD con respecto las células controles, disminución que es constante a lo largo del tiempo (Figura 20).

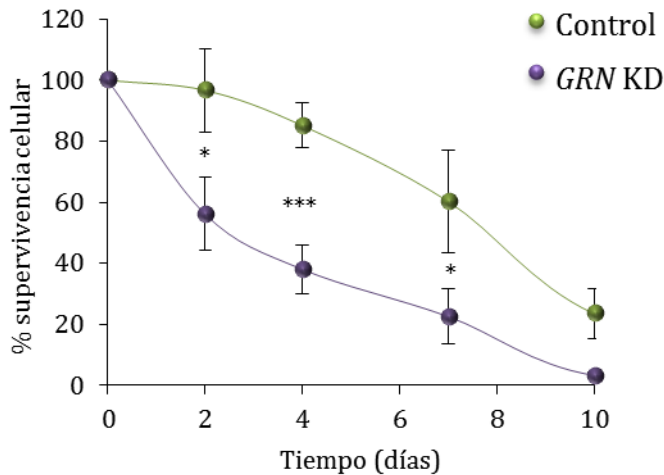


Figura 20: Las células SH-SY5Y deficientes en PGRN reducen su supervivencia ante la retirada del suero. Un total de 60.000 células se cultivaron en placas de 96 pocillos en DMEM sin suero durante el tiempo indicado. La viabilidad de las células *GRN KD* y las controles fue determinado mediante ensayos de MTT y expresado en porcentaje. Los datos representan la media \pm EEM de seis experimentos. * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$ significativamente diferente a las células control.

3.2. La PGRN extracelular protege a las células *GRN KD* de la retirada del suero

Para estudiar si la PGRN es capaz de proteger a las células *GRN KD* ante la retirada del suero, tratamos a las células deficientes con PGRN recombinante humana exógena (rhPGRN) durante tres días. En la Figura 21A vemos que la adición de rhPGRN llega a aumentar el porcentaje de supervivencia de las células deficientes en PGRN a niveles similares a los controles. Este efecto de la rhPGRN desapareció cuando se degradó previamente por elastasas (Figura 21A). Como se muestra en la Figura 21B, panel izquierdo, la incubación de rhPGRN con 0.1 U/ml de elastasas durante 3 horas fue suficiente para degradar completamente la PGRN. Además, se comprobó la estabilidad de la PGRN extracelular determinando los niveles de PGRN en el medio condicionado (CM) por las células controles en presencia y en ausencia de elastasas. Como se ve en el panel derecho de la Figura 21B, la PGRN parece ser bastante estable en el medio neuronal y, en contraste, la PGRN extracelular fue significativamente degradada por las elastasas exógenas.

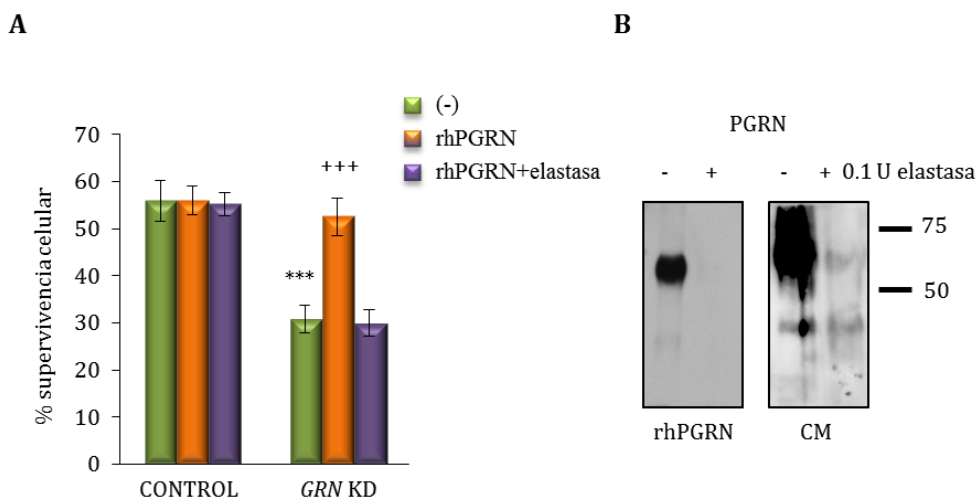


Figura 21: La progranulina exógena restaura la supervivencia de las células *GRN* KD. (A) 600.000 células controles y *GRN* KD fueron sembradas e incubadas en medio DMEM en ausencia de suero durante 72 horas y en presencia o ausencia de 100 ng/ml de progranulina recombinante humana (rhPGRN). El número de células fue determinado por el recuento de células vivas, excluyendo las células muertas teñidas con azul de Tripán, mediante un contador TC10™ Automated Cell Counter. Los valores representan la media \pm EEM de siete experimentos. *** $p < 0,001$ significativamente diferente a las células control. +++ $p < 0,001$ significativamente diferentes a las células *GRN* KD sin tratar. (B) La progranulina recombinante (100 ng/ml) fue incubada en ausencia y en presencia de 0,1 U/ml de elastasa durante 3 horas (panel izquierdo), y los niveles de PGRN fueron determinados por Western blot. También se determinaron los niveles de PGRN en el medio condicionado (CM) de las células tratadas con rhPGRN en ausencia o presencia de elastasa (panel derecho). Se muestra Western blot representativo.

Todos estos datos sugieren que el efecto pro-supervivencia de la rhPGRN añadida se debe principalmente a la proteína completa y no a los péptidos Granulina.

3.3. La retirada del suero produce apoptosis.

La muerte celular debida a la retirada del suero mostraba características apoptóticas. En primer lugar, el análisis por microscopía de fluorescencia de los núcleos de las células controles y *GRN* KD tratadas con DAPI, muestran la abundancia de acúmulos de cromatina condensada (Figura 22A, flechas) en los núcleos de las células *GRN* KD, típico de los núcleos picnóticos. Por otra parte, el análisis de la distribución de fluorescencia en las células *GRN* KD, tratadas con la sonda FLICA (Figura 22B), indica un aumento de la actividad de las caspasas

ejecutoras 3 y 7, ya que esta sonda se une irreversiblemente a estas enzimas cuando son activadas [275].

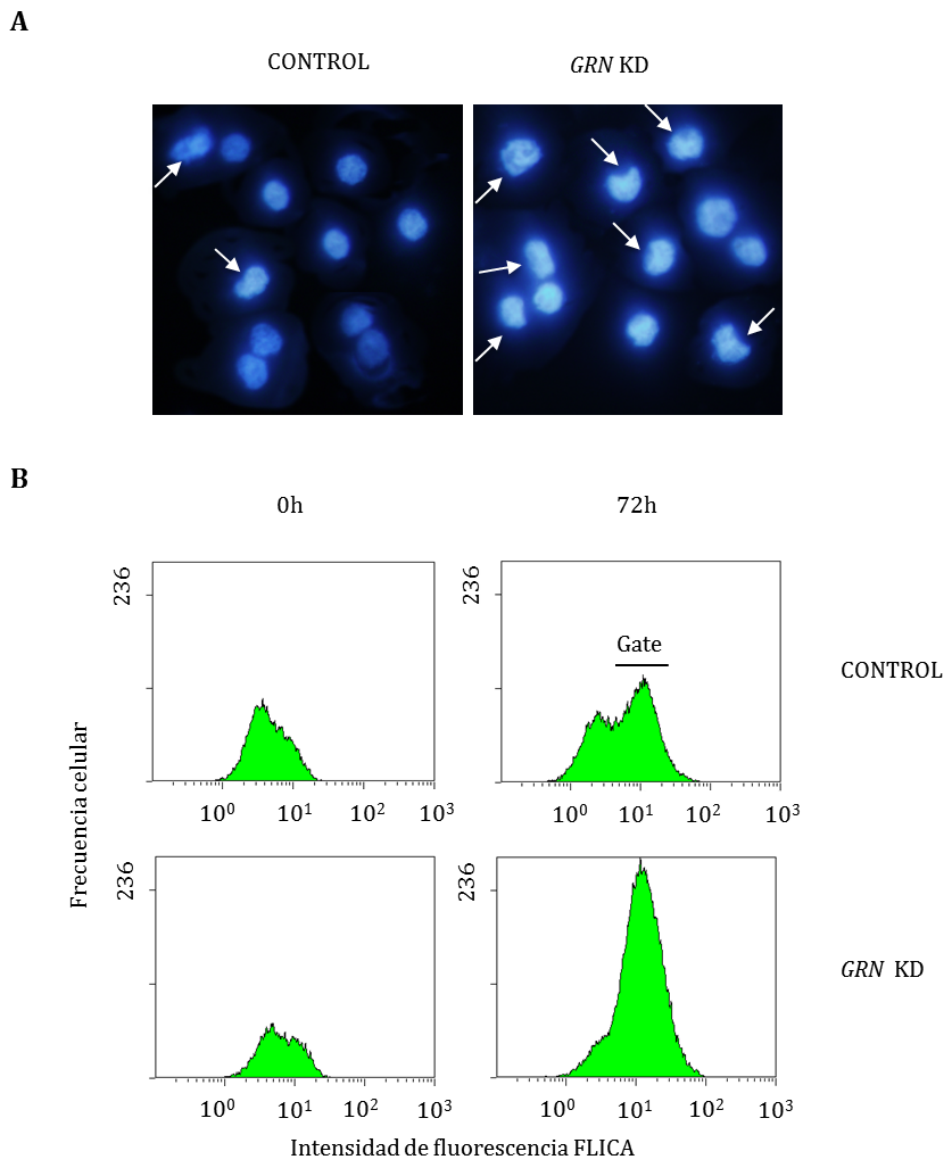


Figura 22: La deficiencia de progranulina sensibiliza a las células *GRN* KD a la apoptosis inducida por la retirada del suero. (A) Fotomicrografía representativa de las células controles y las *GRN* KD teñidas con 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), después de 72 horas deprivadas de suero. Las flechas muestran la presencia de condensación y fragmentación de la cromatina que indica apoptosis. (B) La activación de las caspasas por la retirada del suero en el medio DMEM de las células controles y *GRN* KD. Las células se incubaron del mismo modo que lo anterior y luego se marcaron con el reactivo FLICA, siguiendo las recomendaciones del fabricante, para detectar su unión a las caspasas 3 y 7 activas. Se muestran un análisis citométrico representativo de la distribución de la frecuencia de las células con respecto la fluorescencia verde del FLICA.

Además, se observó que la retirada del suero inducía una mayor liberación de citocromo c (Cyt c) al compartimento citosólico de las células deficientes en PGRN que en las células control (Figura 23).

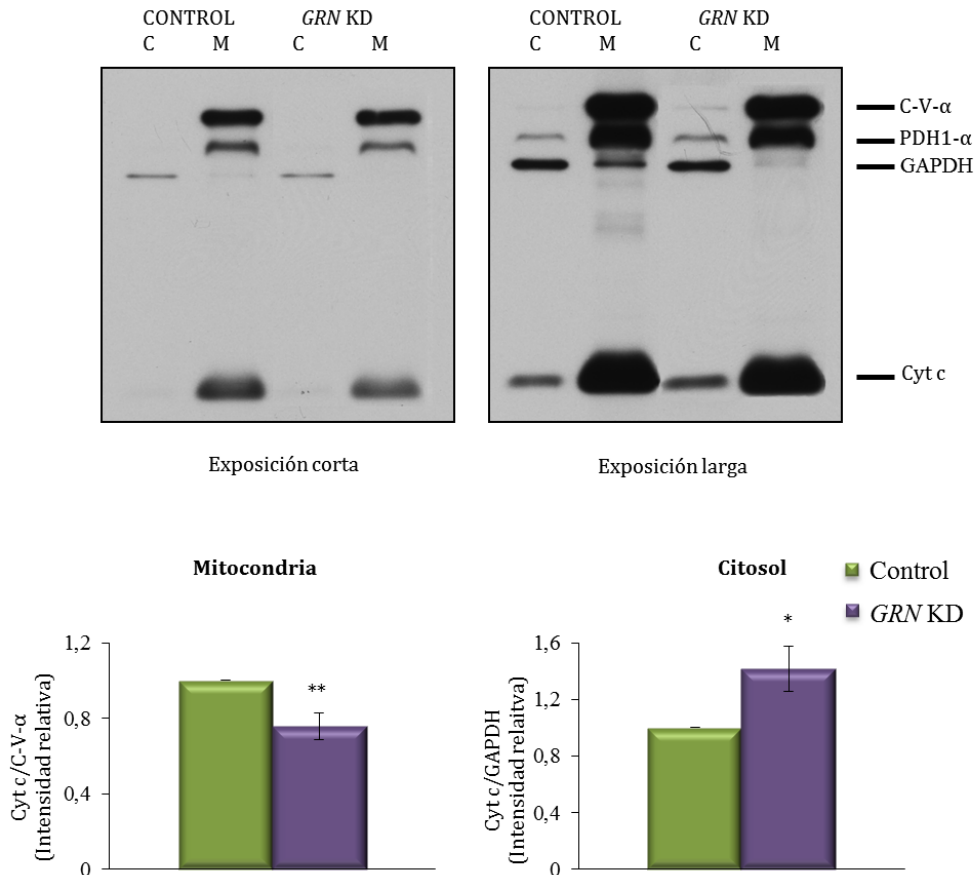


Figura 23: Liberación del citocromo c al citosol en las células GRN KD SH-SY5Y privadas de suero. Las células controles y GRNKD de neuroblastoma se privaron de suero durante 72 horas. Los lisados celulares se fraccionaron para aislar por un lado las mitocondrias y por otro el citosol. La presencia de citocromo c (Cyt c) en las fracciones citosólicas y mitocondriales se analizó por Western blot, usando un coctel de anticuerpos ApoTrack™, que demuestra la pureza de la carga de las fracciones. Se muestran Western blot representativos (parte superior). Los análisis densitométricos se representan debajo. Los datos representan la media ± EEM del citocromo c de las mitocondrias y del citosol para cuatro experimentos. * p<0,05 y ** p<0,01 significativamente diferente a las células control.

Estos datos sugieren que la retirada del suero provoca una activación de la vía intrínseca (activación mitocondrial).

3.4. Papel de la vía CDK4/6/pRb en la supervivencia celular

En nuestro laboratorio habíamos demostrado previamente que el déficit de PGRN alteraba la actividad quinasa CDK4/6 y la supervivencia de células periféricas de pacientes de DLFT-TDP [164]. Con estos antecedentes, creímos interesante evaluar la función de la vía CDK4/6/pRb en el control de supervivencia/muerte de las células de neuroblastoma SH-SY5Y *GRN* KD tras la retirada del suero.

Distintos análisis mediante Western blot revelaron un contenido significativamente más alto de las proteínas CDK4 y CDK6 en las células controles con respecto a las células *GRN* KD (Figura 24A). En consonancia con estos resultados, también pudimos observar un aumento en la actividad quinasa, reflejada por la mayor fosforilación de la proteína pRb (Figura 24A). Para investigar si los niveles de CDK4/6 determinan la capacidad de sobrevivir de las células *GRN* KD tras la retirada del suero, inhibimos la actividad CDK4/6 utilizando bien un inhibidor de histonas deacetilasas (HDAC) como el butirato de sodio (SB) que bloquea la expresión del ARNm de CDK4 y CDK6 o un inhibidor de la actividad quinasa de la CDK4 y CDK6 como la molécula PD332991 (Pfizer). En la Figura 24A se puede apreciar, como cabía esperar, que el tratamiento de las células controles con SB resulta en una disminución de los niveles de CDK4 y de CDK6, mientras que la adición de PD332991 no produce cambios significativos en el contenido celular de estas dos proteínas. Sin embargo, ambos compuestos son capaces de inhibir la actividad quinasa de CDK4 y CDK6 como se deduce de que los dos compuestos disminuyen considerablemente la fosforilación de la pRb (Figura 24A). En estas condiciones aumenta la vulnerabilidad de las células controles aproximándose a los valores de las células *GRN* KD (Figura 24B).

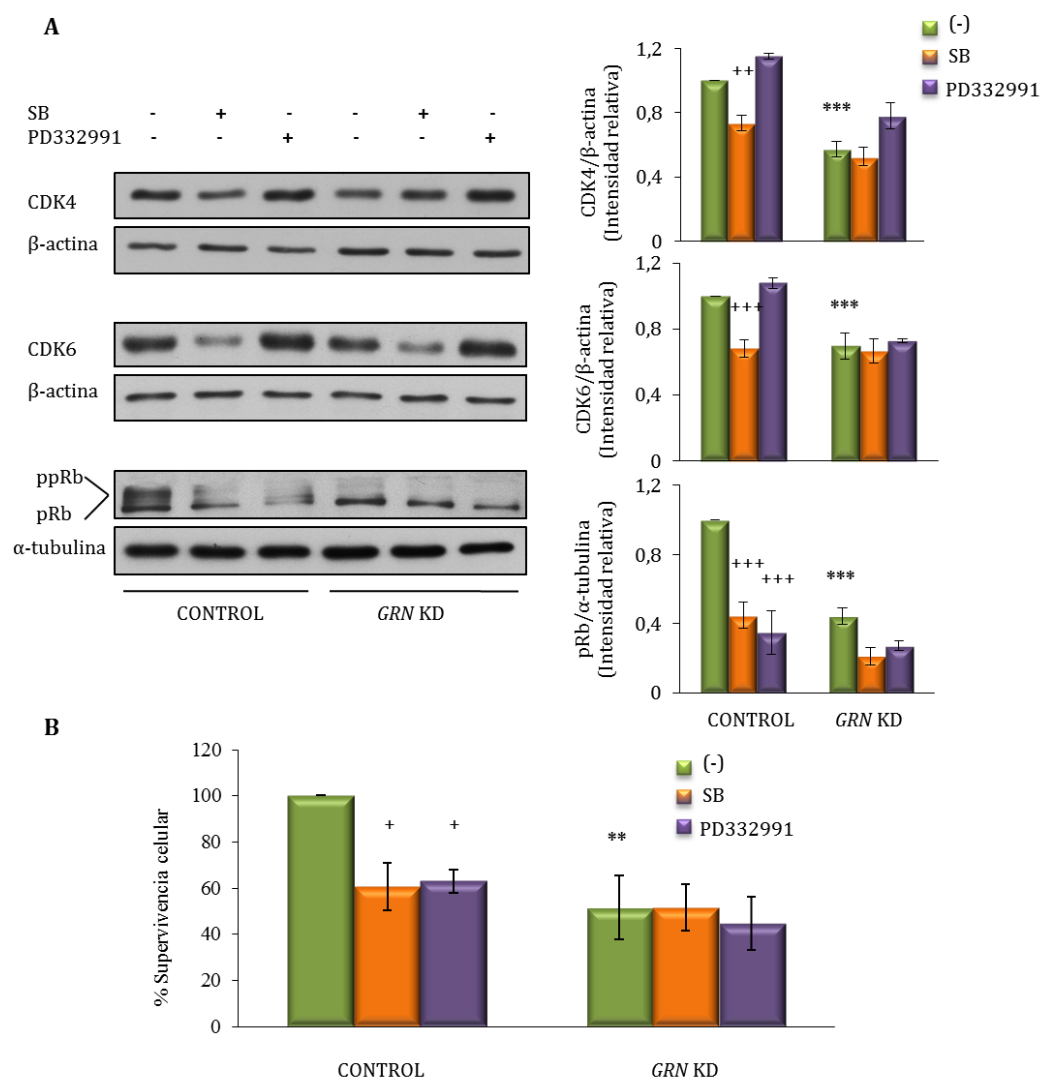


Figura 24: Efectos del butirato de sodio y PD332991 en los niveles de las proteínas CDK4/6, el estado de fosforilación de pRb y la supervivencia celular. (A) Las células controles y *GRN* KD fueron incubadas en ausencia de suero durante 72h y en ausencia o presencia de butirato de sodio (SB) a 10μM o PD332991 a 1μM. Se muestran Western blot representativos. Los análisis densitométricos están representados a la derecha. Los valores representan la media ± EEM de diez experimentos. *** p<0,001 significativamente diferente a las células control. ++ p<0,01 y +++ p<0,001 significativamente diferentes a las células sin tratar. (B) La supervivencia celular se determinó mediante ensayos de MTT y expresado en porcentaje. Los valores representan la media ± EEM de cuatro experimentos independientes. ** p<0,01 significativamente diferente a las células control. + p<0,05 significativamente diferentes a las células sin tratar.

3.5. Vías de señalización implicadas en la muerte por la de la retirada del suero

En muchos tipos celulares, el control de supervivencia/muerte depende de la actividad relativa de la vía de las MAP quinasas (Mitogen-activated protein kinase, MAPK) y de la vía de las fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) [276-278]. Como puede observarse en la Figura 25A la actividad de estas dos vías es mayor en las células controles con respecto las células *GRN* KD, ya que aumenta el estado de fosforilación de Akt y de ERK1/2. Se investigó la participación de estas vías de señalización en el control de supervivencia/muerte celular usando inhibidores farmacológicos específicos de cada vía de señalización. Por un lado, probamos los efectos de PD98059, inhibidor selectivo de MEK1/2, activador upstream de ERK1/2, y por otro lado probamos LY294002, inhibidor de la PI3K. En primer lugar, pudimos confirmar el efecto de estos inhibidores disminuyendo la fosforilación de las respectivas dianas de estas dos quinasas: LY294002 inhibe la fosforilación de Akt sin afectar a la fosforilación de ERK1/2, mientras que PD98059 disminuye la fosforilación de ERK1/2 sin modificar la fosforilación de Akt (Figura 25A). Como vemos en la Figura 25B, tanto LY294002 como PD98059 sensibilizaron a las células controles a la muerte inducida por la retirada del suero. Bajo estas condiciones experimentales, las células controles sufren apoptosis de igual forma que las células *GRN* KD. Estos hallazgos sugieren que la deficiencia de PGRN deteriora la activación de dos vías de supervivencia.

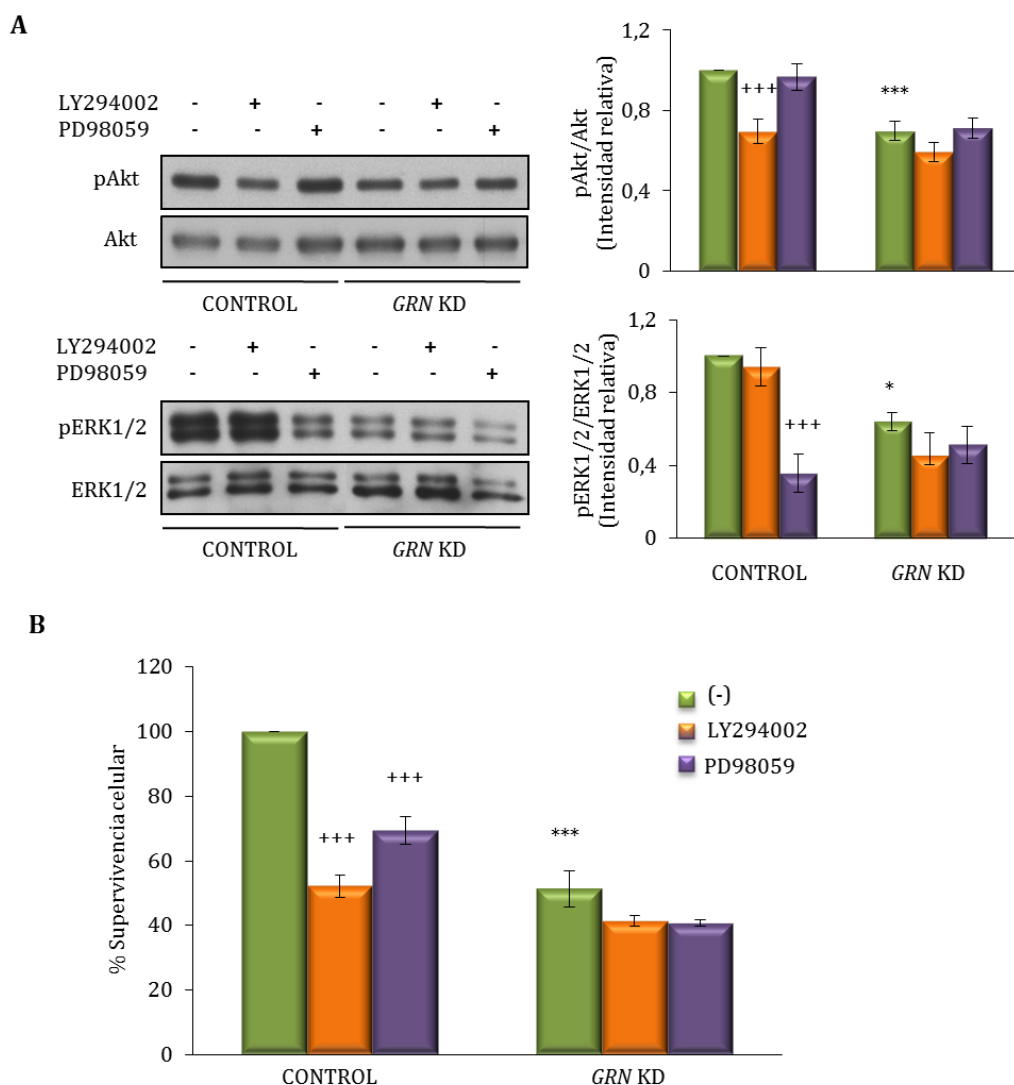


Figura 25: Efectos de los inhibidores de PI3K/Akt y MEK1/2 en la viabilidad celular en ausencia de suero. (A) Las células de neuroblastoma *GRN* KD y las controles fueron incubadas en ausencia de suero durante 24h y en ausencia o presencia de LY29294002 a 10 μ M o PD98059 a 20 μ M. Los valores relativos de la activación de ERK1/2 y Akt se evaluaron mediante análisis de Western blot con anticuerpos específicos de la fosforilación. Se muestran Western blot representativos. Los análisis densitométricos están representados a la derecha. Los valores representan la media \pm EEM de cinco experimentos. * p<0,05 y *** p<0,001 significativamente diferente a las células control. +++ p<0,001 significativamente diferentes a las células sin tratar. (B) Las células *GRN* KD y las controles fueron incubadas en ausencia de suero y en presencia y ausencia de los distintos inhibidores de la quinasas. La supervivencia celular se determinó mediante ensayos de MTT y expresado en porcentaje. Los valores representan la media \pm EEM de siete experimentos. *** p<0,001 significativamente diferente a las células control. +++ p<0,001 significativamente diferentes a las células sin tratar.

La inhibición de PI3K/Akt por LY294002, así como la inhibición de la fosforilación de ERK1/2 por PD98059 redujo los niveles de proteínas CDK4 y CDK6 en las

células control a los niveles encontrados en las células *GRN* KD (Figura 26). Ambos inhibidores también fueron efectivos en la disminución de la fosforilación de la proteína pRb (Figura 26).

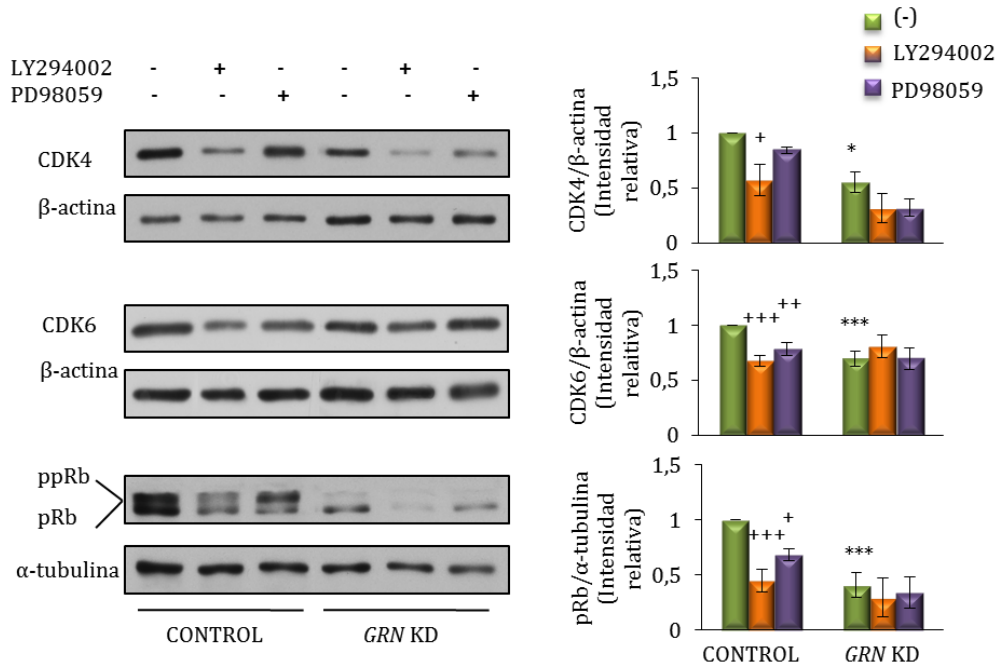


Figura 26: Efectos de los inhibidores de PI3K/Akt y MEK1/2 en los niveles de CDK4/6 y la fosforilación de pRb en la células control y *GRN* KD. Las células SH-SY5Y *GRN* KD y controles fueron incubadas en ausencia de suero durante 72 h y en ausencia o presencia de LY29294002 a 10μM o PD98059 a 20 μM. Los niveles de CDK4, CDK6 y pRb se evaluaron mediante análisis de Western blot con anticuerpos específicos. Se muestran Western blot representativos. Los análisis densitométricos están representados a la derecha. Los valores representan la media ± EEM de cinco a diez experimentos. * p<0,05 y *** p<0,001 significativamente diferente a las células control. + p<0,05, ++ p<0,01 y +++ p<0,001 significativamente diferentes a las células sin tratar.

Todos estos datos sugieren que el destino celular (supervivencia o muerte) está controlado por la actividad CDK4/6/pRb, que parece estar a su vez influenciado por las vías de señalización PI3K/Akt y ERK1/2.

3.6. La PGRN exógena normaliza la actividad de PI3K/Akt y de ERK1/2 en las células *GRN* KD

Evaluamos a continuación si la adicción de rhPGRN al medio de cultivo de las células era capaz de incrementar la actividad de PI3K/Akt y ERK1/2. Como se muestra en la Figura 25A, rhPGRN fue capaz de restaurar el estado de fosforilación de ambos, Akt y ERK1/2, en las células deficientes en PGRN. Además, se demuestra que rhPGRN también normaliza los niveles de las proteínas CDK4 y CDK6 y la fosforilación de pRb en las células deficientes en PGRN, alcanzando niveles parecidos a los de las células controles (Figura 27B).

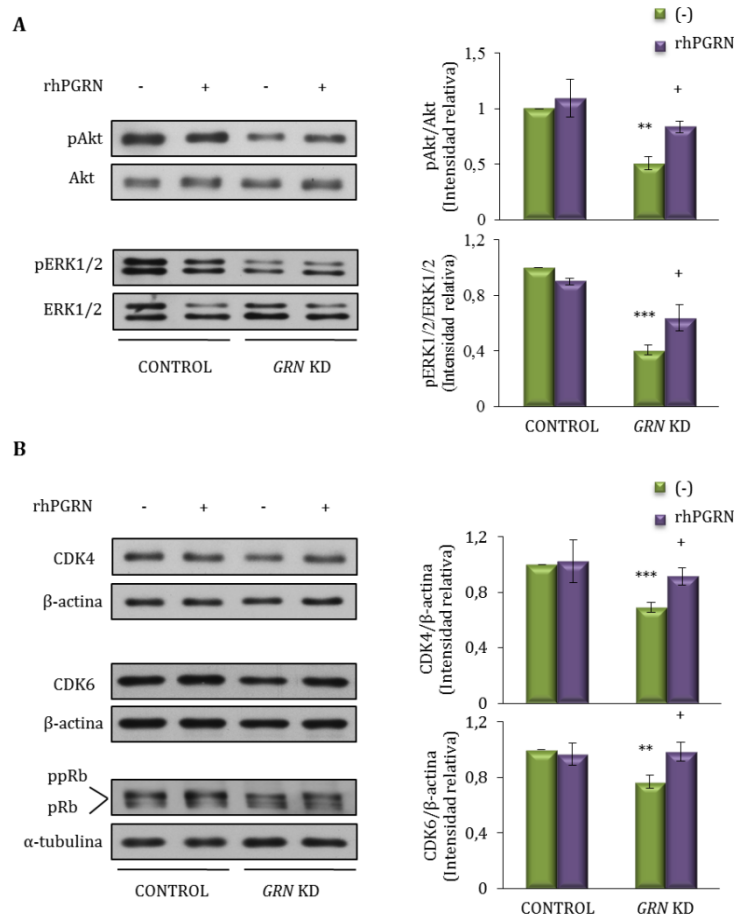


Figura 27: Efectos de rhPGRN en las vías PI3K/Akt, ERK1/2 y CDK4/6/pRb. Las células controles y *GRN* KD se incubaron en ausencia de suero durante 24 h y en ausencia o presencia de progranulina recombinante (rhPGRN) a 100 ng/ml. (A) Los Western blot representativos de Akt y ERK1/2 están a la izquierda, mientras que los análisis densitométricos están representados en las gráficas de la derecha. Los valores representan la media \pm EEM de cinco a diez experimentos. (B) Se muestran Western blot representativos del efecto de rhPGRN en los niveles de CDK4 y CDK6 y en el estado de fosforilación de pRb (a la izquierda). Los valores representan la media \pm EEM de cinco a diez experimentos. ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ significativamente diferente a las células control. + $p < 0,05$ significativamente diferentes a las células sin tratar.

3.7. Efectos de EGF y de la insulina en la supervivencia de las células neurales *GRN* KD

Ya que la deficiencia de PGRN parece resultar en una disminución de la actividad de PI3K/Akt y ERK1/2, hemos tratado de evaluar si las células *GRN* KD podrían ser rescatadas de la muerte inducida por la retirada del suero, en presencia de otros activadores fisiológicamente relevantes de estas vías de señalización, tales como EGF (factor de crecimiento) o la insulina [279, 280]. Como era de esperar, tanto EGF como la insulina incrementaron los niveles de la fosforilación de Akt y ERK1/2 (Figura 28 panel de arriba). En estas condiciones, las células *GRN* KD fueron capaces de sobrevivir en ausencia de suero, a niveles semejantes a los de las células controles (Figura 28 panel de abajo).

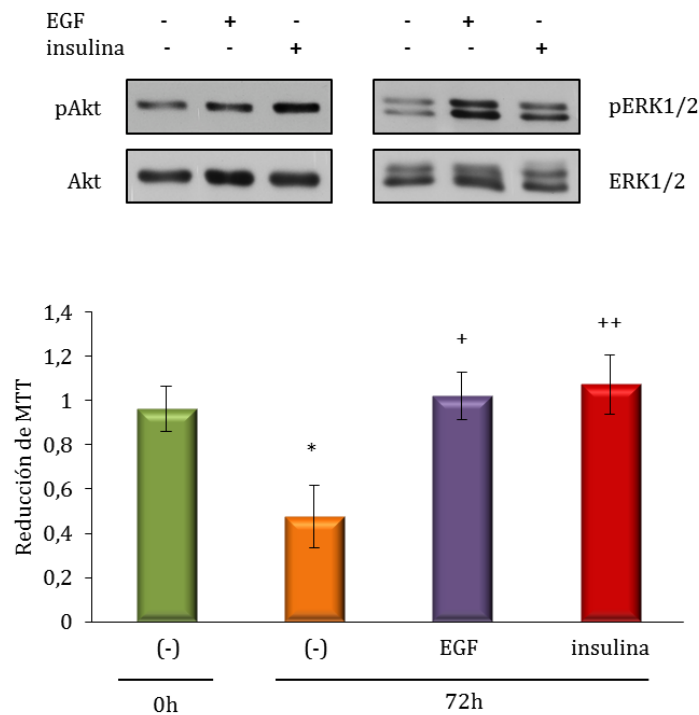


Figura 28: Efectos de EGF y la insulina en la supervivencia de células de neuroblastoma SH-SY5Y *GRN* KD. Las células *GRN* KD se incubaron en ausencia de suero durante 72 h y en ausencia o presencia de EGF (factor de crecimiento) a 100 ng/ml o insulina a 100 nM. Los extractos celulares se prepararon tras 24 h de la adición del factor de crecimiento y la insulina. En el panel de arriba se muestran Western blot representativos del efecto de EGF y la insulina en los niveles de pAkt y pERK1/2. En el panel de abajo vemos la viabilidad celular en ausencia de suero tras 72 h de la adición de EGF y la insulina, medido por la reducción de MTT. Los valores representan la media \pm EEM de tres experimentos llevados a cabo por triplicado. * $p < 0,05$ significativamente diferente a las 0h. + $p < 0,05$ y ++ $p < 0,01$ significativamente diferentes a las células sin tratar.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

1. CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA SH-SY5Y COMO MODELO DE ESTUDIO DE LA DLFT-TDP

Esta tesis ha tenido como objetivo fundamental elucidar los mecanismos moleculares implicados en la muerte neuronal, inducida por el déficit de progranulina en el cerebro de pacientes de DLFT-TDP.

1.1. Caracterización de la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y

En este trabajo hemos utilizado como modelo experimental una línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y, en la que se ha silenciado parcialmente el gen *GRN*, con objeto de reproducir la haploinsuficiencia de PGRN, característica de los pacientes de DLFT portadores de mutaciones en *GRN*, [14, 15]. Estas células fueron donadas por los Drs. Wu y Joselin de la Universidad de Northwestern, EEUU. Pudimos comprobar la eficiencia del silenciamiento parcial de *GRN*, observando una reducción de aproximadamente el 50% en el ARN mensajero y en los niveles de la proteína PGRN. También hemos podido demostrar alteraciones significativas en el procesamiento de la proteína TDP-43. Así por ejemplo, hemos encontrado que hay un aumento pequeño, aunque significativo de fosforilación de TDP-43 en las células *GRN* KD. Esta proteína es fosforilada en los residuos Ser409/Ser410 en el extremo C-terminal, sufriendo después la fragmentación de la molécula, como se aprecia mediante Western blot usando un anticuerpo anti-fosfo-TDP-43. En nuestras condiciones experimentales, aparecen fragmentos de menor tamaño que la TDP-43 completa, observando un aumento considerable en la fosforilación de un fragmento de aproximadamente 25-30 KDa en las células *GRN* KD. Este fragmento contiene el extremo C-terminal de TDP-43, ya que su tamaño coincide con la banda que aparece cuando se utiliza un anticuerpo contra el extremo C-terminal de la proteína. Alteraciones similares han sido descritas en el cerebro e pacientes de DLFT y ELA [16].

La pérdida de neuronas en los lóbulos frontal y temporal del cerebro de pacientes es un signo neuropatológico de la DLFT [9, 88]. Hemos podido demostrar que la disminución en los niveles de PGRN se asocia con una disminución en la viabilidad celular de las células SH-SY5Y *GRN* KD y que se puede rescatar el fenotipo normal añadiendo Progranulina recombinante (rhPGRN) al medio de cultivo. Los mismos resultados se obtuvieron al añadir el medio condicionado de las células control, que presentaban mayores niveles de PGRN exógena, a las células *GRN* KD.

En conjunto estas observaciones indican que las células *GRN* KD recapitulan las características patológicas más importantes de la DLFT, la deficiencia de PGRN, la hiperfosforilación de TDP-43 y la mayor vulnerabilidad neuronal, y por tanto pueden considerarse un buen modelo experimental para el estudio de la DLFT-TDP.

1.2. Neurodegeneración en la DLFT-TDP y disfunción mitocondrial

Los mecanismos que relacionan los niveles reducidos de PGRN con la pérdida neuronal en la DLFT-TDP aún son desconocidos. Sabemos que la PGRN desempeña un papel importante en el mantenimiento de la supervivencia celular [45], además de regular funciones celulares como la inflamación, cáncer o migración celular [94]. Estudios recientes nos indican una relación entre la pérdida neuronal y la muerte por apoptosis en modelos celulares con deficiencia en PGRN [164] que muestran una activación de la vía apoptótica activada posiblemente por una disfunción mitocondrial. Esta disfunción mitocondrial asociada a la pérdida neuronal ya ha sido estudiada en otras enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer o Parkinson [123, 138, 281].

En base a éstos antecedente, creímos de interés elucidar si la deficiencia de PGRN resulta en alteraciones mitocondriales que pudieran dar cuenta de la mayor vulnerabilidad de las células *GRN* KD. Nuestros resultados demuestran una disminución apreciable en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), que es considerado un índice de la calidad de la función mitocondrial ya que refleja el bombeo de protones a través de la membrana interna de la mitocondria, durante el proceso del transporte de electrones a través de la cadena respiratoria, para

producir ATP [282, 283]. Nuestros resultados están de acuerdo con trabajos previos que mostraban la despolarización de la membrana mitocondrial en modelos celulares de TDP-43 [284, 285].

El análisis comparativo de la bioenergética de células controles y *GRN* KD reveló una menor tasa basal de consumo de oxígeno (OCR) en las células deficientes en PGRN, que se acentúa cuando se fuerza a las células a incrementar la producción de ATP. Paralelamente observamos también una disminución en la actividad de la glucólisis. Esa última observación contrasta con otros trabajos en los que se reporta que la disminución de la producción mitocondrial de ATP se compensa aumentando la generación de energía en la glucólisis [140, 260, 286]. No obstante, también se ha descrito la disminución en la actividad de ambos procesos en células de pacientes de EA [287]. Por otro lado cabe señalar que el hipometabolismo de glucosa es una característica común en las enfermedades neurodegenerativas [288, 289]. Por lo tanto, podemos concluir que las células *GRN* KD muestran también esta particularidad.

Otro hallazgo de interés fue que la máxima respiración mitocondrial, que viene dada por la tasa de consumo de oxígeno tras la administración de FCCP, es mucho menor en las células *GRN* KD que en las controles. También disminuye la producción mitocondrial de ATP en las células *GRN* KD. Este parámetro se puede estimar por la diferencia entre la tasa de consumo de oxígeno en condiciones basales y la que se observa tras inhibir la ATP sintasa con oligomicina. Curiosamente, la eficacia del acoplamiento mitocondrial no parece diferir entre las células control y *GRN* KD, ya que la fracción de oxígeno consumido ligado a la producción de ATP es la misma en ambos tipos celulares. Nuestros resultados mostraron una disminución importante en la llamada capacidad respiratoria de reserva, que es un índice de la capacidad que tiene la célula para responder a situaciones que demanden una mayor producción de energía. Este parámetro se determina por la diferencia entre la tasa de respiración máxima y la basal. Las células *GRN* KD tienen una capacidad de reserva muy limitada, lo que compromete su supervivencia en situaciones de estrés.

Estas alteraciones en la función mitocondrial se acompaña de un aumento en la masa mitocondrial. Esta observación podría indicar la existencia de un mecanismo para compensar la disminución en la capacidad de generar energía, como se ha sugerido en otras enfermedades neurodegenerativas [136]. También cabe la posibilidad de que disminuya la mitofagia en las células *GRN* KD y no se eliminen de forma eficiente mitocondrias defectuosas. La proteína completa TDP-43, así como los fragmentos C-terminales que resultan de la hidrólisis y que frecuentemente se encuentran hiperfosforilados parecen activar la mitofagia en la línea celular NSC34 [290]. Serán necesarios más experimentos para elucidar si el déficit de PGRN y/o el procesamiento anómalo de TDP-43 producen un cambio entre el equilibrio entre biogénesis mitocondrial y mitofagia.

La disfunción mitocondrial observada en las células *GRN* KD se acompaña con un aumento considerable en la generación de ROS. Estas especies reactivas de ROS provocan un daño oxidativo irreversible que puede contribuir a la neurodegeneración en la DLFT, como ocurre en otras enfermedades neurodegenerativas [291, 292]. Recientemente se ha descrito la asociación entre disfunción mitocondrial, niveles elevados de ROS y aumento de la vulnerabilidad celular en neurona derivadas de pacientes de DLFT-tau [260].

En conjunto, nuestros resultados mostrando alteraciones en la bioenergética y dinámica mitocondrial, podrían explicar, al menos en parte, la mayor vulnerabilidad de las neuronas deficientes en PGRN y por tanto la disfunción mitocondrial podría jugar un papel relevante en la patogénesis de la DLFT-TDP.

2. MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DE SUPERVIVENCIA/MUERTE DE LAS CÉLULAS SH-SY5Y *GRN* KD

2.1. Relación entre la deficiencia en PGRN y ciclo celular/apoptosis

En este trabajo se ha planteado la hipótesis de que alteraciones en el ciclo celular pudieran ser importantes en la patogénesis de la DLFT-TDP. Estudios anteriores sugieren que una activación aberrante del ciclo celular en las neuronas postmitóticas puede contribuir a la muerte celular y neurodegeneración [144, 149, 264]. Resultados previos de nuestro laboratorio utilizando células de pacientes de DLFT, portadores de una mutación en *GRN*, demostraron la existencia de alteraciones significativas en el control del ciclo celular y apoptosis [165, 170], en consonancia con el hecho de que las enfermedades neurodegenerativas presenten también manifestaciones a nivel sistémico, y demostrando que los fallos en el control del ciclo celular no son exclusivos de las neuronas post-mitóticas.

Hemos intentado estudiar la relación entre re-activación del ciclo celular y el proceso de apoptosis en las células *GRN* KD. Nuestros resultados muestran una mayor tasa de incorporación de BrdU en el ADN en las células *GRN* KD, que se acompaña de un aumento en los niveles de fosforilación de las proteínas de la familia de la pRb, lo que sugiere una alteración en la transición de la fase G1 a S en el ciclo celular. La pRb es fosforilada secuencialmente por dos sistemas de proteínas quinasas, los complejos ciclina D/CDK4/6 y ciclina E/CDK2 [293]. La mayor actividad de estas quinasas en las células *GRN* KD se debe a diferencias en los niveles de expresión de las ciclinas D1, D3 y E, sin que se hayan encontrado cambios significativos en las quinasas CDK4/6 y CDK2, entre ambos tipos de células. A pesar de la activación del ciclo, la viabilidad de las células *GRN* KD disminuye. Esto, y el hallazgo de un menor balance entre proteínas pro- y anti-apoptóticas, de Bcl-xL/Bax y Bcl-xL/Bax en células *GRN* KD, parece indicar que la estimulación de una entrada en ciclo aberrante puede provocar muerte por apoptosis. Estos resultados están de acuerdo con trabajos de otros autores que demostraban un efecto anti-apoptótico de PGRN en neuronas corticales [160, 294].

La relación inversa que parece existir entre activación del ciclo celular y muerte también se produce en células *GRN* KD diferenciadas a neuronas adultas mediante el tratamiento con ácido retinoico y BDNF.

En resumen, nuestros resultados indican que el déficit de PGRN aumenta la vulnerabilidad de las células neuronales, y que este fenómeno está asociado con alteraciones en la regulación del ciclo celular. Nuestros resultados sugieren que en la DLFT, como en otras enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer o ELA [150, 295-297], la entrada en ciclo celular de neuronas diferenciadas pudiera ser importante en la patogénesis de la enfermedad. Por tanto, la restauración de los niveles de PGRN o impedir la activación del ciclo celular podría ser importante en el diseño de nuevas estrategias terapéuticas. En relación a esta idea, cabe señalar que hemos podido comprobar en nuestro laboratorio que la adición exógena de rhPGRN, o drogas que son capaces de aumentar el contenido celular de PGRN como SAHA o cloroquina (CQ) son capaces de normalizar la tasa de incorporación de BrdU y la viabilidad en células deficientes en PGRN [113].

2.2. Relación entre la deficiencia en PGRN y las vías de señalización canónica y no canónica de Wnt

Hemos considerado la posibilidad de que alteraciones en la vía de señalización Wnt, inducidas por el déficit de PGRN, pudieran jugar un papel relevante en el control de supervivencia/muerte en la DLFT-TDP. Nos basamos en estudios previos en los que el análisis genómico funcional desveló la existencia de una desregulación de la señalización vía Wnt inducida por deficiencia en PGRN [114], estableciendo una relación entre la cascada de Wnt y la DLFT [298]. Además, resultados previos de nuestro laboratorio demostraron la sobreexpresión de la vía Wnt5a en linfocitos inmortalizados de individuos portadores de mutación en *GRN* causante de pérdida de función de la proteína [269]. Se han descrito alteraciones en la vía Wnt en varios trastornos neurodegenerativos [299-303] y además, en varios estudios se ha demostrado que estas vías de señalización de Wnt protegen a las neuronas de lesiones neurotóxicas [304].

En este trabajo hemos detectado un aumento de activación tanto de la vía no canónica como la vía canónica en las células deficientes en PGRN. Hemos observado un aumento de expresión de las proteínas de Wnt1 y de Wnt5a en las células *GRN* KD, así como la fosforilación alterada de las principales moléculas de señalización de las respectivas vías de Wnt. El aumento de la actividad proliferativa de las células *GRN* KD parece ser consecuencia de la activación anómala de la vía de señalización de Wnt.

En primer lugar, la adicción de rhWnt1 o rhWnt5a exógenas solos o en combinación en las células controles aumentó la velocidad de incorporación de BrdU en el ADN hasta valores encontrados en las células SH-SY5Y *GRN* KD. A la inversa, el bloqueo de las cascadas de Wnt con inhibidores específicos de la vía Wnt/ β -catenina o Wnt/ Ca^{2+} normalizó la velocidad de síntesis del ADN de las células deficientes en PGRN, restaurando, además la viabilidad celular asociada al déficit de PGRN. La activación de una sola de las cascadas de señalización (Wnt1/ β -catenina o Wnt5a/ Ca^{2+}) es suficiente para estimular la tasa de incorporación de BrdU en el ADN y disminuir la viabilidad celular de las células *GRN* KD ya que no se encontraron efectos aditivos cuando las células se estimularon con rhWnt1 y rhWnt5a simultáneamente. Lo más probable es que la señalización a través de las vías canónicas y no canónicas de Wnt, conduzca en último término a la estimulación de las proteínas reguladoras del ciclo celular aumentando la fosforilación de las proteínas de la familia pRb. Estos datos están en consonancia con el papel que juega Wnt en la proliferación celular. Así se puede encontrar en la literatura un gran número de estudios que sugieren que la señalización de Wnt juega un papel crítico en varios tumores sólidos y neoplasias hematológicas [305-307].

En la vía de señalización canónica de Wnt, la proteína axina, APC (del inglés *adenomatous polyposis coli*), y GSK3 β forman un complejo de degradación que regula la actividad de Wnt a través de la fosforilación de β -catenina. La activación de Wnt1 inhibe la actividad de GSK3 β permitiendo la estabilización de β -catenina, promoviendo su transporte al núcleo, dónde impulsa la transcripción de varios genes diana como la ciclina D1 y c-myc [308]. Por su parte, la señalización a través

de la ruta no-canónica depende de Ca^{2+} y de PKC, produciendo la activación de Calmodulina Quinasa II y la activación de factores de transcripción como el NFAT1 [270]. La Imagen muestra esquemáticamente la señalización a través de Wnt.

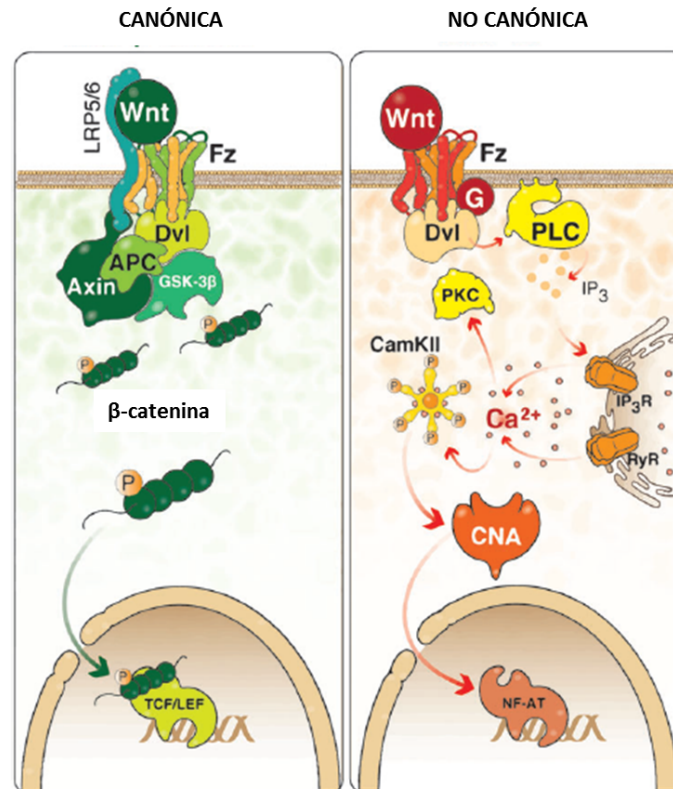


Imagen 12: Vías principales de señalización de Wnt. En la vía canónica (panel izquierdo), un ligando Wnt se une al receptor Fz (Frizzled) y al co-receptor LRP5/6 activando a la proteína Dvl (Dishevelled). Esta activación separa la unión de β-catenina a GSK-3β, haciendo que la β-catenina se acumule en el citosol y se trasloque al núcleo. GSK-3β cuando se une a la β-catenina y la fosforila inactivándola y haciendo que se degrade en el proteasoma. La β-catenina en el núcleo interacciona con los factores de transcripción TCF/LEF. En la vía no canónica (panel derecho) la unión de Wnt a Fz permite la activación de la proteína trimérica G y la PLC (fosfolipasa C), aumentando a su vez DAG (diacylglycerol) e IP₃ (inositol trifosfato). IP₃ induce la liberación del Ca^{2+} intracelular, induciendo a su vez la activación de CamKII y calcineurina (CNA) que regulan la expresión del factor de transcripción NAFT. Adaptado de [8].

Nuestros datos indican que la vía de señalización a través de Wnt/β-catenina está sobre-activada en las células SH-SY5Y GRN KD. Esto se basa en el hallazgo de una expresión incrementada de los niveles de proteína Wnt1, β-catenina nuclear y ciclina D1 en células GRN KD. Asimismo las evidencias de la sobre-activación de la cascada Wnt/ Ca^{2+} en las células GRN KD son un aumento en los niveles de Wnt5a y la activación de CamKII [269] y la activación del factor NFAT1, como se describe en esta tesis.

La acumulación nuclear de β -catenina, incrementando la transcripción de ciclina D1, aumentando los niveles de esta proteína y la fosforilación de pRb, podría explicar el aumento de la síntesis de ADN observado tanto en las células deficientes en PGRN como en las células controles estimuladas con rhWnt1.

El papel de Wnt5a en la proliferación celular parece ser más complejo, ya que se han descrito tanto efectos estimulantes como inhibitorios [309, 310]. Nuestros resultados sugieren que la sobre-activación de Wnt/ Ca^{2+} en células *GRN* KD también produce un aumento en la fosforilación de pRb. Este hecho también se observa tras la estimulación de las células controles con el ligando Wnt5a. Estas observaciones están en consonancia con un trabajo previo de nuestro laboratorio en el que describimos que Wnt5a señala a través de G_i -PLC-PKC-ERK1/2-pRb, aumentando la proliferación de linfocitos inmortalizados humanos, y se demostró que esta cascada está sobre-activada en los linfoblastos portadores de la mutación nula para *GRN* c.709-1G>A [269].

Por otro lado, es importante señalar que la sobre-activación de las rutas Wnt/ β -catenina y Wnt/ Ca^{2+} en las células *GRN* KD, aumentando la síntesis de ADN en células *GRN* KD se acompaña de la pérdida de viabilidad celular. Nuestros resultados indican que la inhibición de la vía canónica de Wnt por la proteína DKK1 y de Wnt/ Ca^{2+} por KN-62 aumenta la viabilidad de las células *GRN* KD, mientras que, la activación de estas vías por la adición de los ligandos correspondientes a las células controles disminuye su viabilidad. Es decir, existe una relación inversa entre viabilidad celular, déficit de PGRN y activación de la señalización Wnt que puede deberse a que los niveles de Wnt1 y Wnt5a secretadas por las células controles y *GRN* KD correlacionan inversamente con los niveles celulares y secretados de PGRN por estas células.

En resumen, nuestros resultados que indican una sobre-activación de la señalización a través de Wnt, asociada con un aumento de la vulnerabilidad celular, y mediada por la estimulación del ciclo celular sugiere por un lado, que la reactivación del ciclo celular en neuronas tiene consecuencias letales para las neuronas, y por otro lado, que la perturbación de la interacción entre PGRN y los

ligandos Wnts, producida en condiciones de déficit de PGRN, puede jugar un papel importante en la patogénesis de la DLFT-TDP como se ha sugerido para otros trastornos neurodegenerativos como el Alzheimer, ELA y la enfermedad de Parkinson [299, 301-303].

Los resultados que aquí se discuten y los trabajos previos de nuestro laboratorio, que desvelaron alteraciones en la señalización vía Wnt y proliferación de linfocitos de pacientes de DFTL-TDP, portadores de una mutación en GRN que produce haploinsuficiencia [113, 269], permiten pensar que la modulación farmacológica de estas cascadas de señalización podría ser una estrategia interesante para el diseño de nuevos tratamientos que pudiesen modificar el curso de la enfermedad. No obstante, se necesitan más estudios en modelos animales con deficiencia en PGRN o en neuronas derivadas de células iPSC de pacientes para confirmar el papel patogénico de la sobre activación de Wnt en la DLFT y su potencial como diana terapéutica.

3. INFLUENCIA DE LA DEFICIENCIA DE PROGRANULINA EN LA SUPERVIVENCIA DE LAS CÉLULAS SH-SY5Y *GRN* KD

3.1. Efecto de la Progranulina en la muerte celular

Con objeto de profundizar en el papel que juega la deficiencia de PGRN en el destino celular, supervivencia/muerte, se realizó un estudio comparativo de la respuesta de células controles y *GRN* KD ante diferentes situaciones de estrés como la adición de H₂O₂, 2-deoxiRibosa (2dRib) o la retirada del suero del medio de incubación. Los dos primeros inductores de estrés causan una importante disminución de la viabilidad celular sin que se aprecien diferencias en la magnitud de la respuesta entre las células control y *GRN* KD. Sin embargo, las células *GRN* KD son mucho más susceptibles a la muerte que produce la retirada del suero. La retirada del suero induce la activación de la vía intrínseca de apoptosis en las células *GRN* KD, ya que pudimos demostrar un aumento en la liberación de citocromo c desde la mitocondria que se acompaña de la estimulación de las caspasas ejecutoras 3 y 7.

La adición de PGRN recombinante protege a las células *GRN* KD de la muerte inducida por la retirada del suero, lo que sugiere que la PGRN actúa principalmente a través de receptores de superficie. Aparentemente es la proteína completa y no las granulinas resultantes de su degradación la que juega este papel protector. En un trabajo previo del laboratorio, pudimos también comprobar que el aumento en los niveles de PGRN, mediante el uso de agentes farmacológicos como SAHA (ácido suberoilánidido hidroxámico o Vorinostat), o cloroquina (CQ), restauraba la respuesta normal de las células *GRN* KD [113]. Estos compuestos actúan regulando la transcripción o modificando post-trasduccionalmente la proteína, respectivamente [219, 220].

3.2. Mecanismos moleculares implicados en la supervivencia celular ante la retirada del suero

De acuerdo con estudios anteriores en nuestro laboratorio en los que se reveló un papel importante de la vía de señalización CDK4/6/pRb en el control de la proliferación y apoptosis de linfoblastos portadores de una mutación de *GRN* [164,

165], observamos que en las células de neuroblastoma *GRN* KD cambios significativos en los niveles de CDK4 y CDK6 y consecuentemente en el estado de fosforilación de pRb. El aumento de la señalización a través de la vía CDK4/6/pRb se asoció con una mayor supervivencia en los linfoblastos y las células de neuroblastoma. Sin embargo, la deficiencia de PGRN indujo cambios opuestos en CDK4/6/pRb y resistencia celular a la privación de suero en linfoblastos y las células SH-SY5Y. Los linfoblastos de pacientes de DLTP-TDP resultaron ser más resistentes a la muerte celular inducida por la privación del suero, característica que desaparece tras la adición de PGRN recombinante [164]. En cambio, en el caso de las células SH-SY5Y *GRN* KD ocurre lo contrario, son menos resistentes a la retirada del suero. Por tanto, parece que la PGRN influye en el destino de supervivencia/muerte celular de manera dependiente del tipo celular. La resistencia de los linfoblastos de pacientes con DLFT a la muerte inducida por la retirada del suero se interpretó como consecuencia de las características similares a las de células tumorales de las líneas linfoblásticas, de manera que presentan mayor actividad proliferativa y menor dependencia del suero para su supervivencia. Por el contrario, la disminución en la actividad de la vía CDK4/6/pRb, que induce la deficiencia de PGRN en las células de neuroblastoma SH-SY5Y se acompaña de mayor vulnerabilidad, lo que podría interpretarse como un intento de frenar la progresión del ciclo celular en condiciones de estrés, de manera similar a lo que ocurre en neuronas vulnerables en algunos trastornos neurodegenerativos [280], en las que una entrada no programada en un ciclo de división celular tiene consecuencias letales.

La participación de CDK4/6/pRb en el control de la respuesta de las células SH-SY5Y a la privación del suero se apoya además en el hecho de que la supervivencia de las células controles se reduce en presencia de inhibidores específicos de la expresión de CDK4 y CDK6 o la actividad quinasa asociada a CDK4/6, tales como butirato de sodio (SB) o PD332991, respectivamente. Los efectos de estos dos fármacos sobre la supervivencia de las células SH-SY5Y están en consonancia con el efecto demostrado en mieloma de PD332991, en el que se observó un aumento en la sensibilidad celular a la apoptosis inducida por bortezumid [311], y con la observación de que la reducción de CDK6 aumentó la susceptibilidad de las células

de glioma a la quimioterapia [312]. El hecho de que estos fármacos no afectaran a la supervivencia de las células deficientes en PGRN, sugiere un umbral para la actividad quinasa asociada a CDK4/6 como señal de la supervivencia. Nuestros resultados están en consonancia con estudios previos que indican un papel de la vía CDK/pRb en el mantenimiento del estado postmitótico a lo largo de la vida de las neuronas [313]. Por otra parte, se ha sugerido un papel anti-apoptótico para CDK/pRb, ya que se ha visto una correlación en ratones KO para pRb (-/-) entre la pérdida de pRb y la inducción de la apoptosis [314]. Sin embargo, nuestros resultados contrastan con otros trabajos que describieron un aumento de la fosforilación de pRb asociado con el incremento de apoptosis neuronal [315, 316], o que inhibidores específicos de CDK6 pueden tener efectos neuroprotectores [317, 318] Por lo tanto, parece que la activación de la vía CDK/pRb puede tener un rol pro o anti-apoptótico en las células neuronales dependiendo quizás del estado de la células o de la naturaleza del factor estresante.

El análisis de los cambios en la señalización molecular durante la privación del suero en las células *GRN* KD, reveló diferencias significativas en los niveles de Akt y ERK1/2 fosforilados en comparación con las células control. Pudimos demostrar la perturbación de ambas vías en las células *GRN* KD. Así por ejemplo, el tratamiento de las células SH-SY5Y control con el inhibidor de PI3K/Akt, LY294002, o el inhibidor de ERK1/2, PD98059, indujo una apoptosis significativa a niveles similares a las células *GRN* KD. Por lo tanto, parece que PGRN puede proteger contra la apoptosis inducida por la retirada del suero mediante la activación de las vías de señalización PI3K/Akt y ERK1/2. De hecho se pudo observar los efectos de la activación de las vías PI3K/Akt y ERK1/2 al añadir rhPGRN en las células *GRN* KD. Esta observación está en consonancia con estudios previos que muestran la participación de PGRN en la activación de estas vías de señalización en otros tipos celulares [319, 320], y en estudios del efecto anti-apoptótico de PGRN en neuronas primarias [94, 183]. Por otro lado, comprobamos, que la activación de las vías de señalización PI3K/Akt y ERK1/2 con insulina o el factor de crecimiento epidérmico (EGF), fueron suficientes para soportar la supervivencia de las células *GRN* KD en ausencia de suero.

Nuestros datos sugieren que las vías de señalización PI3K/Akt y ERK1/2 confluyen en la activación de CDK4/6, ya que los inhibidores específicos de estas rutas, LY294002 y PD98059 respectivamente, producen una disminución significativa de los niveles de CDK4 y CDK6 y aumentan la apoptosis en las células SH-SY5Y controles. Estas observaciones están en consonancia con trabajos previos que en los que se mostraba que el silenciamiento de Akt regula a la baja los niveles de CDK4 y CDK6 [321, 322]. Por lo tanto, parece que la PGRN juega un papel crítico en la activación de las vías PI3K/Akt y ERK1/2 como mediador de la supervivencia celular regulando la actividad de la vía CDK4/6/pRb como se muestra esquemáticamente en la Imagen 13.

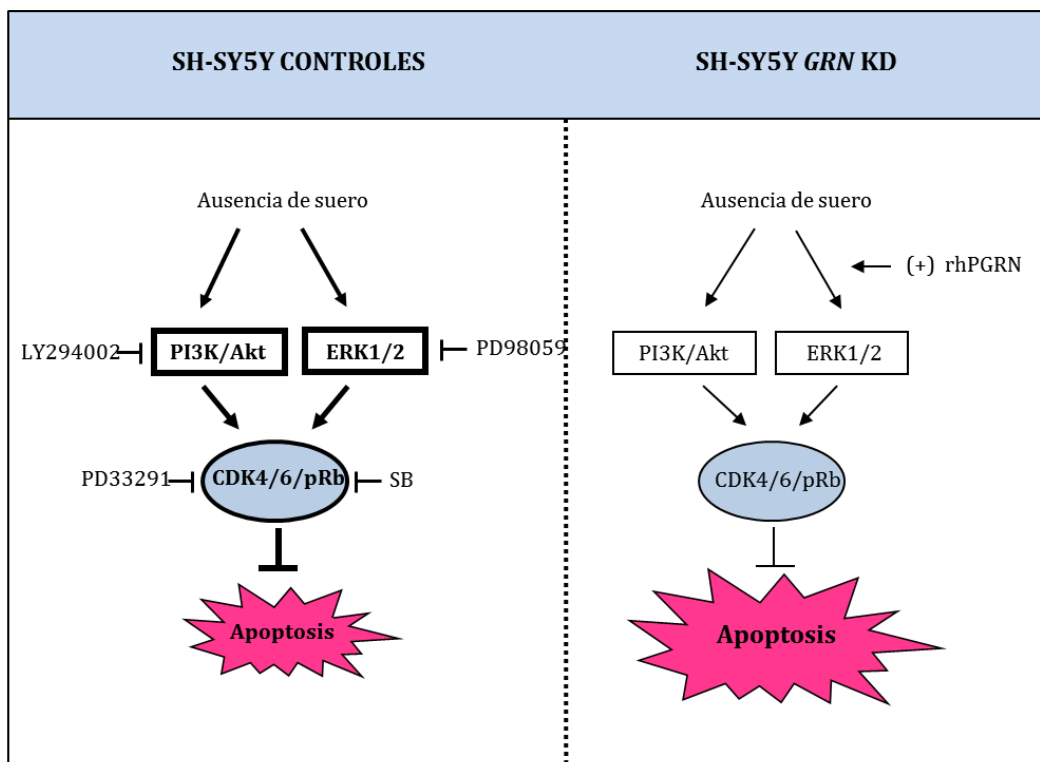


Imagen 13: Influencia de la deficiencia de PGRN en la activación de las vías de supervivencia en ausencia de suero. En comparación con las células control, las células de neuroblastoma SH-SY5Y *GRN* KD mostraron una reducción de la activación de las vías de señalización PI3K/Akt y ERK1/2 en respuesta a la retirada del suero, lo que resulta también de una disminución de la actividad CDK4/6/pRb y la consecuente estimulación de la apoptosis. El tratamiento de las células *GRN* KD con rhPGRN normalizó la respuesta de la supervivencia celular. En contraste, el tratamiento de las células control con inhibidores específicos de las vías CDK4/6/pRb, PI3K/Akt y ERK1/2, las sensibilizó a la inducción de la apoptosis por la ausencia de suero.

En resumen, nuestros resultados sugieren un papel neuroprotector para PGRN, que podría explicar la susceptibilidad neuronal al estrés en cerebros de pacientes con deficiencia crónica en PGRN y que en último término concluye con la pérdida neuronal en áreas selectivas del cerebro. El aumento de los niveles de PGRN, o alternativamente, la activación de las vías PI3K/Akt o ERK1/2 podrían considerarse para el diseño de nuevas aproximaciones terapéuticas para el tratamiento de la DLFT-TDP asociada con mutaciones en *GRN*.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Las principales conclusiones de este trabajo son las siguientes:

1. Las células de neuroblastoma SH-SY5Y *GRN* KD recapitulan las características más relevantes de la DLFT-TDP como son: la haploinsuficiencia de progranulina, la fosforilación y fragmentación en el extremo C-terminal de la TDP-43, el hipometabolismo de glucosa y la mayor vulnerabilidad celular. Por lo que constituyen un modelo celular experimental adecuado que permite estudiar alteraciones funcionales de esta patología.
2. Las células *GRN* KD presentan alteraciones importantes en la función mitocondrial, como despolarización de la membrana mitocondrial, disminución acusada de la tasa de respiración y producción de energía, así como un aumento significativo en la generación de ROS.
3. La elevación de los niveles de PGRN celular restaura la repuesta normal de las células *GRN* KD. Por tanto drogas, que ya han demostrado su potencial terapéutico en otras patologías humanas, como SAHA y CQ, y que son capaces de aumentar los niveles de PGRN, o alternativamente inhibidores del ciclo celular podrían ser útiles en el tratamiento de la DLFT asociada a mutaciones en *GRN*.
4. Nuestros resultados sugieren que la sobre-activación de Wnt, inducida por el déficit de PGRN y que culminan en la activación del ciclo celular y la apoptosis, pueden tener un papel relevante en la patogénesis de la DLFT. Estos hallazgos abren nuevas vías para el diseño de aproximaciones terapéuticas encaminadas a modular la actividad de estas cascadas de señalización.

5. La deficiencia de PGRN induce alteraciones significativas en las vías de señalización PI3K/Akt y ERK1/2, en respuesta a la retirada de suero, induciendo una mayor activación de la vía intrínseca de la apoptosis en las células *GRN* KD que en las células control.

6. La estimulación de apoptosis en células *GRN* KD, inducida por la privación de suero, se acompaña de una disminución acusada en la cascada CDK4/6/pRb, que se interpreta como un intento de la célula por detener la progresión del ciclo celular en ausencia de factores tróficos.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Rabinovici, G.D., et al., *Distinct MRI atrophy patterns in autopsy-proven Alzheimer's disease and frontotemporal lobar degeneration*. Am J Alzheimers Dis Other Demen, 2007. **22**(6): p. 474-88.
2. Nicholson, A.M., et al., *Progranulin axis and recent developments in frontotemporal lobar degeneration*. Alzheimers Res Ther, 2012. **4**(1): p. 4.
3. Aswathy, P.M., P.S. Jairani, and P.S. Mathuranath, *Genetics of frontotemporal lobar degeneration*. Ann Indian Acad Neurol, 2010. **13**(Suppl 2): p. S55-62.
4. Seltman, R.E. and B.R. Matthews, *Frontotemporal lobar degeneration: epidemiology, pathology, diagnosis and management*. CNS Drugs, 2012. **26**(10): p. 841-70.
5. Chen-Plotkin, A.S., V.M. Lee, and J.Q. Trojanowski, *TAR DNA-binding protein 43 in neurodegenerative disease*. Nat Rev Neurol, 2010. **6**(4): p. 211-20.
6. Kumar-Singh, S., *Progranulin and TDP-43: mechanistic links and future directions*. J Mol Neurosci, 2011. **45**(3): p. 561-73.
7. Cenik, B., et al., *Progranulin: a proteolytically processed protein at the crossroads of inflammation and neurodegeneration*. J Biol Chem, 2012. **287**(39): p. 32298-306.
8. Inestrosa, N.C. and L. Varela-Nallar, *Wnt signaling in the nervous system and in Alzheimer's disease*. J Mol Cell Biol, 2014. **6**(1): p. 64-74.
9. Neary, D., J. Snowden, and D. Mann, *Frontotemporal dementia*. Lancet Neurol, 2005. **4**(11): p. 771-80.
10. Brun, A., *Frontal lobe degeneration of non-Alzheimer type. I. Neuropathology*. Arch Gerontol Geriatr, 1987. **6**(3): p. 193-208.
11. Gustafson, L., *Frontal lobe degeneration of non-Alzheimer type. II. Clinical picture and differential diagnosis*. Arch Gerontol Geriatr, 1987. **6**(3): p. 209-23.
12. Neary, D., et al., *Dementia of frontal lobe type*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1988. **51**(3): p. 353-61.
13. Spillantini, M.G., et al., *Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(13): p. 7737-41.

14. Baker, M., et al., *Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17*. Nature, 2006. **442**(7105): p. 916-9.
15. Cruts, M., et al., *Null mutations in progranulin cause ubiquitin-positive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21*. Nature, 2006. **442**(7105): p. 920-4.
16. Neumann, M., et al., *Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis*. Science, 2006. **314**(5796): p. 130-3.
17. Kitagaki, H., et al., *Alteration of white matter MR signal intensity in frontotemporal dementia*. AJNR Am J Neuroradiol, 1997. **18**(2): p. 367-78.
18. Ratnavalli, E., et al., *The prevalence of frontotemporal dementia*. Neurology, 2002. **58**(11): p. 1615-21.
19. Rademakers, R., M. Neumann, and I.R. Mackenzie, *Advances in understanding the molecular basis of frontotemporal dementia*. Nat Rev Neurol, 2012. **8**(8): p. 423-34.
20. Graff-Radford, N.R. and B.K. Woodruff, *Frontotemporal dementia*. Semin Neurol, 2007. **27**(1): p. 48-57.
21. Cairns, N.J., et al., *Neuropathologic diagnostic and nosologic criteria for frontotemporal lobar degeneration: consensus of the Consortium for Frontotemporal Lobar Degeneration*. Acta Neuropathol, 2007. **114**(1): p. 5-22.
22. van der Zee, J. and C. Van Broeckhoven, *Dementia in 2013: frontotemporal lobar degeneration-building on breakthroughs*. Nat Rev Neurol, 2014. **10**(2): p. 70-2.
23. Ikeda, M., T. Ishikawa, and H. Tanabe, *Epidemiology of frontotemporal lobar degeneration*. Dement Geriatr Cogn Disord, 2004. **17**(4): p. 265-8.
24. Sieben, A., et al., *The genetics and neuropathology of frontotemporal lobar degeneration*. Acta Neuropathol, 2012. **124**(3): p. 353-72.
25. Goldman, J.S., et al., *New genes, new dilemmas: FTLD genetics and its implications for families*. Am J Alzheimers Dis Other Demen, 2007. **22**(6): p. 507-15.
26. Poorkaj, P., et al., *Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia*. Ann Neurol, 1998. **43**(6): p. 815-25.

27. Kertesz, A., et al., *The diagnosis and course of frontotemporal dementia*. Alzheimer Dis Assoc Disord, 2007. **21**(2): p. 155-63.
28. Roberson, E.D., et al., *Frontotemporal dementia progresses to death faster than Alzheimer disease*. Neurology, 2005. **65**(5): p. 719-25.
29. Kertesz, A., et al., *The evolution and pathology of frontotemporal dementia*. Brain, 2005. **128**(Pt 9): p. 1996-2005.
30. Johnson, J.K., et al., *Frontotemporal lobar degeneration: demographic characteristics of 353 patients*. Arch Neurol, 2005. **62**(6): p. 925-30.
31. Lomen-Hoerth, C., T. Anderson, and B. Miller, *The overlap of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia*. Neurology, 2002. **59**(7): p. 1077-9.
32. Rosen, H.J., et al., *Behavioral features in semantic dementia vs other forms of progressive aphasia*. Neurology, 2006. **67**(10): p. 1752-6.
33. O'Neill, S., M. Andreotti, and V. de Simone, *[Semantic dementia, a many-worded disorder]*. Rev Neurol, 2006. **43**(11): p. 685-9.
34. Thompson, S.A., K. Patterson, and J.R. Hodges, *Left/right asymmetry of atrophy in semantic dementia: behavioral-cognitive implications*. Neurology, 2003. **61**(9): p. 1196-203.
35. Gorno-Tempini, M.L., et al., *Cognition and anatomy in three variants of primary progressive aphasia*. Ann Neurol, 2004. **55**(3): p. 335-46.
36. Josephs, K.A., et al., *Characterizing a neurodegenerative syndrome: primary progressive apraxia of speech*. Brain, 2012. **135**(Pt 5): p. 1522-36.
37. Matias-Guiu, J.A. and R. Garcia-Ramos, *Primary progressive aphasia: from syndrome to disease*. Neurologia, 2013. **28**(6): p. 366-74.
38. Sagarra Mur, D. and J.A. Olivan Usieto, *[Frontotemporal dementia and motor neuron disease]*. Neurologia, 2010. **25**(1): p. 62-3.
39. Rabinovici, G.D. and B.L. Miller, *Frontotemporal lobar degeneration: epidemiology, pathophysiology, diagnosis and management*. CNS Drugs, 2010. **24**(5): p. 375-98.
40. Boxer, A.L. and B.L. Miller, *Clinical features of frontotemporal dementia*. Alzheimer Dis Assoc Disord, 2005. **19 Suppl 1**: p. S3-6.

41. Mackenzie, I.R., et al., *Nomenclature and nosology for neuropathologic subtypes of frontotemporal lobar degeneration: an update*. *Acta Neuropathol*, 2010. **119**(1): p. 1-4.
42. Mackenzie, I.R., et al., *Novel types of frontotemporal lobar degeneration: beyond tau and TDP-43*. *J Mol Neurosci*, 2011. **45**(3): p. 402-8.
43. Kumar-Singh, S. and C. Van Broeckhoven, *Frontotemporal lobar degeneration: current concepts in the light of recent advances*. *Brain Pathol*, 2007. **17**(1): p. 104-14.
44. Spillantini, M.G., J.C. Van Swieten, and M. Goedert, *Tau gene mutations in frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17)*. *Neurogenetics*, 2000. **2**(4): p. 193-205.
45. Neumann, M., et al., *A new subtype of frontotemporal lobar degeneration with FUS pathology*. *Brain*, 2009. **132**(Pt 11): p. 2922-31.
46. Mackenzie, I.R., et al., *Pathological heterogeneity in amyotrophic lateral sclerosis with FUS mutations: two distinct patterns correlating with disease severity and mutation*. *Acta Neuropathol*, 2011. **122**(1): p. 87-98.
47. Kwiatkowski, T.J., Jr., et al., *Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis*. *Science*, 2009. **323**(5918): p. 1205-8.
48. Seelaar, H., et al., *Frequency of ubiquitin and FUS-positive, TDP-43-negative frontotemporal lobar degeneration*. *J Neurol*, 2010. **257**(5): p. 747-53.
49. Arai, T., et al., *TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **351**(3): p. 602-11.
50. Ou, S.H., et al., *Cloning and characterization of a novel cellular protein, TDP-43, that binds to human immunodeficiency virus type 1 TAR DNA sequence motifs*. *J Virol*, 1995. **69**(6): p. 3584-96.
51. Buratti, E. and F.E. Baralle, *Characterization and functional implications of the RNA binding properties of nuclear factor TDP-43, a novel splicing regulator of CFTR exon 9*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(39): p. 36337-43.
52. Ayala, Y.M., et al., *Structural determinants of the cellular localization and shuttling of TDP-43*. *J Cell Sci*, 2008. **121**(Pt 22): p. 3778-85.

53. Wang, H.Y., et al., *Structural diversity and functional implications of the eukaryotic TDP gene family*. Genomics, 2004. **83**(1): p. 130-9.
54. Ayala, Y.M., et al., *Human, Drosophila, and C.elegans TDP43: nucleic acid binding properties and splicing regulatory function*. J Mol Biol, 2005. **348**(3): p. 575-88.
55. Mackenzie, I.R., et al., *Nomenclature for neuropathologic subtypes of frontotemporal lobar degeneration: consensus recommendations*. Acta Neuropathol, 2009. **117**(1): p. 15-8.
56. Neumann, M., et al., *TDP-43-positive white matter pathology in frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-positive inclusions*. J Neuropathol Exp Neurol, 2007. **66**(3): p. 177-83.
57. Arai, T., et al., *Phosphorylated and cleaved TDP-43 in ALS, FTLD and other neurodegenerative disorders and in cellular models of TDP-43 proteinopathy*. Neuropathology, 2010. **30**(2): p. 170-81.
58. Ling, J.P., et al., *TDP-43 repression of nonconserved cryptic exons is compromised in ALS-FTD*. Science, 2015. **349**(6248): p. 650-5.
59. Dickson, D.W., *TDP-43 immunoreactivity in neurodegenerative disorders: disease versus mechanism specificity*. Acta Neuropathol, 2008. **115**(1): p. 147-9.
60. Forman, M.S., et al., *Novel ubiquitin neuropathology in frontotemporal dementia with valosin-containing protein gene mutations*. J Neuropathol Exp Neurol, 2006. **65**(6): p. 571-81.
61. Neumann, M., et al., *TDP-43 in the ubiquitin pathology of frontotemporal dementia with VCP gene mutations*. J Neuropathol Exp Neurol, 2007. **66**(2): p. 152-7.
62. Rohrer, J.D., et al., *C9orf72 expansions in frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis*. Lancet Neurol, 2015. **14**(3): p. 291-301.
63. Gitcho, M.A., et al., *TARDBP 3'-UTR variant in autopsy-confirmed frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 proteinopathy*. Acta Neuropathol, 2009. **118**(5): p. 633-45.
64. Mackenzie, I.R., P. Frick, and M. Neumann, *The neuropathology associated with repeat expansions in the C9ORF72 gene*. Acta Neuropathol, 2014. **127**(3): p. 347-57.

65. Lashley, T., et al., *Review: An update on clinical, genetic and pathological aspects of frontotemporal lobar degenerations*. Neuropathol Appl Neurobiol, 2015.
66. Josephs, K.A., et al., *Corticospinal tract degeneration associated with TDP-43 type C pathology and semantic dementia*. Brain, 2013. **136**(Pt 2): p. 455-70.
67. Josephs, K.A., et al., *Neuropathological background of phenotypical variability in frontotemporal dementia*. Acta Neuropathol, 2011. **122**(2): p. 137-53.
68. Rohrer, J.D. and J.M. Schott, *Primary progressive aphasia: defining genetic and pathological subtypes*. Curr Alzheimer Res, 2011. **8**(3): p. 266-72.
69. Josephs, K.A., *Clinical aspects of TDP-43 proteinopathy, neurofilament inclusion body disease and dementias lacking distinctive proteinopathy*. Handb Clin Neurol, 2008. **89**: p. 377-82.
70. Irwin, D.J., et al., *Frontotemporal lobar degeneration: defining phenotypic diversity through personalized medicine*. Acta Neuropathol, 2015. **129**(4): p. 469-91.
71. Sleegers, K., et al., *Serum biomarker for progranulin-associated frontotemporal lobar degeneration*. Ann Neurol, 2009. **65**(5): p. 603-9.
72. Goossens, J., et al., *TDP-43 as a possible biomarker for frontotemporal lobar degeneration: a systematic review of existing antibodies*. Acta Neuropathol Commun, 2015. **3**: p. 15.
73. Holm, I.E., A.M. Isaacs, and I.R. Mackenzie, *Absence of FUS-immunoreactive pathology in frontotemporal dementia linked to chromosome 3 (FTD-3) caused by mutation in the CHMP2B gene*. Acta Neuropathol, 2009. **118**(5): p. 719-20.
74. Isaacs, A.M., et al., *Frontotemporal dementia caused by CHMP2B mutations*. Curr Alzheimer Res, 2011. **8**(3): p. 246-51.
75. Boeve, B.F., *The multiple phenotypes of corticobasal syndrome and corticobasal degeneration: implications for further study*. J Mol Neurosci, 2011. **45**(3): p. 350-3.
76. Snowden, J.S., et al., *The clinical diagnosis of early-onset dementias: diagnostic accuracy and clinicopathological relationships*. Brain, 2011. **134**(Pt 9): p. 2478-92.

77. *Clinical and neuropathological criteria for frontotemporal dementia. The Lund and Manchester Groups.* J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1994. **57**(4): p. 416-8.
78. Neary, D., et al., *Frontotemporal lobar degeneration: a consensus on clinical diagnostic criteria.* Neurology, 1998. **51**(6): p. 1546-54.
79. McKhann, G.M., et al., *Clinical and pathological diagnosis of frontotemporal dementia: report of the Work Group on Frontotemporal Dementia and Pick's Disease.* Arch Neurol, 2001. **58**(11): p. 1803-9.
80. Foster, N.L., et al., *FDG-PET improves accuracy in distinguishing frontotemporal dementia and Alzheimer's disease.* Brain, 2007. **130**(Pt 10): p. 2616-35.
81. Kanda, T., et al., *Comparison of grey matter and metabolic reductions in frontotemporal dementia using FDG-PET and voxel-based morphometric MR studies.* Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2008. **35**(12): p. 2227-34.
82. Borroni, B., et al., *New insights into biological markers of frontotemporal lobar degeneration spectrum.* Curr Med Chem, 2010. **17**(10): p. 1002-9.
83. Irwin, D.J., et al., *Comparison of cerebrospinal fluid levels of tau and Abeta 1-42 in Alzheimer disease and frontotemporal degeneration using 2 analytical platforms.* Arch Neurol, 2012. **69**(8): p. 1018-25.
84. Ghidoni, R., A. Paterlini, and L. Benussi, *Translational proteomics in Alzheimer's disease and related disorders.* Clin Biochem, 2013. **46**(6): p. 480-6.
85. Eriksen, J.L. and I.R. Mackenzie, *Progranulin: normal function and role in neurodegeneration.* J Neurochem, 2008. **104**(2): p. 287-97.
86. Ghidoni, R., et al., *Low plasma progranulin levels predict progranulin mutations in frontotemporal lobar degeneration.* Neurology, 2008. **71**(16): p. 1235-9.
87. Finch, N., et al., *Plasma progranulin levels predict progranulin mutation status in frontotemporal dementia patients and asymptomatic family members.* Brain, 2009. **132**(Pt 3): p. 583-91.
88. Mackenzie, I.R., et al., *Heterogeneity of ubiquitin pathology in frontotemporal lobar degeneration: classification and relation to clinical phenotype.* Acta Neuropathol, 2006. **112**(5): p. 539-49.

89. Zhu, J., et al., *Conversion of proepithelin to epithelins: roles of SLPI and elastase in host defense and wound repair*. Cell, 2002. **111**(6): p. 867-78.
90. Bateman, A., et al., *Granulins, a novel class of peptide from leukocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 1990. **173**(3): p. 1161-8.
91. He, Z. and A. Bateman, *Progranulin (granulin-epithelin precursor, PC-cell-derived growth factor, acrogranin) mediates tissue repair and tumorigenesis*. J Mol Med (Berl), 2003. **81**(10): p. 600-12.
92. Ahmed, Z., et al., *Progranulin in frontotemporal lobar degeneration and neuroinflammation*. J Neuroinflammation, 2007. **4**: p. 7.
93. Mackenzie, I.R. and R. Rademakers, *The molecular genetics and neuropathology of frontotemporal lobar degeneration: recent developments*. Neurogenetics, 2007. **8**(4): p. 237-48.
94. Van Damme, P., et al., *Progranulin functions as a neurotrophic factor to regulate neurite outgrowth and enhance neuronal survival*. J Cell Biol, 2008. **181**(1): p. 37-41.
95. Gass, J., et al., *Progranulin: an emerging target for FTL D therapies*. Brain Res, 2012. **1462**: p. 118-28.
96. De Muynck, L., et al., *The neurotrophic properties of progranulin depend on the granulin E domain but do not require sortilin binding*. Neurobiol Aging, 2013. **34**(11): p. 2541-7.
97. Yu, C.E., et al., *The spectrum of mutations in progranulin: a collaborative study screening 545 cases of neurodegeneration*. Arch Neurol, 2010. **67**(2): p. 161-70.
98. Daniel, R., et al., *Progranulin (acrogranin/PC cell-derived growth factor/granulin-epithelin precursor) is expressed in the placenta, epidermis, microvasculature, and brain during murine development*. Dev Dyn, 2003. **227**(4): p. 593-9.
99. Daniel, R., et al., *Cellular localization of gene expression for progranulin*. J Histochem Cytochem, 2000. **48**(7): p. 999-1009.
100. Mackenzie, I.R., *The neuropathology and clinical phenotype of FTD with progranulin mutations*. Acta Neuropathol, 2007. **114**(1): p. 49-54.

101. Bhandari, V. and A. Bateman, *Structure and chromosomal location of the human granulin gene*. Biochem Biophys Res Commun, 1992. **188**(1): p. 57-63.
102. Bateman, A. and H.P. Bennett, *Granulins: the structure and function of an emerging family of growth factors*. J Endocrinol, 1998. **158**(2): p. 145-51.
103. Gijssels, I., et al., *Progranulin locus deletion in frontotemporal dementia*. Hum Mutat, 2008. **29**(1): p. 53-8.
104. Gass, J., et al., *Mutations in progranulin are a major cause of ubiquitin-positive frontotemporal lobar degeneration*. Hum Mol Genet, 2006. **15**(20): p. 2988-3001.
105. Mukherjee, O., et al., *Molecular characterization of novel progranulin (GRN) mutations in frontotemporal dementia*. Hum Mutat, 2008. **29**(4): p. 512-21.
106. van der Zee, J., et al., *Mutations other than null mutations producing a pathogenic loss of progranulin in frontotemporal dementia*. Hum Mutat, 2007. **28**(4): p. 416.
107. Rademakers, R. and A. Rovelet-Lecrux, *Recent insights into the molecular genetics of dementia*. Trends Neurosci, 2009. **32**(8): p. 451-61.
108. Bateman, A. and H.P. Bennett, *The granulin gene family: from cancer to dementia*. Bioessays, 2009. **31**(11): p. 1245-54.
109. Toribio-Diaz, M.E. and J. Morera-Guitart, *[Clinical and biomolecular classification of the frontotemporal dementias. A review of the literature]*. Rev Neurol, 2008. **47**(11): p. 588-98.
110. He, Z., et al., *Progranulin (PC-cell-derived growth factor/acrogranin) regulates invasion and cell survival*. Cancer Res, 2002. **62**(19): p. 5590-6.
111. Monami, G., et al., *Proepithelin promotes migration and invasion of 5637 bladder cancer cells through the activation of ERK1/2 and the formation of a paxillin/FAK/ERK complex*. Cancer Res, 2006. **66**(14): p. 7103-10.
112. He, Z. and A. Bateman, *Progranulin gene expression regulates epithelial cell growth and promotes tumor growth in vivo*. Cancer Res, 1999. **59**(13): p. 3222-9.
113. Alquezar, C., et al., *Increasing progranulin levels and blockade of the ERK1/2 pathway: upstream and downstream strategies for the treatment of*

- progranulin deficient frontotemporal dementia*. Eur Neuropsychopharmacol, 2015. **25**(3): p. 386-403.
114. Rosen, E.Y., et al., *Functional genomic analyses identify pathways dysregulated by progranulin deficiency, implicating Wnt signaling*. Neuron, 2011. **71**(6): p. 1030-42.
 115. Benussi, L., et al., *Loss of exosomes in progranulin-associated frontotemporal dementia*. Neurobiol Aging, 2016. **40**: p. 41-9.
 116. Hu, F., et al., *Sortilin-mediated endocytosis determines levels of the frontotemporal dementia protein, progranulin*. Neuron, 2010. **68**(4): p. 654-67.
 117. Tang, W., et al., *The growth factor progranulin binds to TNF receptors and is therapeutic against inflammatory arthritis in mice*. Science, 2011. **332**(6028): p. 478-84.
 118. Neill, T., et al., *EphA2 is a functional receptor for the growth factor progranulin*. J Cell Biol, 2016. **215**(5): p. 687-703.
 119. Petersen, C.M., et al., *Molecular identification of a novel candidate sorting receptor purified from human brain by receptor-associated protein affinity chromatography*. J Biol Chem, 1997. **272**(6): p. 3599-605.
 120. Carrasquillo, M.M., et al., *Genome-wide screen identifies rs646776 near sortilin as a regulator of progranulin levels in human plasma*. Am J Hum Genet, 2010. **87**(6): p. 890-7.
 121. Nykjaer, A. and T.E. Willnow, *Sortilin: a receptor to regulate neuronal viability and function*. Trends Neurosci, 2012. **35**(4): p. 261-70.
 122. Chen, X., et al., *Progranulin does not bind tumor necrosis factor (TNF) receptors and is not a direct regulator of TNF-dependent signaling or bioactivity in immune or neuronal cells*. J Neurosci, 2013. **33**(21): p. 9202-13.
 123. Arrazola, M.S., C. Silva-Alvarez, and N.C. Inestrosa, *How the Wnt signaling pathway protects from neurodegeneration: the mitochondrial scenario*. Front Cell Neurosci, 2015. **9**: p. 166.
 124. Brown, G.C., *Control of respiration and ATP synthesis in mammalian mitochondria and cells*. Biochem J, 1992. **284 (Pt 1)**: p. 1-13.
 125. Cadenas, E. and K.J. Davies, *Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging*. Free Radic Biol Med, 2000. **29**(3-4): p. 222-30.

126. Naoi, M., et al., *Oxidative stress in mitochondria: decision to survival and death of neurons in neurodegenerative disorders*. Mol Neurobiol, 2005. **31**(1-3): p. 81-93.
127. Tajeddine, N., *How do reactive oxygen species and calcium trigger mitochondrial membrane permeabilisation?* Biochim Biophys Acta, 2016. **1860**(6): p. 1079-88.
128. Filosto, M., et al., *The role of mitochondria in neurodegenerative diseases*. J Neurol, 2011. **258**(10): p. 1763-74.
129. Verdin, E., et al., *Sirtuin regulation of mitochondria: energy production, apoptosis, and signaling*. Trends Biochem Sci, 2010. **35**(12): p. 669-75.
130. Kornmann, B., *Quality control in mitochondria: use it, break it, fix it, trash it*. F1000Prime Rep, 2014. **6**: p. 15.
131. Piantadosi, C.A. and H.B. Suliman, *Redox regulation of mitochondrial biogenesis*. Free Radic Biol Med, 2012. **53**(11): p. 2043-53.
132. Lin, M.T. and M.F. Beal, *Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases*. Nature, 2006. **443**(7113): p. 787-95.
133. Golpich, M., et al., *Mitochondrial Dysfunction and Biogenesis in Neurodegenerative diseases: Pathogenesis and Treatment*. CNS Neurosci Ther, 2017. **23**(1): p. 5-22.
134. Chaturvedi, R.K. and M. Flint Beal, *Mitochondrial diseases of the brain*. Free Radic Biol Med, 2013. **63**: p. 1-29.
135. Onyango, I.G., et al., *Regulation of neuron mitochondrial biogenesis and relevance to brain health*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1802**(1): p. 228-34.
136. Burte, F., et al., *Disturbed mitochondrial dynamics and neurodegenerative disorders*. Nat Rev Neurol, 2015. **11**(1): p. 11-24.
137. Cozzolino, M. and M.T. Carri, *Mitochondrial dysfunction in ALS*. Prog Neurobiol, 2012. **97**(2): p. 54-66.
138. Swerdlow, R.H., J.M. Burns, and S.M. Khan, *The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis*. J Alzheimers Dis, 2010. **20 Suppl 2**: p. S265-79.
139. Onesto, E., et al., *Gene-specific mitochondria dysfunctions in human TARDBP and C9ORF72 fibroblasts*. Acta Neuropathol Commun, 2016. **4**(1): p. 47.

140. Bartolome, F., et al., *Pathogenic VCP mutations induce mitochondrial uncoupling and reduced ATP levels*. Neuron, 2013. **78**(1): p. 57-64.
141. Stribl, C., et al., *Mitochondrial dysfunction and decrease in body weight of a transgenic knock-in mouse model for TDP-43*. J Biol Chem, 2014. **289**(15): p. 10769-84.
142. Wang, W., et al., *The inhibition of TDP-43 mitochondrial localization blocks its neuronal toxicity*. Nat Med, 2016. **22**(8): p. 869-78.
143. Wang, W., et al., *Motor-Coordination and Cognitive Dysfunction Caused by Mutant TDP-43 Could Be Reversed by Inhibiting Its Mitochondrial Localization*. Mol Ther, 2017. **25**(1): p. 127-139.
144. Copani, A., et al., *Activation of cell-cycle-associated proteins in neuronal death: a mandatory or dispensable path?* Trends Neurosci, 2001. **24**(1): p. 25-31.
145. Arendt, T., et al., *Expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 in Alzheimer's disease*. Neuroreport, 1996. **7**(18): p. 3047-9.
146. Katsel, P., et al., *Cell cycle checkpoint abnormalities during dementia: A plausible association with the loss of protection against oxidative stress in Alzheimer's disease [corrected]*. PLoS One, 2013. **8**(7): p. e68361.
147. Nagy, Z., et al., *Cell cycle markers in the hippocampus in Alzheimer's disease*. Acta Neuropathol, 1997. **94**(1): p. 6-15.
148. Seward, M.E., et al., *Amyloid-beta signals through tau to drive ectopic neuronal cell cycle re-entry in Alzheimer's disease*. J Cell Sci, 2013. **126**(Pt 5): p. 1278-86.
149. Husseman, J.W., D. Nochlin, and I. Vincent, *Mitotic activation: a convergent mechanism for a cohort of neurodegenerative diseases*. Neurobiol Aging, 2000. **21**(6): p. 815-28.
150. Stone, J.G., et al., *The cell cycle regulator phosphorylated retinoblastoma protein is associated with tau pathology in several tauopathies*. J Neuropathol Exp Neurol, 2011. **70**(7): p. 578-87.
151. Leugers, C.J., et al., *Tau in MAPK activation*. Front Neurol, 2013. **4**: p. 161.
152. Yang, Y. and K. Herrup, *Cell division in the CNS: protective response or lethal event in post-mitotic neurons?* Biochim Biophys Acta, 2007. **1772**(4): p. 457-66.

153. Yang, Y., D.S. Geldmacher, and K. Herrup, *DNA replication precedes neuronal cell death in Alzheimer's disease*. J Neurosci, 2001. **21**(8): p. 2661-8.
154. Yurov, Y.B., et al., *The variation of aneuploidy frequency in the developing and adult human brain revealed by an interphase FISH study*. J Histochem Cytochem, 2005. **53**(3): p. 385-90.
155. Mosch, B., et al., *Aneuploidy and DNA replication in the normal human brain and Alzheimer's disease*. J Neurosci, 2007. **27**(26): p. 6859-67.
156. Arendt, T., *Cell Cycle Activation and Aneuploid Neurons in Alzheimer's Disease*. Mol Neurobiol, 2012.
157. Currais, A., T. Hortobagyi, and S. Soriano, *The neuronal cell cycle as a mechanism of pathogenesis in Alzheimer's disease*. Aging (Albany NY), 2009. **1**(4): p. 363-71.
158. Csikasz-Nagy, A., A. Palmisano, and J. Zamborszky, *Molecular network dynamics of cell cycle control: transitions to start and finish*. Methods Mol Biol, 2011. **761**: p. 277-91.
159. Ong, C.H. and A. Bateman, *Progranulin (granulin-epithelin precursor, PC-cell derived growth factor, acrogranin) in proliferation and tumorigenesis*. Histol Histopathol, 2003. **18**(4): p. 1275-88.
160. Xu, J., et al., *Extracellular progranulin protects cortical neurons from toxic insults by activating survival signaling*. Neurobiol Aging, 2011. **32**(12): p. 2326 e5-16.
161. Nedachi, T., et al., *Progranulin enhances neural progenitor cell proliferation through glycogen synthase kinase 3beta phosphorylation*. Neuroscience, 2011. **185**: p. 106-15.
162. Piscopo, P., et al., *Hypoxia induces up-regulation of progranulin in neuroblastoma cell lines*. Neurochem Int, 2010. **57**(8): p. 893-8.
163. Chen-Plotkin, A.S., et al., *Variations in the progranulin gene affect global gene expression in frontotemporal lobar degeneration*. Hum Mol Genet, 2008. **17**(10): p. 1349-62.
164. Alquezar, C., et al., *Inactivation of CDK/pRb pathway normalizes survival pattern of lymphoblasts expressing the FTL D-progranulin mutation c.709-1G>A*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e37057.

165. Alquezar, C., et al., *Alteration in cell cycle-related proteins in lymphoblasts from carriers of the c.709-1G>A PGRN mutation associated with FTL-D-TDP dementia*. *Neurobiol Aging*, 2012. **33**(2): p. 429 e7-20.
166. de las Cuevas, N., et al., *Ca²⁺/calmodulin-dependent modulation of cell cycle elements pRb and p27kip1 involved in the enhanced proliferation of lymphoblasts from patients with Alzheimer dementia*. *Neurobiol Dis*, 2003. **13**(3): p. 254-63.
167. Esteras, N., et al., *G1/S Cell Cycle Checkpoint Dysfunction in Lymphoblasts from Sporadic Parkinson's Disease Patients*. *Mol Neurobiol*, 2015. **52**(1): p. 386-98.
168. Papagiannakis, N., et al., *Lysosomal alterations in peripheral blood mononuclear cells of Parkinson's disease patients*. *Mov Disord*, 2015. **30**(13): p. 1830-4.
169. Ayala, Y.M., T. Misteli, and F.E. Baralle, *TDP-43 regulates retinoblastoma protein phosphorylation through the repression of cyclin-dependent kinase 6 expression*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(10): p. 3785-9.
170. Alquezar, C., et al., *Targeting TDP-43 phosphorylation by Casein Kinase-1delta inhibitors: a novel strategy for the treatment of frontotemporal dementia*. *Mol Neurodegener*, 2016. **11**(1): p. 36.
171. Liachko, N.F., et al., *CDC7 inhibition blocks pathological TDP-43 phosphorylation and neurodegeneration*. *Ann Neurol*, 2013. **74**(1): p. 39-52.
172. Moujalled, D., et al., *Kinase Inhibitor Screening Identifies Cyclin-Dependent Kinases and Glycogen Synthase Kinase 3 as Potential Modulators of TDP-43 Cytosolic Accumulation during Cell Stress*. *PLoS One*, 2013. **8**(6): p. e67433.
173. Kerr, J.F.R., *History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept*. *Toxicology*, 2002. **181-182**: p. 471-474.
174. Lockshin, R.A. and Z. Zakeri, *Apoptosis, autophagy, and more*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2004. **36**(12): p. 2405-2419.
175. Cribbs, D.H., et al., *Caspase-mediated degeneration in Alzheimer's disease*. *Am J Pathol*, 2004. **165**(2): p. 353-5.
176. Lockshin, R.A. and Z. Zakeri, *Apoptosis, autophagy, and more*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004. **36**(12): p. 2405-19.

177. Kerr, J.F., *History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept*. Toxicology, 2002. **181-182**: p. 471-4.
178. Ziegler, U. and P. Groscurth, *Morphological features of cell death*. News Physiol Sci, 2004. **19**: p. 124-8.
179. Jellinger, K.A., *Challenges in neuronal apoptosis*. Curr Alzheimer Res, 2006. **3**(4): p. 377-91.
180. Harada, J. and M. Sugimoto, *Activation of caspase-3 in beta-amyloid-induced apoptosis of cultured rat cortical neurons*. Brain Res, 1999. **842**(2): p. 311-23.
181. Zhang, Y., C. Goodyer, and A. LeBlanc, *Selective and protracted apoptosis in human primary neurons microinjected with active caspase-3, -6, -7, and -8*. J Neurosci, 2000. **20**(22): p. 8384-9.
182. Su, J.H., et al., *DNA damage and activated caspase-3 expression in neurons and astrocytes: evidence for apoptosis in frontotemporal dementia*. Exp Neurol, 2000. **163**(1): p. 9-19.
183. Ryan, C.L., et al., *Progranulin is expressed within motor neurons and promotes neuronal cell survival*. BMC Neurosci, 2009. **10**: p. 130.
184. Guerra, R.R., et al., *Progranulin is a stress-response factor in fibroblasts subjected to hypoxia and acidosis*. Growth Factors, 2007. **25**(4): p. 280-5.
185. Gao, X., et al., *Progranulin promotes neurite outgrowth and neuronal differentiation by regulating GSK-3beta*. Protein Cell, 2010. **1**(6): p. 552-62.
186. Kleinberger, G., et al., *Increased caspase activation and decreased TDP-43 solubility in progranulin knockout cortical cultures*. J Neurochem, 2010. **115**(3): p. 735-47.
187. Suzuki, H. and M. Matsuoka, *The JNK/c-Jun signaling axis contributes to the TDP-43-induced cell death*. Mol Cell Biochem, 2013. **372**(1-2): p. 241-8.
188. Higashi, S., et al., *TDP-43 associates with stalled ribosomes and contributes to cell survival during cellular stress*. J Neurochem, 2013. **126**(2): p. 288-300.
189. Xu, Z.S., *Does a loss of TDP-43 function cause neurodegeneration?* Mol Neurodegener, 2012. **7**: p. 27.
190. Kokoulina, P. and T.T. Rohn, *Caspase-cleaved transactivation response DNA-binding protein 43 in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies*. Neurodegener Dis, 2010. **7**(4): p. 243-50.

191. McIlwain, D.R., T. Berger, and T.W. Mak, *Caspase functions in cell death and disease*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(4): p. a008656.
192. Shankaran, S.S., et al., *Missense mutations in the progranulin gene linked to frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-immunoreactive inclusions reduce progranulin production and secretion*. J Biol Chem, 2008. **283**(3): p. 1744-53.
193. Ahmed, Z., et al., *Accelerated lipofuscinosis and ubiquitination in granulin knockout mice suggest a role for progranulin in successful aging*. Am J Pathol, 2010. **177**(1): p. 311-24.
194. Liu-Yesucevitz, L., et al., *Tar DNA binding protein-43 (TDP-43) associates with stress granules: analysis of cultured cells and pathological brain tissue*. PLoS One, 2010. **5**(10): p. e13250.
195. Buchan, J.R. and R. Parker, *Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation*. Mol Cell, 2009. **36**(6): p. 932-41.
196. Bigni, B., et al., *Disease-modifying therapies in frontotemporal lobar degeneration*. Curr Med Chem, 2012. **19**(7): p. 1008-20.
197. Huey, E.D., K.T. Putnam, and J. Grafman, *A systematic review of neurotransmitter deficits and treatments in frontotemporal dementia*. Neurology, 2006. **66**(1): p. 17-22.
198. Cummings, J.L., *The Neuropsychiatric Inventory: assessing psychopathology in dementia patients*. Neurology, 1997. **48**(5 Suppl 6): p. S10-6.
199. Diehl-Schmid, J., et al., *A 6-month, open-label study of memantine in patients with frontotemporal dementia*. Int J Geriatr Psychiatry, 2008. **23**(7): p. 754-9.
200. Boxer, A.L., et al., *Memantine in patients with frontotemporal lobar degeneration: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial*. Lancet Neurol, 2013. **12**(2): p. 149-56.
201. Hodges, J.R., *Hope abandoned: memantine therapy in frontotemporal dementia*. Lancet Neurol, 2013. **12**(2): p. 121-3.
202. Vessel, K.A. and B.L. Miller, *New approaches to the treatment of frontotemporal lobar degeneration*. Curr Opin Neurol, 2008. **21**(6): p. 708-16.

203. Woolley, J.D., et al., *Frontotemporal dementia and mania*. Am J Psychiatry, 2007. **164**(12): p. 1811-6.
204. Swartz, J.R., et al., *Frontotemporal dementia: treatment response to serotonin selective reuptake inhibitors*. J Clin Psychiatry, 1997. **58**(5): p. 212-6.
205. Goldman, J.S., et al., *Comparison of family histories in FTLD subtypes and related tauopathies*. Neurology, 2005. **65**(11): p. 1817-9.
206. Hutton, M., et al., *Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17*. Nature, 1998. **393**(6686): p. 702-5.
207. Ballatore, C., V.M. Lee, and J.Q. Trojanowski, *Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders*. Nat Rev Neurosci, 2007. **8**(9): p. 663-72.
208. Zhou, J., Q. Yu, and T. Zou, *Alternative splicing of exon 10 in the tau gene as a target for treatment of tauopathies*. BMC Neurosci, 2008. **9 Suppl 2**: p. S10.
209. Liu, Y., et al., *Mitoxantrone analogues as ligands for a stem-loop structure of tau pre-mRNA*. J Med Chem, 2009. **52**(21): p. 6523-6.
210. Gozes, I. and I. Divinski, *NAP, a neuroprotective drug candidate in clinical trials, stimulates microtubule assembly in the living cell*. Curr Alzheimer Res, 2007. **4**(5): p. 507-9.
211. Ferrer, I., M. Barrachina, and B. Puig, *Glycogen synthase kinase-3 is associated with neuronal and glial hyperphosphorylated tau deposits in Alzheimer's disease, Pick's disease, progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration*. Acta Neuropathol, 2002. **104**(6): p. 583-91.
212. Hanger, D.P., B.H. Anderton, and W. Noble, *Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease*. Trends Mol Med, 2009. **15**(3): p. 112-9.
213. Wischik, C.M., et al., *Selective inhibition of Alzheimer disease-like tau aggregation by phenothiazines*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(20): p. 11213-8.
214. Pickhardt, M., et al., *Phenylthiazolyl-hydrazide and its derivatives are potent inhibitors of tau aggregation and toxicity in vitro and in cells*. Biochemistry, 2007. **46**(35): p. 10016-23.
215. Bulic, B., et al., *Rhodanine-based tau aggregation inhibitors in cell models of tauopathy*. Angew Chem Int Ed Engl, 2007. **46**(48): p. 9215-9.

216. Luo, W., et al., *Roles of heat-shock protein 90 in maintaining and facilitating the neurodegenerative phenotype in tauopathies*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(22): p. 9511-6.
217. Berger, Z., et al., *Rapamycin alleviates toxicity of different aggregate-prone proteins*. Hum Mol Genet, 2006. **15**(3): p. 433-42.
218. Welch, E.M., et al., *PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations*. Nature, 2007. **447**(7140): p. 87-91.
219. Capell, A., et al., *Rescue of progranulin deficiency associated with frontotemporal lobar degeneration by alkalinizing reagents and inhibition of vacuolar ATPase*. J Neurosci, 2011. **31**(5): p. 1885-94.
220. Cenik, B., et al., *Suberoylanilide hydroxamic acid (vorinostat) up-regulates progranulin transcription: rational therapeutic approach to frontotemporal dementia*. J Biol Chem, 2011. **286**(18): p. 16101-8.
221. Kazantsev, A.G. and L.M. Thompson, *Therapeutic application of histone deacetylase inhibitors for central nervous system disorders*. Nat Rev Drug Discov, 2008. **7**(10): p. 854-68.
222. Huss, M., et al., *Vacuolar H(+)-ATPases: intra- and intermolecular interactions*. Eur J Cell Biol, 2011. **90**(9): p. 688-95.
223. Neumann, M., et al., *Absence of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins and survival motor neuron protein in TDP-43 positive inclusions in frontotemporal lobar degeneration*. Acta Neuropathol, 2007. **113**(5): p. 543-8.
224. Zhang, Y.J., et al., *Aberrant cleavage of TDP-43 enhances aggregation and cellular toxicity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(18): p. 7607-12.
225. DeJesus-Hernandez, M., et al., *Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS*. Neuron, 2011. **72**(2): p. 245-56.
226. Verma, A., *Protein aggregates and regional disease spread in ALS is reminiscent of prion-like pathogenesis*. Neurol India, 2013. **61**(2): p. 107-10.
227. Cushman, M., et al., *Prion-like disorders: blurring the divide between transmissibility and infectivity*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 8): p. 1191-201.

228. Ju, J.S., et al., *Impaired protein aggregate handling and clearance underlie the pathogenesis of p97/VCP-associated disease*. J Biol Chem, 2008. **283**(44): p. 30289-99.
229. Tresse, E., et al., *VCP/p97 is essential for maturation of ubiquitin-containing autophagosomes and this function is impaired by mutations that cause IBMPFD*. Autophagy, 2010. **6**(2): p. 217-27.
230. Urwin, H., et al., *Disruption of endocytic trafficking in frontotemporal dementia with CHMP2B mutations*. Hum Mol Genet, 2010. **19**(11): p. 2228-38.
231. Skibinski, G., et al., *Mutations in the endosomal ESCRTIII-complex subunit CHMP2B in frontotemporal dementia*. Nat Genet, 2005. **37**(8): p. 806-8.
232. Ash, P.E., et al., *Neurotoxic effects of TDP-43 overexpression in C. elegans*. Hum Mol Genet, 2010. **19**(16): p. 3206-18.
233. Liachko, N.F., C.R. Guthrie, and B.C. Kraemer, *Phosphorylation promotes neurotoxicity in a Caenorhabditis elegans model of TDP-43 proteinopathy*. J Neurosci, 2010. **30**(48): p. 16208-19.
234. Kao, A.W., et al., *A neurodegenerative disease mutation that accelerates the clearance of apoptotic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(11): p. 4441-6.
235. Kosmidis, S., et al., *Differential effects of Tau on the integrity and function of neurons essential for learning in Drosophila*. J Neurosci, 2010. **30**(2): p. 464-77.
236. Sager, J.J., Q. Bai, and E.A. Burton, *Transgenic zebrafish models of neurodegenerative diseases*. Brain Struct Funct, 2010. **214**(2-3): p. 285-302.
237. Tomasiewicz, H.G., et al., *Transgenic zebrafish model of neurodegeneration*. J Neurosci Res, 2002. **70**(6): p. 734-45.
238. Kraemer, B.C., et al., *Loss of murine TDP-43 disrupts motor function and plays an essential role in embryogenesis*. Acta Neuropathol, 2010. **119**(4): p. 409-19.
239. Xu, Y.F., et al., *Wild-type human TDP-43 expression causes TDP-43 phosphorylation, mitochondrial aggregation, motor deficits, and early mortality in transgenic mice*. J Neurosci, 2010. **30**(32): p. 10851-9.

240. Seeley, W.W., et al., *Early frontotemporal dementia targets neurons unique to apes and humans*. *Ann Neurol*, 2006. **60**(6): p. 660-7.
241. Tsai, K.J., et al., *Elevated expression of TDP-43 in the forebrain of mice is sufficient to cause neurological and pathological phenotypes mimicking FTLD-U*. *J Exp Med*, 2010. **207**(8): p. 1661-73.
242. Espejo-Porras, F., et al., *Changes in the endocannabinoid signaling system in CNS structures of TDP-43 transgenic mice: relevance for a neuroprotective therapy in TDP-43-related disorders*. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2015. **10**(2): p. 233-44.
243. Yin, F., et al., *Exaggerated inflammation, impaired host defense, and neuropathology in progranulin-deficient mice*. *J Exp Med*, 2010. **207**(1): p. 117-28.
244. Smith, K.R., et al., *Strikingly different clinicopathological phenotypes determined by progranulin-mutation dosage*. *Am J Hum Genet*, 2012. **90**(6): p. 1102-7.
245. Furukawa, K., et al., *Pro-apoptotic effects of tau mutations in chromosome 17 frontotemporal dementia and parkinsonism*. *Neuroreport*, 2000. **11**(1): p. 57-60.
246. Nonaka, T., et al., *Phosphorylated and ubiquitinated TDP-43 pathological inclusions in ALS and FTLD-U are recapitulated in SH-SY5Y cells*. *FEBS Lett*, 2009. **583**(2): p. 394-400.
247. Jiao, J., et al., *MicroRNA-29b regulates the expression level of human progranulin, a secreted glycoprotein implicated in frontotemporal dementia*. *PLoS One*, 2010. **5**(5): p. e10551.
248. Lee, K., et al., *Overexpression of TDP-43 causes partially p53-dependent G2/M arrest and p53-independent cell death in HeLa cells*. *Neurosci Lett*, 2012. **506**(2): p. 271-6.
249. Etcheberrigaray, R. and D. Ibarreta, *[Ionic channels and second messenger alterations in Alzheimer's disease. Relevance of studies in nonneuronal cells]*. *Rev Neurol*, 2001. **33**(8): p. 740-9.
250. Miller, J.N., C.H. Chan, and D.A. Pearce, *The role of nonsense-mediated decay in neuronal ceroid lipofuscinosis*. *Hum Mol Genet*, 2013. **22**(13): p. 2723-34.

251. Rossi, G., et al., *Mutations in MAPT gene cause chromosome instability and introduce copy number variations widely in the genome.* J Alzheimers Dis, 2013. **33**(4): p. 969-82.
252. Rossi, G., et al., *A new function of microtubule-associated protein tau: involvement in chromosome stability.* Cell Cycle, 2008. **7**(12): p. 1788-94.
253. van der Zee, J., et al., *TMEM106B is associated with frontotemporal lobar degeneration in a clinically diagnosed patient cohort.* Brain, 2011. **134**(Pt 3): p. 808-15.
254. Chiang, H.H., et al., *Progranulin mutation causes frontotemporal dementia in the Swedish Karolinska family.* Alzheimers Dement, 2008. **4**(6): p. 414-20.
255. Yagi, T., et al., *Modeling familial Alzheimer's disease with induced pluripotent stem cells.* Hum Mol Genet, 2011. **20**(23): p. 4530-9.
256. Qiang, L., et al., *Directed conversion of Alzheimer's disease patient skin fibroblasts into functional neurons.* Cell, 2011. **146**(3): p. 359-71.
257. Israel, M.A., et al., *Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells.* Nature, 2012. **482**(7384): p. 216-20.
258. Almeida, S., et al., *Induced pluripotent stem cell models of progranulin-deficient frontotemporal dementia uncover specific reversible neuronal defects.* Cell Rep, 2012. **2**(4): p. 789-98.
259. Raitano, S., et al., *Restoration of progranulin expression rescues cortical neuron generation in an induced pluripotent stem cell model of frontotemporal dementia.* Stem Cell Reports, 2015. **4**(1): p. 16-24.
260. Esteras, N., et al., *Mitochondrial hyperpolarization in iPSC-derived neurons from patients of FTDP-17 with 10+16 MAPT mutation leads to oxidative stress and neurodegeneration.* Redox Biol, 2017. **12**: p. 410-422.
261. Preza, E., et al., *Review: Induced pluripotent stem cell models of frontotemporal dementia.* Neuropathol Appl Neurobiol, 2016. **42**(6): p. 497-520.
262. Zhang, Y., et al., *Patient iPSC-Derived Neurons for Disease Modeling of Frontotemporal Dementia with Mutation in CHMP2B.* Stem Cell Reports, 2017. **8**(3): p. 648-658.
263. Ran, F.A., et al., *Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity.* Cell, 2013. **154**(6): p. 1380-9.

264. Arendt, T., *Cell cycle activation and aneuploid neurons in Alzheimer's disease*. Mol Neurobiol, 2012. **46**(1): p. 125-35.
265. Nagy, Z., et al., *Cell cycle kinesis in lymphocytes in the diagnosis of Alzheimer's disease*. Neurosci Lett, 2002. **317**(2): p. 81-4.
266. Weinberg, R.A., *The retinoblastoma protein and cell cycle control*. Cell, 1995. **81**(3): p. 323-30.
267. Lundberg, A.S. and R.A. Weinberg, *Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(2): p. 753-61.
268. Hurford, R.K., Jr., et al., *pRB and p107/p130 are required for the regulated expression of different sets of E2F responsive genes*. Genes Dev, 1997. **11**(11): p. 1447-63.
269. Alquezar, C., et al., *PGRN haploinsufficiency increased Wnt5a signaling in peripheral cells from frontotemporal lobar degeneration-progranulin mutation carriers*. Neurobiol Aging, 2014. **35**(4): p. 886-98.
270. Hogan, P.G., et al., *Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT*. Genes Dev, 2003. **17**(18): p. 2205-32.
271. Niehrs, C., *Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators*. Oncogene, 2006. **25**(57): p. 7469-81.
272. Tokumitsu, H., et al., *KN-62, 1-[N,O-bis(5-isoquinolinesulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazine, a specific inhibitor of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II*. J Biol Chem, 1990. **265**(8): p. 4315-20.
273. Ruffels, J., M. Griffin, and J.M. Dickenson, *Activation of ERK1/2, JNK and PKB by hydrogen peroxide in human SH-SY5Y neuroblastoma cells: role of ERK1/2 in H₂O₂-induced cell death*. Eur J Pharmacol, 2004. **483**(2-3): p. 163-73.
274. Koh, G., et al., *Elevated cAMP level attenuates 2-deoxy-d-ribose-induced oxidative damage in pancreatic beta-cells*. Arch Biochem Biophys, 2005. **438**(1): p. 70-9.
275. Bedner, E., et al., *Activation of caspases measured in situ by binding of fluorochrome-labeled inhibitors of caspases (FLICA): correlation with DNA fragmentation*. Exp Cell Res, 2000. **259**(1): p. 308-13.
276. Gerasimovskaya, E.V., et al., *Extracellular ATP-induced proliferation of adventitial fibroblasts requires phosphoinositide 3-kinase, Akt, mammalian*

- target of rapamycin, and p70 S6 kinase signaling pathways.* J Biol Chem, 2005. **280**(3): p. 1838-48.
277. Katso, R., et al., *Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer.* Annu Rev Cell Dev Biol, 2001. **17**: p. 615-75.
278. Meloche, S. and J. Pouyssegur, *The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition.* Oncogene, 2007. **26**(22): p. 3227-39.
279. Thomas, C.Y., et al., *Spontaneous activation and signaling by overexpressed epidermal growth factor receptors in glioblastoma cells.* Int J Cancer, 2003. **104**(1): p. 19-27.
280. Machado-Neto, J.A., et al., *Knockdown of insulin receptor substrate 1 reduces proliferation and downregulates Akt/mTOR and MAPK pathways in K562 cells.* Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(8): p. 1404-11.
281. Atlante, A., et al., *A disease with a sweet tooth: exploring the Warburg effect in Alzheimer's disease.* Biogerontology, 2017.
282. Brand, M.D. and D.G. Nicholls, *Assessing mitochondrial dysfunction in cells.* Biochem J, 2011. **435**(2): p. 297-312.
283. Perry, C.N., et al., *Xenotransplantation of mitochondrial electron transfer enzyme, Ndi1, in myocardial reperfusion injury.* PLoS One, 2011. **6**(2): p. e16288.
284. Lu, J., et al., *Mitochondrial dysfunction in human TDP-43 transfected NSC34 cell lines and the protective effect of dimethoxy curcumin.* Brain Res Bull, 2012. **89**(5-6): p. 185-90.
285. Wang, W., et al., *The ALS disease-associated mutant TDP-43 impairs mitochondrial dynamics and function in motor neurons.* Hum Mol Genet, 2013. **22**(23): p. 4706-19.
286. Nalbandian, A., et al., *In vitro studies in VCP-associated multisystem proteinopathy suggest altered mitochondrial bioenergetics.* Mitochondrion, 2015. **22**: p. 1-8.
287. Silva, D.F., et al., *Bioenergetic flux, mitochondrial mass and mitochondrial morphology dynamics in AD and MCI cybrid cell lines.* Hum Mol Genet, 2013. **22**(19): p. 3931-46.

288. Silverman, D.H., et al., *Positron emission tomography in evaluation of dementia: Regional brain metabolism and long-term outcome*. JAMA, 2001. **286**(17): p. 2120-7.
289. Womack, K.B., et al., *Temporoparietal hypometabolism in frontotemporal lobar degeneration and associated imaging diagnostic errors*. Arch Neurol, 2011. **68**(3): p. 329-37.
290. Hong, K., et al., *Full-length TDP-43 and its C-terminal fragments activate mitophagy in NSC34 cell line*. Neurosci Lett, 2012. **530**(2): p. 144-9.
291. Manoharan, S., et al., *The Role of Reactive Oxygen Species in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, and Huntington's Disease: A Mini Review*. Oxid Med Cell Longev, 2016. **2016**: p. 8590578.
292. Reddy, P.H., *Amyloid precursor protein-mediated free radicals and oxidative damage: implications for the development and progression of Alzheimer's disease*. J Neurochem, 2006. **96**(1): p. 1-13.
293. Mitnacht, S., *Control of pRB phosphorylation*. Curr Opin Genet Dev, 1998. **8**(1): p. 21-7.
294. Guo, A., et al., *Progranulin deficiency leads to enhanced cell vulnerability and TDP-43 translocation in primary neuronal cultures*. Brain Res, 2010. **1366**: p. 1-8.
295. Hoglinger, G.U., et al., *The pRb/E2F cell-cycle pathway mediates cell death in Parkinson's disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(9): p. 3585-90.
296. Herrup, K. and Y. Yang, *Cell cycle regulation in the postmitotic neuron: oxymoron or new biology?* Nat Rev Neurosci, 2007. **8**(5): p. 368-78.
297. Ueberham, U. and T. Arendt, *The expression of cell cycle proteins in neurons and its relevance for Alzheimer's disease*. Curr Drug Targets CNS Neurol Disord, 2005. **4**(3): p. 293-306.
298. Wexler, E.M., et al., *Genome-wide analysis of a Wnt1-regulated transcriptional network implicates neurodegenerative pathways*. Sci Signal, 2011. **4**(193): p. ra65.
299. Inestrosa, N.C. and E. Arenas, *Emerging roles of Wnts in the adult nervous system*. Nat Rev Neurosci, 2010. **11**(2): p. 77-86.
300. Moon, R.T., et al., *WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies*. Nat Rev Genet, 2004. **5**(9): p. 691-701.

301. Chen, Y., et al., *Wnt signaling pathway is involved in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis in adult transgenic mice*. *Neurol Res*, 2012. **34**(4): p. 390-9.
302. da Cruz e Silva, O.A., et al., *Wnt signalling is a relevant pathway contributing to amyloid beta- peptide-mediated neuropathology in Alzheimer's disease*. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2010. **9**(6): p. 720-6.
303. L'Episcopo, F., et al., *Plasticity of subventricular zone neuroprogenitors in MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) mouse model of Parkinson's disease involves cross talk between inflammatory and Wnt/beta-catenin signaling pathways: functional consequences for neuroprotection and repair*. *J Neurosci*, 2012. **32**(6): p. 2062-85.
304. Toledo, E.M., M. Colombres, and N.C. Inestrosa, *Wnt signaling in neuroprotection and stem cell differentiation*. *Prog Neurobiol*, 2008. **86**(3): p. 281-96.
305. Pandilla, R., et al., *Distinct genetic aberrations in oesophageal adeno and squamous carcinoma*. *Eur J Clin Invest*, 2013. **43**(12): p. 1233-9.
306. Ge, X. and X. Wang, *Role of Wnt canonical pathway in hematological malignancies*. *J Hematol Oncol*, 2010. **3**: p. 33.
307. Dissanayake, S.K., et al., *The Wnt5A/protein kinase C pathway mediates motility in melanoma cells via the inhibition of metastasis suppressors and initiation of an epithelial to mesenchymal transition*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(23): p. 17259-71.
308. Gordon, M.D. and R. Nusse, *Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(32): p. 22429-33.
309. Yu, J.M., et al., *Role of Wnt5a in the proliferation of human glioblastoma cells*. *Cancer Lett*, 2007. **257**(2): p. 172-81.
310. Liang, H., et al., *Wnt5a inhibits B cell proliferation and functions as a tumor suppressor in hematopoietic tissue*. *Cancer Cell*, 2003. **4**(5): p. 349-60.
311. Menu, E., et al., *A novel therapeutic combination using PD 0332991 and bortezomib: study in the 5T33MM myeloma model*. *Cancer Res*, 2008. **68**(14): p. 5519-23.

312. Li, B., et al., *Knockdown of CDK6 enhances glioma sensitivity to chemotherapy*. *Oncol Rep*, 2012. **28**(3): p. 909-14.
313. Feddersen, R.M., et al., *In vivo viability of postmitotic Purkinje neurons requires pRb family member function*. *Mol Cell Neurosci*, 1995. **6**(2): p. 153-67.
314. White, E., *Tumour biology. p53, guardian of Rb*. *Nature*, 1994. **371**(6492): p. 21-2.
315. Greene, L.A., et al., *Cell cycle molecules define a pathway required for neuron death in development and disease*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1772**(4): p. 392-401.
316. Nguyen, M.D., W.E. Mushynski, and J.P. Julien, *Cycling at the interface between neurodevelopment and neurodegeneration*. *Cell Death Differ*, 2002. **9**(12): p. 1294-306.
317. Chen, X.C., et al., *Involvement of CDK4, pRB, and E2F1 in ginsenoside Rg1 protecting rat cortical neurons from beta-amyloid-induced apoptosis*. *Acta Pharmacol Sin*, 2003. **24**(12): p. 1259-64.
318. Copani, A., et al., *The nature of the cell cycle in neurons: focus on a "non-canonical" pathway of DNA replication causally related to death*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1772**(4): p. 409-12.
319. Hu, S.Y., et al., *Progranulin compensates for blocked IGF-1 signaling to promote myotube hypertrophy in C2C12 myoblasts via the PI3K/Akt/mTOR pathway*. *FEBS Lett*, 2012. **586**(19): p. 3485-92.
320. Zanocco-Marani, T., et al., *Biological activities and signaling pathways of the granulin/epithelin precursor*. *Cancer Res*, 1999. **59**(20): p. 5331-40.
321. Cariaga-Martinez, A.E., et al., *Distinct and specific roles of AKT1 and AKT2 in androgen-sensitive and androgen-independent prostate cancer cells*. *Cell Signal*, 2013. **25**(7): p. 1586-97.
322. Santi, S.A. and H. Lee, *Ablation of Akt2 induces autophagy through cell cycle arrest, the downregulation of p70S6K, and the deregulation of mitochondria in MDA-MB231 cells*. *PLoS One*, 2011. **6**(1): p. e14614.

ANEXOS

Progranulin Deficiency Reduces CDK4/6/pRb Activation and Survival of Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells

Ana de la Encarnación · Carolina Alquézar ·
Noemí Esteras · Ángeles Martín-Requero

Received: 5 August 2014 / Accepted: 24 October 2014 / Published online: 7 November 2014
© Springer Science+Business Media New York 2014

Abstract Null mutations in *GRN* are associated with frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 inclusions (FTLD-TDP). However, the influence of progranulin (PGRN) deficiency in neurodegeneration is largely unknown. In neuroblastoma cells, silencing of *GRN* gene causes significantly reduced cell survival after serum withdrawal. The following observations suggest that alterations of the CDK4/6/retinoblastoma protein (pRb) pathway, secondary to changes in PI3K/Akt and ERK1/2 activation induced by PGRN deficiency, are involved in the control of serum deprivation-induced apoptosis: (i) inhibiting CDK4/6 levels or their associated kinase activity by sodium butyrate or PD332991 sensitized control SH-SY5Y cells to serum deprivation-induced apoptosis without affecting survival of PGRN-deficient cells; (ii) CDK4/6/pRb seems to be downstream of the PI3K/Akt and ERK1/2 signaling pathways since their specific inhibitors, LY294002 and PD98059, were able to decrease CDK6-associated kinase activity and induce death of control SH-SY5Y cells; (iii) PGRN-deficient cells show reduced stimulation of PI3K/Akt, ERK1/2, and CDK4/6 activities compared with control cells in the absence of serum; and (iv) supplementation of recombinant human PGRN was able to rescue survival of PGRN-deficient cells. These

observations highlight the important role of PGRN-mediated stimulation of the PI3K/Akt-ERK1/2/CDK4/6/pRb pathway in determining the cell fate survival/death under serum deprivation.

Keywords Progranulin FTLD-TDP · CDK6/pRb · PI3K/Akt · ERK1/2 · Cell survival · Apoptosis

Introduction

The term frontotemporal lobar degeneration (FTLD) refers to a group of progressive brain rare diseases, which involve shrinkage of specific areas of the brain that regulate behavior, personality, and language. The onset of symptoms usually occurs before the age of 60 years, accounting for 5–10 % of dementia patients [1, 2].

The neuropathological hallmark of FTLD is the degeneration of frontal and temporal lobes, as well as the accumulation of protein inclusions in neuronal and glial cells [3]. FTLD subtypes have been established depending on the proteins found in these inclusions. The main subtypes are FTLD-tau and FTLD-TDP for microtubule-associated protein tau (MAPT) and FTLD-TDP for ubiquitinated transactive response DNA-binding protein 43 (TDP-43) positive inclusions, respectively [4–6]. A large subset of FTLD-TDP patients has been identified to harbor loss-of-function mutations (including null mutations) in the gene-encoding progranulin (*GRN*) [7, 8] and a smaller number of mutations in the *valosin-containing protein (VCP)* gene [9], *transactive response DNA-binding protein-43 (TARDBP)* [10], *sequestome1/p62 (SQSTM1)* [11], and *ubiquilin-2 (UBQLN2)* [12]. A *C9ORF72* hexanucleotide expansion in chromosome 9 has been described to be responsible for familial frontotemporal dementia overlapping with motor neuron disease (FTD-MND) cases and amyotrophic lateral sclerosis

A. de la Encarnación · C. Alquézar · N. Esteras ·
Á. Martín-Requero (✉)
Department of Cellular and Molecular Medicine, Centro de
Investigaciones Biológicas (CSIC), Ramiro de Maeztu 9,
28040 Madrid, Spain
e-mail: amrequero@cib.csic.es

C. Alquézar · Á. Martín-Requero
CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), Monforte de Lemos 3,
28029 Madrid, Spain

Present Address:
N. Esteras
Department of Molecular Neuroscience, Institute of Neurology,
Queen Square, London WC1N 3BG, UK

Increased Wnt Signaling and Reduced Viability in a Neuronal Model of Progranulin-Deficient Frontotemporal Lobar Degeneration

Ana de la Encarnación¹ · Carolina Alquézar¹ · Ángeles Martín-Requero^{1,2,3}

Received: 22 July 2015 / Accepted: 1 December 2015
© Springer Science+Business Media New York 2015

Abstract Progranulin (PGRN) deficiency is considered the major cause of frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 protein inclusions (FTLD-TDP). Recent work unveiled a relationship between Wnt signaling and PGRN in cellular models of FTLD and cells of patients carrying loss-of-function *GRN* mutations. This study was undertaken to explore the relationship between PGRN deficit and Wnt signaling in the regulation of survival of *GRN* knockdown neuroblastoma SH-SY5Y cells (*GRN* KD). We report here that both canonical and noncanonical Wnt signaling cascades are overactivated in *GRN* KD cells. We detected increased expression levels of Wnt1 and Wnt5a ligands of the Frizzled receptors, as well as evidence for increased signaling of the Wnt/ β -catenin and Wnt/ Ca^{2+} cascades in PGRN deficient cells, such as increased nuclear content of β -catenin and higher levels of cyclin D1, or increased levels of the active form of the NFAT1 transcription factor, respectively. Upregulation of either Wnt/ β -catenin or Wnt/ Ca^{2+} signaling in *GRN* KD cells leads to the stimulation of BrdU incorporation into DNA, hyperphosphorylation of the pRb family of proteins and reduced cell viability over time. Blocking the Wnt cascades by specific canonical or noncanonical inhibitors of Wnt-dependent signaling, normalized the rate of DNA synthesis, and what it is more important restored the viability of

GRN KD cells. Our results suggest an important role of Wnt activation inducing cell cycle disturbance-mediated neuronal loss in the pathogenesis of PGRN deficiency-linked FTLD-TDP. Therefore, it is plausible that modulation of Wnt signaling could be a promising strategy for developing of new disease-modifying treatments for FTLD-TDP.

Keywords Progranulin FTLD-TDP · Wnt1 · Wnt5a · Cell cycle · Cell survival

Introduction

Progranulin (PGRN) is a glycoprotein widely expressed that is involved in multiple processes including tumorigenesis, wound repair, and inflammation [1]. The role of PGRN in the central nervous system (CNS) is not well understood; however, the discovery that loss-of-function mutations in its encoding gene (*GRN*) causes dementia as the result of neuronal atrophy of the temporal and frontal lobes (FTLD) [2, 3], indicates that PGRN exerts neurotrophic functions [4–6]. Up to now, more than 60 *GRN* mutations have been identified in patients diagnosed from FTLD with TDP-43 protein inclusions (FTLD-TDP) [7], indicating an essential role of PGRN in FTLD-TDP pathogenesis.

Since PGRN is a secreted protein, experiments were performed to determine the potential role of extracellular PGRN in neuronal survival. These studies demonstrated that addition of PGRN to stressed or PGRN-deficient neuronal cells promoted neurite outgrowth and neuronal survival [5, 8, 9].

The neurotrophic effects of PGRN are thought to be mediated by the binding of PGRN with a yet-unidentified receptor, although it had been suggested that sortilin or TNF α receptors might serve as effective PGRN receptors

✉ Ángeles Martín-Requero
amrequero@cib.csic.es

¹ Department of Cellular and Molecular Medicine, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC) Madrid, Madrid, Spain

² CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), Madrid, Spain

³ Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain