



Identificación de los agregados del receptor de andrógenos que causan la atrofia muscular espinal bulbar

Dr. Xavier Salvatella Giralt

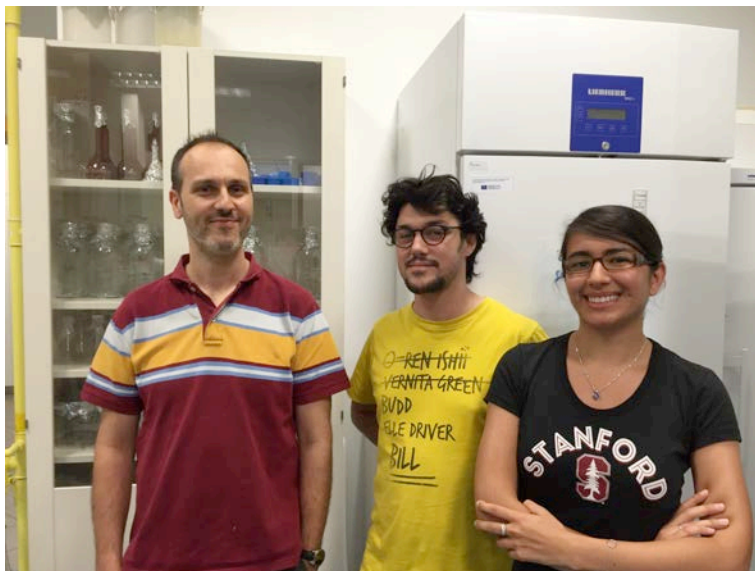
CSIC Consell Superior d'Investigacions Científiques.
Institut de Recerca Biomèdica de Barcelona

Dra. Eva Estébanez Perpiñá

Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona

Dra. Leila Luleshi

University of Cambridge UK



1. Resumen del proyecto

La atrofia muscular espinobulbar (SBMA) es una enfermedad minoritaria hereditaria neurodegenerativa que solo se manifiesta en hombres y no cuenta con tratamiento. Esta enfermedad fue descrita en el año 1968 y está causada por la deposición de agregados de moléculas del receptor de andrógenos (AR) con un mayor número de residuos de glutamina, región conocida como poliQ, en las neuronas motoras.

La formación de estos agregados, de los cuales no se conoce su composición exacta, ni su morfología ni su estructura molecular, altera funciones celulares claves, provocando la muerte de las neuronas motoras del asta anterior de la médula espinal, así como la muerte de los núcleos motores del tallo cerebral, provocando la enfermedad.

Los pacientes con SBMA manifiestan tanto síntomas de pérdida de función como puede ser una disminución de la fertilidad debido a una alteración de la función del AR por un mecanismo desconocido, como una ganancia de función, que incluye la debilidad de los músculos bulbares y de las extremidades debido a las nuevas funciones adquiridas por los agregados del AR.

El trabajo que hemos llevado a cabo está dirigido a resolver los aspectos claves de las bases moleculares de SBMA que son fundamentales para el desarrollo de un tratamiento terapéutico efectivo contra esta enfermedad.

Objetivo 1. Caracterizar *in vitro* la estructura, la dinámica y las interacciones del dominio intrínsecamente desordenado aminoterminal (NTD) del AR. Este dominio NTD presenta una región rica en glutaminas, conocida como poliQ, responsable de la agregación y con un papel clave en las funciones que se ven alteradas en la enfermedad de SBMA.

Objetivo 2. Caracterizar *in vitro* la morfología, la estructura molecular, la estabilidad y las propiedades neurotóxicas de los agregados formados por AR y los fragmentos del mismo que desencadenan SBMA. Comprender el origen de esta neurotoxicidad no es posible sin una descripción detallada de las propiedades biofísicas de estos agregados.

Objetivo 3. Determinar cuantitativamente la relación existente entre de formación de los agregados del AR y fragmentos del mismo con la degeneración de las neuronas *in vitro*. Con el fin de complementar los análisis realizados *in vitro*, hemos cuantificado la neurotoxicidad *in vivo* asociada a los cambios en la localización del AR y de la agregación.

En resumen, correlacionando las observaciones de los experimentos *in vivo* con la información obtenida de nuestros experimentos biofísicos hemos podido determinar qué tipo de agregados y cuáles son sus características que los convierten en responsables de la degeneración de las neuronas motoras en los enfermos de SBMA.

2. Resultados obtenidos

Propiedades estructurales del NTD del AR

Hemos estudiado las propiedades estructurales del dominio de transactivación del AR mediante resonancia magnética nuclear (RMN), la técnica biofísica más adecuada para la caracterización a nivel atómico de las proteínas intrínsecamente desordenadas. Nuestros resultados indican, tal como se había predicho, que este dominio es intrínsecamente desordenado, aunque presenta algunas regiones, conocidas como “motivos”, que están parcialmente plegadas.

Entre los motivos parcialmente plegados del NTD se encuentra la región poliQ, así como dos regiones conocidas como unidad transactivadora 1 y 5, las cuales se ha

descrito que son imprescindibles para la correcta función del receptor. Estos resultados muestran que el dominio está parcialmente plegado y que muy probablemente experimenta un plegamiento tras interactuar con otras proteínas, un mecanismo común en las proteínas intrínsecamente desordenadas.

Los experimentos de equilibrio destinados a estudiar la propensión a la oligomerización de los diferentes motivos presentes en el dominio NTD del AR han demostrado que este dominio se encuentra en equilibrio entre una forma monomérica y una forma oligomérica estabilizada por interacciones intermoleculares entre residuos específicos. Estudios complementarios resueltos en el tiempo han confirmado que dichos residuos desempeñan un papel fundamental en el inicio de la oligomerización del dominio y en la agregación del AR en SBMA.

Hemos estudiado las bases estructurales de la interacción entre el NTD del AR y algunas proteínas con las que interactúa, como son las proteínas de la maquinaria de transcripción basal, así como las proteínas de estrés al calor (*heat shock proteins*, Hsp). Estas últimas son claves en el mecanismo de protección de las células frente a los efectos no deseados de la agregación proteica.

Los resultados que hemos obtenido indican que los motivos de los AR parcialmente plegados están implicados en interacciones proteína-proteína que son claves para la función del AR como factor de transcripción. Es posible que incluso sea más importante que estas proteínas interactúan con los residuos que dan inicio a la oligomerización, proporcionando un mecanismo sencillo que explica la acción protectora de estas chaperonas moleculares.

El mecanismo de oligomerización del AR in vitro e in vivo

Aunque en nuestros planes iniciales no figuraba, hemos realizado también experimentos con un modelo de ratones transgénicos para determinar la naturaleza de las especies presentes en los agregados en SBMA. Estos estudios

fueron motivados, en parte, por la falta de claridad en la bibliografía sobre si la fragmentación del extremo aminoterminal del AR es necesaria para la formación de los agregados *in vivo*.

En colaboración con el grupo del professor Sobue (Universidad de Nagoya), establecimos dos líneas de ratones transgénicos: una que expresa el gen humano del AR con 24 glutaminas (24Q) y otra que expresa el gen humano del AR con 97 glutaminas (97Q). Los ratones que expresan AR con 24Q son indistinguibles de los ratones salvajes, mientras que los ratones que expresan AR con 97Q presentan una atrofia muscular grave y mueren, como promedio, al cabo de 19 semanas del nacimiento.

Hemos desarrollado un método para extraer los agregados de los tejidos de los ratones que expresan AR con 97Q. Esto nos ha permitido determinar en qué tejido estos agregados se forman en grandes cantidades, analizar sus propiedades fundamentales mediante microscopia electrónica de transmisión y microscopia de fuerza atómica, así como analizar su composición. Hemos descubierto que los agregados están formados por otras proteínas además del AR y que esta última está presente como un fragmento y no como proteína intacta. Finalmente, experimentos realizados en líneas celulares nos han permitido establecer que estos agregados formados por fragmentos del AR pueden ser internalizados por estas, translocados al núcleo y ejercer su toxicidad.

Habiendo establecido que el AR está fragmentado en los tejidos que presentan una mayor cantidad de agregados, hemos realizado experimentos *in vitro* con el fin de determinar el mecanismo por el que este fragmento oligomeriza y si, eventualmente, se agrega. Estos experimentos han mostrado inequívocamente que el mecanismo de agregación consiste en dos etapas bien definidas.

En la primera etapa del proceso de agregación, el fragmento del AR forma oligómeros solubles estabilizados por contactos intermoleculares entre las

cadena lateral de residuos específicos (*vid supra*). En una segunda etapa, estos oligómeros solubles se transforman en especies fibrilares capaces de reclutar más fragmentos del AR, formando agregados tóxicos. Hemos observado que el grado de formación de los agregados solubles es relativamente independiente del número de glutaminas presentes en la región poliQ, mientras que el grado de madurez del proceso de agregación sí que depende de este número.

Relación estructura/función de los agregados asociados a SBMA

La disponibilidad en nuestro laboratorio de un modelo de ratón transgénico de SBMA y, más importante aún, la disponibilidad de un método de extracción de agregados del AR de tejidos de estos ratones, nos ha permitido establecer una relación entre la estructura que adoptan los agregados y las consecuencias que su formación conllevan en el fenotipo que presentan los ratones.

Nuestros experimentos establecen que la morfología de los agregados del AR depende de la naturaleza del tejido donde se han formado y que existe una clara correlación entre la cantidad de los agregados formados en un tejido específico en los ratones transgénicos y la gravedad del fenotipo que estos presentan.

3. Relevancia y posibles implicaciones

Nuestros resultados son relevantes tanto para entender la naturaleza de los cambios conformacionales que se producen durante la función del AR y las bases moleculares de SBMA, así como para la identificación de potenciales estrategias terapéuticas para combatirlo. Por lo tanto, creemos que nuestros resultados aportan un avance sustancial en el campo de SBMA y planeamos publicarlos en un futuro próximo.

La caracterización de las propiedades estructurales del NTD muestra que este dominio está parcialmente plegado y que tiene una propensión intrínseca a

oligomerizar, la cual muy probablemente está relacionada con su función y que la evolución ha favorecido el desarrollo de mecanismos de protección para prevenir esta propensión a oligomerizar y que causa efectos no deseados. Estos mecanismos de protección incluyen la inducción de estructura secundaria en la región poliQ inducida por regiones adyacentes a esta, así como a la existencia de chaperonas moleculares.

Nuestras observaciones que los motivos que reconocen las chaperonas moleculares son los mismos que los que muestran nuestros experimentos como motivos claves para la oligomerización del AR, sugieren de forma robusta que pueden representar una diana terapéutica para combatir SBMA. Con esta idea en mente, estamos actualmente desarrollando un ensayo biofísico que nos permita identificar moléculas pequeñas o biológicas capaces de reconocer estos motivos para inhibir la oligomerización.

Siguiendo esta potencial estrategia terapéutica, los resultados obtenidos abren la posibilidad a que moduladores de la actividad de las chaperonas moleculares puedan ser muy beneficiosas para los pacientes con SBMA, previniendo indirectamente el establecimiento de las interacciones intermoleculares que dan lugar a la formación de los agregados tóxicos del AR.

Las observaciones que la acumulación de los agregados tóxicos del AR con una composición y una estructura bien definida tiene lugar en tejidos específicos y que su masa correlaciona con el fenotipo observado en el modelo animal, sugieren que estos agregados son los responsables de los síntomas que se observan en los pacientes. Este hecho tiene importantes implicaciones porque define qué tejido debe ser diana terapéutica en un futuro.

En resumen, los resultados obtenidos nos han permitido identificar tanto el tejido donde los agregados ejercen su toxicidad en SBMA, como el motivo del AR implicado en las interacciones intermoleculares que desencadenan el proceso de

oligomerización asociado a esta enfermedad. Motivados por estos resultados, en la actualidad estamos realizando estudios para verificar estos resultados persiguiendo con más intensidad el objetivo, en un futuro no muy lejano, de contribuir al desarrollo de un fármaco para combatir esta enfermedad.

4. Publicaciones generadas

Actualmente estamos preparando diferentes manuscritos para su publicación, donde se presentarán detalladamente los resultados obtenidos y descritos en este documento.