(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 338 392**

(21) Número de solicitud: 200602225

(51) Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)

(12) PATENTE DE INVENCIÓN B1

(22) Fecha de presentación: **18.08.2006**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **06.05.2010**

Fecha de la concesión: **16.02.2011**

(45) Fecha de anuncio de la concesión: **28.02.2011**

(45) Fecha de publicación del folleto de la patente: **28.02.2011**

(73) Titular/es: **Universidad de Salamanca**
c/ Patio de Escuelas, nº 1
37008 Salamanca, ES

(72) Inventor/es: **Weruaga Prieto, Eduardo;**
Alonso Peña, José Ramón;
Gómez Rodríguez, Carmela;
Berciano, María Teresa;
Lafarga, Miguel y
Valero Gómez-Lobo, Jorge

(74) Agente: **Pons Ariño, Ángel**

(54) Título: **Método para la identificación de signos de disfunción neuronal pre-neurodegenerativos.**

(57) Resumen:
Método para la identificación de signos de disfunción neuronal pre-neurodegenerativos.
La presente invención está dirigida a la detección temprana de procesos degenerativos relacionados con desordenes neurodegenerativos. En concreto, hace referencia a un método para la identificación de signos de disfunción neuronal pre-neurodegenerativos en muestras biológicas mediante la detección de indicadores específicos y un kit para la realización del mencionado método.

ES 2 338 392 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Método para la identificación de signos de disfunción neuronal pre-neurodegenerativos.

La presente invención está dirigida a la detección temprana de procesos degenerativos relacionados con desórdenes neurodegenerativos. En concreto, hace referencia a un método para la identificación de signos de disfunción neuronal pre-neurodegenerativos en muestras biológicas mediante la detección de indicadores específicos y un kit para la realización del mencionado método.

Antecedentes de la invención

Muchas enfermedades neurodegenerativas conllevan la pérdida de tipos específicos de neuronas. La enfermedad de Alzheimer, la de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica, la retinitis pigmentosa, la atrofia muscular espinal y algunas degeneraciones cerebelosas son sólo unos ejemplos, y todos ellos suponen unos costes, personales, socioeconómicos y en sanidad, enormes. Poseen un claro componente genético, que incluye la herencia familiar o la existencia de factores de predisposición. La etiología de estas patologías, cuando se conoce, frecuentemente incluye mutaciones genéticas que acaban causando la activación de mecanismos apoptóticos que dan lugar a los síntomas clínicos (Thompson, 1995). Con el fin de impedir, retrasar el comienzo o reducir el progreso de estas patologías, se necesita entender los mecanismos involucrados en la muerte celular y conocer los eventos y estadios que se producen antes de que tenga lugar la verdadera degeneración neuronal. De esta manera, la identificación de fenómenos pre-neurodegenerativos permitirá detectar los primeros síntomas celulares de las enfermedades neurodegenerativas. Así, se podrán aplicar distintas terapias a pacientes o modelos experimentales durante los primeros estadios de la enfermedad, cuando aún no se manifiestan signos evidentes de la misma. El análisis de los signos de neurodegeneración tales como la aparición de marcadores de apoptosis, detecta las últimas fases de los procesos de degeneración, momento en el que ya no son efectivas la mayoría de las terapias. En la actualidad, no existe un protocolo para la identificación de los estadios tempranos de neurodegeneración ni de signos de pre-neurodegeneración.

Para llevar a cabo la presente invención se ha utilizado el ratón mutante *pcd* (Purkinje cell degeneration) el cual sufre la degeneración selectiva de ciertas poblaciones neuronales específicas. La mutación *pcd* es una mutación autosómica, recesiva y de penetración completa que se localiza en el cromosoma 13 (Mullen *et al*., 1976; Campbell y Hess, 1996). En esta mutación, sólo se ve afectado el gen *nna1*, ya que el ARNm de *nna1* está reducido o alterado estructuralmente y los ARNm de los dos genes que flanquean a *nna1* están inalterados (Fernández-González *et al*., 2002), *nna1* codifica una proteína nuclear involucrada en procesos nucleares y asociada a la diferenciación y regeneración neuronal (Harris *et al*., 2000). Los animales *pcd* son modelos muy interesantes para el estudio de la degeneración neuronal ya que son considerados totalmente normales en el momento del nacimiento, previniendo la existencia de mecanismos prenatales compensatorios, y la neurodegeneración ocurre in periodos concretos, permitiendo una caracterización detallada y exacta del proceso de degeneración. En el ratón *pcd*, degeneran poblaciones neuronales específicas, entre las que se incluyen las neuronas de Purkinje del cerebelo (Mullen *et al*., 1976), los fotorreceptores de la retina (Lavail *et al*., 1982; Blanks *et al*., 1982) y las células mitrales del bulbo olfatorio (BO; Greer y Shepherd, 1982).

Además, en el ratón mutante *pcd* la población de células mitrales es una buena candidata para el estudio de la degeneración neuronal. Primero, la degeneración de estas células tiene lugar desde el día 60 al 90 de vida postnatal. (Greer y Shepherd, 1982). Sin embargo, la degeneración de las células de Purkinje comienza muy tempranamente, durante el desarrollo postnatal, cuando aún está teniendo lugar la maduración normal de las células (Mullen *et al*., 1976). Por el contrario, la degeneración de los fotorreceptores se prolonga mucho, mezclándose con fenómenos relacionados con el envejecimiento (Lavail *et al*., 1982; Blanks *et al*., 1982). Segundo, se conoce perfectamente la tipología neuronal del BO, sus conexiones y neuroquímica (Shipley *et al*., 1996; Kratskin y Belluzzi, 2003), la mutación no afecta directamente a otros tipos neuronales (Greer y Shepherd, 1982) y las células mitrales son fácilmente distinguibles de otras poblaciones neuronales bulbares por su tamaño y posición (Shipley *et al*., 1996; Kratskin y Belluzzi, 2003). Tercero, son las principales neuronas de proyección del BO, con actividades eléctricas y sintéticas elevadas y estables y por lo tanto sin periodos de inactividad (Friedman y Strowbridge, 2000; Lowe, 2003; Djurisic *et al*., 2004). Cuarto, a pesar de que el BO es la principal diana de la neurogénesis adulta, las células recién generadas se diferencian a diversos tipos de interneuronas (Altman, 1969; Lois y Álvarez-Buylla, 1994; Carleton *et al*., 2003), pero nunca a células mitrales. Constituyen, por lo tanto, una población celular homogénea, de edad similar y generada durante un momento concreto del desarrollo prenatal (Chuah *et al*., 2003).

Descripción de la invención

Descripción de las figuras

Figura 1

Pérdida progresiva de células mitrales en el ratón pcd

A-D. Imágenes de microscopía confocal de la capa de las células mitrales marcada con yoduro de propidio (PI) de un ratón control P70 (A), y ratones *pcd* P50 (B), P70 (C) y P90 (D). Cabe destacar la pérdida severa de células mitrales en los ratones *pcd* de P70 y P90. La única célula mitral (flecha) que se aprecia en D, exhibe un mareaje débil de la sustancia citoplásmica de Nissl teñida con PI. A-D: barra de escala de 25 μm. E. Análisis semicuantitativos de

la densidad relativa de células mitrales de animales control y *pcd* de P50 a P90. La densidad de células mitrales se estimó midiendo el número de células mitrales por mm de longitud de la capa de las células mitrales en imágenes de microscopía confocal de secciones coronales similares. Las densidades absolutas de los ratones *pcd* se corrigieron en base a la relación existente entre los volúmenes del BO de cada grupo (volumen *pcd*/volumen control) para poder obtener datos comparables. F. Imágenes de microscopía confocal de disociados neuronales de células mitrales marcadas con PI. Se ha de destacar la presencia de nucleolos prominentes y gran cantidad de sustancia de Nissl en las células mitrales. Barra de escala: 10 μm.

Figura 2

Focos nucleares de daño y reparación de ADN en las células mitrales pcd

Imágenes de microscopía confocal de disociados neuronales de células mitrales de ratones P70 control y *pcd*. A-F. Doble inmunomarcaje para H2AX y ácidos nucleicos con PI. A, las células mitrales de ratones control no expresan γ-H2AX (B) mientras que las células mitrales *pcd* muestran un gran número de focos positivos a γ-H2AX (E y F) distribuidos por todo el núcleo, excluyendo el nucleolo, que aparece teñido con PI en C. Tras la tinción con PI (A y D las células mitrales muestran un mareaje citoplásmico similar del ARNr (sustancia de Nissl) en animales control (A) y mutantes (D). G-L. Doble inmunofluorescencia para la detección de H2AX y pATM en células mitrales control (G-I) y *pcd* (J-L). Se ha de destacar que pATM y H2AX colocalizan formando focos nucleares en las células mitrales *pcd*. Doble inmunomarcaje para H2AX y 53BP1 en células mitrales control (M-P) y *pcd* (Q-R). 53BP1 se redistribuye pasando de tener un patrón nuclear difuso en las neuronas control (M) a formar focos nucleares en las neuronas *pcd*, donde colocaliza con H2AX (Q-S). Barra de escala: 5 μm.

Figura 3

Inhibición transcripcional en las células mitrales pcd

Imágenes de microscopía confocal de disociados neuronales de células mitrales de ratones control (A, C y E) y *pcd* (B, D y F). La inmunodetección de la histona acetilada H4 y de la ARN polimerasa II (H5) presentan un patrón punteado similar para ambos marcadores en las células mitrales control (A-C) con focos nucleares intensamente teñidos, mientras que se detecta una señal nuclear débil para estas dos moléculas dependientes de transcripción en las células mitrales *pcd* (B y D). E y F. Incorporación de 5'-FU al ARN naciente tras un pulso de 30 minutos. Las neuronas control muestran una alta incorporación de 5'-FU en el núcleo y en el nucleolo, además de numerosos focos de transcripción (E). En las células mitrales *pcd* se nota una reducción de las señales nucleolar y extranucleolar de 5'-FU (E). Barra de escala: 5 μm.

Figura 4

Represión transcripcional y heterocromatinización en las células mitrales pcd

Imágenes de microscopía confocal de disociados neuronales de células mitrales de ratones control y *pcd* P70. A-F. Doble inmunomarcaje para la histona H4 trimetilada en K20 (H4-3Me; H43M) y ácidos nucleicos con PI en células mitrales control (A-C) y *pcd* (D-F). En las células mitrales control se pueden observar unos pocos agregados perinucleolares y focos nucleares de H4-3Me, marcador de heterocromatina reprimida transcripcionalmente, (B, y C) mientras que en las células mitrales *pcd* se marcan grandes masas perinucleolares y muchos focos nucleares de H4-3Me (E). La heterocromatina perinucleolar que presenta H4-3Me también se tiñe con PI (A y D). G-I. La Incorporación de 5'-FU en combinación con el inmunomarcaje de H4-3Me en una célula mitral *pcd* muestra la presencia de focos de transcripción alrededor de los agregados nucleares positivos a H4-3Me pero no en su interior. J-O. En las células mitrales control aparecen focos de HP1α, marcador de heterocromatina pericentromérica, pequeños y débilmente teñidos (K y L) mientras que en las células mitrales *pcd* estos focos son mayores y aparecen intensamente teñidos (N, y O). Se ha de destacar que el mareaje de Hp1α excluye a los nucleolos y a la heterocromatina perinucleolar (L y O). Barra de escala: 5 μm.

Figura 5

Cambios ultraestructurales en las células mitrales pcd

Imágenes de microscopía electrónica del núcleo y citoplasma de una célula mitral control (A y C, respectivamente) y una célula mitral *pcd* (B y D, respectivamente). A, B. La célula mitral control presenta la cromatina predominantemente dispersa con unas pocas masas de heterocromatina condensada y un nucleolo reticulado típico (A), mientras que el número de masas de heterocromatina (flechas) se ve notablemente aumentado en la célula mitral *pcd*, que además presenta un nucleolo segregado (B). C, D. A nivel del citoplasma, se pueden apreciar las cisternas de retículo endoplasmático rugoso (RER) en la célula mitral control (C), mientras que éstas se pierden y son reemplazadas por polirribosomas libres en la célula mitral *pcd* (D). Barra de escala: 3 μm.

Figura 6

Segregación del nucleolo en las células mitrales pcd

Imágenes de microscopía electrónica del nucleolo de una célula mitral control (A) y *pcd* (B-D). Los insertos muestran el componente fibrilar denso de diferentes nucleolos inmunoteñidos contra fibrilarina. A. La célula mitral control presenta un nucleolo redondo y reticulado con numerosos centros fibrilares (asteriscos) y una organización reticular de los componentes fibrilar denso y granular. Ch señala la cromatina perinucleolar. B-D. Diferentes patrones de segregación del componente fibrilar denso (F) y granular (G) de células mitrales *pcd*. Existe desorganización y pérdida de los centros fibrilares y presencia de masas de heterocromatina prominentes (Ch) unidas a los nucleolos segregados, a-d (insertos). La inmunodetección de fibrilarina, marcador del componente fibrilar denso, muestra la típica distribución de este componente en todo el nucleolo de una neurona control (a), y su segregación en unas pocas masas intensamente teñidas en la periferia nucleolar de las células mitrales de ratones *pcd* (b-d). Existe una clara correlación entre la distribución ultraestructural del componente fibrilar denso (F, en B-D) y el patrón de distribución de la fibrilarina en b-d. Barra de escala para A-D: 1 μm.

Figura 7

Reorganización de los cuerpos de Cajal (CB) y los agregados nucleares en las células mitrales pcd

Imágenes de microscopía confocal de disociados de células mitrales de ratones P70 control (A-C y G-I) y *pcd* (D-F y J-L). A-C. La célula mitral control muestra un cuerpo de Cajal maduro (círculo intensamente teñido en A-C) doblemente inmunomarcado para coilina (A y C) y SMN (B y C). Además, se puede encontrar SMN en el citoplasma y la envuelta nuclear de las células mitrales control. D-F. Coilina (D y F) y SMN (E y F) colocalizan alrededor del nucleolo formando caperuzas perinucleolares en las células mitrales *pcd*. G-I. La inmunodetección de la proteína U2B" muestra una distribución difusa de los factores de splicing de snRNP en el núcleo de las células mitrales control (H e I). J-L. Los factores de splicing se localizan en grandes agregados nucleares en el núcleo de las células mitrales *pcd* (K y L). El nucleolo, que aparece teñido con PI (G y J), está libre de U2B" (I y L). Barra de escala: 5 μm.

Figura 8

Eventos apoptóticos en las células mitrales pcd. A-B

Imagen de microscopía confocal de la capa de células mitrales de un ratón *pcd* P90 teñida con PI (A) en la que se muestra una célula localizada en la capa de las células mitrales positiva para la técnica de TUNEL con cuerpos apoptóticos prominentes (B). C-D. Doble inmunomarcaje para pan-histona y caspasa 3 en una célula mitral de un ratón P90 *pcd*. Las áreas prominentes inmunorreactivas para pan- histona corresponden a grandes masas de heterocromatina e indican el avanzado estado de heterocromatinización (A). La caspasa 3 activa aparece concentrada dentro del núcleo, excluyendo el nucleolo (B). Esta localización nuclear de la caspasa 3 se ha relacionado con la inducción de muerte celular por apoptosis. Barras de escala: A-B = 20 μm; C-D =10 μm.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona indicadores sensibles de etapas tempranas y potencialmente reversibles de daño neuronal en un amplio rango de desordenes neurodegenerativos, mediante la caracterización de los mecanismos nucleares involucrados en las primeras etapas de degeneración de las células mitrales en los ratones mutantes *pcd*. La presente invención combina diferentes marcadores que, en conjunto, constituyen una herramienta óptima para la detección de procesos pre-neurodegenerativos. Además, la invención incluye la detección de un marcador apoptótico (la caspasa 3 activa) para analizar el grado de degeneración y conocer la reversibilidad de la degeneración tisular global. De este modo, la invención permite evaluar el estado y la progresión de diversas enfermedades neurodegenerativas y conocer la utilidad de diferentes terapias regenerativas o paliativas.

En particular, se estudia la respuesta de los compartimentos nucleares implicados en la regulación de la expresión génica y el procesamiento de ARN mediante el empleo de un sistema de ensayo transcripcional *in situ* de marcadores moleculares para distintos compartimentos nucleares, para componentes de la vía de señalización del daño y reparación del ADN, y análisis ultraestructurales, demostrándose de esta forma que la mutación *pcd* induce la formación de focos de daño y reparación del ADN que están asociados a una inhibición transcripcional, cambios epigenéticos en la metilación de las histonas nucleosomales, segregación nucleolar y a la reorganización de los agregados nucleares y CB (cuerpos de Cajal). Todos estos eventos tienen lugar en ausencia de signos celulares de apoptosis y son reflejo de estadios pre-degenerativos de las células mitrales. Estos cambios pre-degenerativos aparecen en neuronas con una citología general bien preservada y son indicadores sensibles de una etapa de daño neuronal temprana y potencialmente reversible en un amplio rango de desórdenes neurodegenerativos.

En condiciones fisiológicas, el daño espontáneo en el ADN es inmediatamente reparado por recombinación homologa o unión de extremos no homólogos (Cahill *et al*., 2006). De hecho, las células mitrales de ratones control analizadas para la presente invención no mostraban focos de daño en el ADN pero presentaban un mareaje difuso para pATM y 53BP1 (Fig. 2 G-I, M-P). Esta observación indica la presencia de niveles basales de moléculas sensoras del daño en el ADN (pATM y 53BP1) en las células mitrales. Esto sugiere que los mecanismos de reparación mantienen un nivel bajo de actividad, presumiblemente para reparar de forma rápida las roturas del ADN.

Debido a la alta actividad de las células mitrales (Friedman y Strowbridge, 2000; Lowe, 2003; Granados-Fuentes *et al*., 2004; Djurisic *et al*., 2004), puede asumirse que son susceptibles de sufrir daños en su ADN. Este daño se repara de forma rápida gracias a la presencia de estas moléculas guardianas, que aseguran la supervivencia celular. La formación y acumulación de focos nucleares intensamente teñidos para γ-H2AX en las células mitrales de los mutantes *pcd* indica la incapacidad de esta población neuronal para desarrollar una respuesta adecuada para reparar el ADN dañado, probablemente debido a la mutación *pcd*. En este contexto, la agregación de las proteínas de reparación dentro de los focos nucleares observados en las células mitrales de los ratones *pcd* soporta la existencia de una respuesta inicial de supervivencia frente al daño en el ADN. Además, a pesar de que la mayoría de las células mitrales presentan focos positivos para γ-H2AX a P70, sólo se encontraron unas pocas células positivas para TUNEL en la capa de las células mitrales. Esto sugiere que el daño en el ADN no está inmediatamente relacionado con la fragmentación apoptótica del ADN, al menos, en esta fase temprana de pre-degeneración. Sin embargo, la pérdida severa de células mitrales entre P60 y P90 en los ratones *pcd* sugiere que, a pesar del intento inicial de reparar el ADN (fase pre-degenerativa), la severidad de las lesiones en el ADN o defectos en la vía de daño y reparación del ADN podrían impedir la recuperación celular, produciendo una inestabilidad genómica que llevaría, en última instancia, a la neurodegeneración y muerte neuronal por apoptosis.

Se ha de destacar que la formación de los focos de daño y reparación del ADN en las células mitrales del ratón *pcd* está acompañada por una caída general de la transcripción como indica el ensayo de transcripción *in situ*. Esta inhibición de la transcripción en las células mitrales es una respuesta de estrés celular que pretende proteger al ADN de nuevos daños.

Respecto a las modificaciones que sufre la cromatina, los resultados obtenidos en las células mitrales muestran que la mutación *pcd* induce la formación de agregados nucleares de histona H4-K20-3Me que se corresponden con dominios transcripcionalmente inactivos de cromatina. Esta observación soporta la participación en este proceso de mecanismos epigenéticos de inhibición de la transcripción mediados por la metilación de histonas nucleosomales. Esto indica que la trimetilación de la histona H4 en K20 actúa como una marca epigenética de represión dentro de los mecanismos de silenciamiento génico. Además, los resultados obtenidos demuestran una correlación negativa entre los patrones de H4-K20-3Me y los de hiperacetilación de H4 *in vivo*. La existencia de un silenciamiento génico en las células mitrales de los ratones *pcd* de índole epigenética es coherente con la existencia a nivel ultraestructural de masas prominentes de heterocromatina, una modificación estructural de la cromatina asociada a la represión génica.

En paralelo a las modificaciones cromatínicas, la mutación *pcd* causa la segregación de los componentes nucleolares y la desorganización de los centros fibrilares en las células mitrales, dos modificaciones estructurales asociadas con una disfunción severa de la transcripción nucleolar (Puvion-Dutilleil *et al*., 1992; Gebrane-Younés *et al*., 2005). De hecho, estas alteraciones se inducen de forma específica en líneas de cultivo celular tras inhibir la transcripción nucleolar con actinomicina D (Fakan, 1986; Puvion-Dutilleil *et al*., 1992), o en las neuronas de los ganglios sensoriales con adriamicina (Pena *et al*., 2000). Como era de esperar, la alteración de la biogénesis de los ribosomas estaba asociada con una desorganización del retículo endoplasmático rugoso, una modificación estructural que ha sido previamente descrita en las células de Purkinje de los ratones *pcd* (Landis y Mullen, 1978) y que refleja la existencia de una maquinaria traduccional defectuosa.

Además de los cambios en los compartimentos nucleares involucrados en la transcripción, los resultados obtenidos demuestran una reorganización de los cuerpos de Cajal y de los agregados nucleares de factores de splicing, dos compartimentos relacionados con el procesamiento de ARN nucleares (Gall, 2000; Lamond y Spector, 2003). Dado que la transcripción y el procesamiento de ARN están altamente coordinados entre sí (Proudfoot *et al*., 2002), una disminución de la producción de pre-ARNm en las células mitrales de los ratones *pcd* podría conducir a una reorganización de la maquinaria de procesamiento del ARN. De esta manera, la reducción del número de cuerpos de Cajal y la reorganización de la coilina alrededor del nucleolo durante la fase pre-degenerativa de las células mitrales es coherente con las evidencias experimentales que demuestran que los cuerpos de Cajal son orgánulos nucleares dependientes de transcripción (Lafarga *et al*., 1998; Pena *et al*., 2001; Cioce y Lamond, 2005). En lo referente a los agregados nucleares de los factores de splicing snRNP, los resultados obtenidos demuestran una reorganización de estos componentes en agregados mayores y más prominentes (Fig. 7). En la actualidad se acepta de manera general que los agregados nucleares son sitios de pre-ensamblaje y almacenamiento de factores de splicing que luego son redirigidos a las regiones de transcripción activa (Lamond y Spector, 2003). La reorganización de los factores de splicing en grandes agregados puede deberse a la acumulación de estos factores en compartimentos de almacenaje cuando la transcripción se ve reprimida en respuesta al daño en el ADN.

Por lo tanto, se puede afirmar que la degeneración de las células mitrales en los ratones *pcd* implica la acumulación de focos de daño en el ADN. La aparición de estos focos produce una cascada de procesos nucleares que incluyen represión de la transcripción, heterocromatinización, y la reorganización de los agregados nucleares y los cuerpos de Cajal. Todos estos procesos son indicativos de una disfunción de la expresión génica y del procesamiento de los

pre-ARNm. Además, estos cambios están asociados a la desorganización del nucleolo y del retículo endoplasmático rugoso, dos componentes básicos para la biogénesis de ribosomas y la síntesis de proteínas. Curiosamente, estas alteraciones aparecen en células mitrales que presentan una morfología general aparentemente bien preservada, sin evidencias subcelulares de neurodegeneración. Por ello, estos cambios representan las manifestaciones estructurales más tempranas de los cambios pre-degenerativos que sufren las células mitrales de los ratones mutantes *pcd*.

En vista de todo lo mencionado anteriormente, la reorganización de los compartimentos nucleares en las células mitrales inducida por el daño en su ADN es reflejo de una disfunción importante de la transcripción y el procesamiento del ARN, y es una señal de la existencia de cambios pre-degenerativos en esta población neuronal. La presente invención también destaca el comportamiento dinámico de los compartimentos nucleares y su importancia como marcadores sensibles de alteraciones neuronales relacionadas con la expresión génica y el procesamiento de ARN. Por tanto, todos estos marcadores o indicadores pueden ser considerados como indicadores universales de disfunciones neuronales pre-neurodegenerativas en un amplio rango de desórdenes neurodegenerativos.

Así, un primer aspecto de la presente invención hace referencia a un método (de aquí en adelante denominado el método de la invención) para la identificación de signos de pre-neurodegeneración, relacionados con la disfunción neuronal, en muestras biológicas aisladas que comprende el análisis de los patrones de expresión de, al menos, uno de los siguientes indicadores o cualquier combinación de los mismos:

a. la formación de focos nucleares de daño y reparación del ADN

b. la detección de la forma activa de la ARN polimerasa II

c. Cambios epigenéticos en las histonas nucleosomales o heterocromatinización

d. Reorganización de los cuerpos de Cajal y los agregados nucleares

e. Biomarcador caspasa 3 activa (un marcador de apoptosis).

La presente invención hace referencia particularmente a un método de la invención que comprende el análisis de los patrones de expresión de, al menos, uno de los siguientes indicadores o la cualquier combinación de los mismos:

a) focos nucleares inmunorreactivos para γ-H2AX

b) masas perinucleolares y agregados inmunorreactivos para la histona trimetilada

c) La reducción del número de focos y de la intensidad de la señal para la histona acetilada H4 en comparación con las células control

d) biomarcador caspasa 3 activa

e) Cuerpos nucleares inmunorreactivos para pATM

f) Focos nucleares inmunorreactivos para 53BP1

g) La relocalización de coilina en comparación con las células control

h) La reducción en el número de focos o en la intensidad de la señal de la ARN polimerasa II.

Más particularmente, la presente invención se refiere al método de la invención que comprende la determinación de los siguientes indicadores:

a. focos nucleares inmunorreactivos para γ-H2AX, distribuidos por todo el núcleo, pero no en el nucleolo

b. masas perinucleares y agregados inmunorreactivos para la histona trimetilada

c. La reducción del número de focos y la intensidad de la señal de la histona H4 acetilada en comparación con las células control

d. caspasa 3 activa en el núcleo.

En una realización preferida de la invención, los anticuerpos primarios o fragmentos de los mismos, que se muestran en la Tabla I, se utilizan como un medio para la detección específica de los indicadores empleados en el método de la invención. No obstante, otros anticuerpos o sus fragmentos, para la detección de los indicadores anteriormente mencionados, pueden utilizarse para desarrollar el método de la invención.

TABLA 1

Anticuerpos primarios

Anticuerpo primario	Referencia	Dilución del anticuerpo primario
Anti-53BP1 de conejo	NB 100-304, Novus Biologicals, USA	1: 200
Anti-BrdU de ratón	Clone BU-33, Sigma, USA	1: 100
Anti caspasa 3 activa de conejo	R&D systems, USA	1:500
Anti-coilina de conejo	204.3, Bhoman et al. (1995)	1: 75
Anti-fibrilarina de ratón	72B9, Reimer et al. (1987)	1: 10
Anti-γ-H2AX de ratón	Transduction Labs., USA	1: 300
Anti–H4 acetilada de conejo	Chemicon Int., USA.	1: 100
Anti–H4-K20-3Me de conejo	Upstate, USA.	1: 100
Anti-HP1α de ratón	Chemicon Int., USA	1: 500
Anti- ATM pS1981 de conejo	600-401-400, Rockland, USA	1:100
Anti-pan-Histona de ratón	Roche, Alemania	1:100
Anti-pol II de ratón	H5, Warren et al. (1992)	1:100
Anti-SMN de ratón	Transduction Labs., USA	1: 500
Anti- U2B" de ratón	Habets et al. (1989)	1:150

53BP1: Proteína de unión a P53 1, BrdU: Bromodeoxiuridina, γ-H2AX: la forma fosforilada de la variante de histona H2 H2AX, H4: histona H4, H4-K20-3Me: histona H4 trimetilada, HP1α: proteína de la heterocromatina 1 alfa, ATM pS1981: proteína mutada en la ataxia telangiectasia fosforilada (pATM), SMN: proteína de supervivencia de las motoneuronas, pol II: polimerasa II fosforilada.

En una realización preferida de la presente invención, el método de la invención es un método de realización *in vitro*. En una realización aún más preferida de la invención el método de la invención es un método de realización *in vivo*.

En un segundo aspecto de la invención, los signos pre-neurodegenerativos de disfunción neuronal están relacionados con cambios presentes en una amplia diversidad de desórdenes neurodegenerativos, que incluyen, entre otros, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica, la retinitis pigmentosa, la atrofia muscular espinal, degeneraciones cerebelares, la esclerosis múltiple y las encefalopatías espongiformes transmisibles (TSE).

En una realización preferente, este método puede ser útil para la identificación de signos pre-neurodegenerativos de disfunción neuronal en otras patologías no genéticas causadas por priones que incluyen el Scrapie, la encefalopatía espongiforme bovina, la enfermedad del desgaste crónico, la enfermedad de Creutzfeld-Jakob (CJD), la nueva variante de CJD, CJD esporádica, el síndrome de Gerstmann-Straussler Sheinker, el Kuru y el insomnio familiar fatal.

En un tercer aspecto de la invención, las muestras biológicas aisladas empleadas para desarrollar el método de la invención comprenden células o muestras de tejido.

Las células utilizadas para desarrollar el método de la invención comprenden todo o parte del sistema nervioso central y periférico incluyendo el cerebro, la médula espinal, la retina, los ganglios, los nervios o los órganos sensoriales.

En un cuarto aspecto de la invención, la muestra empleada para desarrollar el método de la invención procede de mamíferos, preferentemente de humanos.

Un quinto aspecto de la invención hace referencia a un kit (de aquí en adelante denominado kit de la invención) adecuado para desarrollar el método de la invención, que comprende medios específicos de detección para la determinación de, al menos, uno de los siguientes indicadores:

a. γ-H2AX

b. histona trimetilada

c. histona H4 acetilada

d. caspasa 3 activa

e. pATM

f. 53BP1

g. coilina

h. ARN polimerasa II.

En un concepto más amplio de la invención, los medios de detección del kit de la invención se seleccionan de un grupo que contiene anticuerpos primarios capaces de detectar cualquiera de los indicadores de la invención. En una realización particular, los mencionados anticuerpos se seleccionan de la tabla I. En una realización aún más preferente, el kit de la invención comprende anticuerpos primarios capaces de detectar los siguientes indicadores: γ-H2AX, histona trimetilada, histona H4 acetilada y caspasa fosforilada y opcionalmente anticuerpos primarios capaces de detectar, al menos, uno de los siguientes indicadores: pATM, 53BP1, coilina y ARN polimerasa II, y anticuerpos secundarios capaces de unirse a los anticuerpos primarios. Todos los demás componentes del kit tales como, pero no limitados a, PI, seroalbúmina bovina, o glicina también forman parte de la presente invención.

Tal y como se emplea aquí, el término "muestra biológica" se aplica a cualquier tipo de muestra de tejidos o fluidos biológicos que contengan cualquier tipo de célula.

Tal y como se emplea aquí, los métodos que pueden utilizarse para llevar a cabo el método de la invención incluyen pero no se limitan a:

- disociados de neuronas
- perfusión
- microscopía electrónica
- tinción inmunohistoquímica
- tinción inmunofluorescente
- Western blot.

Tal y como se emplea aquí, el término signos pre-neurodegenerativos de la disfunción neuronal hace referencia a un estado celular que precede a la pérdida irreversible o degeneración de la propia célula.

Tal y como se emplea aquí, el término anticuerpo primario hace referencia a un anticuerpo que se une a cualquier epítopo de las moléculas testadas.

Tal y como se emplea aquí, el término anticuerpo secundario hace referencia a un anticuerpo que reconoce al anticuerpo primario.

A menos que se defina de otra manera, todas las técnicas y términos científicos usados aquí poseen el mismo significado común que cualquier entendido en la materia de la que procede la invención pueda darle normalmente. Métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos aquí pueden ser utilizados para la puesta en práctica de la presente invención. Durante toda la descripción y reclamaciones el verbo "comprender" y sus variaciones no pretenden excluir otros rasgos técnicos, aditivos, componentes o pasos. Tras el examen de la descripción de la invención o su puesta en práctica, pueden derivarse objeciones, ventajas y rasgos adicionales de la misma que se harán aparentes para los expertos en la materia. Los siguientes ejemplos, ilustraciones y enumeración secuencial se proporcionan como medio para ilustrar y no pretenden limitar la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

La mutación pcd induce la pérdida progresiva de células mitrales

Se analizó la citoarquitectura y se cuantificaron las células mitrales en secciones coronales de BO teñidas con PI. Las células mitrales mostraban su típica disposición, formando un estrato celular entre las capas plexiforme externa e interna (Shipley *et al*., 1996; Kratskin y Belluzzi, 2003). Eran las neuronas más grandes del BO y sus cuerpos celulares tenían el diámetro mayor de 30 μm, aunque sus tamaños variaban considerablemente de una célula a otra (Fig. 1A). El análisis cuantitativo de la densidad de células mitrales en las secciones de tejido teñidas con PI (Fig. 1 A-D) indicó que no había cambios significativos en el número de células mitrales del ratón control de P50 a P90 (Fig. 1E). Sin embargo, la densidad de células mitrales disminuía drásticamente de P50 a P90 en los ratones *pcd* (Fig. 1 B-E). El curso temporal de la pérdida de células mitrales en los ratones *pcd* indicaba que no existía pérdida neuronal a la edad P50, que había una pequeña reducción en la densidad de células mitrales a P70 y que sólo unas pocas células mitrales permanecían en el ratón *pcd* a P90, la mayoría de ellas en un avanzado estado de degeneración (Fig. 1 B-E). Teniendo en cuenta estos resultados, la edad P70 se consideró como la mejor para el estudio de los cambios pre-degenerativos en las células mitrales del ratón mutante *pcd*, ya que, a esta edad, se podían observar todas las fases neurodegenerativas.

A pesar de que la citología del cuerpo celular de las células mitrales tanto de ratones control como *pcd* podía examinarse en secciones de tejido teñidas con PI (Fig. 1 A y B), empleamos disociados de células mitrales para estudiar la organización nuclear de esta población neuronal. Este procedimiento, que ya ha sido descrito previamente (Pena *et al*., 2001), permite una preservación excelente de la organización morfológica y citológica global del cuerpo celular de las células mitrales, y es la mejor opción par el estudio de los compartimentos nucleares en todo el núcleo por medio de microscopía confocal láser. La figura 1F ilustra un ejemplo representativo de células mitrales disociadas y teñidas con PI. El cuerpo celular de estas neuronas presenta núcleos grandes y pálidos, nucleolos prominentes y citoplasma abundante que incluye áreas extensas teñidas con PI, que se corresponden con la distribución de la sustancia de Nissl.

Ejemplo 2

La mutación pcd induce la formación de focos nucleares de daño y reparación de ADN en las células mitrales

Tras confirmar que la mutación *pcd* induce cambios degenerativos y la pérdida severa de células mitrales (Greer y Shepherd, 1982), el siguiente paso fue investigar la base celular de este proceso de neurodegeneración a nivel del núcleo celular. Ya que el daño en el ADN parece promover diversos procesos neurodegenerativos (Caldecott, 2004; Paulson y Miller, 2005), y dado que la reparación del ADN puede ser una respuesta importante para el mantenimiento de la fisiología normal de la célula, estudiamos la expresión de ciertos factores clave involucrados en la ruta de señalización de daño y reparación del ADN. En particular, analizamos los patrones de expresión de i) la forma fosforilada de la variante de histona H2AX (γ-H2AX), un sensor de daño en el ADN que sirve como plataforma de anclaje para factores de reparación, ii) la forma fosforilada de ATM (pATM, ataxia telangiectasia mutated), una proteína-quinasa que responde al daño en el ADN, y iii) la proteína 53BP1, un factor del complejo de reparación del ADN que se fosforila de forma dependiente de pATM.

Las células mitrales del ratón control no mostraban presencia de mareaje para γ-H2AX en el núcleo, contrateñido con PI (Fig. 2 A-C). Por el contrario, la mayoría de las células mitrales de los ratones *pcd* exhibían un número variable de focos nucleares inmunorreactivos para γ-H2AX, que se distribuían por todo el núcleo, excluyendo el nucleolo (Fig. 2 D-F). Además, la tinción con PI del ARNr citoplásmico demostró que las células mitrales que contenían focos nucleares de γ-H2AX presentaban aparentemente una organización normal de la sustancia de Nissl (Fig. 2 D, F). Así, la ausencia de rasgos típicos de degeneración, como la vacuolización del citoplasma o cromatolisis, indica que la formación de focos nucleares de γ-H2AX es un signo pre-degenerativo temprano de disfunción neuronal en las células mitrales del ratón *pcd*.

Experimentos de doble inmunomarcaje para γ-H2AX y pATM revelaron la presencia de una señal difusa de pATM en las células mitrales control (Fig. 2 G-I), mientras que en las células mitrales de ratones *pcd* aparecían numerosos focos de pATM. Curiosamente, todos los focos de γ-H2AX colocalizaban con pATM (Fig. 2 J-L). De forma similar, la combinación de los marcadores γ-H2AX y 53BP1 reveló una distribución nuclear difusa de 53BP1, que excluía el nucleolo, en las células mitrales control (Fig. 2 M-O), y su redistribución y colocalización con los focos nucleares positivos para γ-H2AX en los ratones *pcd* (Fig. 2 P-R). En conclusión, la formación de focos de daño y reparación del ADN refleja la respuesta neuronal a una acumulación aberrante de roturas en el ADN, y es un mecanismo clave involucrado en la aparición de cambios pre-degenerativos en las células mitrales de estos animales mutantes.

Ejemplo 3

La mutación pcd induce inhibición transcripcional en las células mitrales

Para poder determinar si la presencia de focos de daño y reparación en el ADN podría inducir cambios generales en la expresión génica, utilizamos diversas aproximaciones directas e indirectas para evaluar la actividad transcripcional. Primero, analizamos el patrón de expresión tanto de la histona H4 acetilada, un marcador de remodelación de la cromatina hacia dominios activos transcripcionalmente (Hendzel *et al*., 1998), como de la forma activa de la ARN polimerasa II fosforilada en la Ser 2 (anticuerpo H5), que está involucrada en la fase de elongación de la transcripción (Kimura *et al*., 2002). En las células mitrales control aparecían numerosos focos nucleares brillantes e inmunorreactivos para la histona H4 acetilada (Fig. 3A) o para la ARN polimerasa II (Fig. 3C) a lo largo de todo el núcleo, con la excepción del nucleolo. Sin embargo, en las células mitrales de los ratones *pcd* existía una reducción dramática en el número de focos y la intensidad de la señal de estos dos marcadores moleculares (Fig. 3B y D).

Para la determinación directa de la tasa de transcripción global en las células mitrales empleamos un ensayo de la transcripción basado en la incorporación de 5'-FU al ARN naciente (Boisvert *et al*., 2000). Tras un pulso corto de 30 min, la 5'-FU se incorporaba masivamente al nucleolo y a algunos focos extranucleolares de transcripción de las células mitrales control (Fig. 3E). Sin embargo, se detectó una reducción notable de la señal de 5'-FU nucleolar y extranucleolar en las células mitrales de ratones *pcd* (Fig, 3 F). En conclusión, estos resultados indican que la mutación *pcd* induce una inhibición severa de la transcripción mediada por la ARN polimerasa I (nucleolar) y II (extranucleolar) en las células mitrales de animales P70.

Ejemplo 4

La inhibición de la transcripción en las células mitrales de ratones pcd está asociada a cambios epigenéticos en las histonas nucleosomales y a beterocromatinización

Con el propósito de investigar si la inhibición de la transcripción en las células mitrales *pcd* estaba asociada a cambios epigenéticos en las histonas nucleosomales analizamos, mediante inmunofluorescencia, el patrón de expresión de la histona H4 trimetilada en la lisina 20 (H4-K20-3Me), una modificación que se requiere para la represión de la expresión génica mediada por heterocromatinización (Jaskelioff y Peterson, 2003; Schotta *et al*., 2004). Mientras que sólo se detectaron unos pocos agregados perinucleares de heterocromatina positiva para H4-K20-3Me en las células mitrales control, aparecieron grandes masas perinucleares y numerosos agregados inmunorreactivos para esta histona trimetilada distribuidos por todo el núcleo de las células mitrales de los ratones *pcd*. La combinación de la incorporación de 5'-FU y el inmunomarcaje de H4-K20-3Me en las células mitrales de los ratones *pcd* demostraron la ausencia de focos de transcripción en los agregados inmunorreactivos para H4-K20-3Me (Fig. 4 G-I), indicando que la expresión de esta histona trimetilada está asociada al silenciamiento transcripcional.

Después, investigamos el patrón de expresión de la proteína alfa de la heterocromatina (HP1α), que se asocia específicamente a la heterocromatina pericentromérica (Maison y Almouzni, 2004). La inmunorreactividad para HP1α aparecía como pequeños focos nucleares de baja intensidad en las células mitrales control, mientras que se producía un aumento notable del tamaño y la intensidad de la señal de estos focos en las células mitrales de ratones *pcd* que se habían procesado de forma paralela (fig. 4 J-O). En resumen, el aumento de expresión de H4-K20-3Me y HP1α en las células mitrales de los ratones *pcd* indica que la inhibición de la transcripción en esta población neuronal está mediada por modificaciones epigenéticas de la cromatina, en particular por la trimetilación de las histonas nucleosomales.

Ejemplo 5

Los análisis de microscopía electrónica revelan cambios en la configuración de la cromatina y segregación de los nucleolos de las células mitrales de ratones pcd

Habiendo establecido que la mutación *pcd* activa la expresión de proteínas de silenciamiento de la cromatina en las células mitrales, investigamos si estos cambios estaban asociados a modificaciones estructurales de la configuración de la cromatina. Las células mitrales de los ratones control presentaban una cromatina predominantemente dispersa, con sólo unas pocas masas de heterocromatina condensada (Fig. 5A). Por el contrario, el número y tamaño de las masas de heterocromatina aumentaba notablemente en las células mitrales de los ratones *pcd* (Fig. 5B). A nivel citoplásmico, estos cambios estaban asociados con un reemplazamiento parcial de las típicas cisternas de retículo endoplasmático rugoso, observadas en las células mitrales control, por una mayor abundancia de ribosomas libres en las células mitrales de ratones *pcd* (Fig. 5C, D). A pesar de que se encontraron distintos niveles de acumulación de ribosomas libres en la población de células mitrales de ratones *pcd*, otros orgánulos, como el complejo de Golgi, las mitocondrias y los lisosomas, no estaban afectados estructuralmente. No se encontraron células mitrales con signos citológicos de apoptosis o necrosis en los análisis de microscopía electrónica, lo cual coincidía con el bajo número de células apoptóticas observadas con microscopía de fluorescencia.

Tras establecer que la mutación *pcd* induce la reorganización de los ribosomas, quisimos saber si este proceso podía estar asociado con cambios en el nucleolo, el sitio de síntesis y procesamiento de los ARN pre-ribosomales (Raska *et al*., 2004). Los análisis de transcripción con 5'-FU revelaban una débil incorporación de esta uridina halogenada en las células mitrales de ratones *pcd* en comparación con los controles (Fig. 3E, F), indicando una inhibición de la transcripción nucleolar. Ya que la organización estructural de los componentes nucleolares es muy sensible a los cambios en la tasa de transcripción de genes ribosomales (Raska *et al*., 2004), realizamos un análisis de microscopía electrónica. En las células mitrales control, los nucleolos exhibían la típica configuración reticular, con hebras de los componentes fíbrilar y granular densos y pequeños y numerosos centros fibrilares, los sitios de transcripción de los genes ribosomales (Raska *et al*., 2004), que aparecen como áreas redondeadas de baja densidad electrónica rodeadas por una envoltura de componente fibrilar denso (Fig. 6A). Por el contrario, los nucleolos de las células mitrales de los ratones *pcd* exhibían diferentes niveles de segregación nucleolar, con condensación de los componentes fibrilares y una migración de los mismos hacia la periferia nucleolar (fig. 6 B-D). Estos cambios iban acompañados de una desorganización de los centros fibrilares, que tendían a desaparecer, y de la formación de masas prominentes de heterocromatina perinucleolar condensada (Fig. 6 B-D). La segregación nucleolar se confirmó mediante análisis de inmunofluorescencia de la proteína nucleolar fibrilarina, un marcador específico del componente fibrilar denso (Raska *et al*, 2004). La fibrilarina se distribuía homogéneamente a lo largo del nucleolo de las neuronas control y aparecía segregada en unas pocas masas de gran intensidad de tinción en los nucleolos de los ratones *pcd*. (Fig. 6, insertos). En conjunto, estas alteraciones reflejan una disfunción de la transcripción de los genes ribosomales y representan una marca nucleolar de cambios pre-degenerativos en las células mitrales de ratones *pcd*.

Ejemplo 6

La mutación pcd induce una reorganización de los agregados nucleares y los cuerpos de Cajal en las células mitrales

Puesto que la transcripción y el procesamiento de ARN son procesos nucleares relacionados y coordinados (Proudfoot *et al*., 2002), investigamos si los cambios en la expresión génica detectados en las células mitrales de los ratones *pcd* podían llevar a una reorganización de dos compartimentos nucleares (CB y agregados nucleares de factores de splicing) involucrados en el procesamiento del ARN.

Los CBs son orgánulos dependientes de transcripción (Lafarga *et al*., 1998; Pena *et al*., 2001; Cioce y Lamond, 2005) que concentran el marcador específico coilina, factores de splicing snRNP y la proteína de supervivencia de las motoneruonas (SMN) (Carvalho *et al*, 1999; Gall, 2000). Experimentos de doble mareaje para la detección de coilina y SMN en las células mitrales control revelaron una intensa concentración de ambas moléculas en CBs típicos, además de una señal más difusa de SMN en el citoplasma y envuelta nuclear (Fig. 7 A-C). Sin embargo, la mayoría de las células mitrales de los ratones *pcd* mostraban una relocalización tanto de coilina como de SMN en forma de caperuzas perinucleolares, acompañada de una disminución en el número de CBs típicos (fig. 7 D-F). Los análisis cuantitativos de la proporción de CBs por célula mitral confirmaron la reducción de estos orgánulos dependientes de transcripción en las células mitrales de ratones *pcd* (2.46 ± 0.48 CBs en ratones control frente a 1.42 ± 0.07 en animales *pcd*, media ± DEM, $p < 0.01$).

La distribución de factores de splicing de pre-ARNm se analizó utilizando un anticuerpo monoclonal específico para la proteína U2 snRNP B" (U2B", Habets *et al*., 1989), un marcador de snRNPs de splicing (Ferreira *et al*., 1994). La tinción para U2B" combinada con una contratinción con PI reveló una distribución predominantemente difusa de los factores de splicing en el nucleoplasma, exceptuando el nucleolo, de las células mitrales control, (Fig. 7 G-I), un patrón similar al que se encuentra en neuronas altamente activas de otros centros del sistema nervioso central (Pena *et al*., 2001). Por el contrario, los factores de splicing de las células mitrales de los ratones *pcd* estaban reorganizados en agregados nucleares irregulares y de gran tamaño, que destacaban sobre la débil señal nucleoplasmática (Fig. 7 J-L). En conclusión, la reorganización de los CBs y los agregados nucleares que se observa en las células mitrales de los ratones *pcd* es consistente con una disfunción del procesamiento nuclear del ARN asociada con los cambios pre-degenerativos observados en esta población neuronal.

Ejemplo 7

Eventos apoptóticos en el BO de ratones pcd

Para investigar si el proceso de muerte celular estaba mediado por apoptosis, empleamos la técnica de TUNEL y la inmunodetección de la caspasa 3 activa. Se observaron células TUNEL positivas en la capa de las células mitrales de ratones *pcd* P70 y P90, indicando la existencia de apoptosis en estas neuronas (Fig. 8A y B). La inducción de la apoptosis se confirmó mediante la inmunodetección de la caspasa 3 efectora (Fig. 8C-D), un biomarcador de este tipo de muerte celular (Porter y Janicke, 1999; Zuzarte-Luis *et al*., 2006), que se detectó en la mayoría de las células mitrales (85.3 ± 5.7%, media ± DEM, n=182 células mitrales) de ratones *pcd* P90. Sin embargo, en los animales P70 se detectaron menos indicios de apoptosis (27.2% ± 7.7%, media ± DEM, n=179 células mitrales) lo que indica que la mayoría de las células mitrales eran pre-neurodegenerativas a esta edad.

Ejemplo 8

Material y métodos

8.1. *Modelo animal*

Se emplearon diez ratones P70 hermanos pcd^{1J}/pcd^{1J} y diez +/+ para el análisis de la degeneración de las células mitrales. Además, se utilizaron secciones de nuestro archivo de animales homocigotos pcd^{1J}/pcd^{1J} y +/+ de P50, P70 y P90 con el mismo fondo genético y características para confirmar la variación temporal en la densidad de células mitrales. Los animales se mantuvieron, manipularon y sacrificaron de acuerdo con el Consejo de la Comunidad Europea (directiva 86/609/EEC) y la legislación española vigente (RD 1201/2005; BOE 252. Oct. 21, 2005).

8.2. *Genotipado de los ratones*

Se obtuvieron ratones machos C57BL/6J heterocigotos para el gen mutado pcd^{1J} de los laboratorios Jackson y se cruzaron con hembras DBA/2J que no portaban la mutación *pcd*. El alelo pcd^{1J} se aisló junto con el fondo genético de la estirpe C57BL/6J, mientras que el alelo normal se asoció al fondo genético de la estirpe DBA/2J. Esta segregación diferencial de ambos alelos, mutado y silvestre, permitió identificar a los ratones control y heterocigotos para la expansión de la colonia y su tipificación genética. La PCR se realizó usando los cebadores propuestos por los laboratorios Jackson para los marcadores D13Mit250 y D13Mit283: recursos informáticos sobre el genoma de los ratones (para más información ver: http://www.informatics.jax.org/searches/probe.cgi?38700 y http://www.informatics.jax.org/searches/probe.cgi?41581). Los productos de la PCR de las regiones microsatélites D13Mit250 y D13Mit283, que tienen distintos tamaños para las estirpes C57BL/6J y DBA/2J, se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 3%.

8.3. *Preparación de los tejidos*

Los animales se anestesiaron con una mezcla de (3/4) de hidrocloruro de ketamina (Ketolar, Parke-Davis, Barcelona, España) e hidrocloruro de tiacina (Rompún, Bayer, Leverkussen, Alemania, 1 ml de la mezcla/kg peso corporal), y luego se perfundieron por vía intracardiaca con NaCl 0.9%, seguido de 5 ml/g de peso corporal de paraformaldehído al 4%. Tras la perfusión, los cerebros se diseccionaron y se dividieron en dos bloques a lo largo del plano coronal a -2.40 mm del nivel Bregma usando una matriz coronal del cerebro de ratón (Electron Microscopy Sciences, Pennsylvania, USA). Luego se post-fijaron con el mismo fijador durante 2 horas. Los cerebros se lavaron durante 2 h con tampón fosfato 0.1 M, pH 7.4 (PB). Los bloques de cerebro se sumergieron en sacarosa al 30% (p/v) hasta que se hundieron. Tras la crioprotección, se obtuvieron secciones coronales de 40 mieras de grosor con un microtomo de congelación (Leica Frigomobil, Jung SM 2000, Nussloch, Alemania). Estas secciones se recogieron en seis series en PB y luego se almacenaron a -20ºC en una mezcla congeladora compuesta por un 30% de glicerol y un 30% de polietilenglicol en PB.

La densidad de las células mitrales se estimó en secciones de animales control y mutantes P50, P70, y P90. Las secciones se lavaron tres veces en tampón fosfato salino 0.1 M, pH 7.4 (PBS), y luego se incubaron a temperatura ambiente y en oscuridad durante 30 min con PI (Sigma) diluido 1:2,000 en PBS. Después, los tejidos se lavaron en oscuridad tres veces en PBS. Finalmente, las secciones se montaron con un cubre-objetos usando un medio para evitar el desvanecimiento de la fluorescencia previamente descrito (Valero *et al*., 2005).

El número de células mitrales por mm presentes en la capa de las células mitrales de cada sección coronal se midió usando un microscopio confocal espectral Leica TCS SP (Leica Mannheim) y su software asociado. Las secciones se seleccionaron de tal manera que fueran similares al nivel 3.80 mm Bregma del cerebro del ratón C57BL/6 (Patrick *et al*., 2000).

8.4. *Técnica de TUNEL*

Se empleó un kit de detección *in situ* de muerte celular (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany) para la detección de cuerpos apoptóticos. Las secciones de tejido se postfijaron con paraformaldehído al 4% en PB durante 20 min. Tras lavar, las secciones (PBS 3 x 10 min), fueron tratadas con etanol/ácido acético (2:1) a -20ºC durante 5 min. Después, los tejidos se lavaron en PBS (3 x 10 min) y fueron permeabilizados a temperatura ambiente durante 15 min con Tritón X-100 al 0.2% diluido en sodio citrato 0.1% en agua destilada. Finalmente, los tejidos se incubaron a 37ºC con la mezcla de reacción TUNEL durante 2 horas, que contenía la deoxinucleotidil terminal transferasa y una mezcla de nucleótidos marcados. Las células se contratiñeron con PI 1:2,000 y luego se montaron las secciones.

8.5. *Ensayo de la transcripción*

Los sitios de transcripción activa se marcaron mediante la incorporación de 5'-fluorouridina (5'-FU, Sigma) a las hebras nacientes de ARN. Bajo anestesia con 2,2,2-tribromoetanol (25 mg/100 g peso., Aldrich), los animales control y mutantes *pcd* se trataron con una única inyección intraperitoneal (5 μl/g peso) de 5'-FU 0.4 M disuelta en solución

salina (NaCl 0.9%). Los ratones se sacrificaron 30 min después de la inyección. Los animales se fijaron mediante perfusión con paraformaldehído al 3.7% en tampón HPEM (PIPES 130 mM, HEPES 60 mM, $MgCl_2$ $6H_2O$ 4 mM, EGTA 20 mM, pH 6.9) con Tritón X-100 al 0.5% durante 10 min. Se diseccionaron pequeños bloques de tejido que contenían la capa de las células mitrales a partir de secciones de BO de 300 μm obtenidas con un vibratomo, que se lavaron durante 10 min con tampón HPEM que contenía con Tritón X-100 al 0.5%. Se realizó una disociación mecánica de las neuronas según descripciones previas (Pena *et al*., 2001). Brevemente, cada fragmento de tejido se transfirió a una gota de PBS en porta-objetos siliconizados. Después, se puso un cubre-objetos sobre el porta-objetos y se aplastaron los fragmentos de tejido de forma enérgica, golpeando el cubreobjetos con una aguja histológica para separar los somas neuronales. La preparación se congeló en hielo seco, y los cubreobjetos se quitaron con una cuchilla de afeitar. Usando este procedimiento, la mayoría de las células mitrales permanecían adheridas al porta-objetos. Las muestras celulares se procesaron en etanol de 96% a 4ºC durante 10 min, lo cual incrementa la adhesión de las células al porta-objetos, y secuencialmente se rehidrataron en etanol del 70%, 50% y PBS. Después, las muestras se trataron con proteinasa K (0.25 μg/ml en tampón TRIS 1M, pH 8) durante 2-4 min a 25ºC, con glicina 0.1 M (Sigma) en PBS que contenía seroalbúmina bovina al 0.1% durante 30 min, y Tween-20 al 0.01% en PBS durante 5 min. Se detectó la incorporación de 5'-FU en las hebras nacientes de ARN con un anticuerpo monoclonal anti-BrdU (Tabla 1), diluido 1:50 en PBS (1 hora a 37ºC). Después, las muestras se lavaron con Tween-20 0.01% en PBS y se incubaron durante 45 min con un anticuerpo secundario conjugado con FITC a una dilución 1:150 (Jackson, USA). Para finalizar, las muestras se lavaron en PBS y se montaron con el medio Vectashield (Vector, USA). Las muestras se contratiñeron con PI, un procedimiento citoquímico fluorescente para la detección de ácidos nucleicos, o se procesaron para la realización de dobles mareajes con inmunofluorescencia.

8.6. *Inmunofluorescencia y microscopía confocal*

Para la inmunofluorescencia convencional, las muestras de células mitrales disociadas y fijadas con paraformaldehído al 3.7% en PBS se trataron secuencialmente con Tritón X-100 al 0.5% en PBS durante 15 min, con glicina 0.1 M con seroalbúmina bovina al 1% durante 30 min, y con Tween-20 al 0.01% en PBS durante 5 min. Las muestras se incubaron durante 1 h con el anticuerpo primario y seroalbúmina bovina 1% a temperatura ambiente, luego se lavaron con Tween-20 0.01% en PBS, se incubaron 45 min con el anticuerpo secundario correspondiente (1:150) conjugado con FITC o Texas-Red (Jackson, USA), se lavaron en PBS, y se montaron. Los anticuerpos primarios usados se enumeran en la Tabla I. Las muestras se examinaron con un microscopio láser confocal (Zeiss LSM 510) usando un objetivo plan-apocromático de 63X (1.4 AN), y láseres de iones de argón (488 nm) y HeNe (543 nm).

8.7. *Microscopía electrónica*

Para el examen de la ultraestructura de las células mitrales, se perfundieron cinco ratones control y cinco mutantes *pcd* con glutaraldehído al 3% en PB. Se extrajeron fragmentos de tejido de secciones coronales del BO de 300 μm de grosor obtenidas con un vibratomo, que se lavaron en PB, se postfijaron con tetróxido de osmio al 2% diluido en tampón de doble-fuerza (compuesto por dextrosa 0.2 M al 3.5% en PB), se deshidrataron en acetona y se incluyeron en araldita (Durcupan, Fluka, Suiza). Las secciones ultrafinas se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo para su examen con un microscopio electrónico Philips EM-208.

Referencias

Altman, J., 1969. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* 137, 433-457.

Blanks, J. C., **Mullen**, R. J., **Lavail**, M. M., 1982. Retinal degeneration in the *pcd* cerebellar mutant mouse. 2. Electron-microscopic analysis. *J. Comp. Neurol.* 212,231-246.

Bohmann, K., **Ferreira**, F., **Lamond**, A. I., 1995. Mutational analysis of p80 coilin indicates a functional interaction between coiled bodies and the nucleolus. *J. Cell Biol*. 131,817-831.

Boisvert, F. M., **Hendzel**, M. J., **Bazett-Jones**, D. P., 2000. Promyelocytic leukemia (PML) nuclear bodies are protein structures that do not accumulate RNA. *J. Cell Biol.* 148, 283-292.

Cahill, D., **Connor**, B., **Carney**, J. P., 2006. Mechanisms of eukaryotic DNA double strand break repair. *Front. Biosci.* 11, 1958-1976.

Campbell, D. B., **Hess**, E. J., 1996. Chromosomal localization of the neurological mouse mutations tottering (*tg*), Purkinje cell degeneration (*pcd*), and nervous (*nr*). *Mol. Brain Res.* 37, 79-84.

Caldecott, K. W., 2004. DNA single-strand breaks and neurodegeneration. *DNA Repair* 3, 875-882.

Carleton, A., **Petreanu**, L. T., **Lansford**, R., **Álvarez-Buylla**, A., **Lledo**, P. M., 2003. Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. *Nat. Neurosci*. 6, 507-518.

Carvalho, T., **Almeida**, F., **Calapez**, A., **Lafarga**, M., **Berciano**, M. T., **Carmo-Fonseca**, M., 1999. The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN: a link between snRNP biogénesis and Cajal (coiled) body. *J. Cell Biol.* 147, 715-727.

Celeste, A., **Petersen**, S., **Romanienko**, P. J., **Fernández-Capetillo**, O., **Chen**, H. T., **Sedelnikova**, O. A., **Reina-San-Martín**, B., **Coppola**, V., **Meffre**, E., **Difilippantonio**, M. J., 2002. Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science* 296, 922-927.

Chuah, M. I., **Schwob**, J. E., **Farbman**, A. I., 2003. Developmental anatomy of the olfactory system. In: Doty R. L. (Ed.), Handbook of olfaction and gustation, *Marcel Dekker*, NY, pp. 139-164.

Cioce, M., **Lamond**, A. I., 2005. Cajal bodies: A long history of discovery. *Ann. Rev. Cell. Dev. Biol*. 21, 105-131.

Cremer, T., **Cremer**, C., 2001. Chromosome territories nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat. Rev. Gen*. 2, 292-301.

Djurisic, M., **Antic**, S., **Chen**, W. R., **Zecevic**, D., 2004. Voltage imaging from dendrites of mitral cells: EPSP attenuation and spike trigger zones. *J. Neurosci*. 24, 6703-6714.

Downs, J.A., **Allard**, S., **Jobin-Robitaille**, O., **Javaheri**, A., **Auger**, A., **Bouchard**, N., **Kron**, S. J., **Jackson**, S. P., **Cote**, J., 2004. Binding of chromatin-modifying activities to phosphorylated historie H2A at DNA damage sites. *Mol. Cell* 16, 979-990.

Fakan, S., 1986. Structural support for RNA synthesis in the cell nucleus. *Meth. Achiev. Exp. Pathol.* 12, 105-140.

Fernández-González, A., La **Spada**, A. R., **Treadaway**, J., **Higdon**, J. C., **Harris**, B. S., **Sidman**, R. L., **Morgan**, J. I., **Zuo**, J., 2002. Purkinje cell degeneration (*pcd*) phenotypes caused by mutations in the axotomy-induced gene, Nna1. *Science* 295,1904-1906.

Ferreira, J. A., **Carmo-Fonseca**, M., **Lamond**, A. I., 1994. Differential interaction of splicing snRNPs with coiled bodies and interchromatin granules during mitosis and assembly of daughter cell nuclei. *J. Cell Biol*. 126,11-23.

Francisconi, S., **Codenotti**, M., **Ferrari-Toninelli**, G., **Uberti**, D., **Memo**, M., 2005 Preservation of DNA integrity and neuronal degeneration. *Brain Res. Rev*. 48, 347-351.

Friedman. D., **Strowbridge**, B. W., 2000. Functional role of NMDA autoreceptors in olfactory mitral cells. *J. Neurophysiol*. 84, 39-50.

Gall, J. G., 2000. Cajal bodies: The fírst 100 years. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol*. 16, 273-300.

Gébrane-Younés, J., **Sirri**, V., **Junéra**, H. R., **Roussel**, P., **Hernández-Verdun**, 2005. The nucleolus: An essential nuclear domain. In: Hemmeerich P, Dieckmann S. (Eds.), Vision of he cell nucleus, *Am. Sci. Publishers*, CA, pp.120-135.

Greer, C. A., **Shepherd**, G. M., 1982. Mitral cell degeneration and sensory function in the neurological mutant mouse Purkinje-cell degeneration (*pcd*). *Brain Res.* 235, 156-161.

Granados-Fuentes, D., **Saxena**, M. T., **Prolo**, L. M., **Aton**, S. J., **Herzog**, E. D., 2004. Olfactory bulb neurons express functional, entrainable circadian rhythms, *Eur. J. Neurosci*. 19, 898-906.

Habets, W. J., **Hoet**, M. H., **DeJong**, B. A. W., Vam Der **Kemp**, A., Van **Venroojij**, W. J., 1989. Mapping of B cell epitopes on small nuclear ribonucleoproteins that react with human autoantibodies as well as with experimentally-induced mouse monoclonal antibodies. *J. Immunol*. 143, 2560-2566.

Harris, A., **Morgan**, J. I., **Pecot**, M., **Soumare**, A., **Osborne**, A., **Soares**, H. D., 2000. Regenerating motor neurons express Nna1, a novel ATP/GTP-binding protein related to zinc carboxypeptidases. *Mol. Cell Neurosci*. 16, 578-596.

Hendzel, M. J., **Kruhlak**, M. J., **Bazett-Jones**, D. P., 1998. Organization of highly acetylated chromatin around of sites of heterogeneous nuclear RNA accumulation. *Mol. Biol. Cell* 9, 2491-2507.

Heintz, N., 1993. Cell death and the cell cycle: a relationship between transformation and neurodegeneration? *Trends Biochem. Sci*. 18, 157-159.

Isacson, O., 1993. On neuronal health. *Trends Neurosci*. 16, 306-308.

Jaskelioff, M., **Peterson**, C. L., 2003. Chromatin and transcription: histones continué to make their marks. *Nat. Cell Biol.* 5, 395-399.

Jin J., **Cai**, Y., **Li**, B., **Conaway**, R. C., **Workman**, J. L., **Conaway**, J. W., **Kusch**, T., 2005. In and out: histone variant exchange in chromatin. *Trends Biochem. Sci.* 30, 680-687.

Jolly, C., **Morimoto**, M. I., 1999. Stress and the cell nucleus: dynamics of gene expression and structural reorganization. *Gene Expression* 7, 216-270.

Kim, S. T., **Lim**, D. S., **Canman**, C. E., **Kastan**. M. B., 1999. Substrate specificities and identification of putative substrates of ATM kinase family members. *J. Biol. Chem.* 274, 37538-37543.

Kimura, H., **Sugaya**, K., **Cook**, P. R., 2002. The transcription cycle of the RNA polymerase II in living cells. *J. Cell Biol*. 159, 777-782.

Kratskin, I. L., **Belluzzi**, O., 2003. Anatomy and neurochemistry of the olfactory bulb. In: Doty, R., L (Ed.), Handbook of olfaction and gustation, *Marcel Dekker,* NY, pp. 139-164.

Kyuhou, S. I., **Kato**, N., **Gemba**, H., 2005. Emergence of endoplasmic reticulum stress and activated microglia in Purkinje cell degeneration mice. *Neurosci. Lett*. 396, 91-96.

Lafarga, M., **Berciano**, M. T., **García-Segura**, M., **Andrés**, M. A., **Carmo-Fonseca**, M., 1998. Acute osmotic/stress stimuli induce a transíent decrease of transcriptional activity in the neurosecretory neurons of supraoptic nuclei. *J. Neurocytol*. 27, 205-217.

Landis, S. C., **Mullen**, R. J., 1978. The development and degeneration of Purkinje cells in *pcd* mutant mice. *J. Comp. Neurol*. 177, 125-144.

Lavail, M. M., **Blanks**, J. C., **Mullen**, R. J., 1982. Retinal degeneration in the *pcd* cerebellar mutant mouse. 1. Light microscopio and autoradiographic analysis. *J. Comp. Neurol*. 212, 217-230.

Lavail, M. M., **Yasumura**, D., **Matthes**, M. T., **Lau-Villacorta**, C., **Unoki**, K., **Sung**, C. H., **Steinberg**, R. H., 1998. Protection of mouse photoreceptors by survival factors in retinal degenerations. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 39, 592-602.

Lamond, A. I., **Spector**, D. L., 2003. Nuclear speckles: a model for nuclear organelles *Mol. Cell Biol.* 4, 605-612.

Lois, C., **Álvarez-Buylla**, A., 1994. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264, 1145-1148.

Lowe, G., 2003. Electrical signaling in the olfactory bulb. *Curr. Opin. Neurobiol*. 13, 476-481.

Lydall, D., **Whitehall**, S., 2005. Chromatin and the DNA damage response. *DNA Repair* (Amst.) 4,1195-1207.

Maison, C., **Almouzni**, G., 2004. HP1 and dynamics of heterochromatin maintenance. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol*. 5, 296-304.

McGowan, C. H., **Russell**, P., 2004. The DNA damage response: sensing and signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 629-633.

Morrison, A. J., **Highland**, J., **Krogan**, N. J., **Arbel-Eden**, A., **Greenblatt**, J. F., **Haber**, J. E., **Shen**, X., 2004. INO80 and gamma-H2AX Interaction links ATP-dependent chromatin remodeling to DNA Damage Repair. *Cell* 119, 767-775.

Mullen, R. J., **Eicher**, E. M., **Sidman**, R. L., 1976. Purkinje cell degeneration, a new neurological mutation in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 208-212.

O'Gorman, S., 1985. Degeneration of thalamic neurons in "Purkinje cell degeneration" mutant mice. II. Cytology of neuron loss. *J. Comp. Neurol*. 234, 298-316.

Patrick, R. H., **Warren**, G. Y., **Floyd**, E. B., **Pavel,** V. B., **Marco**, R. C., 2000. Atlas of the brain of the C57BL/6 mouse. In: Patrick R. H., Warren G. Y., Floyd E. B., Pavel V. B., Marco R. C. (Eds.), Comparative cytoarchitectonic Atlas of the C57BL/6 and 129/Sv mouse brains, *Elsevier,* Amsterdam, pp. 17-127.

Paulson, H. L., **Miller**, V. M., 2005. Breaks in coordination: DNA repair in inherited ataxia. *Neuron* 46, 845-848.

Pena, E., **Berciano**, M. T., **Fernández**, R., **Crespo** P, **Lafarga** M., 2000. Stress-induced activation of c-Jun N-terminal kinase in sensory ganglion neurons: accumulation in nuclear domains enriched in splicing factors and distribution in perichromatin fibrils. *Exp. Cell. Res.* 256, 179-191.

Pena, E., **Berciano**, M. T., **Fernández**, R., **Ojeda**, J. L., **Lafarga**, M., 2001. Neuronal body size correlates with the number of nucleoli and Cajal bodies, and with the organization of the splicing machinery in rat trigeminal ganglion neurons. *J. Comp. Neurol.* 430, 250-263.

Poot, R. A., **Bozhenok**, L., van den **Berg**, D. L., **Hawkes**, N., **Varga-Weisz**, P. D., 2005. Chromatin remodeling by WSTF-ISWI at the replication site: opening a window of opportunity for epigenetic inheritance? *Cell Cycle* 4, 543-546.

Proudfoot, N., **Furger**, A., **Dye**, M. J., 2002. Integrating mRNA processing with transcription. *Cell* 108, 501-512.

Puvion-Dutilleul, F., **Mazan**, S., **Nicoloso**, M., **Pichard**, E., **Bachellerie**, J. P., **Puvion**, E., 1992. Alterations of nucleolar ultrastructure and ribosome biogénesis by actinomycin D. Implications for U3 snRNP function. *Eur. J. Cell Biol*. 58, 149-162.

Raska, I., **Koberna**, K., **Malinsky**, J., **Fidlerova**, H., **Masata**, M., 2004. The nucleolus and transcription of ribosomal genes. *Biol. Cell*. 96, 579-594.

Reimer, G., **Pollard**, K. M., **Penning**, C. A., **Ochs**, R. L., **Lischwe**, N. A., **Tan**, E. M., 1987. Monoclonal antibody from (New Zealand black x New Zealand white) F1 mouse and some human scleroderma sera target a Mr 34000 nucleolar protein of the U3 ribonucleoprotein particle. *Arthritis Rheum*. 30, 793-800.

Sarg, B., **Helliger**, W., **Talasz**, H., **Koutzamani**, E., **Lindner**, H. H., 2004. Histone H4 hyperacetylation precludes histone H4 lysine 20 trimethylation. *J. Biol. Chem.* 279, 53458-53464.

Schotta, G., **Lachner**, M., **Sarma**, K., **Ebert**, A., **Sengupta**, R., **Reuter**, G., **Reinberg**, D., **Jenuwein**, T., 2004. A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev*. 18, 1251-1262.

Shiloh, Y., 2003. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat. Rev. Cancer* 3, 155-168.

Shipley, M. T., **Mclean**, J. H., **Zimmer**, L. A., **Ennis**, M., 1996. The olfactory system. In: Swanson L. W., Björklund A., Hökfelt T. (Eds.), Handbook of chemical neuroanatomy. Integrated systems of the CNS, *Elsevier,* Amsterdam, pp. 469-573.

Talasz, H., **Lindner**, H. H., **Sarg**, B., **Helliger**, W., 2005. Histone H4-Lysine 20 Monomethylation is increased in promoter and coding regions of active genes and correlates with hyperacetylation. *J. Biol. Chem*. 280, 38814-38822.

Thompson, C. B., 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267, 1456-1462.

Valero, J., **Weruaga**, E., **Murias**, A. R., **Recio**, J. S., **Alonso**, J. R., 2005. Proliferation markers in the adult rodent brain: bromodeoxyuridine and proliferating cell nuclear antigen. *Brain Res. Prot*. 15, 127-134.

Villagra, N. T., **Berciano**, J., **Altable**, M., **Navascués**, J., **Casafont**, I., **Lafarga**, M., **Berciano**, M. T., 2004. PML bodies in reactive sensory ganglion neurons of the Guillain-Barre syndrome. *Neurobiol. Dis*. 16,158-168.

Warren, S. L., **Landolfi**, A. S., **Curtis**, C., **Morrow**, J. S., 1992. Cytostellin: a novel, highly conserved protein that undergoes continuous redistribution during the cell cycle. *J. Cell. Sci.* 103, 381-388.

Yamada, M., **Sato**, T., **Shimohata**, T., **Hayashi**, S., **Igarashi**, S., **Tsuji**, S., **Takahashi**, H., 2001. Interaction between neuronal intranuclear inclusions and promyelocytic leukemia protein nuclear and coiled bodies in CAG repeat diseases. *Am. J. Pathol.* 159, 1785-1795.

Zhai, L., **Kita**, K., **Wano**, C., **Wu**, Y., **Sugaya**, S., **Suzuki**, N., 2005. Decreased cell survival and DNA repair capacity after UVC irradiation in association with down-regulation of GRP78/BiP in human RSa cells. *Exp. Cell Res.* 305, 244-252.

REIVINDICACIONES

1. Método para la identificación de signos pre-neurodegenerativos de disfunción neuronal en muestras biológicas aisladas que comprende el análisis de los patrones de expresión de los siguientes indicadores:

a) Detección de la histona γ-H2AX, y

b) detección de la reducción de la histona H4 acetilada, en comparación con las células control.

2. Método según la reivindicación 1, donde además se identifica pATM ó 53BP1.

3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde además se detecta la reducción de ARN polimerasa II fosforilada en la Serina 2, en comparación con las células control.

4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde además se detecta el aumento de expresión de la histona H4 trimetilada, en comparación con las células control.

5. Métodos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde además se detecta la relocalización de coilina en forma de caperuzas perinucleolares.

6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la detección de los indicadores se hace usando anticuerpos o sus fragmentos.

7. Método según la reivindicación 6, donde la histona γ-H2AX se detecta con el anticuerpo anti-γ-H2AX de ratón y la histona H4 acetilada se detecta con el anticuerpo anti-H4 acetilada de conejo.

8. Método según la reivindicación 7, donde la histona H4 trimetilada se detecta con el anticuerpo anti-H4-K20-3Me de conejo.

9. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los signos pre-neurodegenerativos de disfunción neuronal se correlacionan con cualquiera de las siguientes enfermedades del grupo compuesto por la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica, degeneraciones cerebelares, la esclerosis múltiple y encefalopatías espongiformes transmisibles (TSE).

10. Método según la reivindicación 9, en el que las TSE identificadas se encuentran en el grupo que comprende al Scrapie, la encefalopatía espongiforme bovina, la enfermedad del desgaste crónico, la enfermedad de Creutzfeld-Jakob (CJD), la nueva variante de CJD, la CJD esporádica, el síndrome de Gerstmann-Straussler Sheinker, el Kuru y el insomnio familiar fatal.

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde las muestras biológicas aisladas comprenden muestras de tejido celular.

12. Método según la reivindicación 11, donde las muestras biológicas aisladas de tejido celular comprenden la totalidad o fracciones del sistema nervioso central y periférico, incluyendo el cerebro, la médula espinal, la retina, los ganglios, nervios y órganos sensoriales.

13. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde las muestras biológicas aisladas proceden de mamíferos.

14. Método según la reivindicación 13, donde los mamíferos son humanos.

15. Kit que comprende los anticuerpos anti-γ-H2AX de ratón y anti-H4 acetilada de conejo para la detección de los patrones de expresión de los indicadores histona γ-H2AX e histona H4 acetilada.

16. Kit según la reivindicación 15, donde además comprende el anticuerpo anti- H4-K20-3Me de conejo para la detección del patrón de expresión histona H4 trimetilada.

17. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 15 ó 16, donde además comprende anticuerpos secundarios marcados capaces de unirse a cualquiera de dichos anticuerpos primarios.

18. Uso del kit según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17 para identificar signos pre-neurodegenerativos de disfunción neuronal en muestras biológicas aisladas.

Fig. 1.

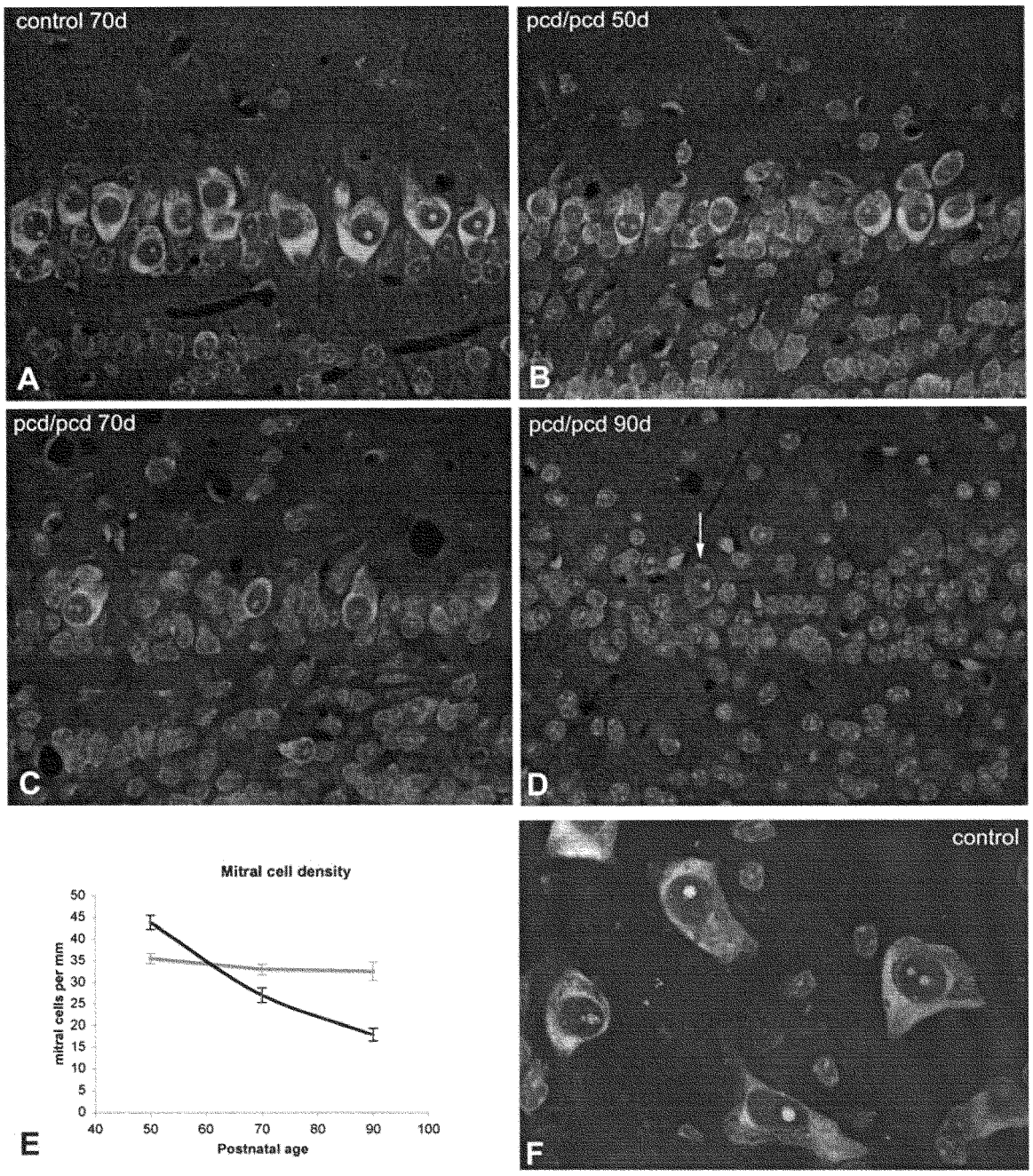

control 70d
A
pcd/pcd 50d
B
pcd/pcd 70d
C
pcd/pcd 90d
D
Mitral cell density
mitral cells per mm
Postnatal age
E
control
F

Fig. 2

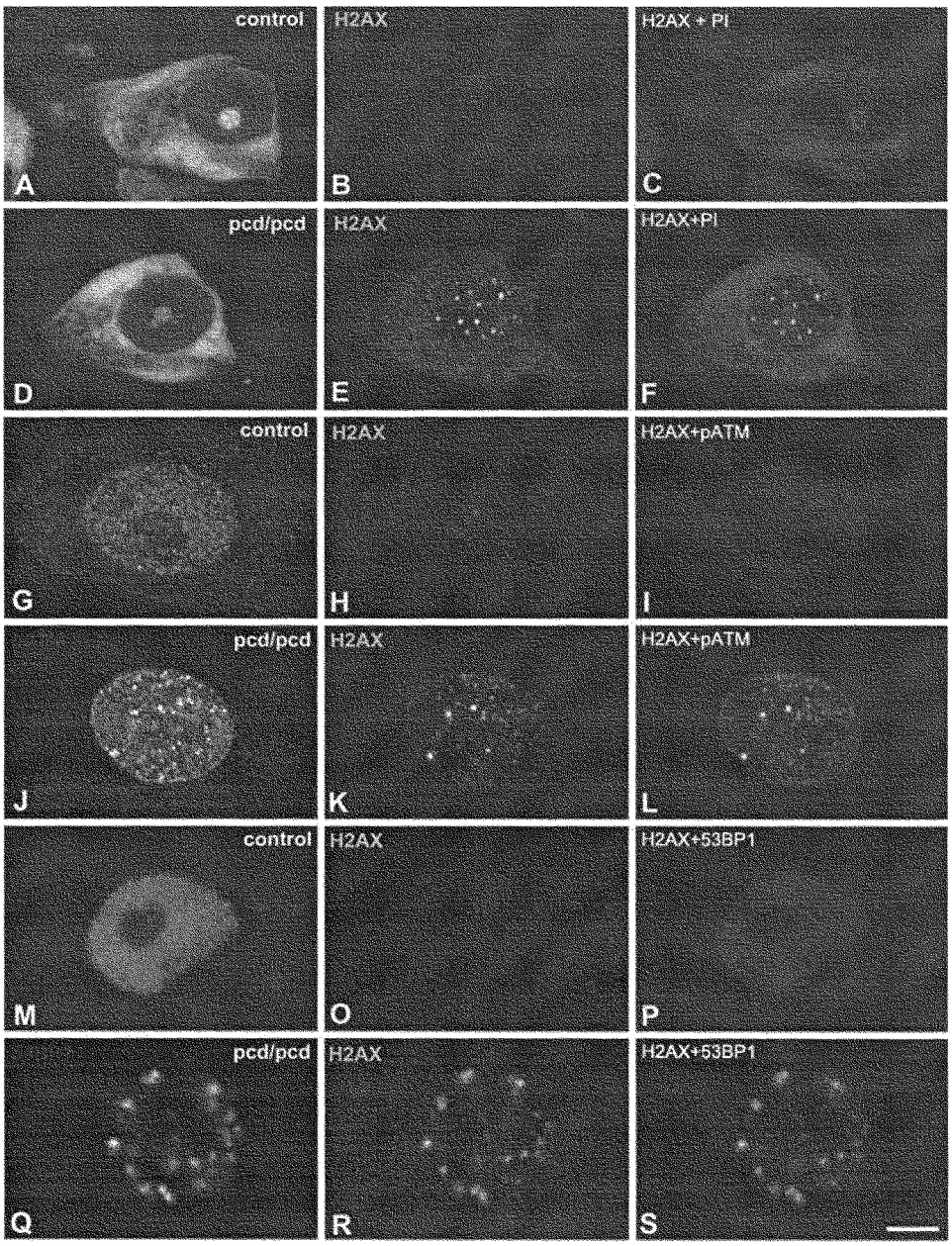

control
H2AX
H2AX + PI
A
B
C
pcd/pcd
H2AX
H2AX+PI
D
E
F
control
H2AX
H2AX+pATM
G
H
I
pcd/pcd
H2AX
H2AX+pATM
J
K
L
control
H2AX
H2AX+53BP1
M
O
P
pcd/pcd
H2AX
H2AX+53BP1
Q
R
S

Fig. 3.

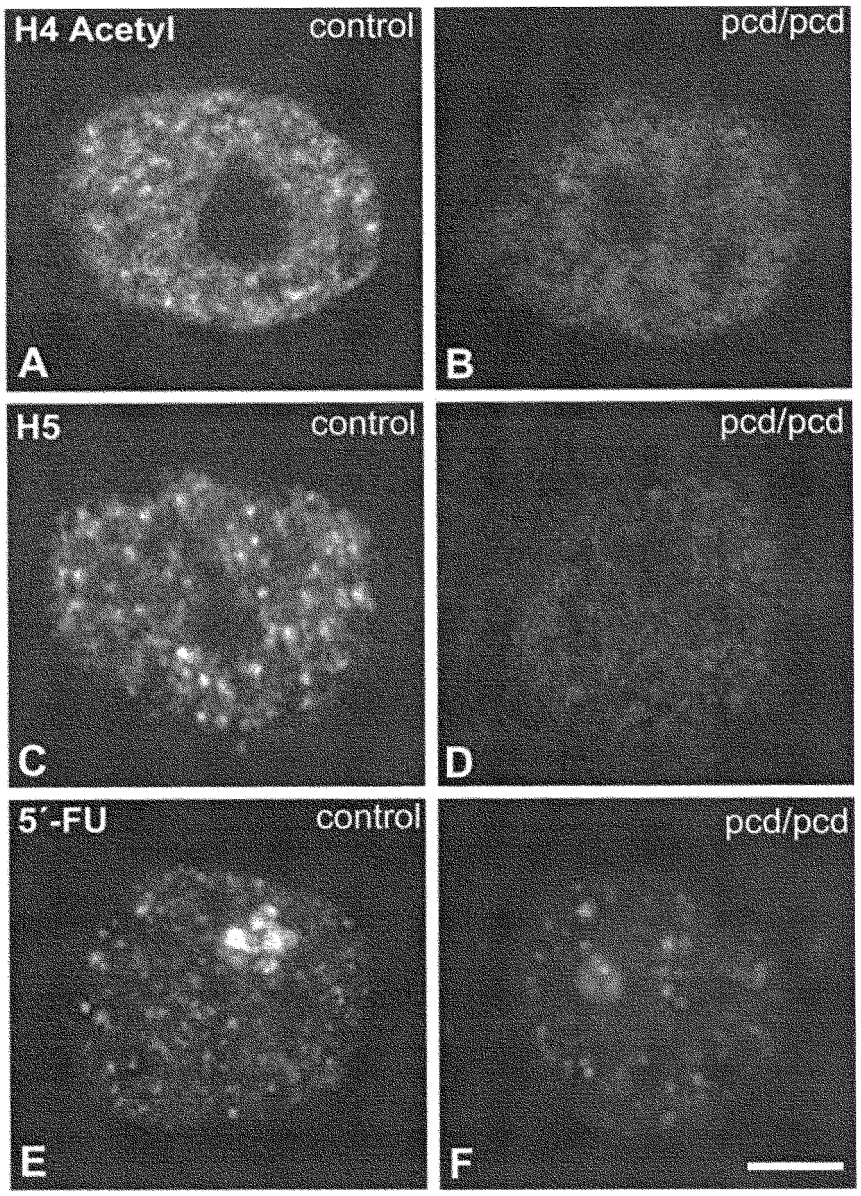

H4 Acetyl
control
pcd/pcd
A
B
H5
control
pcd/pcd
C
D
5´-FU
control
pcd/pcd
E
F

Fig. 4.

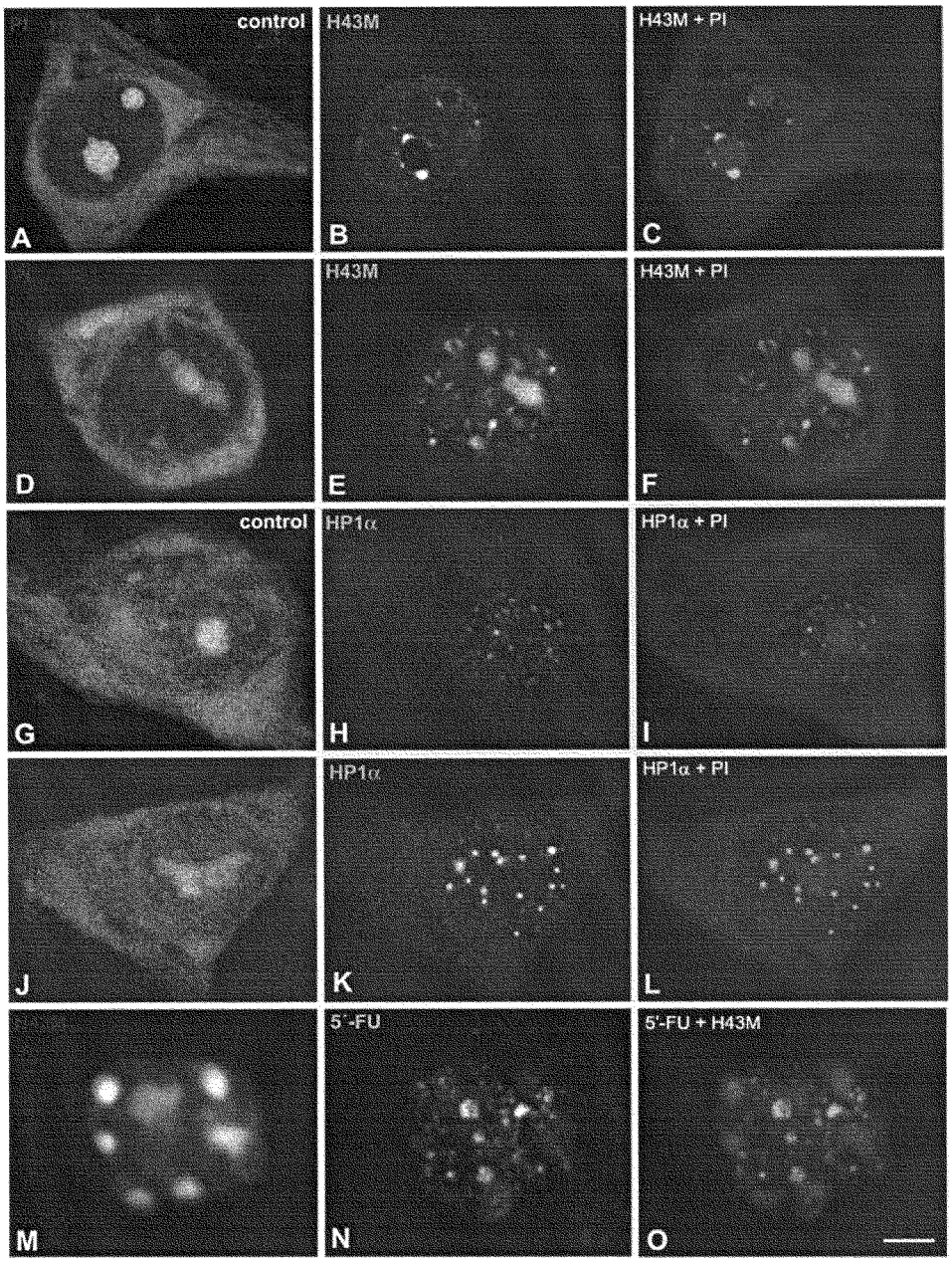

control
H43M
H43M + PI
A
B
C
H43M
H43M + PI
D
E
F
control
HP1α
HP1α + PI
G
H
I
HP1α
HP1α + PI
J
K
L
5'-FU
5'-FU + H43M
M
N
O

Fig. 5.

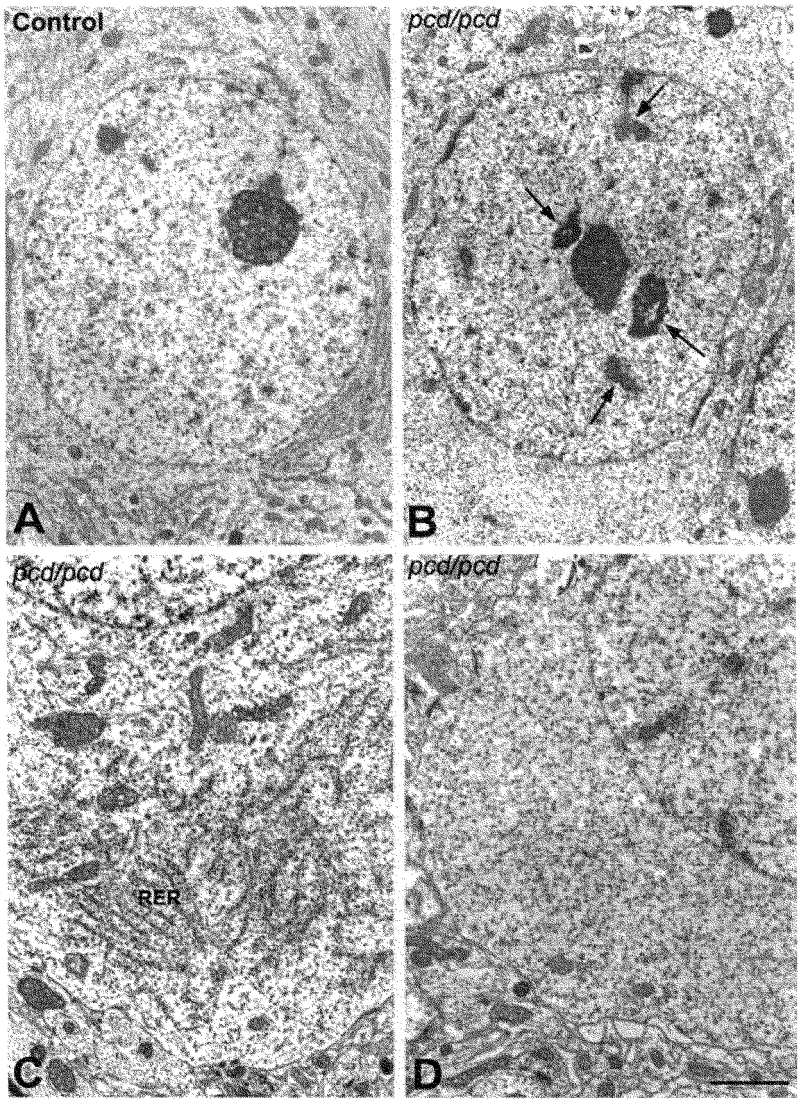


Fig. 6

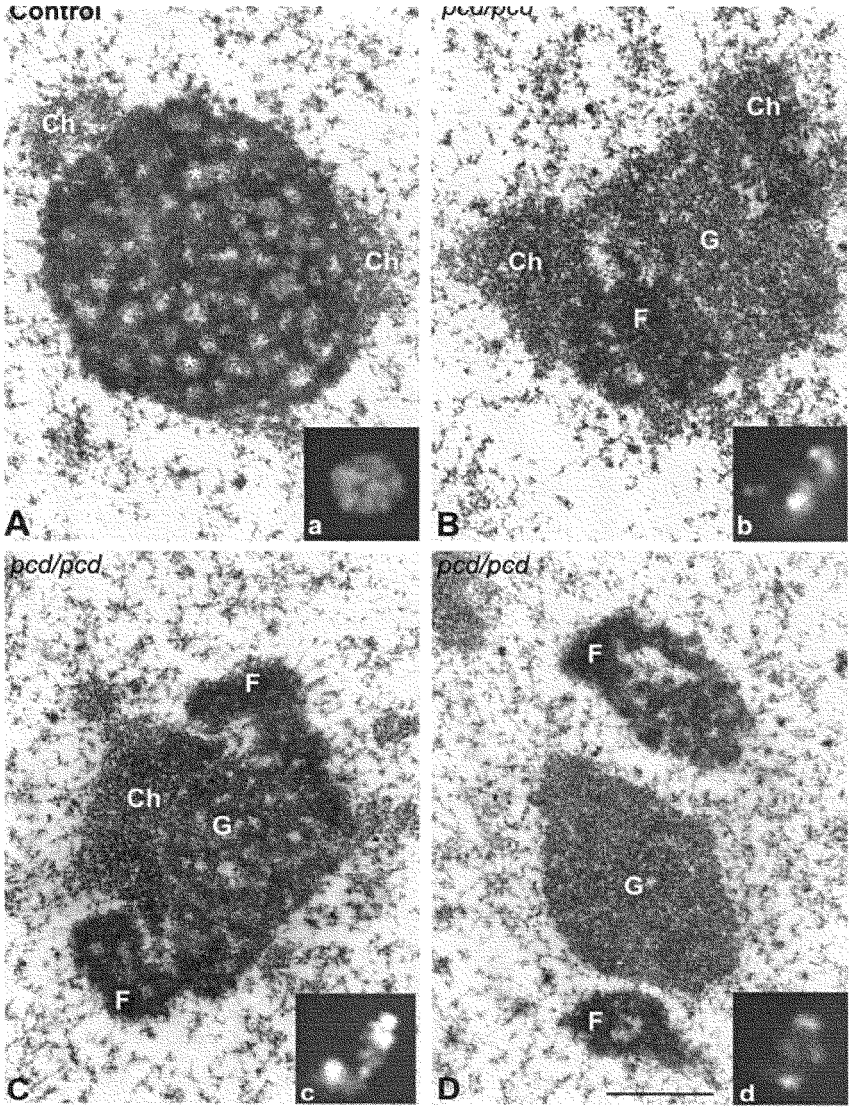

Control
Ch
Ch
A
a
pcd/pcd
Ch
G
Ch
F
B
b
pcd/pcd
F
Ch
G
F
C
c
pcd/pcd
F
G
F
D
d

Fig. 7

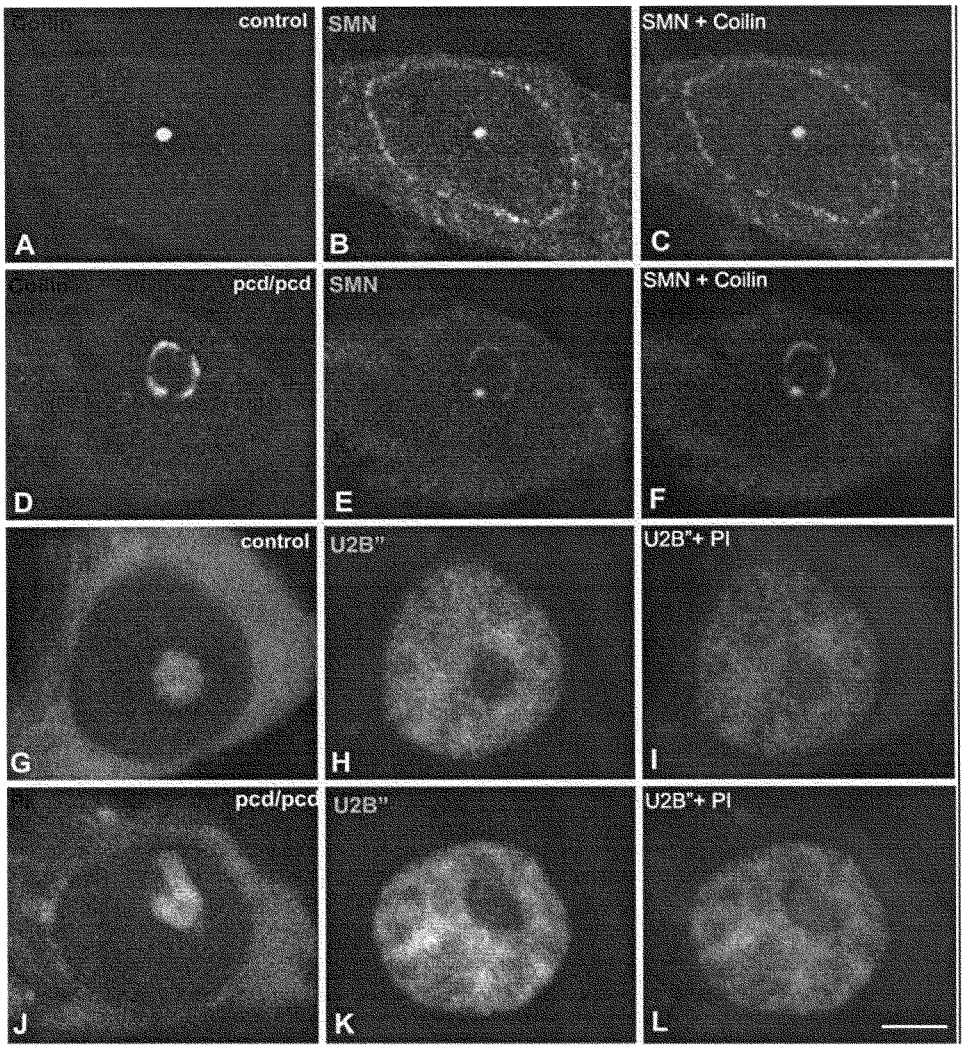
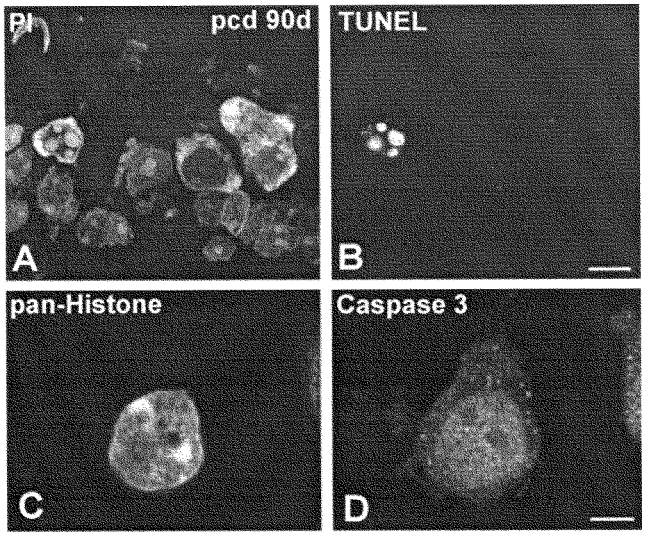

control
SMN
SMN + Coilin
A
B
C
pcd/pcd
SMN
SMN + Coilin
D
E
F
control
U2B''
U2B''+ PI
G
H
I
pcd/pcd
U2B''
U2B''+ PI
J
K
L

Figura 8



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) ES 2 338 392

(21) Nº de solicitud: 200602225

(22) Fecha de presentación de la solicitud: **18.08.2006**

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

(51) **Int. Cl.:** ***G01N 33/68*** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	CASAFONT I. et al. Nuclear organization and dynamics of transcription sites in rat sensory ganglia neurons detected by incorporation of 5'-fluorouridine into nascent RNA. Neuroscience. 23.03.2006, Vol. 140, páginas 453-462 doi:10.1016/j.neuroscience. 2006.02.030, todo el documento.	1,4-18
Y	NAVASCUES J. et al. Reorganization of nuclear compartments of type A neurons of trigeminal ganglia in response to inflammatory injury of peripheral nerve endings. Journal of Neurocytology. 2004, Vol. 33, páginas 393-405 ISSN 0300-4864, todo el documento.	
A	KANG J. et al. Functional interaction of H2AX, NBS1 and p53 in ATM-dependent DNA damage responses and tumor suppression. Molecular and Cellular Biology. Enero 2005, Vol. 25, Nº 2, páginas 661-670 doi:10.1128/MCB.25.2.661-670.2005, todo el documento.	1,2,6-18
A	FERNANDEZ-CAPETILLO O. et al. DNA damage-induced G2-M checkpoint activation by histone H2AX and 53BP1. Nature Cell Biology. 25.11.2002, Vol. 4, páginas 993-997 doi:10.108/ncb884, todo el documento.	1,2,6-18
A	HUSSEMAN J.W. et al. Mitotic activation : a convergent mechanism for a cohort of neurodegenerative diseases. Neurobiology of Aging. 2000, Vol. 21, páginas 815-828 ISSN 0197-4580, todo el documento.	3

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe	Examinador	Página
21.04.2010	M. Cumbreño Galindo	1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXTE, XPESP, BIOSIS, MEDLINE, NPL, EMBASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 21.04.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-18	**SÍ**
	Reivindicaciones		**NO**
Actividad inventiva	Reivindicaciones	2, 3	**SÍ**
(Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1, 4-18	**NO**

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial.** Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Casafont I. et al. Neuroscience. Vol. 140, páginas 453-462 doi:10.1016/j.neuroscience.2006.02.030	23-3-2006
D02	Navascues J. et al. Journal of Neurocytology. Vol. 33, páginas 393-405 ISSN 0300-4864	2004
D03	Kang J. et al. Molecular and Cellular Biology. Vol. 25, Nº 2, páginas 661-670 doi:10.1128/MCB.25.2.661-670.2005	01-2005
D04	Fernandez-Capetillo O. et al. Nature Cell Biology. Vol. 4, páginas 993-997 doi:10.108/ncb884	25-11-2002
D05	Husseman J.W. et al. Neurobiology of Aging. Vol. 21, páginas 815-828 ISSN 0197-4580	2000

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención tiene por objeto un método para la identificación de signos pre-neurodegenerativos de disfunción neuronal en muestras biológicas aisladas que comprende el análisis de los patrones de expresión de los siguientes indicadores: histona gamma-H2AX y reducción de la histona H4 acetilada, en comparación con las células control (reivindicación 1). Además, se puede identificar pATM o 53BP1 (reivindicación 2), la reducción de ARN polimerasa II fosforilada en la serina 2 (reivindicación 3), el aumento de expresión de la histona H4 trimetilada (reivindicación 4) y la relocalización de coilina en forma de caperuzas perinucleolares (reivindicación 5), llevándose a cabo la detección de dichos indicadores usando anticuerpos (reivindicaciones 6 a 8). Los signos pre-neurodegenerativos de disfunción neuronal se correlacionan con enfermedades como el Alzheimer, el Parkinson, la enfermedad de Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica, degeneraciones cerebelares, la esclerosis múltiple y encefalopatías espongiformes transmisibles (reivindicaciones 9 y 10). La muestra analizada es tejido celular del sistema nervioso central o periférico (reivindicaciones 11 a 14). La invención también tiene por objeto un kit que comprende los anticuerpos anti-gamma-H2AX de ratón y anti-H4 acetilada de conejo (reivindicación 15) y, además, el anticuerpo anti-H4-K20-3Me de conejo (reivindicación 16) y anticuerpos secundarios (reivindicación 17), así como el uso del kit para la identificación de signos pre-neurodegenerativos de disfunción neuronal en muestras biológicas aisladas (reivindicación 18).

D01 analiza la organización nuclear y la dinámica de los sitios de transcripción en las neuronas de los ganglios trigéminos.

D02 investiga, en neuronas de tipo A de los ganglios trigéminos, la reorganización y dinámica de los compartimentos nucleares implicados en la transcripción y en el procesamiento del RNA que tienen lugar en respuesta al daño neuronal.

D03 investiga las interacciones funcionales entre ATM, NBS1, H2AX y p53 en relación con el daño en el ADN, el mantenimiento de la estabilidad genética y la supresión de tumores. Expone que ATM codifica una proteína kinasa (pATM) responsable de activar las respuestas celulares al daño en el ADN mediante la fosforilación y activación de proteínas como H2AX y 53BP1. Así, la histona H2AX es fosforilada, denominándose gamma-H2AX, y puede detectarse poco después de iniciarse tal daño, estando implicada en el reclutamiento de otros componentes conocidos de reparación del ADN como es 53BP1.

D04 propone que, a ciertos niveles de daño en el ADN, la concentración de 53BP1 mediada por gamma-H2AX, ambos diana de la fosforilación realizada por ATM, es esencial para la amplificación de señales que, de otro modo, serían insuficientes para evitar que entren en mitosis las células dañadas. El ensayo se lleva a cabo utilizando anticuerpos anti-gamma- H2AX de ratón y anti-53BP1 de conejo.

Hoja adicional

D05 examina la especificidad de la relación entre la cdc2/cyclin B1 kinasa y la degeneración neurofibrilar en la enfermedad de Alzheimer, para lo cual se emplean anticuerpos específicos frente a la cdc2 kinasa, su activador, ciclina B1 y tres fosfoepítopos producidos por la enzima: TG-3, MPM-2 y el fosfoepítopo H5 de la RNA polimerasa II (RNAP II), todo ello en regiones del cerebro afectadas por enfermedades neurodegenerativas. La RNAP II, que regula la transcripción del RNA, es fosforilada por cdc2 en la serina 2, de modo que en las neuronas afectadas se produce una disminución de los niveles de RNAP II y una inhibición del proceso de transcripción. Estos marcadores aparecen en neuronas con agregados neurofibrilares y patología neurítica, así como en neuronas sin un aparente depósito fibrilar, lo que sugiere su presencia en fases tempranas de desarrollo de enfermedades neurodegenerativas . Se utiliza el anticuerpo H5 que detecta la serina 2 fosforilada de la RNA polimerasa II.

1. NOVEDAD

Las reivindicaciones de la 1 a la 18 cumplen el requisito de novedad

2. ACTIVIDAD INVENTIVA

2.1. REIVINDICACIONES 1, 4-18

D01 utiliza el ensayo de transcripción con 5´-fluorouridina para analizar la organización nuclear y la dinámica de los sitios de transcripción en las neuronas de los ganglios trigéminos. La reducción en la síntesis de RNA, después del tratamiento con actinomicina D, se asocia con dos eventos celulares, el silenciamiento de la heterocromatina y la formación de focos nucleares de daño/reparación del ADN, lo cual se demuestra por el aumento en la expresión de histona H4 trimetilada y gamma-H2AX, respectivamente. También estudia otros marcadores de compartimentos nucleares dependientes de transcripción, como la coilina para los cuerpos de Cajal, teniendo lugar la disminución de estos y la reorganización de coilina en anillos perinucleolares, típicamente asociados con una inhibición del proceso de transcripción neuronal. Postula que el estudio de todos estos factores asociados con la inhibición de la transcripción nuclear es importante para determinar las bases celulares de las enfermedades neurodegenerativas. Utiliza anticuerpos gamma- H2AX de ratón y anti-H4-K20-3Me de conejo.

La diferencia entre D01 y la presente invención es que en dicho documento no se menciona el análisis de la reducción de los niveles de expresión de la histona H4 acetilada como modo de identificación de signos pre-neurodegenerativos.

D02 investiga, en neuronas de tipo A de los ganglios trigéminos, la reorganización y dinámica de los compartimentos nucleares implicados en la transcripción y en el procesamiento del RNA que tienen lugar en respuesta al daño neuronal. Al inicio de dicha respuesta, se produce la condensación de la cromatina, la reducción de los niveles de expresión de la histona H4 acetilada, la disminución del número de cuerpos de Cajal y alteraciones nucleorales, entre otros, lo que demuestra la reorganización dependiente de transcripción de los compartimentos nucleares y la importancia de la respuesta nuclear al daño axonal en la capacidad regenerativa de las neuronas. Utiliza anti-H4 acetilada de conejo y, para identificar los cuerpos de Cajal, anticuerpo anti-coilina de conejo.

Para un experto en la materia sería evidente utilizar el análisis de la reducción en los niveles de expresión de la histona H4 acetilada (D02) junto con la determinación del aumento en la expresión de histona H4 trimetilada y gamma-H2AX y la reorganización de coilina en anillos perinucleolares (D01) como método de diagnóstico de los estadíos iniciales de las enfermedades neurodegenerativas. Por lo tanto, las reivindicaciones 1 y de la 4 a la 18 no presentan actividad inventiva.