

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**Efecto patológico de la expansión de poliglutaminas de hTBP en la
Enfermedad neurodegenerativa SCA17 en *Drosophila melanogaster***

POR

LBG. MARCELA CÁRDENAS TUEME

**COMO REQUISITO PARCIAL OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA**

DICIEMBRE, 2017

Comité de Tesis

Dra. Diana Reséndez Pérez
Presidente

Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Secretario

Dr. Fermín Mar Aguilar
Vocal

Dra. Vianey González Villasana
Vocal

Dra. Diana Caballero Hernández
Vocal

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos al Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, por todo el apoyo brindado en la realización de esta tesis de maestría.

A la Doctora Cristina Rodríguez Padilla por su apoyo económico en la realización de este proyecto.

Principalmente, a la Doctora Diana Reséndez Pérez por su impulso incansable por la perfección, por su apoyo en la realización de este proyecto, tanto económico como intelectual.

Y a CONACYT por el otorgamiento de la beca que me permitió realizar este posgrado.

CONTENIDO

1. RESUMEN	7
2. INTRODUCCIÓN	9
3. ANTECEDENTES.....	12
3.1 Ataxias espinocerebelares.....	12
3.2 Expansión de poliglutaminas.....	15
3.3 Estructura de los agregados polyQs	17
3.4 Modelado de enfermedades degenerativas en <i>D. melanogaster</i>.....	19
3.5 Enfermedades de poliglutaminas modeladas en <i>D. melanogaster</i>.....	20
4. JUSTIFICACIÓN.....	24
5. HIPÓTESIS.....	25
6. OBJETIVO DEL TRABAJO	26
6.1 Objetivo general.....	26
6.2 Objetivos específicos	26
7. MATERIALES Y MÉTODOS	27
7.1 Expresión de hTBP 34Q y 80Q en el cerebro y ojos de <i>D. melanogaster</i>	27
7.1.1 Generación de las moscas transgénicas pUAST-hTBP34Q y 80Q	27
7.1.2 Amplificación y mantenimiento de las moscas productoras y reporteras	27
7.1.3 Sexado de las moscas transgénicas	28
7.1.4 Expresión tejido-específica con los promotores GMR y ELAV	28
7.1.5 Cruzas para expresar hTBP en cerebro y ojos de <i>D. melanogaster</i>	29
7.1.6 Colecta de F1 de cada una de las cruzas genéticas	31
7.1.7 Análisis de supervivencia	32
7.1.8 Modelaje de hTBP34Q y hTBP80Q el ojo de <i>D. melanogaster</i>	33
7.1.9 Disección de los cerebros de adultos.....	33
7.1.10 Inmunodetección de hTBP en el cerebro de <i>D. melanogaster</i>	33
7.2 Evaluación de la muerte celular con hTBP 34 y 80Q	34
7.2.1 Ensayo de TUNEL	34
7.3 Análisis de la marcha con hTBP 34 y 80Q	35

7.3.1	Prueba de escalada.....	35
7.4	Pruebas estadísticas	35
8.	RESULTADOS	36
8.1	Expresión de hTBP 34 y 80Q en el cerebro y ojos de <i>D. melanogaster</i>	36
8.1.1	Expresión tejido-específica con GMR y ELAV	36
8.1.2	hTBP80Q en el cerebro de <i>D. melanogaster</i> acorta su tiempo de vida.....	38
8.1.3	hTBP 34 y 80Q afectan el fenotipo del ojo de la mosca	39
8.1.4	Los agregados de hTBP 34 y 80Q en el cerebro de <i>Drosophila</i> son dependientes de la edad	41
8.1.5	Los agregados de hTBP80Q en el cerebro de <i>Drosophila</i> incrementan de los 2 a los 20 días	45
8.2	hTBP34Q y 80Q provocan muerte neuronal dependiente de la edad.....	46
8.3	hTBP80Q en el cerebro de <i>Drosophila</i> afecta su marcha.....	50
9.	DISCUSIÓN	52
10.	CONCLUSIONES	57
11.	PERSPECTIVAS	59
12.	BIBLIOGRAFÍA	61

LISTADO DE FIGURAS

1. Figura 1. Vías/sitios afectados por las diversas mutaciones que causan las ataxias.....	13
2. Figura 2. Expresión del gen de interés a través del sistema GAL4/UAS.....	29
3. Figura 3. Esquema de cruzas para dirigir hTBP34Q y hTBP80Q a los ojos de <i>Drosophila</i>	30
4. Figura 4. Esquema de cruzas para dirigir hTBP34Q y hTBP80Q al cerebro de <i>Drosophila</i>	31
5. Figura 5. Selección de los fenotipos F1 en las cruzas genéticas con GMR y ELAV.....	32
6. Figura 6. Expresión del promotor GMR-GAL4 a la región posterior al surco morfológico del ojo de <i>D. melanogaster</i>	37
7. Figura 7. Expresión del promotor ELAV-GAL4 al cerebro de <i>D. melanogaster</i>	37
8. Figura 8. La expresión de hTP80Q en el cerebro de <i>Drosophila melanogaster</i> acorta su tiempo de vida.....	39
9. Figura 9. Expresión de hTBP34Q y hTBP80Q dirigida a los ojos de <i>Drosophila melanogaster</i>	41
10. Figura 10. La expresión de hTBP34Q y 80Q forma agregados en el cerebro de <i>Drosophila melanogaster</i> dependientes de la edad.....	44
11. Figura 11. La intensidad de fluorescencia de los agregados de hTBP80Q incrementó de los 2 a los 20 días.....	45
12. Figura 12. La expresión de hTBP34Q y 80Q provoca muerte neuronal a largo plazo.....	48
13. Figura 13. Cuantificación de la fluorescencia de TUNEL en los cerebros de las moscas que expresan hTBP34Q y hTBP80Q.....	49
14. Figura 14. La expresión de hTBP80Q en el cerebro de <i>Drosophila melanogaster</i> afecta su habilidad de escalada.....	51

1. RESUMEN

Las ataxias espinocerebelosas (SCAs) son trastornos progresivos en los que el cerebelo y el tronco cerebral se degeneran lentamente. El síntoma principal de las diversas SCAs que existen es el patrón de neurodegeneración cerebelar que los pacientes exhiben. La ataxia espinocerebelosa 17 (SCA17) también conocida como enfermedad de Huntington-4 (HDL4), es causada por una expansión del trinucleótido CAG/CAA en las regiones polyQ del gen que codifica al factor transcripcional TBP humano (hTBP). El umbral fisiológico de las glutaminas totales presentes en hTBP es de alrededor de 30 a 40 repeticiones y un número mayor de 40 causa la patología. En esta tesis analizamos el efecto neuropatológico de hTBP con la región polyQ expandida (80Q) modelado en *D. melanogaster*. La estrategia experimental consistió en la generación de las moscas transgénicas para dirigir la expresión específica de hTBP34Q y 80Q en el cerebro y en los ojos de *Drosophila*. La agregación de proteínas en el cerebro de las moscas se determinó mediante inmunofluorescencia y la muerte celular fue evaluada utilizando el ensayo TUNEL. Para determinar el estado de la marcha de las moscas que expresaban hTBP34Q y 80Q en el cerebro se realizó la prueba de escalada en moscas adultas. Los resultados obtenidos mostraron exitosamente la expresión específica de tejido de hTBP 34 y 80Q en el cerebro y ojos de *Drosophila* usando los promotores ELAV y GMR respectivamente. La expresión de hTBP34 y 80Q causó fenotipos aberrantes en el ojo de *Drosophila*. Así mismo, la expresión de hTBP80Q en el cerebro mostró ser neurotóxica acortando el tiempo de vida de las moscas. Las imágenes confocales mostraron que la agregación de hTBP34Q y 80Q en el cerebro de *Drosophila* es dependiente de la edad de las moscas y del tamaño de la expansión, donde los agregados de hTBP80Q mostraron un incremento de los 2 a los 20 días. La expresión de hTBP 34 y 80Q provocó muerte neuronal dependiente de la edad y las moscas hTBP80Q fueron severamente afectadas en las pruebas de escalada. Estos resultados permitieron concluir claramente el efecto neurotóxico de hTBP80Q en el cerebro de la mosca que acortó su tiempo de vida y capacidad locomotriz debido a la formación de los agregados proteicos y muerte celular por lo que abren la posibilidad para evaluar el tipo de muerte celular producida en las neuronas afectadas y el comportamiento molecular de estas expansiones polyQs en las patologías neurodegenerativas como SCA17.

SUMMARY

Spinocerebellar ataxias (SCAs) are progressive disorders in which the cerebellum and the brain stem slowly degenerate. We modeled spinocerebellar ataxia 17 (SCA17) in *Drosophila melanogaster*, also known as Huntington-4-like disease (HDL4). SCA17 is caused by an expansion of the CAG / CAA trinucleotide in the gene encoding polyQ regions in the human TBP protein (hTBP). The physiological threshold of the total glutamines present in non-pathological TBP is around 30 to 40 repetitions and a greater number of 40 causes the pathology. To analyze the neuropathological effect of hTBP with the extended polyQ (80Q) compared with wild type hTBP (34Q) using *D. melanogaster* as a model. Our experimental strategy consisted of addressing specific expression of hTBP with polyQ expansions of 34Q and 80Q using the eye driver GMR-GAL4 to evaluate eye-phenotype toxicity due to these polyQ expansions. Then, we used ELAV-GAL4 to address hTBP34 and 80Q to the flies' brain and measure protein aggregation, cell death and climbing ability. Protein aggregation in the flies' brain was measured by immunofluorescence; cell death was evaluated using TUNEL and climbing test in adult flies were compared between 34Q and 80Q. Our results, showed that hTBP34 and 80Q expressed in the flies' eyes caused an aberrant phenotype which was polyQ length-dependent as well as age-dependent. hTBP80Q expression in the flies' brain shortened its life span when compared with the control groups. Confocal images of the flies' brains expressing hTBP34 and 80Q, showed that protein aggregation from hTBP80Q occurred from day 2 to day 20, and, hTBP34Q started aggregating at day 50. Expression of hTBP34 and 80Q caused neurodegeneration, hTBP80Q triggered more neuronal death than hTBP34Q. When testing climbing ability, hTBP80Q flies were severely affected when compared with the rest of the groups in the RING test. These results let us conclude that hTBP34 and 80Q are neurotoxic, form protein aggregates, cause neurodegeneration and affect the climbing ability of *Drosophila melanogaster*. We expect to complement these results with further experiments and analyze these polyQ expansions in additional models.

2. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades neurodegenerativas (EN) constituyen un grupo de padecimientos que cada vez están más dispersas entre la población. Éstas se caracterizan por afectar varias actividades del cuerpo humano, tales como el equilibrio, movimiento, habla, respiración y funciones del corazón, entre muchas otras. Entre estos padecimientos se encuentran: la esclerosis lateral amiotrófica, ataxia de Friedreich, enfermedad de Huntington, demencia con cuerpos de Lewy, enfermedad de Parkinson, atrofia muscular espinal y las ataxias espinocerebelosas, entre otras.

Las ataxias espinocerebelosas (SCAs) son desórdenes progresivos en los cuales el cerebelo, el cual está encargado de la coordinación muscular y movimientos involuntarios, y el tronco cerebral se degeneran lentamente (Stevanin & Brice, 2008). Estos desórdenes se clasifican según sea su etiología molecular, la clasificación está dividida en tres grupos principales según la descripción de Dueñas, y cols., en el 2006): 1) Ataxias relacionadas a la expansión de poliglutaminas (polyQ); 2) Ataxias causadas por expansiones repetitivas en regiones no codificantes; y 3) Ataxias producidas por mutaciones convencionales (deleciones, inserciones, duplicaciones, mutaciones sin sentido). La característica que agrupa a las diversas SCAs es el patrón de neurodegeneración que exhibe el paciente. Además de la degeneración cerebelar, otras partes del sistema nervioso central pueden verse afectadas (Paulson, 2009). El síntoma principal en este tipo de aflicciones es la pérdida de coordinación, especialmente al momento de caminar, por lo tanto, cuando un médico diagnostica a un paciente con ataxia, será alguien que padece problemas motores. El número de ataxias espinocerebelosas sigue creciendo, hasta ahora se conocen cerca de 30. Dentro de ese amplio grupo de EN se encuentra la ataxia espinocerebelar 17 (SCA17), también conocida como enfermedad parecida a Huntington-4 (HDL4). Este padecimiento es descrito como una enfermedad poco común, autosómica dominante y su prevalencia mundial de acuerdo a datos epidemiológicos, es parecida a la de la enfermedad de Huntington, de 5 a 7 personas por cada 100,000 habitantes (Craig, Keers, Archibald, Curtis, & Chinnery, 2004; Van De Warrenburg, Sinke, Bemelmans, & Scheffer, 2002). Esta ataxia

es causada por una expansión del trinucleótido CAG/CAA en el gen que codifica para el factor transcripcional TBP (Del inglés, TATA binding protein). El umbral fisiológico del total de glutaminas presentes en la TBP de personas sanas es de 30-40 repeticiones, es decir un mayor número de 40 repeticiones el individuo es afectado por la enfermedad. El cuadro clínico está compuesto de ataxia, demencia, movimiento coreicos y distonia, epilepsia, señales piramidales y extrapiramidales, discapacidad cognitiva e incluso algún trastorno psiquiátrico (OMIM # 607136, 2016). Los síntomas suelen aparecer entre los 30 y 50 años, sin embargo, también es posible que se presenten en la infancia o después de los 60 años. La aparición del trastorno dependerá del número de repeticiones presentes en el gen, debido a que existe una correlación negativa entre el número de repeticiones y la aparición del trastorno.

El estudio de las EN es complejo, por lo tanto, en los últimos 12 años se ha propuesto a *Drosophila melanogaster* como un modelo de estudio, porque a pesar que a simple vista la mosca de la fruta se ve muy distinta al ser humano, ésta posee procesos celulares que están altamente conservados entre *D. melanogaster* y los humanos. Las grandes ventajas que ofrece *D. melanogaster* es que su ciclo de vida es corto (10 días a 25°C), producen una gran descendencia, y su mantenimiento es económico; además la genética de mosca de la fruta es más simple, posee solo 4 pares de cromosomas en comparación con los 23 en humanos; 12,000 genes en vez de 20,000 en humanos; y un sistema nervioso más sencillo con alrededor de 200,000 neuronas en lugar de las ~100 billones. A pesar de la simplicidad de su sistema nervioso, la mosca de la fruta sigue siendo capaz de completar diversas tareas motoras es por esto que ha hecho grandes aportes a la rama de la neurobiología (Ambegaokar, Roy, & Jackson, 2010; Matthews, Kaufman, & Gelbart, 2005).

La mosca de la fruta ha servido como modelo para diferentes enfermedades del cerebro humano, en especial, las neurodegenerativas. En la mayoría de estos modelos de transgénicos invertebrados, se reproducen algunos aspectos de las enfermedades humanas (Jeibmann & Paulus, 2009). Aunque la investigación de los modelos de roedores ha tenido un impacto significativo, los modelos de invertebrados ofrecen una amplia variedad de

herramientas experimentales que potencialmente pueden abordar algunas de las preguntas pendientes subyacentes a la enfermedad neurológica.

Lo anterior nos permitió postular en esta tesis que el análisis del patrón de neurodegeneración de SCA17 modelado en la mosca usando hTBP con la expansión de polyQ para estudiar la agregación proteica y muerte celular en las neuronas, así como su efecto en la habilidad locomotora podrían ser utilizadas en un futuro mediano para alternativas que eviten el deterioro cognitivo y funcional que caracteriza a esta patología.

3. ANTECEDENTES

3.1 Ataxias espinocerebelares

Paulson y colaboradores en el año 2009, definieron ataxia como la pérdida de la coordinación, en particular de la marcha; y se denominó cerebelar porque el cerebelo, encargado de la coordinación muscular y movimientos involuntarios, el tronco cerebral, la vía espinocerebelar y sus conexiones aferentes/eferentes, se degeneran lentamente (Orr, 2012; Paulson, Shakkottai, Clark, & Orr, 2017; Stevanin & Brice, 2008). El término ataxia comprende los diversos trastornos del cerebelo encontrados durante la vida diaria, tales como el equilibrio, movimiento, habla, respiración y funciones del corazón, entre muchas otras. Los pacientes presentan un síndrome cerebeloso por el que exhiben dificultades de coordinación, incluyendo problemas con el control motriz grueso y fino; además, también se puede presentar con retinopatía pigmentaria, trastornos extrapiramidales del movimiento, signos piramidales, los síntomas corticales (convulsiones, deterioro cognitivo/síntomas de comportamiento), y neuropatía periférica (Gilman, 2000; Manto & Marmolino, 2009).

Las ataxias espinocerebelares (SCAs) son padecimientos que pueden ser adquiridos como consecuencia de diversas condiciones clínicas tales como: esclerosis múltiple, tumor cerebral, alcoholismo, entre otras; o bien pueden ser heredadas, de forma autosómica dominante o recesiva (Orr, 2012; Paulson, 2009; Paulson et al., 2017; Soong & Paulson, 2007). La mayoría de estas degeneraciones cerebelares son heredadas de manera autosómica dominante, de manera que, portar un alelo defectuoso es suficiente para desarrollar el padecimiento.

La etiología de las SCAs permanece en duda y existen dos corrientes que respaldan el desarrollo de la patología. La primera se centra en la región de poliglutaminas como responsable de la patogénesis ya que es evidente que los péptidos polyQ expandidos son tóxicos. Esto ha sido reportado en diversos estudios que indican que la enfermedad podría deberse a la producción proteolítica de tales péptidos (Crotti et al., 2014; Bauer & Nobuyuki, 2009; Chafekar & Duennwald, 2012; Chongtham & Agrawal, 2016; J. L. Marsh et al., 2000; Matilla-Deñas et al., 2015; Nageshwaran & Festenstein, 2015; Olejniczak,

Urbanek, & Krzyzosiak, 2015). La segunda se enfoca en la capacidad de agregación y formación de cuerpos de inclusión que tiene la proteína mutante (con regiones polyQ extendidas). Por lo que es relevante intentar determinar si estas características de la proteína mutante son responsables de la neurodegeneración asociada a las diversas SCAs (Orr & Zoghbi, 2007).

Las SCAs conforman un amplio grupo de enfermedades neurodegenerativas progresivas, se han descrito cerca de 30 de este tipo de padecimientos, sin embargo, sólo seis de estas (las más comunes) SCA1, SCA2, SCA3, y SCA6 en conjunto con SCA7 y SCA17 además de compartir la sintomatología, su etiología es similar, pues todas ellas son causadas por la expansión de una repetición de CAG que codifica una región poliglutaminas en la proteína afectada. En la Tabla 1 se muestran las SCAs reportadas a la fecha y se indica en color rojo SCA17 que es el enfoque primordial de esta tesis. La Figura 1 resume y muestra todas las diferentes vías que se ven afectadas con la aparición de algún tipo de SCA.

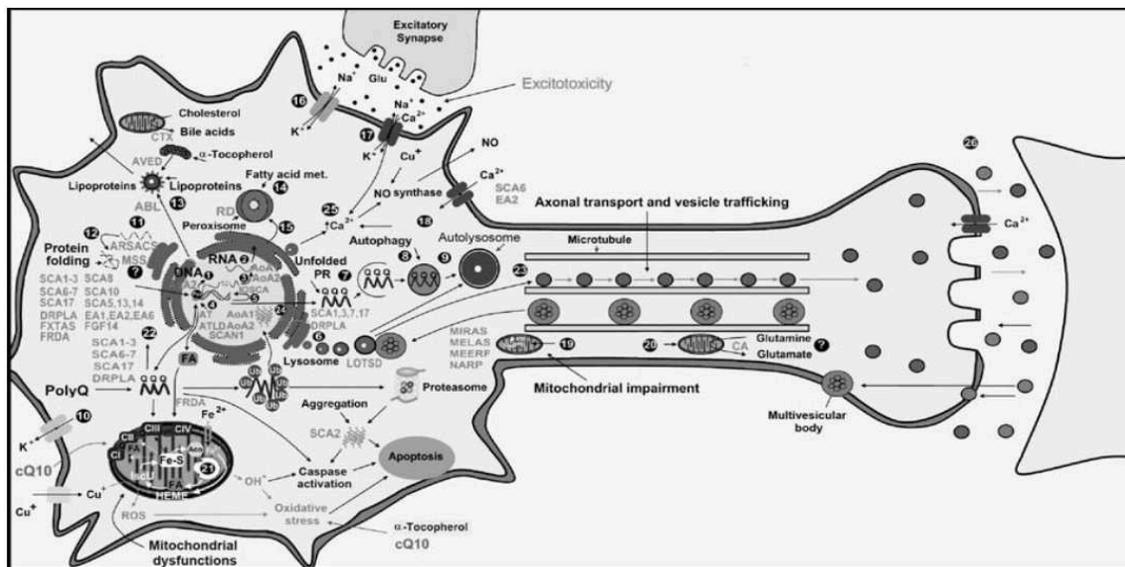


Figura 1. Vías/sitios afectados por las diversas mutaciones que causan las ataxias. El diagrama muestra los procesos que ocurren dentro de la célula o en asociación de una estructura subcelular específica se representan cerca del respectivo orgánulo. Con números se muestran los procesos afectados: 1, la transcripción; 2, el procesamiento; 3, el transporte; 4, la reparación del DNA; 5, la replicación; 6, el metabolismo de los glicoesfingolípidos; 7, la respuesta de la proteína desplegada (PR); 8, la autofagia; 9, autolisosoma; 10, Ca^{2+} activa el canal de K^{+} dependientes de voltaje; 11, la traducción; 12, el plegamiento de proteínas; 13, el montaje de lipoproteínas; 14, el metabolismo de ácidos grasos; 15, la importación de proteínas; 16, el receptor no NMDA; 17, el receptor de NMDA; 18, los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje; 19, la reparación del DNA/replicación; 20, la función mitocondrial; 21, el ciclo de Krebs; 22, las chaperonas; 23, el transporte axonal y el tráfico de vesículas; 24, la agregación; 25, Ca^{2+} homeostasis y 26, la función sináptica.

Tabla 1. Ataxias espinocerebelosas con sus respectivos genes y mutación

Enfermedad	Gen	Mutación (rango de expansión)
SCA1	<i>ATXN1</i>	CAG/polyQ exp. (39-82)
SCA2	<i>ATXN2</i>	CAG/polyQ exp. (33-64)
SCA3	<i>ATXN3</i>	CAG/polyQ exp. (52-86)
SCA4	Desconocido	Desconocido
SCA5	<i>SPTBN</i>	Mutaciones no repetitivas
SCA6	<i>CACNA1</i>	CAG/polyQ exp. (19-30)
SCA7	<i>ATXN7</i>	CAG/polyQ exp. (37-200)
SCA8	SCA8	CAG/CTG exp. (107-128)
SCA10	SCA10	ATTCT exp. (1000-4000)
SCA11	<i>TTBK2</i>	Mutaciones no repetitivas
SCA12	<i>PPP2R2B</i>	CAG exp. (66-78)
SCA13	<i>KCNC3</i>	Desconocido
SCA14	<i>PKC γ</i>	Mutaciones no repetitivas
SCA15/16	<i>ITPR</i>	Mutaciones no repetitivas
SCA17	<i>TBP</i>	CAG/polyQ exp. (50-63)
SCA18	<i>7q22-q32</i>	Desconocido
SCA19	<i>KCND3</i>	Desconocido
SCA20	<i>11q12.3</i>	Duplicación genómica
SCA21	<i>TMEM240</i>	Mutación sin sentido
SCA22	<i>KCND3</i>	Delección
SCA23	<i>PDYN</i>	Variantes alélicas
SCA25	<i>SCA25</i>	Desconocido
SCA26	<i>EEF2</i>	Desconocido
SCA27	<i>FGF14</i>	Mutaciones no repetitivas
SCA28	<i>AFG3L2</i>	Mutaciones sin sentido
SCA29	<i>ITPR1</i>	Mutaciones sin sentido
SCA30	<i>4q34.3-q35.1</i>	Desconocido
SCA31	<i>PLEKHG4</i>	Inserción TGGAA (2.5-3.8kb)
SCA35	<i>TGM6</i>	Variantes alélicas
SCA36	<i>NOP56</i>	GGCCTG (15-650)
SCA37	SCA37	Desconocido
SCA38	<i>ELOVL5</i>	Variantes alélicas
SCA40	<i>CCDC88C</i>	Variantes alélicas
SCA41	<i>TRPC3</i>	Variantes alélicas
SCA42	<i>CACNA1G</i>	Mutaciones sin sentido
SCA43	<i>MME</i>	Mutaciones sin sentido

3.2 Expansión de poliglutaminas

La mayoría de las SCAs comparten sintomatología por lo que se pensaría que la misma mutación es responsable de los diversos padecimientos, sin embargo, no funciona de tal forma. De todas las SCAs sólo la 1, 2, 3, 6, 7 y 17 son reconocidas como “enfermedades de poliglutaminas” (Fan et al., 2014). La región poliglutamínica presente en diversas proteínas está definida por un umbral fisiológico: Este se determina después de que el número de repeticiones de la proteína se considera tóxica. Se sabe que en algunas de las ENs las proteínas polyQ tienden a acumularse en el núcleo celular o en el citoplasma, y es de esta manera que ganan funciones de toxicidad, las cuales afectan la expresión génica, la organización, función celular, etc. Cabe destacar que en los trastornos de expansión de repetición de trinucleótidos, la longitud de la repetición expandida está inversamente correlacionada con la edad de inicio de la enfermedad (Krench, Cho, & Littleton, 2016).

Se ha demostrado que la SCA1 es causada por una expansión de repetición de trinucleótidos CAG, dentro de la región codificante de la proteína ataxina-1(ATXN-1). La proteína ATXN-1 se encuentra en el núcleo de las neuronas y en el citoplasma en las células periféricas, su función principal contribuye en la regulación de la transcripción y el metabolismo del RNA (Matilla-Dueñas, Goold, & Giunti, 2008). En reportes previos, se ha esclarecido que cuando los ratones carecen ataxina-1 tienen deficiencias en el aprendizaje espacial y motor. Además, presentan un deterioro de la plasticidad a corto plazo; sin embargo en este modelo no se presenta ataxia ni degeneración neuronal, lo que sugiere y propone que la aparición de la SCA1 no depende de la traducción de la proteína en su estado fisiológico natural, sino que se le atribuyen los mecanismos tóxicos con ganancia de función a la expansión polyQ de la ATXN-1 (Matilla-Dueñas et al., 2008).

Dentro de la clasificación de las proteinopatías también se encuentra la SCA2, ésta al igual que la SCA1 también es causada por una expansión de repetición de trinucleótidos CAG dentro de la región codificante de la proteína ataxina-2 (ATXN-2). Esta proteína reside en el citoplasma de todas las células, sin embargo, la mayor expresión se presenta en las células de Purkinje (Huynh, Del Bigio, Ho, & Pulst, 1999). La agregación citoplasmática o acumulación de la ATXN-2 ha sido reportada como un factor determinante para causar la patología SCA2 en los seres humanos y ratones. La función de la ATXN-2 es muy amplia

en el citoplasma de la célula, no obstante, ha sido relacionada particularmente con funciones relacionadas al RNA, principalmente con la traducción. En 1998 Neuwald y Koonin determinaron a través de ensayos bioinformáticos que la secuencia primaria de ATXN2 contiene motivos LSM conocidos por su participación en el 'splicing' del RNA y el metabolismo del RNAm en el citoplasma. Lo que apoya la hipótesis de la ganancia de función de ATXN-2 a partir de la expansión de la región de polyQs.

La SCA más común entre la población mundial es la SCA3, mejor conocida como la enfermedad de Machado-Joseph. La aparición de la SCA3 está relacionada con la presencia de una expansión en la región polyQ de la proteína ataxina-3 (ATXN-3). La ATXN-3 en condiciones normales está involucrada en dos procesos celulares: represión de la transcripción (Evert et al., 2006; Li, Macfarlan, Pittman, & Chakravarti, 2002) y la homeostasis proteica (Reina, Zhong, & Pittman, 2009). Sin embargo, no está esclarecido si estos dos procesos están involucrados en la etiología de la enfermedad. Estudios han demostrado que ATXN-3 interactúa con Rad23 y VCP, lo que la involucra en la maquinaria de degradación proteica, por lo tanto cuando su región polyQ se extiende la ATXN-3 tiende a plegarse erróneamente lo que conlleva a su ubiquitinación y la formación de las inclusiones intranucleares (Berke, Chai, Marrs, Wen, & Paulson, 2005).

Existe otra SCA que se le denominó SCA6 y que al principio se pensaba que sólo se trataba de una canalopatía, sin embargo posteriormente se descubrió que existía una expansión en la región de polyQs en la región C terminal de la subunidad $\alpha 1A$ del canal de calcio CACNA1A (Riess et al., 1997; Zuchenko et al., 1997) el cual está altamente expresado en las neuronas de Purkinje. Se ha reportado que en los cerebelos de los pacientes con SCA6 la proteína CACNA1A se agrega en el citoplasma de las neuronas de Purkinje, lo que sugiere que no sólo es una canalopatía sino que la proteína gana una función (Nakamura, Yoshida, Miyazaki, Morita, & Ikeda, 2009).

Otro de los padecimientos en los que se involucra la expansión de poliglutaminas, es la SCA7 en la que la proteína involucrada es la ataxina 7 (ATXN-7). Lo particular en esta enfermedad es que los pacientes sufren una degeneración de la retina (Helmlinger et al., 2006), del sistema auditivo y somato sensorial (Fan et al., 2014). Además de presentar la

característica agregación de la proteína en el citoplasma de las células de Purkinje. ATXN-7 forma parte del complejo SAGA, por lo que aún no queda claro la forma en que modula las acetiltransferasas (HAT) en la transcripción (Helmlinger et al., 2006).

Finalmente, de todas las SCAs, se encuentra la SCA17, la mutación responsable para esta enfermedad es la expansión de poliglutaminas en el gen que codifica para el factor transcripcional TBP (Koide et al., 1999). Se sabe que esta proteína forma parte de la maquinaria basal de la transcripción, por lo que se ha relacionado con la desregulación de la transcripción cuando sus polyQs están expandidas: Se ha descrito anteriormente que las polyQs alteran la estructura de la proteína y afectan su asociación al DNA o bien que esto se deba a una ganancia o pérdida de función de la TBP (Friedman et al., 2007, 2008). Además de esto, al igual que el resto de las SCAs, se ha reportado que cuando TBP posee la región polyQ expandida, tiene la capacidad de agregarse en el núcleo de las células de Purkinje, a diferencia que en el citoplasma en las otras SCAs, secuestrando factores de transcripción, lo que apoya la teoría que TBP con polyQs expandidas afecta la transcripción. Los pacientes con SCA17 padecen afecciones motoras, fallas en la marcha, demencia, trastornos psiquiátricos, entre otros síntomas comunes entre las diversas SCAs. Lo más interesante y la gran pregunta que yace dentro de la patología de SCA17, es su especificidad de tejido, cómo es que una proteína expresada de manera sistémica sólo afecta al sistema nervioso central.

3.3 Estructura de los agregados polyQs

Los mecanismos moleculares por los cuales se forman las inclusiones /agregados proteicos no están del todo esclarecidos, así como tampoco existe una estructura definida que define los agregados proteicos, sin embargo, se han hecho estudios en los que se ha dilucidado algunos mecanismos de como los agregados formados por monómeros evolucionan a convertirse en agregados oligoméricos.

Se ha reportado previamente que la polyQ expandida es una estructura enriquecida en forma de lámina β , similar a las fibrillas amiloideas presentes en Alzheimer. Lo que aún no queda claro es si los agregados adoptan esta conformación antes o después de su

polimerización, es decir, es si la transición a una conformación de lámina β causa la polimerización de polyQ o si la oligomerización de polyQ causa el cambio conformacional (Hoffner & Djian, 2015).

El grupo de Perutz y colaboradores fue de los pioneros en descubrir la conformación de los agregados polyQ, ellos reportaron que las polyQ expandidas sintetizadas químicamente, bajo condiciones fisiológicas normales forman agregados ricos de estructuras de β -tira plegada. A partir de esto se propuso un modelo en el que las fibras polyQ estaban compuestas por hélices β y β -tiras plegadas, por lo que propusieron que un solo giro helicoidal con 20 residuos de polyQ sería inestable, por lo tanto, se eliminaría, pero dos vueltas con un total de 40 residuos se mantendrían juntas por enlaces de hidrógeno entre amidas de giros sucesivos formando así cremalleras polares (Perutz et al., 1994). Siguiendo los mismos principios del estudio anteriormente descrito, Wetzel y colaboradores demostraron que péptidos sintéticos con regiones polyQ se transforman gradualmente de estructuras enrolladas al azar solubles a fibrillas amiloideas con β -tira plegadas insolubles, a pesar de que se logró describir este cambio, no es posible aún determinar que provoca o cuando sucede esta transformación (Chen et al., 2002).

Además de adoptar conformaciones de β -tira plegadas, se ha reportado previamente que las regiones de polyQ pueden adoptar conformaciones parecidas a la de la α -sinucleína en la enfermedad de Parkinson y del β -amiloide en Alzheimer. Sin embargo, se encontró que antes de formar agregados de tipo amiloideo (β -tira plegadas) se forman especies intermedias tales como oligómeros y protofibrillas (Poirier et al., 2002).

Se ha intentado a través del uso de diferentes técnicas de microscopía dilucidar las estructuras que además de las anteriormente descritas están presentes en estos agregados proteicos, para así describir no sólo su estructura o lo que les confiere su toxicidad característica, sino también su formación dentro de las células (Legleiter et al., 2010; Nucifora et al., 2012; Olshina et al., 2010).

Aunque los mecanismos detallados sobre la agregación de polyQ no se han dilucidado; se conocen algunas de las estructuras que conforman estas agregaciones y, además, está claro

que los la intervención en los primeros eventos durante el proceso de agregación, como la transición conformacional anormal a la estructura de lámina- β y la formación de oligómeros, son en este momento el objetivo terapéutico más ideal para el desarrollo de la terapia modificadora de la enfermedad de las enfermedades polyQ (Takeuchi & Nagai, 2017).

3.4 Modelado de enfermedades degenerativas en *D. melanogaster*

El primer acercamiento hacia la mosca de la fruta fue en 1900, cuando Charles W. Woodworth, un entomólogo estadounidense, propuso usar por primera vez a *Drosophila melanogaster* como organismo modelo genético (Sturtevant, 1959). Ha sido a partir de entonces que se han llevado a cabo cientos de estudios para justificar a *D. melanogaster* como un organismo modelo.

A la fecha se conoce que los genes entre la mosca de la fruta y el ser humano están altamente conservados, y no sólo queda en los genes, sino que *D. melanogaster* posee un sistema nervioso complejo y presenta comportamientos desarrollados tales como el aprendizaje y la memoria, lo que la convierte en un excelente prospecto para estudiar la disfunción neuronal y la muerte neuronal derivada de las diversas enfermedades neurodegenerativas que ya se conocen (Chan & Bonini, 2000). Aproximadamente de todos los genes humanos que están relacionados a diversas enfermedades un 75% tiene su homólogo en *D. melanogaster* (Yamamoto et al., 2014).

El modelado de enfermedades neurodegenerativas humanas en *Drosophila melanogaster* se ha logrado a partir de la “humanización” de ésta, es así que se consigue la expresión de la proteína humana patogénica relacionada a la enfermedad en cuestión (Marsh & Thompson, 2006), usando del sistema binario GAL4/UAS (Brand & Perrimon, 1993). Una vez “humanizada” *D. melanogaster* ofrece múltiples ventajas para estudiar los mecanismos moleculares y celulares que intervienen en la patogénesis de la enfermedad a estudiar, entre ellos se encuentran que *D. melanogaster* posee un lapso de vida corto, un gran número de prole, una anatomía bien conocida y estudiada, promotores bien caracterizados para su expresión en tiempo y tejido específico, además de una amplia variedad de mutantes (Venken & Bellen, 2005).

Entre los ejemplos actuales de los modelos de *Drosophila* de enfermedades neurodegenerativas se encuentran: Alzheimer, PD, tauopatías, varios trastornos de poliglutaminas (HD, SCA1, SCA3, atrofia muscular espinobulbar), ALS, enfermedades de priones (PrD), distonia, expansiones no codificantes (SCA8, distrofia miotónica), y varios trastornos recesivos, incluyendo el síndrome X-frágil y ataxia de Friedreich, entre otros (Xu et al., 2015).

3.5 Enfermedades de poliglutaminas modeladas en *D. melanogaster*

Actualmente, existen 9 enfermedades relacionadas a la expansión de poliglutaminas: SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7, SCA17, Atrofia dentatorubralpalidolusiana (DRPLA), Atrofia muscular espino-bulbar (SMBA) y la enfermedad de Huntington (HD). Todas éstas causan comparten algunas manifestaciones clínicas y son heredadas de forma autosómica dominante.

Los primeros modelajes en *D. melanogaster* son SCA1 y SCA3 (Fernandez-Funez et al., 2000; Warrick et al., 1998). El modelaje de SCA1 en *D. melanogaster* permitió dilucidar los mecanismos genéticos y mecanismos moleculares subyacentes a la degeneración neuronal, expresando el gen SCA1 humano en *Drosophila*. Se encontró que altos niveles de ATXN-1 *wild-type* pueden causar fenotipos degenerativos similares a los causados por la proteína expandida. Además de corroborar que las moscas que expresan las proteínas con regiones polyQs expandidas sufren de los efectos tóxicos de éstas mismas. También se describieron los modificadores involucrados en la desintoxicación celular mediada por GST, regulación transcripcional y el procesamiento del RNA, los cuales revelaron mecanismos patogénicos adicionales en la SCA1 (Fernandez-Funez et al., 2000).

Para SCA3, se creó un modelo de *D. melanogaster* con sólo un segmento de la proteína ATXN-3 que contenía la región expandida de poliglutaminas. A través del sistema binario GAL4/UAS se dirigió la expresión a las neuronas fotoreceptoras, así como a todas las células involucradas en el desarrollo del ojo de la mosca de la fruta, usando el promotor GMR. Esta expresión proteica promovió la formación de inclusiones nucleares (NI) y finalmente conllevó a la degeneración celular. El fenotipo más claro fue en con la proteína

con 78 glutaminas, que presentó ojos anormalmente delgados y severamente despigmentados, debido principalmente a la pérdida severa de las células del ojo (Xu et al., 2015). Sin embargo, a pesar de que todas las células fueron afectadas, las más susceptibles a la expresión del transgen fueron las neuronas. Estos resultados demostraron que los mecanismos celulares de las enfermedades de expansión de poliglutaminas están conservados en invertebrados (Warrick et al., 1998). Sin embargo, el mismo grupo de investigación describió más adelante que ATXN-3 patógena en moscas con SCA3 (Q78 o Q84) conserva una función de protección neuronal a través de un mecanismo mediado por proteosoma (Warrick et al., 2005).

Otro grupo involucrado en el estudio de SCA3 es el de Lin y colaboradores, en el 2015 utilizaron el modelo de Warrick y cols. propuesto en 1998 y silenciaron la expresión de la transglutaminasa (TG) por dos diferentes vías, la primera fue usando un RNAi que suprimía la traducción de la TG y la otra fue, alimentando a las moscas con un inhibidor de esta enzima (cistamina). Los autores demostraron que cuando la TG se encuentra silenciada ya sea por RNAi o cistamina la degeneración de las ommatidias se veía aumentada, así como el aumento del tamaño de los agregados causados por ATXN3. Estos hallazgos los llevaron a la conclusión de que la TG es crucial en la neurotoxicidad provocada por ATXN3 en un modelo de SCA3 en *Drosophila melanogaster* (Lin, He, Luo, Zhu, & Duan, 2015).

SCA7 se intentó modelar en *D. melanogaster*, sin embargo, a pesar de la creación de moscas transgénicas con una expansión de trinucleótidos CAG en la proteína ATXN-7, la proteína permaneció estable independientemente del contexto en el que fuese expresada. Por lo tanto, a partir de este reporte se generó la hipótesis de que durante la evolución, la presión selectiva permitió que *D. melanogaster* desarrollara mecanismos robustos para mantener las polyQs dentro de un rango controlado, lo cual no se observa en los mamíferos (Jackson et al., 2005).

SMBA también ha sido descrita en *D. melanogaster*, en donde se observó que la proteína de receptor de andrógenos (AR) con la región de polyQs expandida tiene la capacidad de translocarse al núcleo y activar la transcripción vía dependiente del AR (Nedelsky et al., 2012).

También se ha modelado la HD en *D. melanogaster* y se ha observado el mismo fenotipo,

la degeneración del ojo, característica para estudiar este tipo de padecimientos. Se observó que las líneas de moscas con las polyQs expandidas HD-Q75 y HD-Q120 muestran una morfología de ojo normal y la estructura ommatidial intacta en el día de la eclosión (día 0), pero al día 10, un subconjunto importante de rhabdómeros se ven interrumpidos, con una obvia degeneración más grave en las moscas HD-Q120 que en HD-Q75 (Zhang et al., 2010).

Otro de los modelajes que ha surgido en los últimos años es el de SCA6. En el año 2015, Tsou y colaboradores, describieron la generación y caracterización de los primeros modelos de SCA6 en *Drosophila melanogaster*, que expresan la proteína α 1ACT humana completa con una región polyQ normal o expandida. Los autores demostraron que la proteína α 1ACT con la región polyQ expandida recapitula la naturaleza degenerativa de SCA6 al ser expresada en varios tejidos de moscas, además que también presenta la capacidad de formar agregados. El fenotipo característico de los agregados en los ojos de la mosca de la fruta, identifican una co-chaperona DnaJ-1 como un posible blanco terapéutico. La sobreexpresión de ésta suprime casi del todo la degeneración causada por la expansión polyQ en α 1ACT. Asimismo mejoró el tiempo de vida que se había visto afectado con la expansión de polyQ y también propició una disminución de la cantidad y tamaño de los agregados, por lo que esta co-chaperona parece estar altamente involucrada en la regulación de la agregación de estas proteínas en SCA6 modelada en *D. melanogaster* (Tsou et al., 2015).

Adicionalmente, Jun Ma y cols., establecieron un modelo de SCA17 en *Drosophila*, en el cual expresaron hTBP34, 54 y 80Q en el ojo de la mosca de la fruta. Las moscas transgénicas que expresaban una proteína mutante hTBP con un tracto polyQ expandido (hTBP80Q) exhibieron degeneración progresiva en las ommatidias del ojo, característica que fue extrapolada con la neurodegeneración presente en los cerebros de los pacientes con SCA17. Los autores se centraron principalmente en la expresión génica, la cual midieron con microarreglos, en los cuales se encontraron desregulaciones en la transcripción y sugirieron que la actividad del factor de transcripción Su(H) está involucrado en la progresión patológica en los pacientes SCA17 (Ren et al., 2011).

Debido a todos los antecedentes anteriormente descritos, en esta tesis se propone el modelando la expresión de las proteínas hTBP34Q y hTBP80Q en el cerebro de la mosca de la fruta, para determinar y elucidar los mecanismos de toxicidad que producen estas proteínas en el cerebro de *Drosophila melanogaster*.

4. JUSTIFICACIÓN

La importancia del esclarecimiento de la etiología y patología de la ataxia espinocerebelosa 17 (SCA17) justifica el estudio exhaustivo y el desarrollo de modelos de la enfermedad lo más cercano posible a como el padecimiento se manifiesta en el ser humano.

En esta tesis se propuso el organismo modelo *Drosophila melanogaster* para replicar la patología SCA17. *D. melanogaster*, comparte principios de organización y función corporal con el ser humano, además de poseer un genoma altamente estudiado y menos repetitivo; alrededor del 75% de los genes que causan enfermedades en el humano poseen un homólogo en el genoma de la mosca de la fruta. También, es importante destacar que su sistema nervioso está altamente desarrollado y ha permitido realizar estudios avanzados en el área de la neurobiología.

El modelaje de SCA17 en *Drosophila melanogaster* nos permitió determinar el patrón de agregación de las proteínas estudiadas (hTBP34 y 80Q), también, dilucidó la neurotoxicidad de éstas en el cerebro y ojo de la mosca. Así mismo, nos permitió evaluar la presencia de neurodegeneración dependiente de la expansión de glutaminas y edad de la mosca; además de estudiar la afectación de la marcha de la mosca de la fruta a consecuencia de la expresión de las proteínas hTBP34 y 80Q en el cerebro de ésta.

La ventaja más importante en el modelaje de enfermedades neurodegenerativas en *Drosophila melanogaster*, es que se pueden estudiar de forma rápida, es decir, se pueden analizar al mismo tiempo diferentes generaciones de moscas; éstas permitieron entender el progreso de la neurodegeneración de SCA17 y sus consecuencias.

Este tipo de modelos representan un escalón más cerca para brindar alternativas de intervención médica para estos padecimientos, y, de esta forma conseguir en un futuro que el deterioro cognitivo y funcional, causado por este tipo de enfermedades pueda ser tratado.

5. HIPÓTESIS

La presencia de poliglutaminas expandidas en la proteína hTBP forma agregados en el cerebro de *D. melanogaster* provocando neurodegeneración y afectando su marcha.

6. OBJETIVO DEL TRABAJO

6.1 Objetivo general

Determinar el efecto neuropatológico de hTBP con la región de poliglutaminas extendidas en la degeneración neuronal y su afectación en la capacidad motriz en *D. melanogaster*.

6.2 Objetivos específicos

- Detectar los agregados de hTBP con las diferentes expansiones de polyQ 34 y 80 en el cerebro de *D. melanogaster*.
- Evaluar la presencia de neurodegeneración debida a la expresión específica de hTBP con las expansiones de 34 y 80Q
- Analizar la capacidad motriz de hTBP con las expansiones de 34 y 80Q a través de los ensayos de escalada en adultos de *D. melanogaster*.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Expresión de hTBP 34Q y 80Q en el cerebro y ojos de *D. melanogaster*

7.1.1 Generación de las moscas transgénicas pUAST-hTBP34Q y 80Q

Los plásmidos fueron obtenidos mediante donación del laboratorio del Dr. Jun-Ma, se caracterizaron con enzimas de restricción diagnósticas, se confirmaron mediante secuenciación Sanger utilizando el servicio de la compañía MacroGen, USA y se mandaron microinyectar a la compañía Best Gene Inc ©, Chino Hills, California para la generación de las moscas transgénicas con el sistema de transformación por elemento *P*.

7.1.2 Amplificación y mantenimiento de las moscas transgénicas productoras y reporteras

Las líneas de *D. melanogaster* que fueron utilizadas en este proyecto se amplificaron en tubos con comida estándar (agar, harina de maíz, azúcar, levadura y propionato de sodio) suplementadas con levadura activa seca a 20° C. Todas las cruces se mantuvieron a 20° C y se transfirieron a viales o frascos (dependiendo de la densidad de población) con comida fresca una vez a la semana. Las líneas de moscas transgénicas productoras y reporteras usadas durante el desarrollo del presente trabajo se describen a continuación:

- **GMR-GAL4:** Esta línea productora dirige la expresión del gen reportero hacia los fotoreceptores de *D. melanogaster*, en este caso el promotor se encuentra en el cromosoma 2.
- **ELAV-GAL4:** ELAV está encargado de dirigir la expresión en células progenitoras neurales y células gliales embrionarias, la línea con la que se trabajó posee el promotor en el cromosoma 2.
- **UAS-hTBP34Q:** Esta línea reportera posee el gen que codifica la hTBP con 34 poliglutaminas, este gen se encuentra en el cromosoma 3.
- **UAS-hTBP80Q:** Esta línea reportera posee la hTBP con 80 poliglutaminas, este gen se encuentra en el cromosoma 3.
- **UAS-GFP:** Esta línea reportera posee el gen que codifica para la GFP, éste se encuentra en el cromosoma 3.

7.1.3 Sexado de las moscas transgénicas

Para llevar a cabo las cruzas de interés, las moscas transgénicas fueron sexadas con base al dimorfismo sexual que presentan, el criterio de sexado se basó en las siguientes características:

- a) El tamaño, las hembras tienden a ser más grandes que los machos.
- b) El abdomen, los machos tienen en su extremo terminal tres segmentos fusionados melanizados; mientras que las hembras no tienen fusionados estos segmentos y presentan una coloración uniforme, además de que el final del abdomen es puntiagudo en contraste con el del macho, el cual es prácticamente redondo.
- c) Los peines sexuales, la presencia de peines sexuales (*sex comb reduced*) en la región basal del tarso del primer par de patas, es una característica perteneciente a los machos (Ramos et al., 1993).

Se realizó la recolección de hembras vírgenes para su posterior cruce con los machos de la línea deseada, esto se llevó a cabo durante un periodo no mayor a 8 h de haber eclosionado para así evitar su cruce con los machos.

Las cruces de las moscas transgénicas se realizaron en la proporción 3:1 (hembra:macho), se dejaron aparear al menos durante 24-72 h a 20° C. Se mantuvieron en sus respectivos frascos con comida estándar.

7.1.4 Análisis de la expresión específica de tejido usando los promotores GMR y ELAV

Antes de realizar las cruces de interés, en primera instancia se procedió a realizar la expresión de la proteína verde fluorescente GFP de forma tejido específico, para lo cual se evaluó la capacidad de las líneas productoras para dirigir la expresión de la proteína GFP (línea reportera) de interés en el tejido correspondiente. En la Figura 2 se ilustra el funcionamiento del sistema binario GAL4/UAS. La determinación de la expresión de proteína GFP se realizó a través del microscopio confocal Olympus BX61W1 con un módulo FV1000.

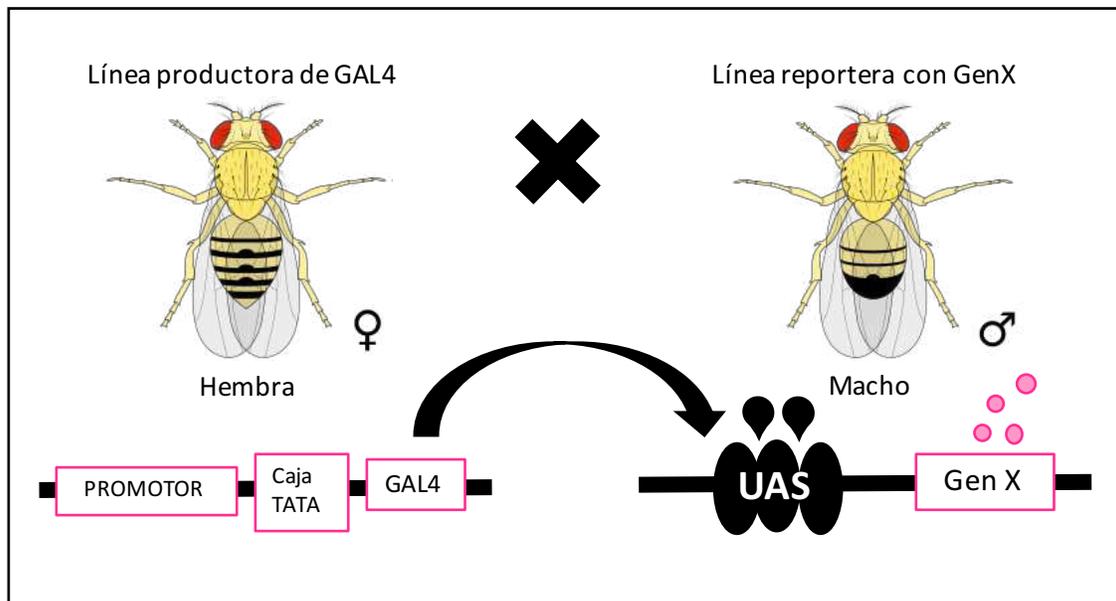


Figura 2. Expresión del gen de interés a través del sistema GAL4/UAS. El gen de levadura GAL4 codifica para una proteína transactivadora, la cual fue introducida al genoma de *D. melanogaster* y su expresión es regulada por un potenciador específico de tejido en la línea productora que expresará GAL4 en tejidos y células específicas a donde se dirige. Las líneas reporteras contienen el gen de interés (Gen X) subclonado río abajo de sitios de unión para GAL4 (UAS). Cuando se cruza la línea productora con la reportera, la progenie expresará GAL4 en el tejido específico del promotor o potenciador y ésta reconocerá las secuencias UAS, lo que a su vez permitirá la expresión del Gen X de interés.

El ensayo de expresión de GFP-tejido específico se realizó en los ojos y cerebro de la mosca de la fruta. Para dirigir la expresión de GFP a los ojos de *Drosophila melanogaster* se cruzaron 12 hembras vírgenes de la línea GMR-GAL4 con 4 machos de la línea UAS-GFP, y el 50% de la descendencia de esta cruce se espera que exprese GFP en los ojos. La expresión de GFP se evaluó en el disco imaginal ojo-antena de la larva de la mosca de la fruta. En cambio, para evaluar el promotor ELAV-GAL4, se realizó la cruce de 12 hembras vírgenes de la línea ELAV-GAL4 con 4 machos de la línea UAS-GFP, de igual manera se espera que el 50% de la progenie exprese GFP en el cerebro, esta fluorescencia se evaluó en el cerebro de la mosca adulta.

7.1.5 Cruzas genéticas para la expresión hTBP en el cerebro y ojos de *D. melanogaster*

La expresión de hTBP en el cerebro de *D. melanogaster* fue dirigida con el potenciador ELAV-GAL4 y la expresión en los ojos fue a través del potenciador GMR-GAL4. En todas las cruces se colectaron 30 hembras vírgenes de las líneas potenciadoras (ELAV-GAL4 y

GMR-GAL4) y se cruzaron con 10 machos de la línea UAS (UAS-hTBP34Q o UAS-hTBP80Q). Las cruzas se mantuvieron en frascos con comida fresca, se dejaron aparear de 24-72 h y se mantuvieron a 18° C.

En la Figura 3 se muestra el diagrama de cruzas utilizado para la expresión en el ojo usando GMR-GAL4 y las líneas UAS-hTBP34Q y UAS-hTBP80Q. Estas cruzas se utilizaron en el modelaje de degeneración de las ommatidias debido a la expansión de poliglutaminas.

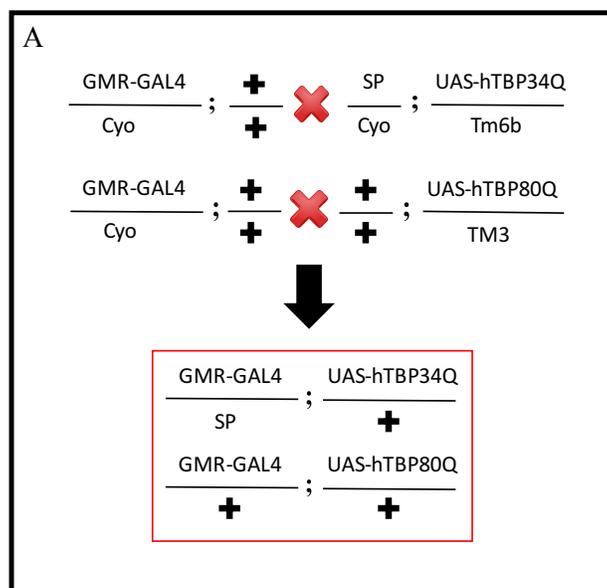


Figura 3. Esquema de cruzas genéticas para dirigir hTBP34Q y hTBP80Q a los ojos de *Drosophila*. El diagrama de cruzas genéticas muestra la cruce de la línea promotora GMR-GAL4 con las líneas reporteras UAS-hTBP34Q y UAS-hTBP80Q usando el sistema binario UAS/GAL4. Los genotipos esperados se muestran indicados en el recuadro rojo (1/8 de la descendencia).

En los experimentos de agregación proteica, muerte celular y habilidad de escalada, las cruzas genéticas que se utilizaron están descritas en la Figura 4, con estas cruzas se dirigió la expresión de hTBP34Q y 80Q usando las líneas UAS-hTBP34Q y UAS-hTBP80Q con potenciador ELAV-GAL4.

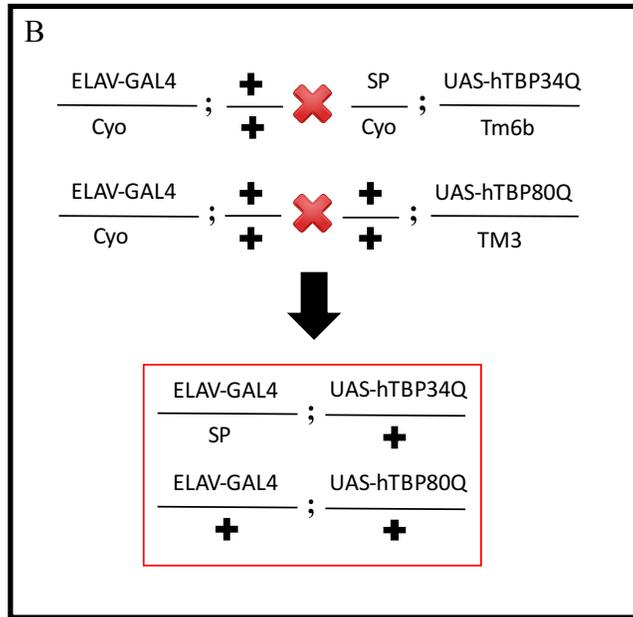


Figura 4. Esquema de cruzas genéticas para dirigir hTBP34Q y hTBP80Q al cerebro de *Drosophila*. El diagrama de cruzas genéticas muestra la cruce de la línea promotora ELAV-GAL4 con las líneas reporteras UAS-hTBP34Q y UAS-hTBP80Q usando el sistema binario UAS/GAL4. Los genotipos esperados se muestran indicados en el recuadro rojo (1/8 de la descendencia).

7.1.6 Colecta de F1 de cada una de las cruzas genéticas

La progenie F1 de las cruzas descritas en las figuras 3 y 4 fueron seleccionadas de acuerdo a los marcadores fenotípicos específicos como se describe en la Figura 5. La F1 seleccionada de la cruce GMR-GAL4 x UAS-hTBP34Q correspondió a un fenotipo de alas lisas, cerdas humerales normales y cerdas esternopleurales pobladas (Figura 5A). En la cruce GMR-GAL4 x UAS-hTBP80Q la descendencia seleccionada fue un fenotipo de alas lisas y cerdas dorsocentrales normales (Figura 5B). En cambio, para la cruce ELAV-GAL4 x UAS-hTBP34Q la progenie seleccionada presentó alas lisas, cerdas humerales normales y cerdas esternopleurales pobladas (Figura 5C). Finalmente, la F1 colectada en la cruce ELAV-GAL4 x UAS-hTBP80Q fue de alas lisas y cerdas dorsocentrales normales (Figura 5D). Al momento de seleccionar la progenie, se rechazaron en su totalidad la presencia de alas rizadas puesto que uno de los genotipos es para Cyo es (SP/Cyo) y podría ser confundido con ELAV/Cyo. Adicionalmente, se siguió desde el momento de su eclosión y se clasificaron en cuatro grupos: 1, 10, 20 y 50 días después de haber eclosionado. Los adultos (el sexo es indiferente) fueron colectados de cada uno de los grupos de edad.

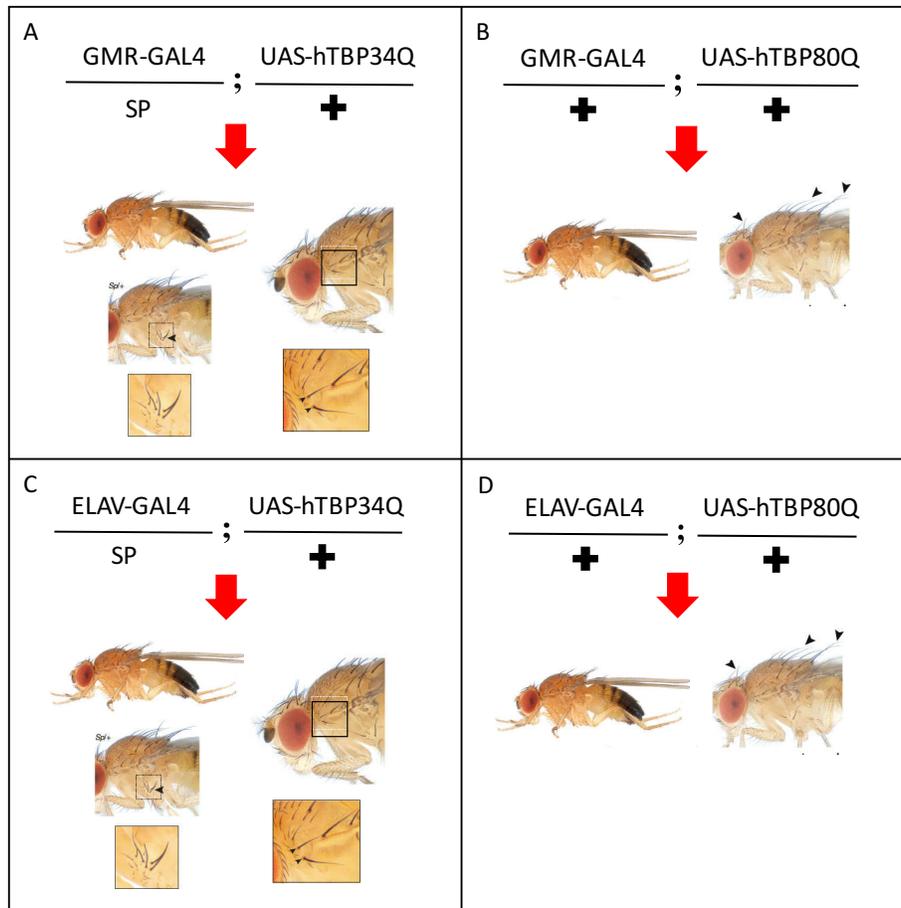


Figura 5. Selección de los fenotipos F1 en las cruza genéticas con GMR y ELAV. (A) El fenotipo deseado para la descendencia de la cruza GMR-GAL4 x UAS-hTBP34Q correspondió a alas lisas, cerdas esternopleurales pobladas y cerdas humerales normales. **(B)** El fenotipo para la F1 de la cruza GMR-GAL4 x UAS-hTBP80Q seleccionado fue de alas lisas y cerdas dorsocentrales normales. **(C)** Las características fenotípicas de la descendencia de la cruza ELAV-GAL4 x UAS-hTBP34Q son alas lisas, cerdas esternopleurales pobladas y cerdas humerales normales. **(D)** Alas lisas y cerdas dorsocentrales normales fueron seleccionadas en la progenie de la cruza ELAV-GAL4 x UAS-hTBP80Q.

7.1.7 Análisis de supervivencia

Para evaluar el efecto de las mutantes de hTBP34Q y hTBP80Q, de las cruza descritas en la figura 4 se realizó una curva de supervivencia utilizando las moscas adultas (n = 100, de cada una de las líneas) que expresan las proteínas hTBP con las diferentes longitudes de polyQ. Las moscas que expresaban hTBP34 o 80Q en el cerebro fueron comparadas contra las líneas ELAV-GAL4 y Oregon (*wild-type*), las cuales fueron utilizadas como control para asegurar que la línea promotora (ELAV-GAL4) no afectaba la esperanza de vida de la mosca de la fruta y, Oregon siendo la mosca *wild-type*, representó en su totalidad el comportamiento normal de este organismo.

7.1.8 Modelaje de hTBP con las diferentes expansiones poly Q 34 y 80 en el ojo de *D. melanogaster*

Se reprodujeron los experimentos propuestos por Ren, Jie et al., 2011, en los cuales se dirigió la expresión de hTBP34Q y hTBP80Q hacia el ojo de la mosca de la fruta para observar el deterioro del tejido de acuerdo a la expansión polyQ utilizada. La cruce que se realizó está descrita en la figura 3, para lo cual se cruzaron 100 hembras vírgenes de la línea GMR-GAL4 con 30 machos de las líneas UAS-hTBP34Q y UAS-hTBP80Q. Estos experimentos se utilizaron como controles para comparar la toxicidad de las proteínas en cuestión. De la descendencia de las cruces, se siguieron 20 moscas de cada expansión de polyQs (34Q y 80Q) durante 50 días para evaluar el progreso del fenotipo.

7.1.9 Disección de los cerebros de adultos

Los cerebros de las moscas adultos que expresaban hTBP34Q o hTBP80Q en el cerebro de cada uno de los grupos de edad (2, 10, 20 y 50 días) fueron disecados en paraformaldehído al 4% diluido en PBS 1X con 0.1% Tritón a pH 7 y posteriormente fijados en paraformaldehído al 4% (peso/vol) en PBS 1X a temperatura ambiente durante 60 min de acuerdo a Tito, Cheema, Jiang, & Zhang, 2016.

7.1.10 Detección de hTBP en el cerebro de *D. melanogaster* mediante inmunofluorescencia

Los cerebros, después de haber sido extraídos y fijados, fueron lavados tres veces en PBS 1X. Posteriormente se hicieron 5 enjuagues en una solución de PBT 1X y se eliminó el sobrenadante. Consecutivamente, los cerebros fueron bloqueados durante 3 horas en una solución de PBT 1X con 5% de suero de caballo, 5% de suero de cabra y 5% de suero fetal bovino, después se añadió en anticuerpo primario Anti-TATA binding protein (Abcam, ab818) (1:200) diluido en la misma solución de bloqueo y se incubó toda la noche a 4°C.

Al término de la incubación, se lavaron 5 veces los cerebros en PBT 1X, dejando durante 5-10 min en la solución entre cada lavado y se procedió a bloquearlos de nuevo en la misma solución durante 3 horas. Después se agregó el anticuerpo secundario, Anti-IgG de ratón acoplado a AlexaFluor 488 (1:1000) diluido de igual manera en la solución de bloqueo, y se incubó toda la noche a 4°C. Al término de las incubaciones, las muestras se lavaron 3 veces

con PBT 1X, dejándolas 10 min en la solución entre cada lavado de acuerdo al protocolo estipulado por Etchegaray et al., en el 2016. Posteriormente se retiró cuidadosamente el sobrenadante y se incubaron en DAPI 1:10000 en PBS 1X. Finalmente, los cerebros se montaron en VECTASHIELD (Vector Laboratories). Las micrografías de las inmunofluorescencias fueron tomadas a través de microscopia confocal-láser con un microscopio Olympus BX61W1 con un módulo FV1000. Se procesaron 6 cerebros por grupo de edad y expansión de glutamina y se analizaron en tres experimentos independientes. Las imágenes obtenidas fueron analizadas en el software ImageJ.

7.2 Evaluación de la muerte celular con los agregados de hTBP 34 y 80Q

7.2.1 Ensayo de TUNEL

Las moscas que se utilizaron en este experimento, provienen la descendencia de la cruce descrita en la figura 4. Para analizar la neurodegeneración debida a la expresión de hTBP34Q o hTBP80Q en el cerebro se utilizó el sistema TUNEL fluorométrico DeadEnd (Promega). Se procesaron 6 cerebros por grupo de edad (2, 10, 20 y 50 días) y expansión de glutamina (hTBP34Q y hTBP80Q) y se analizaron en tres experimentos independientes.

El tejido se incubó durante 10 min en 20 μ l del buffer de equilibrio en agitación suave. Después se retiró el buffer de equilibrio y se añadió el buffer de incubación para transferasa terminal desoxinucleotidil recombinante (rTdT) (45 μ l buffer de equilibrio, 5 μ l de nucleótidos, 1 μ l de la enzima rTdT). A continuación, las muestras se incubaron durante 3 h a 37° C. Posteriormente, la reacción se detuvo con la adición de 300 μ l de solución de 2X SSC en agitación suave durante 1 min. La solución se retiró y se sustituyó con otros 300 μ l de 2X SSC, rotando durante 15 min. El tejido se lavó tres veces en PBT en constante agitación suave en un total de 30 min. Finalmente, las muestras fueron colocadas en Vectashield (Vector Laboratories). De acuerdo al protocolo descrito por Etchegaray et al., 2016. Las señales fluorescentes se detectaron mediante microscopia confocal-láser con un microscopio Olympus BX61W1 con un módulo FV1000. Las imágenes obtenidas fueron analizadas en el software ImageJ.

7.3 Análisis de la marcha con hTBP 34 y 80Q

7.3.1 Prueba de escalada

Las moscas que se utilizaron en este ensayo provienen de la cruce descrita en la figura 4. Se utilizaron 20 moscas de cada expansión de glutaminas (hTBP34Q y hTBP80Q) y de cada grupo de edad (2, 10, 20 y 50 días), estas moscas se siguieron durante 55 días y la prueba se realizó cada dos días. La prueba de escalada se llevó a cabo en tubos de vidrio de acuerdo al método descrito por Barone & Bohmann en 2013. El ensayo consistió en medir la capacidad para escalar de las moscas. Para llevarlo a cabo se trazó una marca a una altura de 3 cm en los viales, la cual debería de ser pasada por las moscas en 5 segundos o menos, se hicieron 10 repeticiones de cada ensayo, golpeando al mismo tiempo los viales para bajar las moscas y volver a contar cuantas subían. Se tomó nota del total de moscas que pasan los 3 cm en 5 segundos o menos y las diez repeticiones se promediaron para después comparar los grupos con un ANOVA de dos vías seguido de correcciones de Bonferroni. Este experimento se realizó con el apoyo de una cámara digital para grabarlo, un cronómetro para tomar el tiempo y una computadora en donde se analizó el video posteriormente.

7.4 Pruebas estadísticas

El total de agregados proteicos en el cerebro de *D. melanogaster*, la muerte celular y la prueba de escalada se midieron y analizaron cada uno utilizando un ANOVA de dos vías seguido por correcciones de Bonferroni. Las pruebas estadísticas fueron realizadas en el software GraphPad Prism.

8. RESULTADOS

8.1 Expresión de hTBP 34 y 80Q en el cerebro y ojos de *D. melanogaster*

Para realizar la detección de los agregados de hTBP, primeramente, estandarizamos el uso del sistema binario UAS-GAL4 para dirigir la expresión específica de GFP al cerebro y al ojo de *Drosophila* usando los potenciadores ELAV y GMR respectivamente y posteriormente dirigimos las proteínas hTBP 34Q y 80 Q en el cerebro de la mosca de la fruta.

8.1.1 Expresión específica de tejido usando GMR y ELAV

Antes de realizar la detección de hTBP en *Drosophila*, se analizaron los potenciadores GMR-GAL4 y ELAV-GAL4 con la finalidad de dirigir la expresión de GFP en el tejido correspondiente a cada promotor y evaluar su actividad para dirigir la expresión tejido-específica. Las figuras 6 y 7 muestran la dirección específica de expresión de GFP en el disco imaginal ojo-antena en la región posterior al surco morfogenético del ojo y en el cerebro de la mosca de la fruta con los potenciadores utilizados.

La figura 6 muestra un disco imaginal ojo-antena, proveniente de una larva de la F1 de la cruce descrita en la figura 3. En el cuadrante A, se observa un disco imaginal ojo-antena en campo claro y en el cuadrante B se puede observar la fluorescencia verde correspondiente a GFP en la región posterior al surco morfogenético del ojo. De acuerdo a este resultado, se pudo comprobar la dirección de la expresión de la proteína GFP hacia el disco imaginal que cuando la larva se desarrolla dará lugar al ojo de la mosca de la fruta.

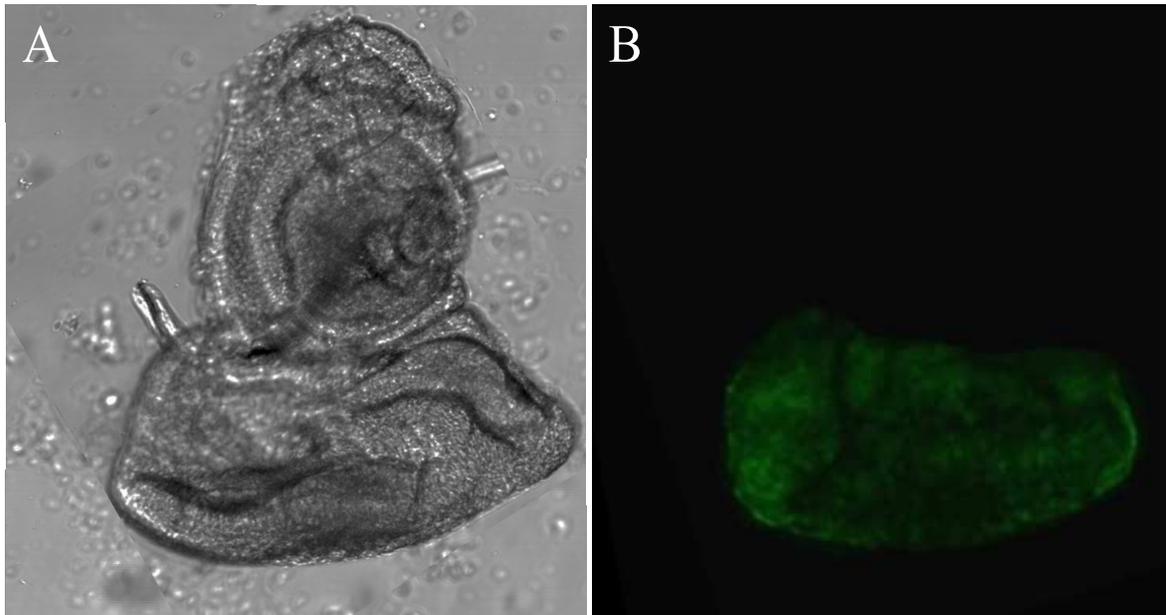


Figura 6. Expresión del promotor GMR-GAL4 a la región posterior al surco morfogenético del ojo de *D. melanogaster*. La cruce GMR-GAL4 x UAS-GFP muestra la señal de GFP en los discos imaginales de los ojos de *Drosophila*, dirigida con el promotor específico de tejido GMR. **(A)** Disco imaginal de ojo-antena, micrografía en campo claro. **(B)** Expresión de la proteína GFP en la región posterior al surco morfogenético del ojo; corroborando la función de GMR-GAL4 ($n = 6$).

En la figura 7, se muestra el cerebro de una mosca adulta proveniente de la descendencia de la cruce descrita en la figura 4. En el panel A se observa en luz clara el cerebro de la mosca de la fruta; en el panel B, se observa la fluorescencia de la proteína GFP. Con estos resultados se pudo corroborar la dirección de la expresión de GFP al cerebro de la mosca de la fruta.

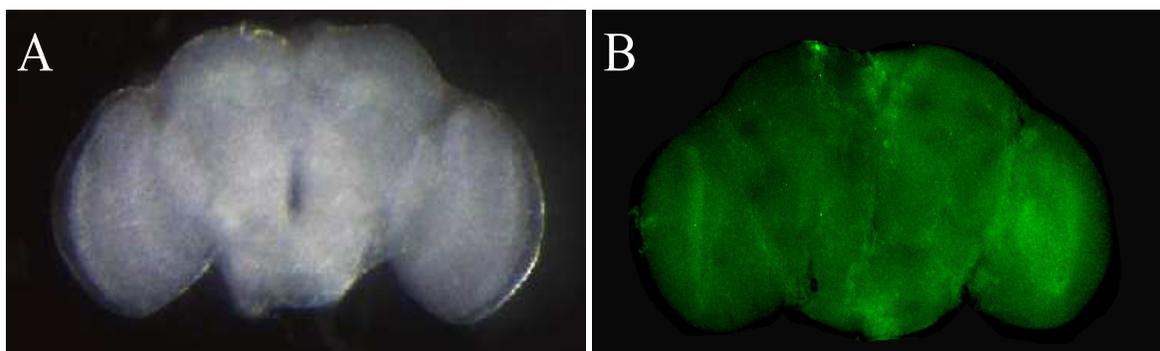


Figura 7. Expresión del promotor ELAV-GAL4 al cerebro de *D. melanogaster*. La cruce ELAV-GAL4 x UAS-GFP dirige la expresión de la proteína GFP al cerebro de *D. melanogaster*. **(A)** Micrografía tomada en campo claro que muestra el cerebro de *D. melanogaster*. **(B)** Expresión de la proteína GFP en el cerebro de *Drosophila* ($n = 6$).

Estos resultados en conjunto comprobaron la funcionalidad de los dos promotores GMR y ELAV, por lo que fue posible continuar con la expresión de hTBP.

8.1.2 hTBP80Q en el cerebro de *Drosophila melanogaster* es neurotóxica y acorta su tiempo de vida

Para evaluar el efecto de las mutantes de hTBP34Q y hTBP80Q, se realizó una curva de supervivencia utilizando las moscas adultas que expresan las proteínas hTBP con las diferentes longitudes de polyQ, éstas provenían de la progenie de la cruce descrita en la figura 4. Se siguieron 100 moscas de cada una de las líneas. Las moscas que expresan hTBP80Q exhibieron un tiempo de vida acortada en comparación con las que expresan hTBP34Q (Figura 8). A la edad de 51 días, ninguna de las moscas que expresan hTBP80Q sobrevivió, mientras que aproximadamente la mitad de las moscas que expresaron hTBP34Q se mantuvieron con vida. La curva de supervivencia de hTBP34Q y hTBP80Q fue comparada contra las líneas ELAV-GAL4 y Oregon (*wild-type*) utilizadas como control para estar seguros que la línea promotora (ELAV-GAL4) no afectaba la esperanza de vida de la mosca de la fruta. Es importante mencionar que a pesar de que no es estadísticamente significativo, hTBP34Q y ELAV-GAL4 también presentan muerte prematura en comparación con la línea *wild-type*. Estos resultados demuestran una esperanza de vida acortada de las moscas que expresan hTBP80Q y muestran que hTBP80Q es tóxica provocando mortalidad temprana en la mosca de la fruta, la cual es una característica de la patología compartida entre *Drosophila melanogaster* y humanos con la patología SCA17.

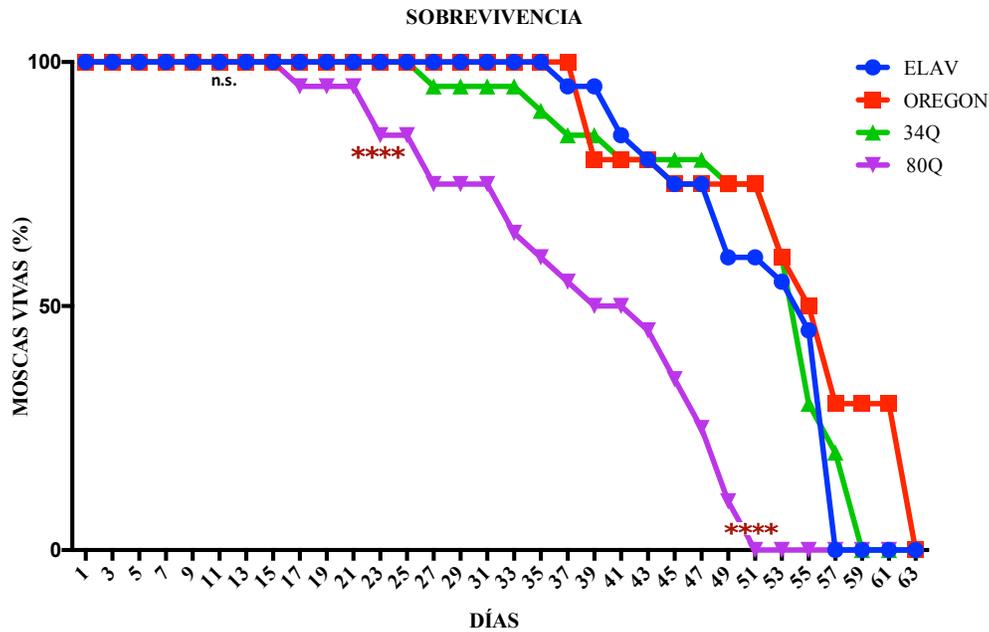


Figura 8. La expresión de hTP80Q en el cerebro de *Drosophila melanogaster* acorta su tiempo de vida. El tiempo de vida de las moscas hTBP 34 y 80Q se determinó en la curva de sobrevivencia. No se observó ningún deceso hasta después de los 15 días de observación. A partir del día 15, el grupo de moscas de hTBP80Q comenzó a decaer y en el día 23 y 51 se encontró diferencia altamente significativa (ANOVA con correcciones de Bonferroni, $p < 0.0001$) entre este grupo de moscas y el de hTBP34Q. Se utilizaron los controles ELAV-GAL4 y Oregon (*wild-type*).

8.1.3 hTBP 34 y 80Q afectan el fenotipo del ojo de la mosca

El modelaje de la expresión de hTBP34Q y hTBP80Q dirigidas al ojo de *Drosophila melanogaster* con GMR-GAL4 (Ellis, O'Neill, & Rubin, 1993) se analizó a diferentes días (1, 10, 20 y 50) después de haber eclosionado. Las moscas que se analizaron y siguieron en este experimento son parte de la F1 de la cruce descrita en la figura 3. Se obtuvieron alrededor de 15 moscas expresando el fenotipo esperado para cada expansión de glutaminas, lo cual correspondió al 1/8 de la descendencia como se esperaba. Cabe destacar que las fotografías que se reportan en la figura 9 son de un solo organismo que se siguió a través del tiempo.

En la Figura 9 A, se observa el ojo de *D. melanogaster* un día después de haber eclosionado, se distingue una ligera decoloración en el perímetro del ojo. Para el día diez y veinte (Figura 9 B y C), siguió presente la decoloración en el perímetro del ojo, pero no pareció deteriorarse dependiendo del tiempo, de acuerdo a lo observado hasta el día cincuenta (Figura 9 D). Conforme a estas observaciones se pudo concluir que la expansión

de poly 34Q es ligeramente tóxica para el tejido, debido a la decoloración observada en el ojo de la mosca de la fruta.

En cambio, cuando hTBP80Q fue expresada en el ojo, a partir del día 1 (Figura 9 E) se pudo observar una decoloración más intensa en el perímetro y en el extremo inferior izquierdo comenzó a aparecer una mancha de un color más tenue que el resto del ojo. El fenotipo al día diez (Figura 9 F) se denotó distinto, el color del ojo cambió y fue más clara la definición de la pérdida de color en el perímetro, además, la presencia de la mancha blanca fue más notoria puesto que el color de ésta fue mucho más claro que el resto tejido. La Figura 9 G muestra el día veinte donde el tono del ojo cambió de nuevo, y, se observó un color rojo más oscuro con los bordes blancos, además de la aparición de un blanqueamiento más definido, el cual parece ser progresivo de acuerdo a la edad de la mosca. Finalmente, al día cincuenta (Figura 9 H) la pérdida de pigmentación en el ojo de la mosca se vio mucho más pronunciada y esparcida, sin embargo, el orden de las omatidias nunca se vio afectado.

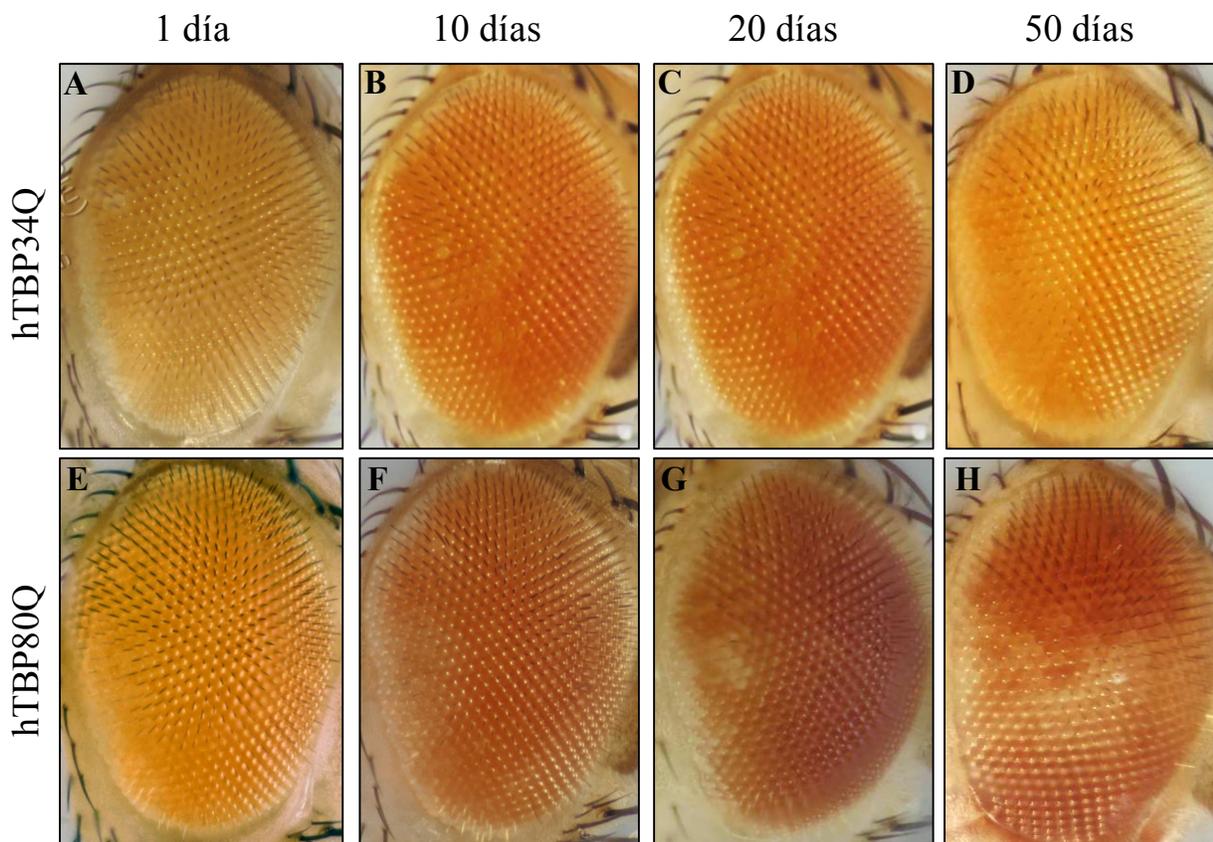


Figura 9. Expresión de hTBP34Q y hTBP80Q dirigida a los ojos de *Drosophila melanogaster*. La micrografías en campo claro del ojo de *Drosophila* muestran que la expresión de hTBP34Q y hTBP80Q dirigida con GMR causan afectaciones en el fenotipo del ojo de la mosca de la fruta. **(A-D)** Expresión de hTBP34Q a diferentes tiempos: 1, 10, 20 y 50 días después de haber eclosionado, el fenotipo causado por hTBP34Q no es agresivo, se aprecia una ligera decoloración persistente a lo largo de los días en el perímetro del ojo. **(E-H)** Expresión de hTBP80Q a 1, 10, 20 y 50 días después de la eclosión. **(E)** Al día 1, se aprecia una despigmentación en el perímetro del ojo. **(F)** La decoloración es más intensa y se aprecia la aparición de una ligera mancha blanca en la parte izquierda-central del ojo. **(G)** El cambio de color en el ojo es evidente, el perímetro es completamente blanco y además se aprecia una mancha blanca bien definida. **(H)** La decoloración se ha diseminado hacia el centro del ojo, al día 50 por lo que la proteína hTBP80Q parece ser más tóxica que el resto de los otros días.

8.1.4 Los agregados de hTBP 34 y 80Q en el cerebro de *Drosophila* son dependientes de la edad

Los cerebros que se analizaron en este experimento corresponden a la descendencia de la craza descrita en la figura 4. La progenie se dividió en cuatro grupos de edad a estudiar: 2, 10, 20 y 50 días después de haber eclosionado.

En el grupo de 2 días de edad que expresa hTBP34Q se detectó una expresión tenue de la proteína sin presencia de agregados (Figura 10 A'), en cambio para el grupo que expresa hTBP80Q se detectó la presencia de agregados proteicos (Figura 10 B') principalmente en

la *medulla*, protocerebro ventrolateral anterior y el ganglio *gnathal* adulto. Ambos grupos fueron comparados utilizando un ANOVA de dos vías, seguido por correcciones de Bonferroni y se obtuvo una $p < 0.0001$, obteniendo diferencia altamente significativa entre los grupos de dos días de edad.

En el caso del grupo de 10 días, hTBP34Q se vio expresada en todo el cerebro, apreciándose la señal verde homogénea (Figura 10 C'), pero, sin presencia de agregados; en contraste en las moscas que expresan hTBP80Q se apreciaron agregados focalizados (Figura 10 D') en las regiones cerebrales como el centro motor y antenal mecanosensorial, *wedge*, *vest*, protocerebro ventrolateral anterior, ganglio *gnathal* adulto y comienzan a aparecer en *medulla* y *lobulla*, lo cual se espera que con el paso de los días presenten fluorescencia de manera más intensa. Para determinar si existía diferencia significativa entre las intensidades de fluorescencias de los cerebros de las moscas de 10 días de edad se realizó un ANOVA de dos vías con correcciones de Bonferroni y se obtuvo una $p < 0.0001$. Además, se compararon los grupos hTBP80Q de 2 días de edad en comparación con el grupo de 10 días y se obtuvo una $p < 0.0001$, por lo que se puede concluir que los agregados proteicos al día 10 presentan mayor fluorescencia que los del día 2.

Al día 20, los grupos mostraron la expresión de ambas proteínas hTBP34Q y hTBP80Q. hTBP34Q (Figura 10 E') se comportó de manera similar a la observada en el día 10, distribuida en el cerebro de forma casi uniforme con una fluorescencia ligera y, de igual manera que a los días 2 y 10, no se observó la presencia de agregados. El cerebro de las moscas que expresaban hTBP80Q (Figura 10 F') mostraron agregados más grandes y más fluorescentes, en las mismas regiones antes descritas, en comparación con los observados en el día 10 ($p = 0.0012$, ANOVA con correcciones de Bonferroni), indicando que los agregados presentes al día 20 son más grandes que al día 10, lo cual nos permitió corroborar que mientras más longevidad presente mosca, más prominentes son los agregados. Cabe destacar que también se compararon las intensidades de fluorescencia entre las moscas que expresaban hTBP34Q y hTBP80Q de 20 días de edad y se calculó un valor de $p < 0.0001$, por lo que se considera que la diferencia entre hTBP34Q y hTBP80Q es altamente significativa, es decir, los agregados causados por hTBP80Q son más grandes que los de hTBP34Q.

Finalmente, al día 50 en contraste con lo obtenido anteriormente para las moscas hTBP34Q, ya no se observó la expresión de la proteína de manera homogénea, pero, aparecieron pequeños agregados principalmente en el ganglio nathal adulto (Figura 10 G'). También, en el caso de hTBP80Q los resultados que se obtuvieron variaron un poco en comparación con los reportados para los días 10 y 20. En este caso los agregados no aumentan de tamaño ni de intensidad de fluorescencia, sólo se mantuvieron aparentemente estables en las mismas regiones antes mencionadas. Es decir, no desaparecen, pero no incrementan como era de esperarse (Figura 10 H'). A este grupo de edad (50 días) se le realizó un ANOVA de dos vías con correcciones de Bonferroni para comparar las intensidades de fluorescencias entre hTBP34Q y hTBP80Q y se obtuvo un valor de $p < 0.0001$. Sin embargo, al comparar las intensidades de fluorescencia entre hTBP80Q a los 20 días y 50 días de edad, no se encontró diferencia significativa, por lo que entre estos días aparentemente los agregados no incrementan.

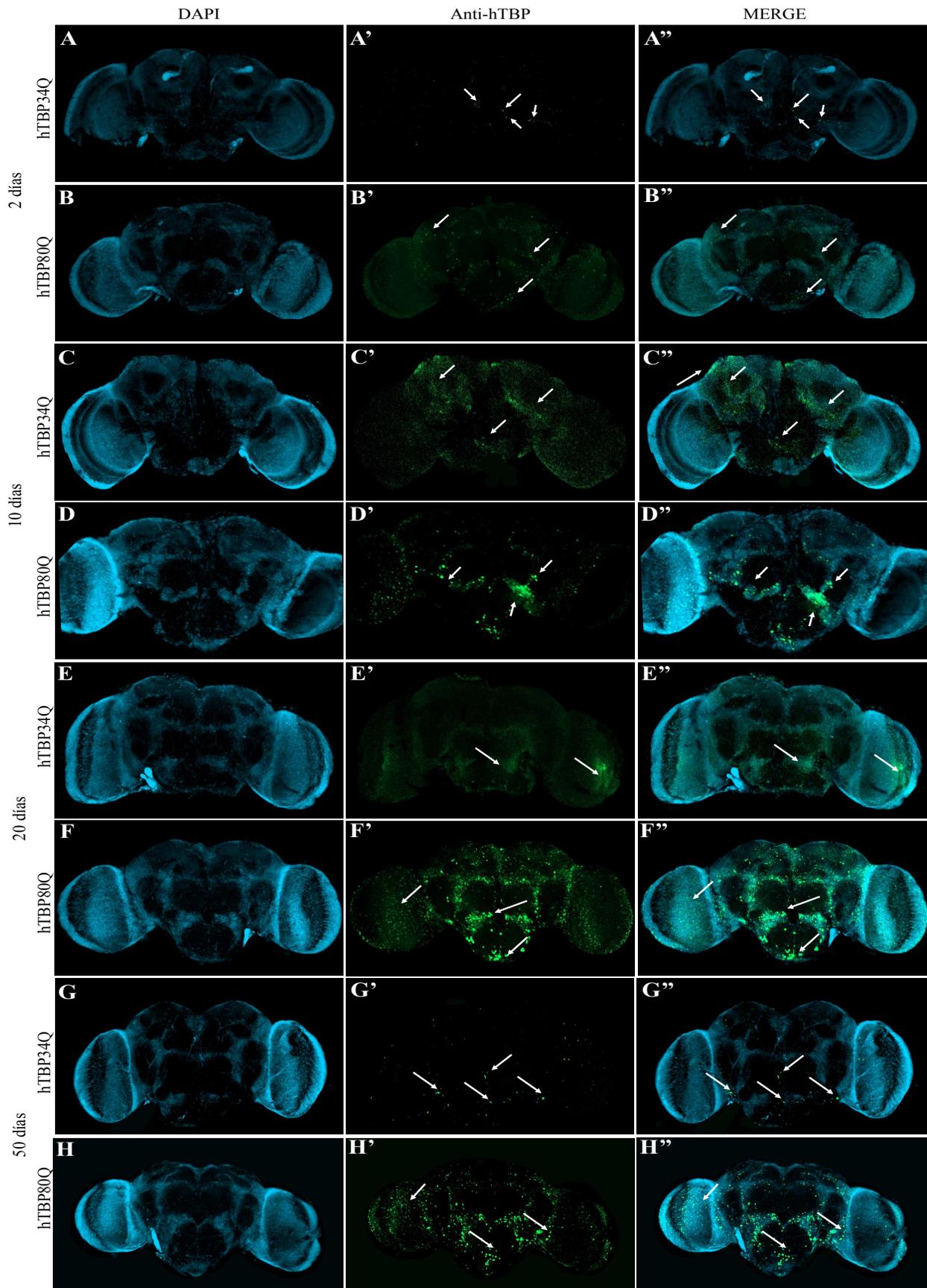


Figura 10. La expresión de hTBP34Q y 80Q forma agregados en el cerebro de *Drosophila melanogaster* dependientes de la edad. La inmunodetección de hTBP mediante fluorescencia permitió visualizar los agregados proteicos de hTBP a diferentes tiempos (2, 10, 20 y 50 días). (A-H) Cerebros marcados con DAPI.

(A'-H') Inmunofluorescencia para hTBP34Q y hTBP80Q. (A''-H'') Traslape de los marcajes de DAPI y hTBP34Q y hTBP80Q. (A'') hTBP34Q a los 2 días de edad es ligeramente detectada. (B'') Al día 2 pequeños agregados de hTBP80Q comienza a aparecer en el cerebro de *D. melanogaster*. (C'') La expresión de hTBP34Q parece incrementar al día 10, no se observan agregados. (D'') Aparecen agregados de hTBP80Q intensamente fluorescentes al día 10. (E'') La expresión de hTBP34Q se mantiene sin formar agregados. (F'') Los agregados formados por hTBP80Q al día 20 son más intensos que los que se observan al día 10. (G'') Al día 50 hTBP34Q comienza a formar agregados. (H'') Los agregados causados por hTBP80Q no aumentan, parecen mantenerse estables. Las flechas blancas indican algunos de los agregados presentes en los cerebros. Los agregados hTBP80Q incrementan en concordancia con la edad de la mosca hasta el día 20, después, al día 50 no se observan cambios.

8.1.5 Los agregados de hTBP80Q en el cerebro de *Drosophila* incrementan de los 2 a los 20 días

Las comparaciones de la intensidad de fluorescencia de los agregados analizadas entre los grupos de la misma edad de hTBP34Q y hTBP80Q resultaron ser todas altamente significativas. Sin embargo, al comparar las intensidades de fluorescencia entre los diferentes grupos de edad de hTBP80Q se encontró que existe diferencia significativa entre los grupos de 2 días y 10 días y los 10 y 20 días en contraste con los 20 y 50 días que no mostraron diferencia significativa (Figura 11).

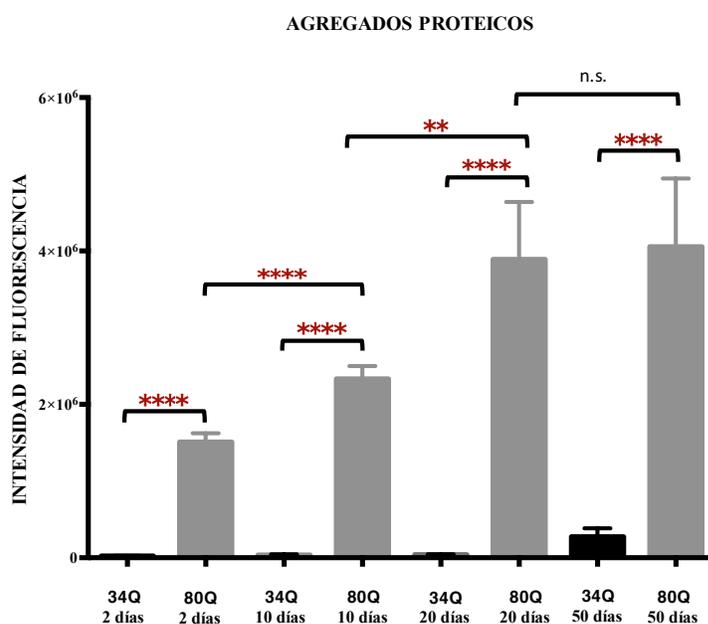


Figura 11. La intensidad de fluorescencia de los agregados de hTBP80Q incrementó de los 2 a los 20 días. La intensidad de la fluorescencia en los agregados de hTBP 34 y 80Q se cuantificó mediante el software ImageJ. Las comparaciones entre los grupos fueron realizadas mediante un ANOVA de dos vías con correcciones de Bonferroni. Las comparaciones realizadas entre los grupos de la misma edad (hTBP34Q y 80Q) resultaron ser todas altamente significativas ($p < 0.0001$). Sin embargo, al comparar las intensidades de fluorescencia entre los diferentes grupos de edad de hTBP80Q se encontró que entre el grupo de 2 días y 10

días existe diferencia altamente significativa ($p < 0.0001$), entre los 10 y 20 días hay una diferencia significativa ($p = 0.0001$), mientras que entre los 20 y 50 días la diferencia no fue significativa.

8.2 hTBP34Q y 80Q provocan muerte neuronal dependiente de la edad

Para evaluar la muerte celular causada por los agregados proteicos también se realizaron cruza genéticas para dirigir la expresión de hTBP34Q y hTBP80Q al cerebro de la mosca de la fruta (sección de materiales y métodos descritos en la figura 4). La descendencia de las cruza se dividió en cuatro grupos de edad a estudiar: 2, 10, 20 y 50 días después de haber eclosionado.

Las moscas que expresaban hTBP34Q, a los 2 días de haber eclosionado, a simple vista, presentaban menos muerte celular, la presencia de la señal de TUNEL se presentó en su mayoría en el ganglio *nathal* adulto (Figura 12 A') en comparación con las moscas de hTBP80Q (Figura 12 B'). Las regiones positivas para TUNEL fueron el protocerebro medio, intermedio y lateral superior, así como el ganglio *gnathal* adulto, y se observaron algunos puntos en *medulla* y *lobulla*. Sin embargo, para validar nuestras observaciones se realizó un ANOVA de dos vías seguido de correcciones de Bonferroni en la cual se comparó la intensidad de fluorescencia entre ambos grupos, y se obtuvo que no existía diferencia significativa entre hTBP34Q y hTBP80Q ($p = 0.06$). De esta manera se pudo concluir que al igual que en los humanos, esta enfermedad se agudiza con la edad, y, es por esto que, considerando que a los 2 días la mosca es joven, la presencia de la muerte celular no fue significativa.

En el siguiente grupo de edad de 10 días, hTBP34Q presentó un ligero aumento en la muerte neuronal, la cual se siguió presentando en el ganglio *nathal* adulto (Figura 12 C') y para hTBP80Q, la fluorescencia de TUNEL se presentó en su mayoría en el ganglio *nathal* adulto y se observó ligeramente en el protocerebro medio, intermedio y lateral superior (Figura 12 D') también incrementó y al ser comparados entre sí, se obtuvo una diferencia altamente significativa ($p < 0.0001$, ANOVA de dos vías con correcciones de Bonferroni), Estos resultados nos permitieron corroborar que hTBP80Q provocó mayor muerte neuronal que hTBP34Q (Figura 12). Además, se compararon las intensidades de fluorescencia de hTBP80Q a los 2 y 10 días para evaluar la evolución de la muerte neuronal con respecto a la acumulación de hTBP80Q y resultó que, la muerte neuronal aumentó en este lapso de

tiempo ($p < 0.0001$, ANOVA de dos vías con correcciones de Bonferroni), corroborando que esta enfermedad es dependiente de la edad, mientras más longevo más afectado.

A los 20 días, de la misma manera se evaluó la muerte neuronal entre hTBP34Q y hTBP80Q. En el caso de hTBP34Q (Figura 12 E') siguió exhibiendo muerte neuronal, se observa difusa y no tan presente, la señal es débil, presente en *medulla* y *lobulla*. En hTBP80Q, a simple vista, se ve un aumento en la presencia de la señal de TUNEL principalmente en *medulla* y *lobulla*, así como en el ganglio *nathal* adulto (Figura 12 F') en comparación con hTBP34Q. Para corroborar las observaciones, se realizó un ANOVA de dos vías seguido por correcciones de Bonferroni, en donde se comparó la fluorescencia entre hTBP34Q y hTBP80Q y, se determinó que hTBP80Q presenta mayor muerte neuronal que las moscas que expresaban hTBP34Q a 20 días después de haber eclosionado ($p < 0.0001$). Asimismo, para garantizar que la muerte neuronal aumentó de acuerdo a la agregación proteica y fue dependiente de la edad, se compararon los grupos de hTBP80Q de 10 y 20 días de edad y se encontró una diferencia altamente significativa ($p < 0.0001$). Se concluyó a partir de estos resultados que la muerte neuronal aumenta de manera dependiente de la edad, y, tiene mayor presencia en las moscas que expresaban hTBP80Q.

Finalmente, los últimos grupos que se evaluaron fueron hTBP34Q y hTBP80Q a los 50 días de edad. hTBP34Q mostró muerte neuronal principalmente en *medulla* y *lobulla* (Figura 12 G'), de la misma manera que hTBP80Q, también en *medulla* y *lobulla* (Figura 12 H'); sin embargo, éste último presentó mayor señal de TUNEL, lo que indicó más muerte celular que el grupo de hTBP34Q. Se compararon ambos grupos a través de un ANOVA de dos vías seguido por correcciones de Bonferroni (Figura 13) y se obtuvo un valor de $p = 0.011$, lo cual indicó que la diferencia entre la muerte celular de hTBP34Q y hTBP80Q fue significativa. Al mismo tiempo, se realizó la comparación entre hTBP80Q de 20 y 50 días y el valor de $p = 0.014$, indicando una diferencia significativa. Estos resultados comprobaron que con el tiempo hubo mayor muerte celular, pero no hubo un gran cambio entre los grupos de 20 y 50 días de hTBP80Q, de la misma manera que ocurrió con la agregación proteica.

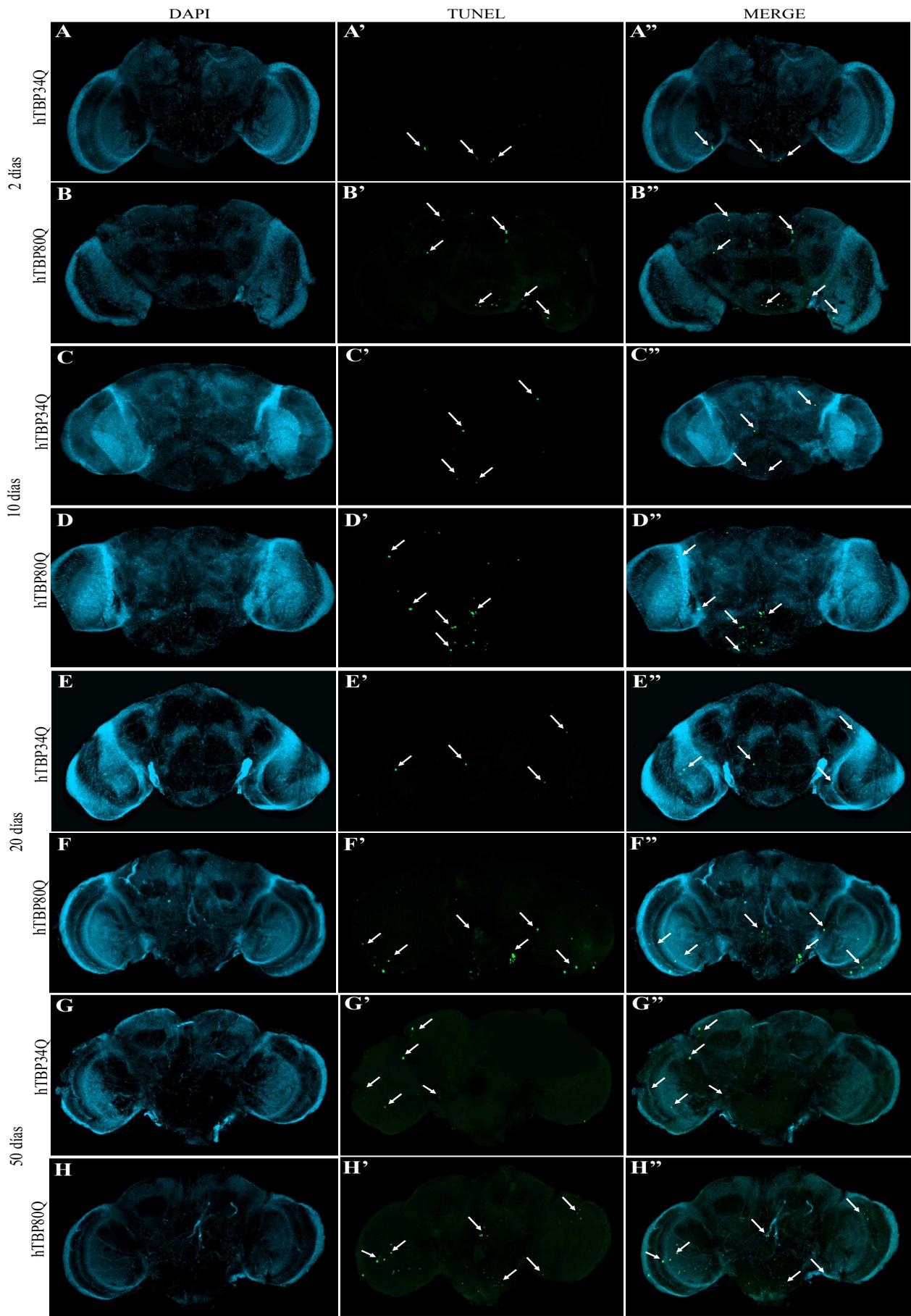


Figura 12. La expresión de hTBP34Q y 80Q provoca muerte neuronal a largo plazo. La muerte celular

por la expresión de hTBP 34 y 80Q fue evaluada usando el kit de TUNEL de Promega a diferentes tiempos (2, 10, 20 y 50 días). (A-H) Marcaje de núcleos neuronales con DAPI. (A'-H') Marcaje de TUNEL. (A''-H'') Traslape de los marcajes de DAPI y TUNEL. Las flechas blancas indican algunas células positivas para TUNEL. (A') El grupo de hTBP34Q de 2 días reflejó un marcaje tenue para TUNEL. (B') hTBP80Q de 2 días en comparación con el grupo hTBP34Q de 2 días, mostró una mayor cantidad de células positivas para TUNEL, demostrando que a tan sólo dos días de haber eclosionado hTBP80Q es neurotóxica. (C') La muerte celular por hTBP34Q de 10 días no parece aumentar en comparación con hTBP34Q de 2 días. (D') hTBP80Q de 10 días mostró una mayor presencia de células positivas para TUNEL, lo que corrobora que la proteína es más neurotóxica con el tiempo. (E') hTBP34Q a los 20 días parece permanecer estable, hay presencia de muerte celular pero no parece aumentar de manera significativa. (F') A los 20 días, hTBP80Q siguió mostrando su comportamiento neurotóxico y aumentó el número de células positivas para TUNEL. (G') Cincuenta días después de haber eclosionado, hTBP34Q mostró un comportamiento similar al observado los tiempos anteriores. (H') Al día 50 de hTBP80Q mostró la presencia de muerte celular sin cambio comparado con los 20 días. La muerte celular mostró un incremento dependiendo de la edad de la mosca hasta el día 20.

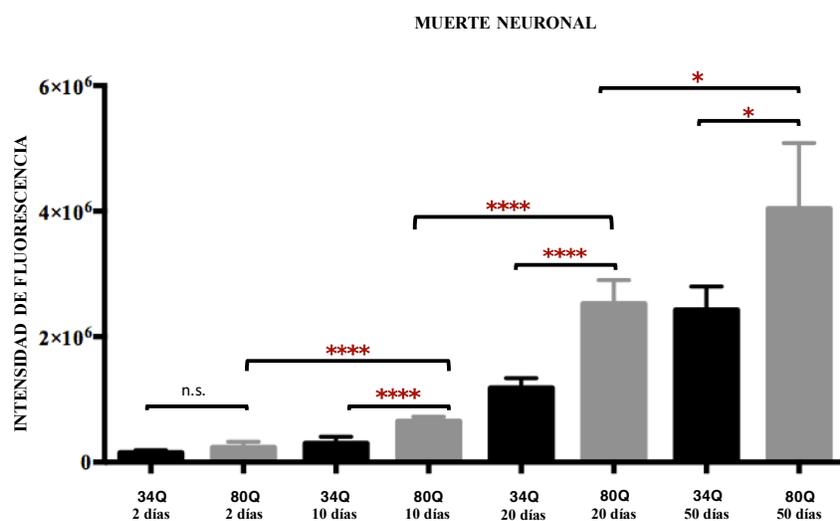


Figura 13. Cuantificación de la fluorescencia de TUNEL en los cerebros de las moscas que expresan hTBP34Q y hTBP80Q. Todas las comparaciones de la fluorescencia de TUNEL en los cerebros de las moscas detectadas en los diferentes grupos fueron realizadas a través de un ANOVA de dos vías seguido de correcciones de Bonferroni. Entre los grupos de 2 días de hTBP34Q y hTBP80Q, la diferencia de intensidad de fluorescencia no fue significativa; al realizar la comparación de los grupos (hTBP34Q y hTBP80Q) a los 10 días y 20 días se obtuvo una diferencia altamente significativa con un valor de $p < 0.0001$. A los 50 días el patrón de incremento cambió, a pesar de que se observó un aumento sólo se reflejó como significativo con un valor de $p = 0.011$. Las comparaciones entre los grupos de hTBP80Q de 2 y 10 días, y 10 y 20 días fueron altamente significativas ($p < 0.0001$); sin embargo, entre 20 y 50 días sólo fue significativo ($p = 0.014$).

8.3 Expresión de hTBP80Q en el cerebro de *Drosophila* afecta su habilidad de escalada

Las moscas que expresaban hTBP34Q y hTBP80Q en el cerebro fueron parte de la descendencia obtenida de la cruce descrita en la figura 4. En la progenie de la cruce se analizó la afectación de la función locomotora causada por la expresión de las proteínas hTBP34Q y hTBP80Q en el sistema nervioso de las moscas. Para ello se realizó la prueba de escalada, de acuerdo a lo estipulado en el reporte de Barone y cols. 2013, usando como controles la línea productora ELAV-GAL4 y la Oregon (*wild-type*).

Los resultados en la figura 14 muestran que durante los primeros 15 días todas las líneas se comportan de forma normal de la misma manera. Sin embargo, a partir del día 16-18 se registró un declive en actividad de escalada en la línea de moscas que expresaban hTBP80Q en el cerebro en comparación con hTBP34Q y a partir de ahí siguió decayendo su habilidad de escalada, en comparación con las otras líneas ($p < 0.0001$, ANOVA de dos vías seguido de correcciones de Bonferroni). Al día 37, sólo el 70% de las moscas hTBP80Q pudieron pasar la marca de 3 cm en 5 segundos o menos en comparación con el resto de las líneas, que, al mismo día entre el 95-98% de las moscas seguían escalando. Finalmente, al día 55, el último día de la prueba, se observó un declive total de escalada en la línea hTBP80Q mientras que alrededor del 68-70% de las moscas hTBP34Q y los controles todavía podían escalar (Figura 14).

Estos resultados indican que las moscas que expresaban hTBP80Q presentan un impedimento locomotor tardío de la misma manera que los humanos con SCA17.

ENSAYO DE GEOTAXIS NEGATIVA

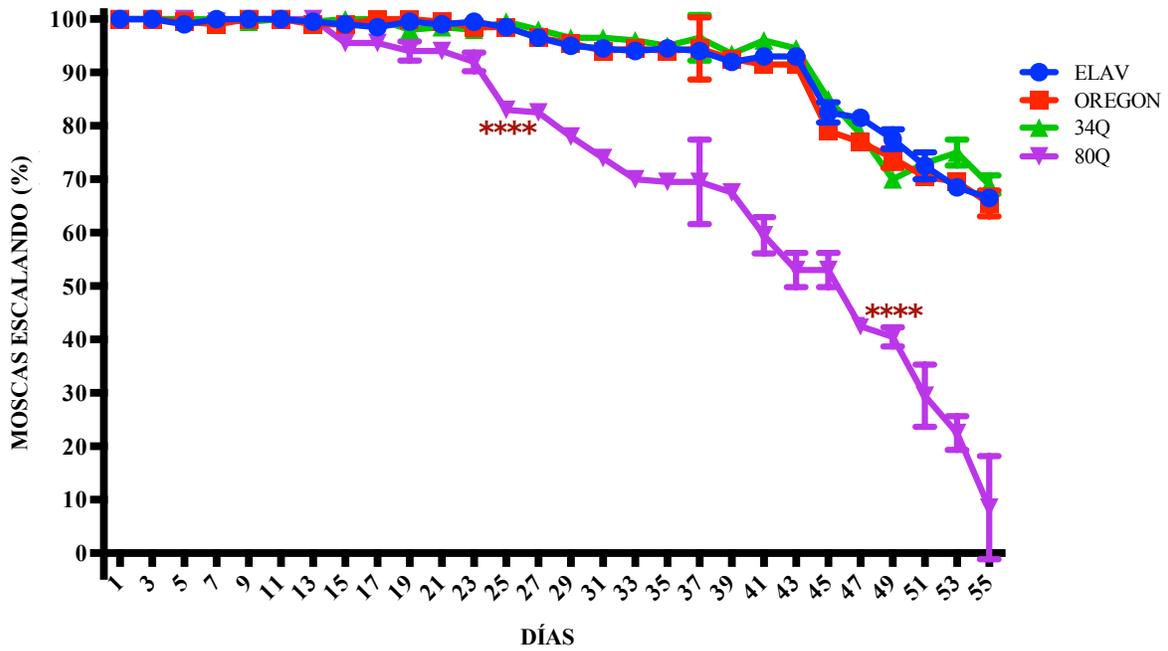


Figura 14. La expresión de hTBP80Q en el cerebro de *Drosophila melanogaster* afecta su habilidad de escalada. Grupos de 20 moscas de los genotipos hTBP 34 y 80Q fueron sometidas a los ensayos de escalada en comparación con las líneas ELAV-GAL4 y Oregon (*wild-type*). La prueba de escalada se realizó cada dos días durante 55 días. Las diferencias significativas entre las moscas que expresan hTBP80Q y hTBP34Q están marcadas con asteriscos, en donde $p < 0.0001$ (ANOVA de dos vías con correcciones de Bonferroni). Se realizaron 10 repeticiones por cada grupo.

9. DISCUSIÓN

El objetivo de esta tesis consistió en modelar la patología SCA17 en *Drosophila melanogaster*. Para ello, se estandarizó el sistema binario UAS-GAL4 usando los promotores GMR y ELAV con la expresión tejido específica de GFP. Posteriormente, se determinó que el modelaje de las proteínas hTBP con ambas longitudes de polyQ (34Q y 80Q) hacia el ojo de la mosca de la fruta causó afectaciones en el fenotipo del ojo de la mosca y que la expresión de hTBP80Q en el cerebro de *Drosophila melanogaster* es neurotóxica y acorta su tiempo de vida y la acumulación de la expresión de hTBP34 y 80Q en el cerebro mostró que es dependiente de la edad y que los agregados de hTBP80Q incrementaron de los 2 a los 20 días. Adicionalmente, se evaluó la muerte celular causada por la expresión de hTBP34Q y 80Q que provocó muerte neuronal dependiente de la edad. También se analizó el estado locomotor de las moscas en los que se determinó que la proteína hTBP80Q causó una alguna conducta aberrante en su habilidad de escalada.

La estandarización del sistema binario UAS-GAL4 consistió en dirigir la expresión de la proteína GFP con dos promotores tejido-específico; GMR-GAL4 que dirigió GFP hacia los ojos y, ELAV-GAL4, que dirigió GFP al cerebro de la mosca de la fruta. Los resultados obtenidos revelaron que el promotor GMR-GAL4 dirigió la expresión de GFP a la región posterior del surco morfogenético del ojo en el disco ojo-antena de la larva de *D. melanogaster*, esto permitió corroborar la función de GMR-GAL4, que de acuerdo a lo previamente reportado dirige la expresión hacia esa región del disco ojo-antena (Ellis et al., 1993). Así mismo, en el cerebro de la mosca de la fruta adulto, se observó una expresión homogénea de la proteína GFP, lo que permitió de la misma manera ratificar que ELAV-GAL4 dirigió correctamente la expresión de GFP, tal y como está reportado en la literatura (Bier et al., 1988; Robinow & White, 1988). Estos resultados permitieron llegar a la conclusión de que los promotores y el sistema binario funcionaron para la dirección de la expresión de manera tejido-específica.

La expresión de hTBP34Q y hTBP80Q en los ojos de *Drosophila melanogaster* permitió la evaluación de la toxicidad de las diferentes longitudes de polyQ a simple vista. Para las moscas expresando hTBP34Q se observó un fenotipo tenue y poco agresivo. Nuestros

resultados demostraron sólo una ligera pérdida de la pigmentación del ojo desde el día 1 de análisis, y ésta se mantiene hasta el día 50, pero no se observó ningún cambio en el tamaño del ojo, se observó un ligero desorden de las ommatidias tal y como anteriormente se había reportado en Ren, Jie en el 2011. Sin embargo, en el caso de hTBP80Q la despigmentación del ojo de la mosca fue mucho más abrupta y más evidente, a partir del día 10 se presentó la aparición de una mancha de color más clara que el resto del ojo del lado inferior derecho y esa mancha fue progresando con el paso del tiempo hasta convertirse en una franja blanca en la mitad del ojo. La expresión de hTBP34Q y hTBP80Q en el ojo de la mosca demostró la toxicidad de ambas proteínas, sin embargo, la que resulto ser más tóxica y provocó un fenotipo más severo fue hTBP80Q; hTBP34Q causó un fenotipo ligeramente aberrante, pero, se presentó hasta los 50 días de edad; a diferencia de hTBP80Q que a partir de los 10 días de edad provocó la afectación del tejido del ojo, lo que apoya la teoría de que las enfermedades polyQ son dependientes del tamaño de la expansión y la edad de quien las padece. De acuerdo a nuestros resultados, las proteínas utilizadas en este experimento (hTBP34Q y hTBP80Q) aunque presentan toxicidad parecen no ser tan tóxicas, no provocaron los mismos efectos que se han observado en otras enfermedades causadas por expansiones polyQ, en estudios previos de modelaje de ataxias en el ojo de *Drosophila melanogaster* se han reportado reducciones en el tamaño de éste, despigmentaciones más evidentes, pérdida drástica del orden de las ommatidias (Ambegaokar et al., 2010; Fernandez-Funez et al., 2000; Tsou et al., 2015; Warrick et al., 1998; Zhang et al., 2010) e incluso existen evidencias en donde aparecen pequeñas regiones necróticas, indicando la toxicidad de las proteínas causantes de las enfermedades que fueron modeladas (Lin, He, Luo, Zhu, & Duan, 2015), o bien necesitan más tiempo para provocar un fenotipo más aberrante, sin embargo, dejar a las moscas vivir más días parece complejo, pues debido a la misma naturaleza de la enfermedad, éstas presentan mortalidad temprana.

Después de haber comprobado que las proteínas eran tóxicas en el ojo, se dirigió la expresión de hTBP34 y 80Q al sistema nervioso central de la mosca utilizando el promotor ELAV-GAL4 (Marsh et al., 2000). Esto se hizo siguiendo el primer reporte de SCA17 en humanos (Koide et al., 1999) que, de acuerdo a éste, el paciente presentó degeneración cerebelar, cortical y subcortical, la cual se sospechó que fue causada por la presencia de agregaciones proteicas en el cerebro post-mortem, dada la naturaleza de la enfermedad,

ahora se conoce que siendo una enfermedad polyQ forma agregados proteínicos (Paulson et al., 2017), por lo que nos propusimos evaluar su capacidad de formar agregados en el cerebro de la mosca de la fruta.

La progenie de las cruzas se evaluó a los dos días de haber eclosionado para la presencia de agregados, tanto para hTBP34Q como para hTBP80Q. Los cerebros de las moscas que expresaban hTBP34Q no presentaron agregados, por lo que suponemos que, a la edad de 2 días, la expansión de 34Q es soluble y no se agrega, a diferencia de hTBP80Q, que desde ese momento causa agregados en el cerebro de *Drosophila*, son pequeños y presentaron poca fluorescencia, pero son distinguibles en el tejido; estas observaciones van de acuerdo a la patología de las ataxias espinocerebelosas, son dependientes de la edad (Dueñas et al., 2006; Fan et al., 2014; Xu et al., 2015), es decir mientras más viejo el paciente con mayor intensidad se presenta la enfermedad. En este caso 34Q no se agrega porque no representa una expansión amplia, considerando que la mayoría de las patologías polyQ son causadas por una expansión por arriba de 40Q, por lo que hTBP34Q se mantiene dentro del umbral fisiológico y siendo una mosca joven aún no desarrolla agregados. En contraste, hTBP80Q siendo una expansión amplia desde los dos días de edad muestra agregaciones proteicas en el cerebro de la mosca de la fruta. A los 10 días, el comportamiento de hTBP34Q no cambió, pero hTBP80Q comenzó a agregarse de manera más notoria, los agregados fueron más grandes y presentaron una mayor fluorescencia. Veinte días después de haber eclosionado los cerebros de las moscas presentaron el mismo patrón, 34Q permaneció estable y 80Q continuó agregándose, esta vez de manera más intensa y formó agregados más grandes. Este comportamiento es común entre las enfermedades polyQ, mientras más amplia la región de polyQ, presenta mayor toxicidad (Krench, Cho, & Littleton, 2016). Sin embargo, al día 50 el comportamiento cambió, hTBP34Q formó pequeños agregados y no se vio un aumento de los agregados formados por hTBP80Q. Por parte de hTBP34Q, proponemos que los agregados que se detectaron a los 50 días son debido a que, a pesar de que 34Q no es considerada una expansión polyQ para los humanos, si lo es para *D. melanogaster*, pues ésta en su TBP sólo posee en total 14Q, dividida en dos regiones de poliglutaminas, una de 6Q y otra de 8Q, de acuerdo a la secuencia reportada en el NCBI (Hoskins et al., 2010). Por lo que, estos resultados, nos permitieron plantear que hTBP34Q es también neurotóxica para *Drosophila melanogaster*, sólo que necesita mayor tiempo

para agregarse. Al contrario, el que no haya habido incremento en los agregados de hTBP80Q, nos hizo pensar que es probable que las neuronas que albergan estos agregados estén muriendo y esta muerte no nos permita detectar el posible incremento que pueda existir.

Posteriormente, se procedió a medir la muerte celular a través de los ensayos de TUNEL, a los 2 días de edad, los cerebros de las moscas que expresaban hTBP34Q presentaron poca muerte celular, apenas se lograron apreciar algunos pixeles en color verde, en contraste con hTBP80Q se apreciaron muchas más células verdes, los cuales nos indicaron la presencia de muerte celular. La siguiente observación, a los 10 días, en el caso de hTBP34Q no se observó un incremento en la muerte celular, pero para hTBP80Q el aumento de muerte celular fue muy claro, demostrando una mayor presencia de señal positiva para TUNEL en los cerebros de estas moscas. De igual manera que en nuestros resultados, existen reportes previos que demuestran la presencia de apoptosis aberrante en el SNC y ésta se ha visto implicada en una amplia gama de desórdenes del sistema nervioso, en estos estudios precedentes se ha demostrado la aparición gradual de la muerte celular a edades tempranas hasta su incremento en el paciente de mayor edad (Chongtham & Agrawal, 2016; Friedlander, 2003; Hickey & Chesselet, 2003; Yuan & Yankner, 2000). Por lo que, los resultados para el día 20, fueron de acuerdo a lo anteriormente reportado, la muerte celular se vio potenciada para el grupo de moscas que expresaba hTBP80Q, pero el grupo de hTBP34Q se mantuvo relativamente estable. De la misma manera que en el experimento de agregados proteicos, el patrón de incremento proporcional en el grupo de hTBP80Q que se había observado en los resultados cambió. Se esperaba obtener una mayor cantidad de muerte celular para el caso de hTBP80Q, pero no fue así, lo cual nos hizo suponer que el método de detección de muerte celular probablemente fue deficiente. El método de TUNEL detecta la fragmentación del DNA (Didenko, 2011), lo cual sucede en un punto muy avanzado de la muerte celular (Mutsuddi & Nambu, 1998), lo que puede estar sucediendo en nuestros resultados, es que las neuronas de *Drosophila melanogaster* al día 50, si se encuentran en un proceso de muerte celular, pero aún no llegan a la fragmentación del DNA, por lo que se ha propuesto enriquecer la detección de muerte celular con el método de yoduro de propidio, para poder evaluar si la membrana celular se encuentra

comprometida y de esta manera complementar los resultados (Jiajia et al., 2017). De acuerdo a los resultados obtenidos se pudo concluir que hTBP80Q es neurotóxica y provoca más muerte celular que hTBP34Q.

Finalmente, también se evaluó la habilidad de escalada de las moscas que expresaban hTBP34Q o hTBP80Q a través de la prueba de geotaxis negativa (Barone & Bohmann, 2013). En la progenie de la cruce se comparó el desempeño de hTBP34Q y hTBP80Q contra los grupos ELAV-GAL4 y Oregon. Esta comparación se realizó para evitar tener falsos positivos causados por la línea promotora. Los primeros 10 días, todos los grupos de moscas se comportaron de manera normal, todas escalaban de manera similar. Es importante recalcar que, a los 10 días las moscas se consideran adultos jóvenes (Linford, Bilgir, Ro, & Pletcher, 2013), por lo que de acuerdo a la naturaleza de la patología, al ser dependiente de la edad (Taroni & DiDonato, 2004), se esperaba tener resultados negativos en este intervalo de edad. No obstante, a partir del día quince, el deterioro locomotor del grupo que expresaba hTBP80Q en el cerebro fue en incremento, en comparación con el resto de los grupos que seguían escalando de manera normal. Del grupo de la expansión 80Q al día 55 sólo el 10% de las moscas podía pasar la marca de 3 cm, en contraste con los grupos hTBP34Q, ELAV-GAL4 y Oregon que al día 55 aún presentaban un comportamiento normal, es decir, alrededor del 70% de las moscas seguían escalando. Estos resultados nos permitieron concluir que la expansión de 80Q en comparación con la 34Q, provoca una afección locomotora severa, tal y como se ha demostrado anteriormente (M. Krench & Littleton, 2017; Maas, Van Gaalen, Klockgether, & Van De Warrenburg, 2015; Xu et al., 2015).

10. CONCLUSIONES

De acuerdo a los experimentos que se realizaron en el modelado de SCA17 en *Drosophila melanogaster* se pudo concluir que:

- 1) La estandarización del sistema binario UAS/GAL4 permitió la expresión de la proteína GFP tejido-específica en el ojo y cerebro de *Drosophila melanogaster* con los promotores GMR y ELAV respectivamente.
- 2) La expresión específica de hTBP80Q en el cerebro de la mosca resultó ser neurotóxica y acortó el tiempo de vida de *Drosophila melanogaster* en comparación, con hTBP34Q y los grupos control que no mostraron cambio significativo en el tiempo de vida.
- 3) La toxicidad de las proteínas hTBP fue dependiente de la longitud de la expansión de glutaminas y de la edad de la mosca ya que, aunque ambas expansiones provocaron cambios en el fenotipo del ojo, hTBP80Q indujo un fenotipo agresivo que se manifestó desde los 10 días de edad de la mosca en comparación con hTBP34Q que causó un fenotipo más tenue.
- 4) La expresión de hTBP34Q y 80Q formó agregados proteicos en el cerebro de la mosca que mostraron un comportamiento dependiente del tamaño de la expansión y de la edad de la mosca. Los agregados proteicos formados por hTBP80Q fueron de mayor tamaño, fluorescencia y se detectaron en mayor cantidad con respecto a hTBP34Q, lo que indica que la acumulación de 80Q es más tóxica que la de 34Q.
- 5) Los agregados de hTBP80Q no incrementaron de forma significativa de los 20 a los 50 días de edad.
- 6) La muerte neuronal se vio potenciada por la expresión de hTBP80Q en el cerebro de *Drosophila melanogaster* en comparación con hTBP34Q y, de la misma manera que los agregados proteicos, fue dependiente de la edad y del tamaño de la expansión de polyQs.
- 7) La muerte neuronal por hTBP80Q incrementó de los 2 a los 20 días, sin embargo, de los 20 a 50 días no se observó un aumento de la muerte neuronal

- 8) La expresión de hTBP80Q en el cerebro de la mosca afectó significativamente la habilidad de escalada en comparación con hTBP34Q y los grupos control.

11.PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en esta tesis muestran claramente el efecto neurotóxico de hTBP80Q en el cerebro de la mosca que acortó su tiempo de vida y la capacidad locomotriz debido a la formación de agregados proteicos y muerte celular por lo que abre la posibilidad de perspectivas que se orientan en diversas direcciones. En primera instancia, sería interesante determinar la causa por la que los agregados de hTBP80Q no incrementan de forma significativa de los 20 a los 50 días de edad. De acuerdo a la naturaleza de la enfermedad, se espera que los agregados aumenten, sin embargo, de alguna manera se están perdiendo o bien, la detección no es oportuna. Por lo tanto, se planea continuar con el modelaje de los agregados proteicos para dilucidar si entre los 20 y 50 días éstos se eliminan de cierta manera, debido a la muerte de las neuronas, o bien, si la detección está fallando. Por otro lado, el análisis de la muerte neuronal, se puede complementar con otras pruebas que evalúen la muerte celular y procesos de apoptosis de forma mas precisa ya que el ensayo de TUNEL detecta un estado muy avanzado en el proceso de muerte, por lo que probablemente estamos detectando neuronas que aún no llegan a la fragmentación de DNA, pero, que si están en proceso de muerte.

Asi mismo, sería interesante complementar los experimentos de modelaje para analizar el comportamiento de hTBP34Q a partir de los 50 días de edad y, observar si más adelante, hTBP34Q es capaz de afectar la marcha de *D. melanogaster* e identificar el punto de quiebre en el que una proteína que no tiene una expansión de poliglutaminas considerada como tóxica se convierte en patológica.

12. RESUMEN BIOGRÁFICO

Marcela Cárdenas Tueme

Candidata para el Grado de
Maestría en Ciencias con Orientación en Immunobiología

Tesis: EFECTO PATOLÓGICO DE LA EXPANSIÓN DE POLIGLUTAMINAS DE HTBP EN LA ENFERMEDAD NEURODEGENERATIVA SCA17 EN *Drosophila melanogaster*

Campo de Estudio: Genética Molecular del Desarrollo

Datos Personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León el 19 de Diciembre de 1989, hija de Carlos Cárdenas Barrera y Marcela Tueme Reséndez.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Lic. en Biotecnología Genómica en 2014.

Experiencia Profesional: Responsable de laboratorio de Diagnóstico Molecular en Novogen México, en los años 2014-2015.

13.BIBLIOGRAFÍA

1. A. Crotti, C. Benner, B. Kerman, D. Gosselin, C. Lagier-Tourenne, C. Zuccato, E. Cattaneo, F.H. Gage, D.W. Cleveland, and C. K. G. (2014). Mutant Huntingtin promotes autonomous microglia activation via myeloid lineage-determining factors. *Nature Neuroscience*, 17(4), 513–521.
2. Ambegaokar, S. S., Roy, B., & Jackson, G. R. (2010). Neurodegenerative models in *Drosophila*: Polyglutamine disorders, Parkinson disease, and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Disease*, 40(1), 29–39.
3. Barone, M. C., & Bohmann, D. (2013). Assessing neurodegenerative phenotypes in *Drosophila* dopaminergic neurons by climbing assays and whole brain immunostaining. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (74), e50339.
4. Bauer, P. O., & Nobuyuki, N. (2009). The pathogenic mechanisms of polyglutamine diseases and current therapeutics strategies. *Journal of Neurochemistry*, 5, 1737–1765.
5. Berke, S. J. S., Chai, Y., Marrs, G. L., Wen, H., & Paulson, H. L. (2005). Defining the role of ubiquitin-interacting motifs in the polyglutamine disease protein, ataxin-3. *Journal of Biological Chemistry*, 280(36), 32026–32034.
6. Bier, E., Ackerman, L., Barbel, S., Jan, L., & Jan, Y. N. (1988). Identification and characterization of a neuron-specific nuclear antigen in *Drosophila*. *Science (New York, N.Y.)*, 240(4854), 913–916.
7. Brand, A. H., & Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, 415, 401–415.
8. Chafekar, S. M., & Duennwald, M. L. (2012). Impaired Heat Shock Response in Cells Expressing Full- Length Polyglutamine-Expanded Huntingtin, 7(5), 1–12.
9. Chan, H. Y., & Bonini, N. M. (2000). *Drosophila* models of human neurodegenerative disease. *Cell Death and Differentiation*, 7(11), 1075–1080.
10. Chen, S., Berthelie, V., Hamilton, J. B., O’Nuallain, B., & Wetzel, R. (2002). Amyloid-like features of polyglutamine aggregates and their assembly kinetics. *Biochemistry*, 41(23), 7391–7399.

11. Chongtham, A., & Agrawal, N. (2016). Curcumin modulates cell death and is protective in Huntington's disease model. *Scientific Reports*, 6(November 2015), 18736.
12. Craig, K., Keers, S. M., Archibald, K., Curtis, A., & Chinnery, P. F. (2004). Molecular Epidemiology of Spinocerebellar Ataxia Type 6. *Annals of Neurology*, 55(5), 752–755.
13. Didenko, V. V. (2011). DNA Damage Detection In Situ, Ex Vivo, and In Vivo. *Methods and protocols. Methods in Molecular Biology*, vol. 682 (Vol. 682).
14. Dueñas, A. M., Goold, R., & Giunti, P. (2006). Molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxias. *Brain*, 129(6), 1357–1370.
15. Ellis, M. C., O'Neill, E. M., & Rubin, G. M. (1993). Expression of Drosophila glass protein and evidence for negative regulation of its activity in non-neuronal cells by another DNA-binding protein. *Development (Cambridge, England)*, 119(3), 855–865.
16. Etcheagaray, J. I., Elguero, E. J., Tran, J. A., Sinatra, V., Feany, M. B., & McCall, K. (2016). Defective Phagocytic Corpse Processing Results in Neurodegeneration and Can Be Rescued by TORC1 Activation. *Journal of Neuroscience*, 36(11), 3170–3183.
17. Evert, B. O., Araujo, J., Vieira-Saecker, A. M., de Vos, R. a I., Harendza, S., Klockgether, T., & Wüllner, U. (2006). Ataxin-3 represses transcription via chromatin binding, interaction with histone deacetylase 3, and histone deacetylation. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(44), 11474–11486.
18. Fan, H., Ho, L., Chi, C., Chen, S., Peng, G., Chan, T., Harn, H. (2014). Review Polyglutamine (PolyQ) Diseases : Genetics to Treatments. *Cell Transplantation*, 23(235), 441–458.
19. Fernandez-Funez, P., Nino-rosales, M. L., Gouyon, B. De, She, W., Luchak, J. M., Martinez, P., Botas, J. (2000). Identification of genes that modify ataxin-1-induced neurodegeneration. *Letters to Nature*, 408, 101–105.
20. Friedlander, R. M. (2003). Apoptosis and Caspases in Neurodegenerative Diseases. *New England Journal of Medicine*, 348(14), 1365–1375.

21. Friedman, M. J., Shah, A. G., Fang, Z., Ward, E. G., Warren, S. T., & Li, S. (2007). Polyglutamine domain modulates the TBP-TFIIB interaction : implications for its normal function and neurodegeneration, 10(12), 1519–1528.
22. Friedman, M. J., Wang, C., Friedman, M. J., Wang, C., Li, X., & Li, S. (2008). Polyglutamine Expansion Reduces the Association of TATA-binding Protein with DNA and Induces DNA. *The Journal of Biological Chemistry*, 283, 8283–8290.
23. Gilman, S. (2000). The Spinocerebellar Ataxias. *Clinical Neuropharmacology*, 23(6), 296–303.
24. Helmlinger, D., Hardy, S., Abou-sleymane, G., Eberlin, A., Bowman, A. B., Gansmu, A., Trottier, Y. (2006). Glutamine-Expanded Ataxin-7 Alters TFTC / STAGA Recruitment and Chromatin Structure Leading to Photoreceptor Dysfunction. *PLoS Biology*, 4(3).
25. Hickey, M. A., & Chesselet, M. F. (2003). Apoptosis in Huntington's disease. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*.
26. Hoffner, G., & Djian, P. (2015). Polyglutamine Aggregation in Huntington Disease: Does Structure Determine Toxicity? *Molecular Neurobiology*, 52(3), 1297–1314.
27. Hoskins, R. a, Carlson, J. W., Kennedy, C., Acevedo, D., Frise, E., Wan, K. H., ... Celniker, S. E. (2010). Sequence Finishing and Mapping of *Drosophila melanogaster* Heterochromatin, 316(5831), 1625–1628.
28. Huynh, D. P., Del Bigio, M. R., Ho, D. H., & Pulst, S. M. (1999). Expression of ataxin-2 in brains from normal individuals and patients with Alzheimer's disease and spinocerebellar ataxia 2. *Annals of Neurology*, 45(2), 232–241.
29. Jackson, S. M., Whitworth, A. J., Greene, J. C., Libby, R. T., Baccam, S. L., Pallanck, L. J., & La, A. R. (2005). A SCA7 CAG / CTG repeat expansion is stable in *Drosophila melanogaster* despite modulation of genomic context and gene dosage. *Gene*, 347, 35–41.
30. Jeibmann, A., & Paulus, W. (2009). *Drosophila melanogaster* as a model organism of brain diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(2), 407–440.
31. Jiajia, L., Shinghung, M., Jiacheng, Z., Jialing, W., Dilin, X., Shengquan, H., Wei, C. (2017). Assessment of Neuronal Viability Using Fluorescein Diacetate-Propidium Iodide Double Staining in Cerebellar Granule Neuron Culture. *Journal of*

Visualized Experiments, (123), 1–7.

32. Koide, R., Kobayashi, S., Shimohata, T., Ikeuchi, T., Maruyama, M., Saito, M., Tsuji, S. (1999). A neurological disease caused by an expanded CAG trinucleotide repeat in the TATA-binding protein gene: A new polyglutamine disease? *Human Molecular Genetics*, 8(11), 2047–2053.
33. Krench, M., Cho, R., & Littleton, J. T. (2016). A *Drosophila* model of Huntington disease-like 2 exhibits nuclear toxicity and distinct pathogenic mechanisms from Huntington disease. *Human Molecular Genetics*.
34. Krench, M., & Littleton, J. T. (2017). Neurotoxicity Pathways in *Drosophila* Models of the Polyglutamine Disorders. *Current Topics in Developmental Biology* (1st ed., Vol. 121). Elsevier Inc.
35. Legleiter, J., Mitchell, E., Lotz, G. P., Sapp, E., Ng, C., DiFiglia, M., ... Muchowski, P. J. (2010). Mutant huntingtin fragments form oligomers in a polyglutamine length-dependent manner in Vitro and in Vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 285(19), 14777–14790.
36. Li, F., Macfarlan, T., Pittman, R. N., & Chakravarti, D. (2002). Ataxin-3 is a histone-binding protein with two independent transcriptional corepressor activities. *Journal of Biological Chemistry*, 277(47), 45004–45012.
37. Lin, Y., He, H., Luo, Y., Zhu, T., & Duan, R. (2015). Inhibition of Transglutaminase Exacerbates Polyglutamine-Induced Neurotoxicity by Increasing the Aggregation of Mutant Ataxin-3 in an SCA3 *Drosophila* Model. *Neurotoxicity Research*, 27(3), 259–267.
38. Linford, N. J., Bilgir, C., Ro, J., & Pletcher, S. D. (2013). Measurement of Lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Visualized Experiments*, (71), 1–9.
39. Maas, R. P. P. W. M., Van Gaalen, J., Klockgether, T., & Van De Warrenburg, B. P. C. (2015). The preclinical stage of spinocerebellar ataxias. *Neurology*, 85(1), 96–103.
40. Manto, M., & Marmolino, D. (2009). Cerebellar ataxias. *Current Opinion in Neurology*, 419–429.
41. Marsh, J. L., Walker, H., Theisen, H., Zhu, Y. Z., Fielder, T., Purcell, J., & Thompson, L. M. (2000). Expanded polyglutamine peptides alone are intrinsically

- cytotoxic and cause neurodegeneration in *Drosophila*. *Human Molecular Genetics*, 9(1), 13–25.
42. Marsh, J., & Thompson, L. (2006). *Drosophila* in the Study of Neurodegenerative Disease. *Neuron*, 52(1), 169–178.
 43. Matilla-Dueñas, A., Ashizawa, T., Magri, S., McFarland, K. N., Pandolfo, M., Pulst, S. M., ... Sánchez, I. (2015). Consensus Paper: Pathological Mechanisms Underlying Neurodegeneration in Spinocerebellar Ataxias. *Cerebellum*, 13(2), 269–302.
 44. Matilla-Dueñas, A., Goold, R., & Giunti, P. (2008). Clinical, genetic, molecular, and pathophysiological insights into spinocerebellar ataxia type 1. *Cerebellum*, 106–14.
 45. Matthews, K. A., Kaufman, T. C., & Gelbart, W. M. (2005). Research resources for *Drosophila*: The expanding universe. *Nature Reviews Genetics*.
 46. Mutsuddi, M., & Nambu, J. R. (1998). Neural disease: *Drosophila* degenerates for a good cause. *Current Biology : CB*, 8(22), R809-11.
 47. Nageswaran, S., & Festenstein, R. (2015). Epigenetics and Triplet-Repeat Neurological Diseases. *Frontiers in Neurology*, 6(December), 1–9.
 48. Nakamura, K., Yoshida, K., Miyazaki, D., Morita, H., & Ikeda, S. ichi. (2009). Spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6): Clinical pilot trial with gabapentin. *Journal of the Neurological Sciences*, 278(1–2), 107–111.
 49. Nedelsky, N. B., Pennuto, M., Smith, R. B., Palazzolo, I., Nie, Z., Neale, G., & Taylor, J. P. (2012). Native functions of the androgen receptor are essential to pathogenesis in a *Drosophila* model of spinobulbar muscular atrophy. *Neuron*, 67(6), 936–952.
 50. Nucifora, L. G., Burke, K. A., Feng, X., Arbez, N., Zhu, S., Miller, J., Poiriera, M. A. (2012). Identification of novel potentially toxic oligomers formed in vitro from mammalian-derived expanded huntingtin exon-1 protein. *Journal of Biological Chemistry*, 287(19), 16017–16028.
 51. Olejniczak, M., Urbanek, M. O., & Krzyzosiak, W. J. (2015). The Role of the Immune System in Triplet Repeat Expansion Diseases, 2015.
 52. Olshina, M. A., Angley, L. M., Ramdhan, Y. M., Tang, J., Bailey, M. F., Hill, A. F.,

- & Hatters, D. M. (2010). Tracking mutant huntingtin aggregation kinetics in cells reveals three major populations that include an invariant oligomer pool. *Journal of Biological Chemistry*, 285(28), 21807–21816.
53. Orr, H. T. (2012). Cell biology of spinocerebellar ataxia. *The Journal of Cell Biology*, 197(2), 167–177.
54. Orr, H. T., & Zoghbi, H. Y. (2007). Trinucleotide Repeat Disorders. *Annual Review of Neuroscience*, 575–623.
55. Paulson, H. L. (2009). The Spinocerebellar Ataxias. *J Neuroophthalmol*, 29(3), 227–237.
56. Paulson, H. L., Shakkottai, V. G., Clark, H. B., & Orr, H. T. (2017). Polyglutamine spinocerebellar ataxias — from genes to potential treatments. *Nature Reviews Neuroscience*.
57. Perutz, M. F., Johnson, T., Suzuki, M., & Finch, J. T. (1994). Glutamine repeats as polar zippers: their possible role in inherited neurodegenerative diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(12), 5355–5358.
58. Poirier, M. A., Li, H., Macosko, J., Cai, S., Amzel, M., & Ross, C. A. (2002). Huntingtin spheroids and protofibrils as precursors in polyglutamine fibrilization. *Journal of Biological Chemistry*, 277(43), 41032–41037.
59. Reina, C. P., Zhong, X., & Pittman, R. N. (2009). Proteotoxic stress increases nuclear localization of ataxin-3. *Human Molecular Genetics*, 19(2), 235–249.
60. Ren, J., Jegga, A. G., Zhang, M., Deng, J., Liu, J., Gordon, C. B., ... Ma, J. (2011). A *Drosophila* model of the neurodegenerative disease SCA17 reveals a role of RBP-J/Su(H) in modulating the pathological outcome. *Human Molecular Genetics*, 20(17), 3424–36.
61. Riess, O., Schöls, L., Böttger, H., Nolte, D., Vieira-saecker, A. M. M., Schimming, C., Laccone, F. A. (1997). SCA6 is caused by moderate CAG expansion in the α 1A-voltage-dependent calcium channel gene. *Human Molecular Genetics*, 6(8), 1289–1293.
62. Robinow, S., & White, K. (1988). The locus *elav* of *Drosophila melanogaster* is expressed in neurons at all developmental stages. *Developmental Biology*, 126(2), 294–303.

63. Soong, B., & Paulson, H. L. (2007). Spinocerebellar ataxias : an update. *Current Opinion in Neurology*, 20, 438–446.
64. Stevanin, G., & Brice, A. (2008). Spinocerebellar Ataxia 17 And Huntington's Disease-like 4. *Genetic Instabilities and Neurological Diseases*, Second Edition, 17(March), 475–483.
65. Takeuchi, T., & Nagai, Y. (2017). Protein misfolding and aggregation as a therapeutic target for polyglutamine diseases. *Brain Sciences*, 7(10).
66. Taroni, F., & DiDonato, S. (2004). Pathways to motor incoordination: the inherited ataxias. *Nature Reviews. Neuroscience*, 5(8), 641–655.
67. Tito, A. J., Cheema, S., Jiang, M., & Zhang, S. (2016). A Simple One-step Dissection Protocol for Whole-mount Preparation of Adult *Drosophila* Brains. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (118).
68. Tsou, W. L., Hosking, R. R., Burr, A. A., Sutton, J. R., Ouyang, M., Du, X., Todi, S. V. (2015). DnaJ-1 and karyopherin $\alpha 3$ suppress degeneration in a new *Drosophila* model of Spinocerebellar Ataxia Type 6. *Human Molecular Genetics*, 24(15), 4385–4396.
69. Van De Warrenburg, B. P. C., Sinke, R. J., Bemelmans, C. C. V., & Scheffer, H. (2002). Spinocerebellar ataxias in the Netherlands. *Neurology*, 58(97252), 702–708.
70. Venken, K. J. T., & Bellen, H. J. (2005). Emerging technologies for gene manipulation in *Drosophila melanogaster*. *Nature Reviews Genetics*, 6(3), 167–78.
71. Warrick, J. M., Morabito, L. M., Bilen, J., Gordesky-Gold, B., Faust, L. Z., Paulson, H. L., & Bonini, N. M. (2005). Ataxin-3 suppresses polyglutamine neurodegeneration in *Drosophila* by a ubiquitin-associated mechanism. *Molecular Cell*, 18(1), 37–48.
72. Warrick, J. M., Paulson, H. L., Gray-Board, G. L., Bui, Q. T., Fischbeck, K. H., Pittman, R. N., & Bonini, N. M. (1998). Expanded polyglutamine protein forms nuclear inclusions and causes neural degeneration in *Drosophila*. *Cell*, 93(6), 939–949.
73. Xu, Z., Joel Tito, A., Rui, Y. N., & Zhang, S. (2015). Studying polyglutamine diseases in *Drosophila*. *Experimental Neurology*, 274, 25–41.
74. Yamamoto, S., Jaiswal, M., Charng, W., Gambin, T., Karaca, E., Mirzaa, G.,

- Wangler, M. F. (2014). Resource A *Drosophila* Genetic Resource of Mutants to Study Mechanisms Underlying Human Genetic Diseases. *Cell*, 159(1), 200–214.
75. Yuan, J., & Yankner, B. A. (2000). Apoptosis in the nervous system. *Nature*.
76. Zhang, S., Binari, R., Zhou, R., & Perrimon, N. (2010). A Genomewide RNA Interference Screen for Modifiers of Aggregates Formation by Mutant Huntingtin in *Drosophila*. *Genetics*, 184, 1165–1179. <http://doi.org/10.1534/genetics.109.112516>
77. Zuchenko, O., Bailey, J., Bonnen, P., Ashizawa, T., Stockton W., D., Amos, C., Lee Chi, C. (1997). Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the $\alpha 1A$ -voltage-dependent calcium channel. *Nature Genetics*, 15, 62–69.