



Cinvestav

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD ZACATENCO**

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

***Generación y caracterización de un modelo inducible en astrocitos
para el estudio de la ataxia espinocerebelar tipo 7 (SCA7)***

Tesis que presenta

Biol. Enue Reynaldo Gómez Macías

para obtener el Grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

en la Especialidad de

GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Tutores

Dr. Jaime García Mena

Dr. Oscar Hernández Hernández

Asesores

Dr. Bulmaro Cisneros Vega

Dr. Jonathan Javier Magaña Aguirre

México, D. F.

2015

Durante la realización de este trabajo, el autor fue becario del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), expediente 298795.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Medicina Genómica del Departamento de Genética del Instituto Nacional de Rehabilitación (INR) bajo la dirección del Dr. Oscar Hernández Hernández; así como en el Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN bajo la dirección del Dr. Jaime García Mena.

RESUMEN

La SCA7 es un desorden neurodegenerativo autosómico dominante caracterizado por cuadros de ataxia con descontrol progresivo de la capacidad motriz y retinopatía. Esta enfermedad es la más común de las ataxias espinocerebelares autosómicas dominantes en la región central de Veracruz en México, donde se ha reportado la mayor serie de casos de SCA7 a nivel mundial. La degeneración progresiva se causa por la pérdida neuronal de las células de Purkinje en el cerebelo y de los fotorreceptores, conos y bastones, en la retina. Si bien aún se desconocen con exactitud los mecanismos específicos involucrados en la patofisiología de la SCA7, evidencia experimental reciente ha demostrado la importancia de los astrocitos en la progresión de la enfermedad. Por este motivo, en este trabajo se propuso la generación de un modelo celular para la expresión inducible de ataxina-7 en las células MIO-M1, como un primer paso para el estudio de la participación de las células gliales en la patogénesis de la SCA7. Utilizando el sistema de expresión Tet-On 3G se generó un modelo en la línea celular MIO-M1 con expresión inducible de ataxina-7.

Abstract

Spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7) is an autosomal dominant neurodegenerative disorder characterized by progressive ataxia, and retinal dystrophy. SCA7 is the most common autosomal dominant spinocerebellar ataxia in the central region of Veracruz Mexico, where one of the largest series of cases worldwide has been reported. Progressive degeneration is caused by the neuronal loss of Purkinje cells in the cerebellum and photoreceptors in the retina. Detailed pathogenic mechanisms involved in the pathophysiology of SCA7 remain still unknown, however the importance of astrocytes in the disease progression has been recently demonstrated. Due to this, in this work we generated an inducible experimental model for ataxin-7 expression based on the MIO-M1 cells, as a first step into the study of the glia cell contribution in the pathogenesis of SCA7.

Índice

1. Introducción.....	7
1.1 Generalidades de ataxias	7
1.2. Ataxia espinocerebelosa tipo 7	7
1.2.1 Epidemiología	7
1.2.2 Características clínicas de la SCA7	8
1.2.3 Bases moleculares de la SCA7	10
1.2.4 Mecanismos de patogénesis	12
1.3 Funciones de la glía en el sistema nervioso central	15
1.3.1 Papel de los astrocitos.....	16
1.3.2 Papel de la glía en la enfermedad	17
1.3.3 Las células Mio-M1	19
2. Antecedentes directos	21
2.1 Alteraciones de la glía en la SCA7	21
4. Justificación.....	26
5. Hipótesis.....	26
6. Objetivos	26
6.1 General	26
6.1.2 Particulares.....	26
7. Estrategia experimental.....	27
8. Materiales y métodos	30
8.1 Extracción de RNA total.....	30
8.2 Síntesis de cDNA.....	30
8.3 Reacción de PCR	31
8.4 Purificación de DNA a partir de gel de agarosa	32
8.5 Restricción de DNA	32
8.6 Sistema de expresión inducible	33
8.7 Ligación	33
8.8 Preparación de células competentes.....	34

8.9 Transformación de bacterias	34
8.10 Clonación.....	34
8.12 Extracción de DNA plasmídico	35
8.13 Secuenciación de DNA.....	36
8.14 Cultivo de células MIO-M1.....	36
8.15 Ensayo de viabilidad.....	37
8.16 transfección de células	37
8.17 Ensayo de western blot.....	38
9. Resultados	39
9.1 Clonación de ataxina 7 en el sistema Tet-On.	39
9.2 Transfección estable del vector PTRE3G-MYC-ATXN710Q	50
10. Discusión.....	53
11. Conclusiones.....	56
12. Referencias	57

Índice de figuras

Figura 1.	Origen geográfico en México de la mayor serie de casos de SCA7 reportada a nivel mundial.....	8
Figura 2.	Características patológicas de la SCA7.....	9
Figura 3.	Repetidos CAG en el gen ATXN7.....	10
Figura 4.	Complejo STAGA y la función de ataxina-7.....	12
Figura 5.	Mecanismo potencial por el cual la ataxina-7 mutante induce toxicidad en los fotorreceptores tipo bastón.....	14
Figura 6.	Interacción neurona-glía.....	15
Figura 7.	Esquema del sistema tripartita.	18
Figura 8.	Inmunohistoquímica de secciones de SNC en un ratón transgénico que expresa ataxina-7 mutante.....	21
Figura 9.	Inmunohistoquímica de un ratón transgénico para SCA7 (PrP-SCA7-c92Q).....	22
Figura 10.	Degradación de células de Purkinje en un ratón transgénico Gfa2-SCA7 92Q.....	23
Figura 11.	Efectos de la expresión de ataxina-7 mutante en un ratón transgénico para Gfa2-SCA7.....	23
Figura 12.	Múltiple origen celular de la neurodegeneración en la SCA7.....	24
Figura 13.	Expresión de repetidos expandidos polyQ de ataxina-7 disminuye la expresión de la reelina.....	25
Figura 14.	Estrategia para la clonación del gen en el vector pTRE3G-myc.....	27
Figura 15.	Estrategia para la transfección estable de las construcciones generadas en el sistema Tet-On.....	28
Figura 16.	Caracterización del modelo celular inducible generado.....	29
Figura 17-	Vectores del sistema de expresión inducible Tet On.....	33
Figura 18	Diagnóstico de repetidos CAG por PCR punto final y TP-PCR.....	39
Figura 19.	Evaluación de la integridad del RNA total y de la síntesis de cDNA.....	40
Figura 20.	Amplificación por PCR de la región codificante de ATXN-7.....	41
Figura 21	Purificación de vector e insertos para ensayo de ligación.....	42
Figura 22.	Condiciones de ligación utilizadas para generar la ligación entre el vector pTRE3G-myc y el inserto de ATXN7 control o mutante.....	43
Figura 23.	Análisis de la orientación de la clonación.....	44
Figura 24.	Electroferograma de la secuenciación de la construcción pTRE3G-myc-ATXN710Q.....	45
Figura 25.	Secuenciación de la construcción pTRE3G-myc-ATXN710Q.....	50
Figura 26	Ensayo de viabilidad de las células Mio-M1.....	51
Figura 27.	Transfección estable de células MIO-M1 con la construcción pTRE3G-myc-ATXN7.....	51
Figura 28.	Expresión de un transcrito específico de ATXN7 exógena.....	52
Figura 29	Expresión de ataxina-7 en el sistema de expresión inducible Tet-On en presencia o ausencia de doxiciclina.....	52

1. INTRODUCCIÓN

1.1 GENERALIDADES DE ATAXIAS

Las ataxias espinocerebelosas autosómicas dominantes (ADCAs por sus siglas en inglés) son un grupo heterogéneo de trastornos neurodegenerativos caracterizados por la degeneración progresiva del cerebelo, del tronco cerebral y de la medula espinal. Dependiendo del tipo de ADCAs, los pacientes pueden presentar un cuadro de ataxia cerebelosa, oftalmoplejía, signos extrapiramidales y piramidales, demencia, retinopatías pigmentarias y neuropatías periféricas (Dueñas, Goold, & Giunti, 2006).

Clínicamente las ADCAs se dividen en cuatro grupos (Rüb *et al.*, 2013). Las ADCA tipo I son genéticamente heterogéneas con cuadros de oftalmoplejía demencia y amiotrofia; dentro de este grupo, se encuentran las ataxias espinocerebelosas (SCA) tipo 1, 2, 3, 4, 8, 12. Las ADCA tipo II presentan como sello característico la degeneración retinal pigmentosa y fallas extra piramidales; la única ataxia en este grupo es la tipo 7 (SCA7). Por su parte, el grupo ADCA tipo III a menudo denominado “síndrome cerebeloso puro” presenta trastornos más homogéneos y está representado por la SCA5, 6, 11, 14 y 26. Finalmente las ADCA tipo IV se caracteriza por presentar cuadros de sordera y mioclonías (Rüb *et al.*, 2013).

1.2. ATAXIA ESPINOCEREBELOSA TIPO 7

1.2.1 EPIDEMIOLOGIA

La SCA7 es considerada como una enfermedad rara a nivel mundial con una frecuencia de 1:100,000 habitantes (Filla *et al.*, 2000). Distintos estudios indican que la SCA7 representa el 2% de todas las SCAs (Storey *et al.*, 2000). En nuestro país, un estudio reciente demostró que la SCA7 presenta una prevalencia de 10.63/100,000 habitantes en la región central de Veracruz abarcando los municipios de Xalapa, Coatepec, Xico, Tuzamapan, Cosautlan y Tlaltetela (*Figura*

1). Esta población representa la mayor serie de casos de SCA7 reportada a nivel mundial (Magaña, 2014).



Figura 1.- Origen geográfico en México de la mayor serie de casos de SCA7 reportada a nivel mundial. Los pacientes con SCA7 fueron detectados en cinco diferentes comunidades del estado de Veracruz. Modificado de (Magaña, 2014).

1.2.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA SCA7

La SCA7 es un desorden neurodegenerativo autosómico dominante caracterizado por cuadros de ataxia con descontrol progresivo de la capacidad motriz, dificultad al caminar, pérdida de la destreza manual y retinopatía. Los pacientes presentan también disartria y disfagia así como alteración en los movimientos oculares sacádicos. La SCA7 se asocia invariablemente con distrofia de los conos y bastones en la retina, que produce reducción de la agudeza visual, fotosensibilidad, pérdida progresiva de la visión periférica, maculopatía y eventualmente ceguera total (Berciano, 1982). La degeneración progresiva se ha atribuido a la pérdida de las células de Purkinje en el cerebelo y a la disminución de los fotorreceptores (conos y bastones) en la retina (Nakamura *et al.*, 2012). Otras áreas afectadas por la pérdida de neuronas son la corteza cerebelar, el tronco del cerebelo y el complejo del olivo inferior (Zander *et al.*, 2001).

La severidad de la SCA7 varía según la cantidad de repetidos polyQ que presente la proteína ataxina (ver bases moleculares de la SCA7) (Michalik, Martin, & Van Broeckhoven, 2004). Se ha observado que en la mayoría de los casos, a menor número de repetidos se presenta un menor daño en comparación con las alteraciones manifestadas por pacientes con un mayor número de repetidos (Johansson & Forsgren, 1998). En un estudio, se describió como un paciente de 68 años con 38 repetidos CAG, presentaba leves problemas al caminar (*Figura 2b*), mientras que un paciente de 40 años con 52 repetidos CAG mostraba una severa atrofia tanto en cerebelo como en puente de Varolio (*Figura 2c*) (Michalik *et al.*, 2004).

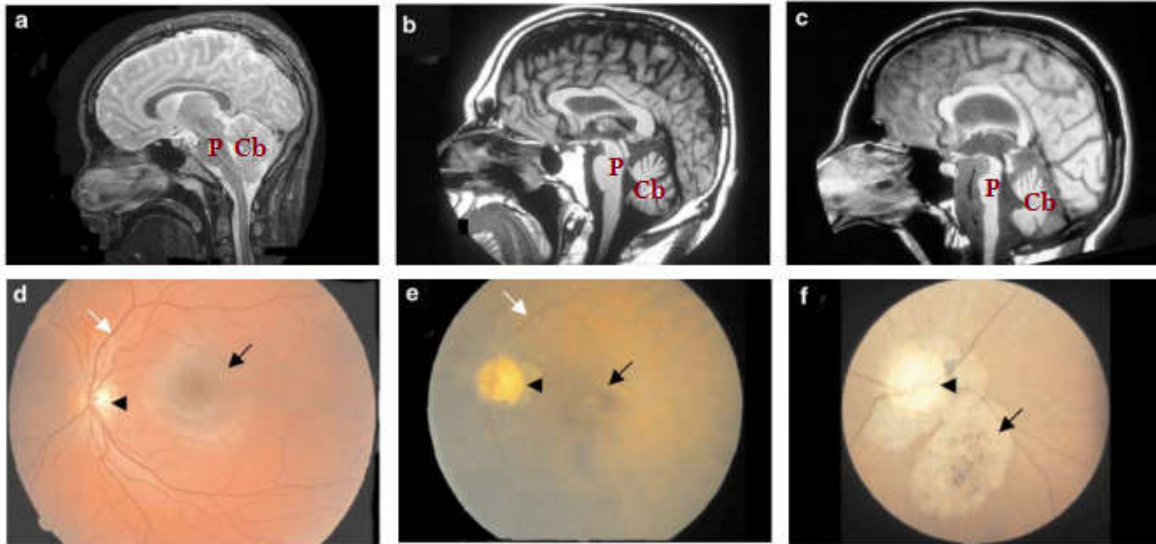


Figura 2.-Características patológicas de la SCA7. Resonancias magnéticas de un individuo sano (a) y dos pacientes con SCA7 (b, c). (b) severa atrofia en el cerebelo (Cb), (c) severa atrofia tanto en cerebelo como en puente de Varolio (P). Imágenes de fundoscopia de un individuo sano (d) y dos pacientes con SCA7 (e, f). Macula lútea (flecha negra), disco óptico (punta de flecha) y sistema vascular (flecha blanca). (e) se observa macula atrofiada (flecha negra), disco óptico pálido (punta de flecha), pobre vascularización (flecha blanca). (f) Retina con un grado extremo de daño en el disco óptico (punta de flecha) y gran atrofia en el epitelio pigmentoso y en la capa de coroides (flecha). Modificado de (Michalik *et al.*, 2004).

1.2.3 BASES MOLECULARES DE LA SCA7

La SCA7 es causada por la presencia de una región poliglutamínica expandida (polyQ) en la proteína ataxina-7 debida a la expansión del trinucleótido repetido CAG en el exón 3 del gen *ATXN7* ubicado en el cromosoma 3p12-p21 (Benomar, Krols, Stevanin, & Cancel, 1995). El número de repetidos CAG es polimórfico, encontrándose en la población sana hasta 35 repetidos (*Figura 3*). Cuando este tracto excede los 35 trinucleótidos CAG, se sobrepasa un umbral a partir del cual se presenta inestabilidad genómica. El aumento de los repetidos es variable y por lo general tiende a incrementarse cuando es transmitido en generaciones sucesivas. De esta manera, en la ataxina-7 mutante, el tracto de poliglutamina codificado por los repetidos CAG oscila entre 37 y 400 (Holmberg *et al.*, 1998). Las proteínas que contienen poliglutaminas tienen una inherente habilidad de agregación, por lo cual el sello característico de esta enfermedad es la presencia de agregados en el núcleo o inclusiones intranucleares. Estas inclusiones se han observado en cerebro humano y de distintos modelos animales. Varios grupos de proteínas, como los elementos del sistema de ubiquitin-proteosoma y factores de transcripción son secuestrados en estos cuerpos intranucleares. Sin embargo aún se debate sí la formación de estos cuerpos sea solo una señal o una causa directa de la progresión de la enfermedad (Zander *et al.*, 2001).

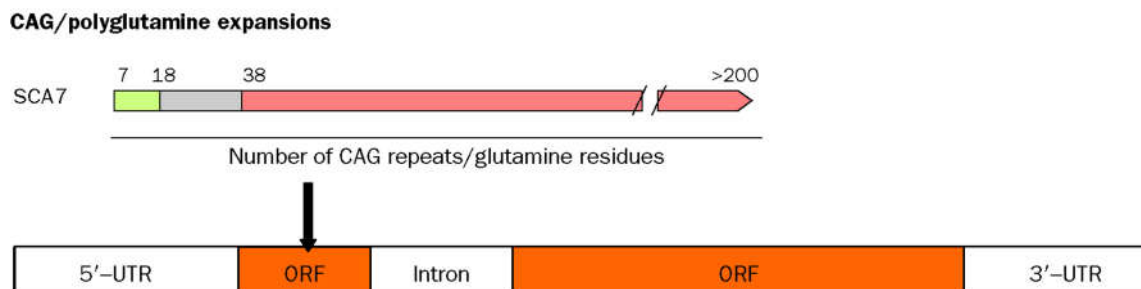


Figura 3.- Repetidos CAG en el gen ATXN7. Se muestra la ubicación de los repetidos CAG en el exón 3 en la región 5'-UTR. En verde se muestra la cantidad de repetidos normales, en gris el rango intermedio y en rojo el rango patológico. Modificado de (Schöls et al., 2004).

El gen *ATXN7* genera mediante *splicing* alternativo 3 variantes transcripcionales denominadas a, b y c (Yu, Ajayi, Boga, & Ström, 2012), de estas, la isoforma “a” representa el transcrito predominante. La isoforma “a” del gen *ATXN7* codifica una proteína de 892 aminoácidos con un peso molecular de 95 kDa (David *et al.*, 1997). Se ha reportado la presencia de señales de localización nuclear en la ataxina-7 y se encuentra localizada tanto en el citoplasma como en el núcleo de las células que la expresan. En los humanos, la ataxina-7 es un componente del complejo TFTC/STAGA (Ström, Forsgren, & Holmberg, 2005). TFTC y STAGA son un gran complejo proteico con composición y actividades que se sobrelapan, por lo que suele referirse a ellos como un solo complejo. Ambos carecen del factor TBP y contienen diversos factores de transcripción como la histona acetiltransferasa Gcn5, proteínas SPT, factores de asociación TBP (TAFs) y dominios de asociación TRRAP. El complejo TFTC/STAGA puede promover la transcripción a través de la remodelación de la cromatina por acetilación de histonas y reclutamiento del complejo de preiniciación a sitios promotores. Este complejo también se ha asociado con el *splicing* y la reparación del DNA (Ström *et al.*, 2005).

Se ha identificado un dominio de unión a zinc en la ataxina-7 el cual parece ser suficiente para interactuar con las subunidades del complejo TFTC/STAGA (Helmlinger *et al.*, 2004). Estudios *in vitro* revelan la interacción directa entre la ataxina-7 y Gcn5 asociada a la acetilación de la histona H3 (*Figura 4*) (Palhan *et al.*, 2005). La interacción de STAGA con Ataxina-7-92Q propicia una reducción en la incorporación de factores como ADA2b, SPT3 y TAF12 y a su vez la desregulación de la expresión de genes (Palhan *et al.*, 2005). Un estudio sugirió que ataxina-7 es capaz de trasladarse desde el núcleo al citoplasma por medio de una señal conservada de exporte nuclear (Taylor *et al.*, 2006), sugiriendo funciones citoplásmicas de ataxina-7, así como un mecanismo de regulación de

la actividad del complejo TF/STAGA mediante el control de su localización subcelular (McMahon, 2005) (Helmlinger, Tora, & Devys, 2006).

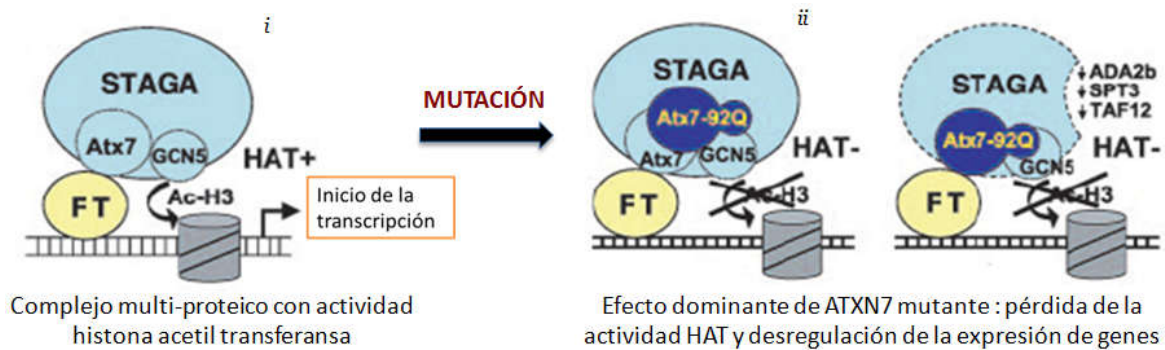


Figura 4. Complejo STAGA y la función de ataxina-7. (i) La ataxina-7 (Atx7) unida a Gcn5 en el complejo STAGA media la acetilación de la histona H3 a través de la interacción con un sitio de unión a factores de transcripción (TF) como CRX. (ii) Por su parte, la ataxina-7 mutante (Atx7-92Q) tiene un efecto dominante negativo sobre Gcn5 inhibiendo la acetilación de la histona H3 (Modificado de Palhan et al., 2005).

1.2.4 MECANISMOS DE PATOGÉNESIS

Los mecanismos moleculares de patogénesis de la SCA7 que subyacen a la neurodegeneración no se conocen con precisión. Diversos estudios han asociado la pérdida neuronal y el proceso neurodegenerativo en pacientes con SCA7 con la interferencia de la regulación transcripcional generada por la proteína mutada, así como con fenómenos de agregación y degradación de proteínas, con alteraciones en el sistema ubiquitin proteosoma y en la homeostasis de calcio (Baber & Haghghat, 2010). La incorporación del tracto polyQ en la proteína de ataxina-7 produce la pérdida de varias subunidades en el complejo STAGA y la interrupción de la actividad acetil transferasa sobre el nucleosoma (Figura 4) (McMahon, 2005). Muchos estudios han descrito el efecto de la expresión de polyQ de ataxina-7 sobre la regulación de diversos genes individuales, sin embargo el impacto de estos repetidos sobre la expresión global de genes en células específicas ha sido poco examinado (McCullough et al., 2012). Se ha demostrado que ataxina-7

puede reprimir la actividad transcripcional mediada por CBP así como mediar la expresión nuclear del receptor RORa1 en células de Purkinje (Ström *et al.*, 2005).

Para profundizar en el estudio de las funciones de ataxina-7 se han generado varios modelos animales. Existen ratones transgénicos que expresan ataxina-7 humana (silvestre y mutante) en células de Purkinje o en fotorreceptores de retina en los cuales se han utilizado construcciones con promotores tejido específicos. Las consecuencias fisiológicas debidas a la expresión de ataxina-7 mutante varían en el grado de deficiencia motora y visual (Yvert *et al.*, 2000).

En un ratón transgénico que expresa ataxina-7 con 92 repetidos de glutaminas a lo largo del sistema nervioso se determinó que ataxina-7 interacciona con el factor de transcripción nuclear CRX el cual se encuentra predominantemente expresado en los fotorreceptores. Se observó que la ataxina-7 mutante ocupaba la misma región, tanto a nivel promotor y en “*enhancer*”, de los genes que regulan la expresión de *CRX in vivo*, lo cual sugirió que la desregulación transcripcional podría ser un mecanismo responsable de la distrofia y la degeneración retinal (La Spada *et al.*, 2001).

En la *Figura 5* se esquematiza el mecanismo potencial por el cual la ataxina-7 mutante induce toxicidad en los fotorreceptores de bastones en la retina. Se muestra como el complejo TFTC/STAGA que contiene ataxina-7 normal actúa como un coactivador transcripcional de genes. Por su parte, en presencia de la ataxina-7 mutante con repetidos polyQ ocurre una “dilución” de factores de transcripción, la cual afecta principalmente la expresión de los genes fuertemente expresados en este tipo de células. La incorporación de repetidos polyQ en la ataxina-7 del complejo TFTC/STAGA produce una desregulación de su reclutamiento alrededor de grandes regiones genómicas. Esta desregulación induce la hiperacetilación de la histona H3, descondensación de la cromatina y “dilución” de la maquinaria transcripcional debido al incremento del volumen nuclear (Helmlinger *et al.*, 2006).

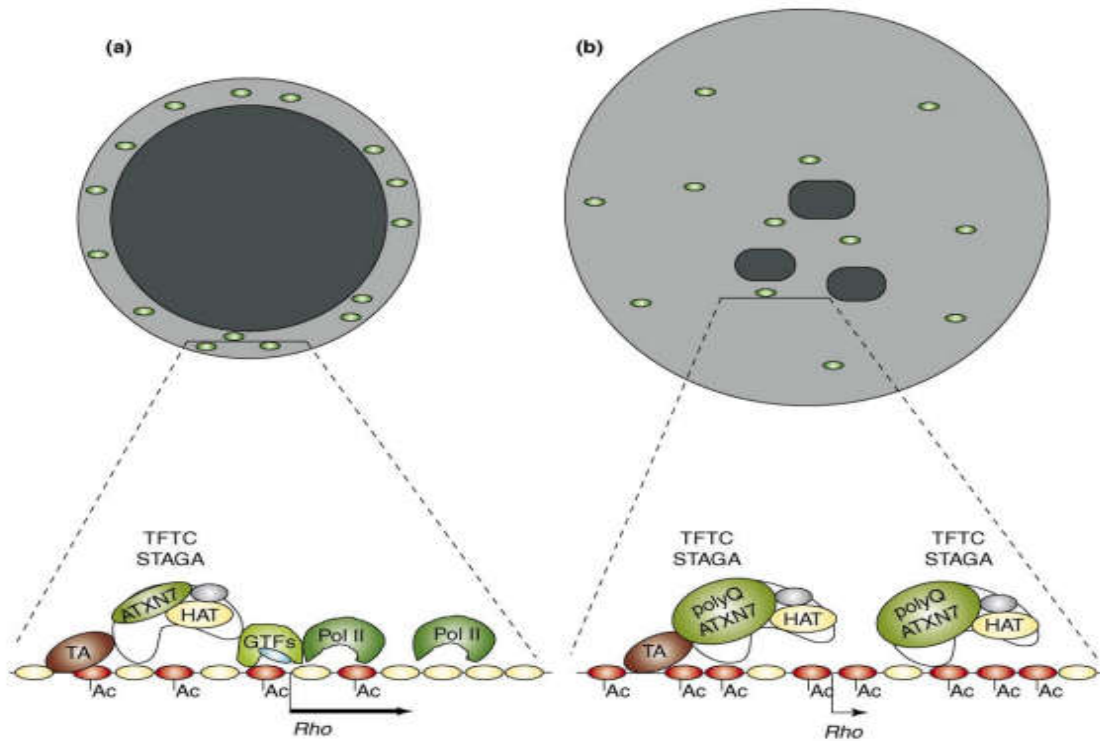


Figura 5.- Mecanismo potencial por el cual la ataxina-7 mutante induce toxicidad en los fotoreceptores tipo bastón. (a) En condiciones normales, en el núcleo de los bastones en la retina los genes están fuertemente expresados y localizados en el pequeño compartimiento de la periferia de la cromatina (gris claro), mientras que los genes no expresados y los housekeeping se encuentran en la región central de la heterocromatina (gris oscuro). La concentración de factores de transcripción específicos y generales (óvalos verdes) en la euromatina propicia una fuerte y restringida expresión de genes específicos de bastones como rhodopsina (*Rho*). (b) En la SCA7, la ataxina-7 mutante induce una severa descondensación de heterocromatina por aumento en el reclutamiento del complejo STAGA, lo cual incrementa a su vez el volumen nuclear en los bastones con un efecto final en la expresión de genes específicos como *Rho*. Modificado de (Helmlinger et al., 2006).

Se ha observado que en el tejido afectado se puede provocar daño celular que eventualmente conduce a la disfunción y muerte a través de la activación de una o varias vías apoptóticas. (Lipinski and Yuan, 2004)(Dueñas et al., 2006). En la SCA7, la muerte celular es precedida en las neuronas por el reclutamiento de caspasas en los agregados de polyQ. Este proceso es seguido por la activación de las caspasas 3 y 9 así como la activación de vías apoptóticas mitocondriales mediadas por miembros de la familia Bcl-2, tales como Bax y Bclx. En esta

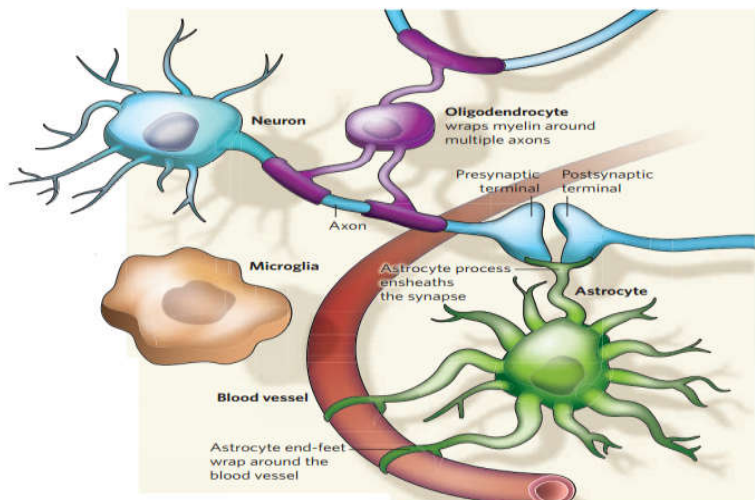
activación se han descrito componentes claves que regulan la liberación mitocondrial de citocromo c y Smac/DIABLO (Dueñas et al., 2006).

En presencia de ataxina-7 mutante se induce la translocación de citocromo c y Smac/DIABLO al citosol, proceso precedido por la activación de las caspasas 9 y 3. Por otro lado las vías pro apoptóticas podrían ser activadas por el desplazamiento de los factores nocivos secuestrados por poliglutaminas expandidas o a través de mecanismos no conocidos de activación de caspasas (Dueñas et al., 2006). Estos mecanismos de toxicidad sin embargo no explican del todo la vulnerabilidad diferencial en los distintos tipos de células y regiones cerebrales.

1.3 FUNCIONES DE LA GLÍA EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

La glía está compuesta por un conjunto de células especializadas que se diferencian de las neuronas por su incapacidad para transmitir señales eléctricas rápidas. En los mamíferos la glía se divide en tres linajes celulares de acuerdo a su función; la microglía, los oligodendrocitos y los astrocitos (*Figura 6*) (Allen & Barres, 2009).

Figura 6.- Interacción neurona-glia: Diferentes tipos de glía interactúan con neuronas y los vasos sanguíneos que las rodean. Modificada de (Allen & Barres, 2009).



Estas unidades celulares desempeñan distintas funciones, entre las que destaca el papel de soporte para la neurotransmisión, mantenimiento del balance iónico en

el espacio extracelular y el aislamiento de axones para aumentar la velocidad de la comunicación eléctrica (Allen & Barres, 2009). Los oligodendrocitos participan en la producción de la mielina que envuelve a los axones, lo cual permite el aumento de la velocidad de las señales transmitidas entre las neuronas entre la zona presináptica y la zona postsináptica. Los astrocitos involucran a los vasos sanguíneos en sus procesos sinápticos. La microglía es considerada como el sistema inmune residente del sistema nervioso, dado que interviene en la reparación por daño mecánico y por infección. También se ha visto implicada durante el remodelamiento sináptico en el desarrollo del sistema nervioso, así como en la remoción de sinapsis inapropiadas mediante procesos de fagocitosis (Allen & Barres, 2009).

1.3.1 PAPEL DE LOS ASTROCITOS

Los astrocitos participan en la homeostasis del sistema nervioso, generando el suministro de energía y actuando como sustrato de neurotransmisores. Los astrocitos funcionan como una barrera física entre los espacios de conexiones sinápticas de los vecindarios neuronales y ayudan a remover el exceso de neurotransmisores del espacio extracelular permitiendo el refinamiento de la transmisión de un mensaje (Allen, N. J. & Barres, B. A, 2005).

Recientemente los astrocitos se han visto involucrados en la modulación de la función sináptica a través de la comunicación bidireccional de las neuronas. En respuesta a la actividad neuronal, los astrocitos envían señales a los vasos sanguíneos para aumentar el flujo sanguíneo en las regiones específicas que lo requieren, lo que resulta en una mayor entrega de oxígeno y glucosa en las regiones del cerebro activo. Además de regular el flujo de sangre, los astrocitos transportan la glucosa y el oxígeno de la sangre a las neuronas. Se plantea la hipótesis de que convierten la glucosa en lactato el cual se exporta a las neuronas, donde se convierte en piruvato para producir ATP. Los astrocitos también son responsables de regular el efecto de los neurotransmisores secretados por las

neuronas y mediando su reciclamiento en un proceso regulado por el ciclo del glutamato-glutamina (Haydon, P. G. & Carmignoto, G., 2006).

1.3.2 PAPEL DE LA GLÍA EN LA ENFERMEDAD

La comunicación entre los astrocitos y las neuronas es muy importante para la función neuronal. Esta relación se ha explicado mediante el modelo del “sistema tripartita” de comunicación intercelular entre astrocitos y neuronas (*Figura 7*). El sistema involucra a dos terminales, una presináptica y otra postsináptica de dos neuronas diferentes, conectadas entre sí por un astrocito. Los astrocitos tienen la capacidad de modular la actividad neuronal, ya sea excitando o inhibiendo la transmisión sináptica (Koizumi, Fujishita, & Inoue, 2005). Debido a que los astrocitos expresan muchos de los receptores que expresan las neuronas, cuando un neurotransmisor es liberado de la terminal presináptica de una neurona, los receptores en los astrocitos son activados dando lugar a un aumento en las concentraciones intracelulares de calcio y la liberación de diversas sustancias activas (Allen & Barres, 2009). De esta manera los astrocitos controlan la formación de sinapsis, regulan la función presináptica y modulan la liberación de neurotransmisores en las neuronas postsinápticas (Allen & Barres, 2009). Esta comunicación tripartita es bidireccional, existe intercambio de información entre ambos elementos neuronales pre y postsinápticos con los astrocitos (Perea & Araque, 2005).

Esta comunicación tripartita, pierde su control en los desórdenes del sistema nervioso. En la esclerosis lateral amiotrófica, por ejemplo, los astrocitos secretan factores tóxicos de neuronas motoras. Después de una lesión de la médula espinal, los astrocitos forman una cicatriz glial que actúa como una barrera para la regeneración de los axones dañados. En ocasiones, los astrocitos pueden volverse cancerosos y pueden dar lugar a la formación de gliomas. (Allen & Barres, 2009). La relación entre las células de Purkinje y la glía de Bergmann en el cerebelo se ha considerado de particular importancia para explicar la progresión

de distintas enfermedades neurodegenerativas. Mientras las neuronas de Purkinje reciben impulsos glutamatérgicos de los axones provenientes del olivo inferior y de células granulosas del cerebelo, la glía de Bergmann remueve el exceso de glutamato de las sinapsis de las células de Purkinje y secreta factores neurotróficos que a la vez les da soporte. Las células de la oliva inferior producen IGF-1 para promover la supervivencia de las neuronas de Purkinje y a su vez la expresión de GLAST en la glía de Bergmann (Furrer et al., 2011).

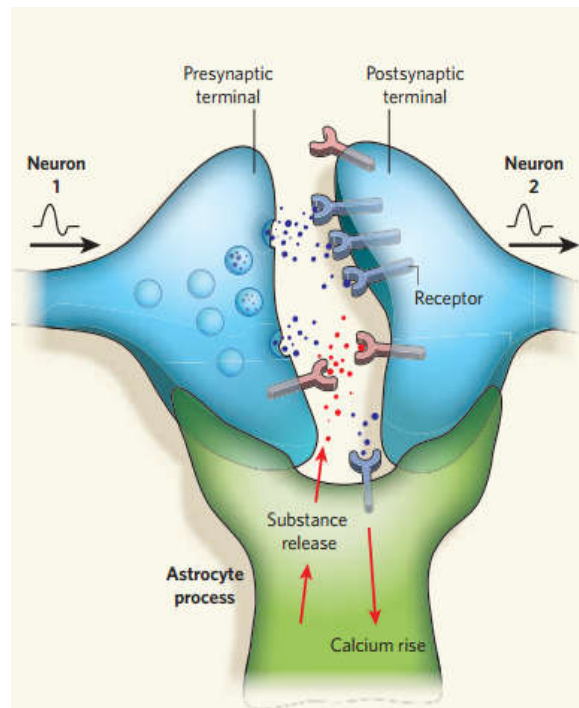


Figura 7.- Esquema del sistema tripartito. Se ejemplifica la liberación de una sustancia x por parte del astrocito, dado un estímulo inducido por la liberación de calcio de una neurona presináptica. Se observa como esta sustancia x es captada por los receptores tanto presinápticos como postsinápticos de las neuronas. Azul: neuronas, verde: astrocito. Modificado de (Allen & Barres, 2009).

1.3.3 LAS CÉLULAS MIO-M1

Las células de Müller son astrocitos de glía radial que se extienden verticalmente en toda la retina con sus núcleos situados en el centro de la capa nuclear interna. Estas células constituyen la principal población de células gliales en la retina y tienen la capacidad de realizar funciones que los astrocitos, los oligodendrocitos y las células endoteliales realizan en otras regiones del sistema nervioso central. Las células de Müller y las células neuronales comparten un progenitor pluripotencial en común (Lawrence et al., 2007). La glía de Müller estabiliza además la arquitectura del complejo retinal, proporciona un andamio de orientación; dan soporte estructural y metabólico a las neuronas de la retina y los vasos sanguíneos, y evita la migración de los fotorreceptores aberrantes en el espacio subretinal. *In vitro*, las células de Müller promueven el crecimiento de neuritas tipo bastón, expresan además varios receptores de neurotransmisores, incluyendo el receptor de ácido aminobutírico tipo B (GABA B) y varios tipos de transportadores de glutamato, que facilitan la captación de glutamato para mantener su concentración extracelular debajo de los niveles neurotóxicos. Las células de Müller también expresan glutamina sintetasa, una enzima que participa en la desintoxicación de amoníaco y glutamato que opera en conjunto con transportador L-glutamato-L-aspartato (GLAST). (Lawrence et al., 2007).

Se piensa que las células de Müller desempeñan un papel importante en los procesos patológicos de la curación de heridas y neovascularización de la retina. La proliferación masiva de las células locales de Müller es una característica clave de los trastornos degenerativos de la retina. Estas células se encuentran en el lumen ocluido de los capilares de la retina durante la oclusión venosa de la retina y exhiben profundos cambios en la expresión de moléculas reactivas constitutivas e inducibles durante los procesos de enfermedad.

La alteración en el comportamiento de las células de Müller y el cambio en el fenotipo se ven a menudo en modelos animales de proliferación de retina. Se han

observado profundos cambios en la retina de pacientes con diversos trastornos, incluyendo vitreorretinopatía proliferativa, retinopatía diabética proliferativa, agujeros maculares y pliegue macular, así como distrofias maculares hereditarias. La elucidación de los mecanismos que conducen al desarrollo de la enfermedad de la retina, podrían ayudar a una mejor comprensión de los procesos celulares que preceden a los cambios patológicos.

Las células de Müller cuentan con características fenotípicas distintivas, incluyendo la presencia de gránulos de glucógeno intracelulares, la expresión del factor de crecimiento ependimal (EGF-R), la expresión de cimentina – una proteína de unión a retinaldehído celular (CRALBP)- y la expresión de glutamato sintetasa. Estas células también expresan al transportador de glutamato GLAST y se despolarizan en respuesta a L-glutamato sin cambios de resistencia en la membrana, consistentes con la absorción electrogénica de este aminoácido.

Las células MIO-M1 constituyen un tipo de células de glía de Müller humana inmortalizada (Lawrence et al., 2007). Esta es una línea celular ampliamente utilizada como sistema modelo para estudiar enfermedades neurodegenerativas dado que en ellas es posible evaluar características fisiológicas de los astrocitos. (Limb et al., 2001) (Da Silva et al., 2015).

2. ANTECEDENTES DIRECTOS

2.1 ALTERACIONES DE LA GLÍA EN LA SCA7

Si bien aún se desconocen todos los mecanismos específicos involucrados en la SCA7, se sabe que una de las células más afectadas en esta patología son las neuronas de Purkinje del cerebelo. Estas células están íntimamente ligadas a sus células vecinas no neuronales, las células gliales de Bergmann, que son astrocitos especializados del cerebelo. La glía de Bergmann utiliza estructuras “similares a dedos largos” para envolver los enormes árboles de dendritas de las células de Purkinje (Lobsiger & Cleveland, 2007). Estudios iniciales en ratones transgénicos han demostrado que la ataxia puede ser inducida mediante la expresión generalizada de ataxina-7 mutante en el sistema nervioso del ratón. En ellos se produjo una ataxia leve y cuadros de neurodegeneración en edades avanzadas (Yvert *et al.*, 2000). En otro modelo, se usó un promotor de prion de ratón (PrP) para expresar ataxina-7 en todo el sistema nervioso. Se detectó la expresión de ataxina-7 con repetidos expandidos polyQ a lo largo del sistema nervioso pero no en células de Purkinje. El ratón desarrolló ataxia y permitió documentar el papel de la degeneración de células de Purkinje independientemente de la expresión en estas células de la proteína ataxina-7 mutante (*Figuras 8 y 9*) (Garden, Libby, & Fu, 2002).

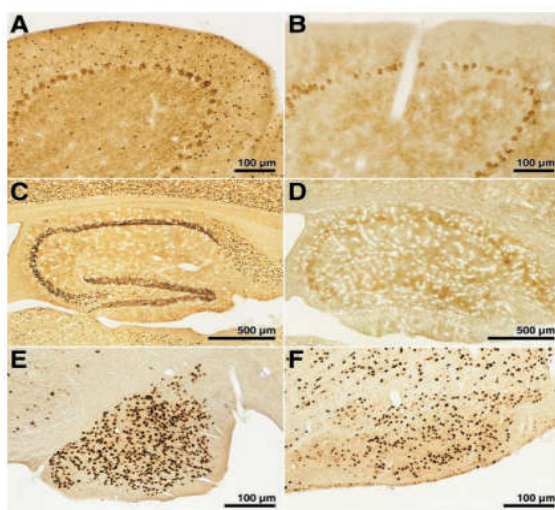


Figura 8.- Inmunohistoquímica de secciones de SNC en un ratón transgénico para ataxina-7 mutante (PrP-SCA7-c92Q). (A) tinción nuclear puntiforme intensa de las neuronas en la capa granular y molecular de PrP-SCA7-c92Q. (B) control 24Q. (C) Hipocampo de PrP-SCA7-c92Q. (D) hipocampo de ratón control c24Q. (E) base pontiana y olivo inferior de ratón c92Q (f) expresión de ataxia en PrP-SCA7-92Q Modificado de (Gwenn A. Garden, 2002).

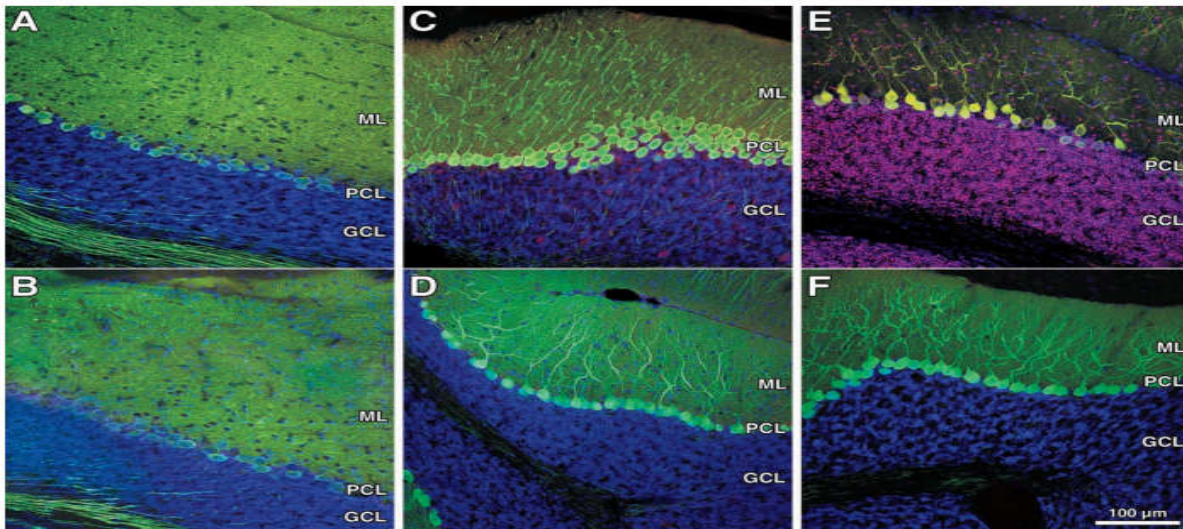


Figura 9.- Inmunohistoquímica de un ratón transgénico para SCA7 (PrP-SCA7-c92Q) a las 4, 8 y 13 semanas de edad. (A) Expresión de PrP-SCA7-c92Q a las 4 semanas, no muestra diferencias respecto al ratón control (B). (C) Expresión de PrP-SCA7-c92Q a las 8 semanas. El tejido muestra pérdida sustancial de dendritas en la capa molecular del cerebelo, inmunoreactividad de células granulares y pérdida de neuronas en la lámina media respecto al ratón control (D). (E) Expresión de PrP-SCA7-c92Q a las 13 semanas. (F) control 13 semanas. Calbindina: CP-verde; DAPI: núcleo, azul; anti-k: ataxina-7, magenta. Modificado de (Gwenn A. Garden, 2002).

Estudios posteriores evaluaron si la ataxina-7 mutante expresada sólo en células gliales era suficiente para inducir la toxicidad en células de Purkinje. En este nuevo modelo (ratón *Gfa2-SCA7 92Q*) se observó que la ataxina-7 mutante causaba degeneración de las neuronas de Purkinje (Figuras 10 y 11) y ataxia sin déficits neurológicos adicionales. Con ello se demostró que la toxicidad puede originarse únicamente a partir de la expresión de ataxina-7 mutante en células gliales de Bergmann en el cerebelo (Custer et al., 2006). En tejido post-mortem de pacientes con SCA7 se ha detectado la expresión tanto en las células neuronales como en la glía de Bergmann de la proteína mutante (Lobsiger & Cleveland, 2007).

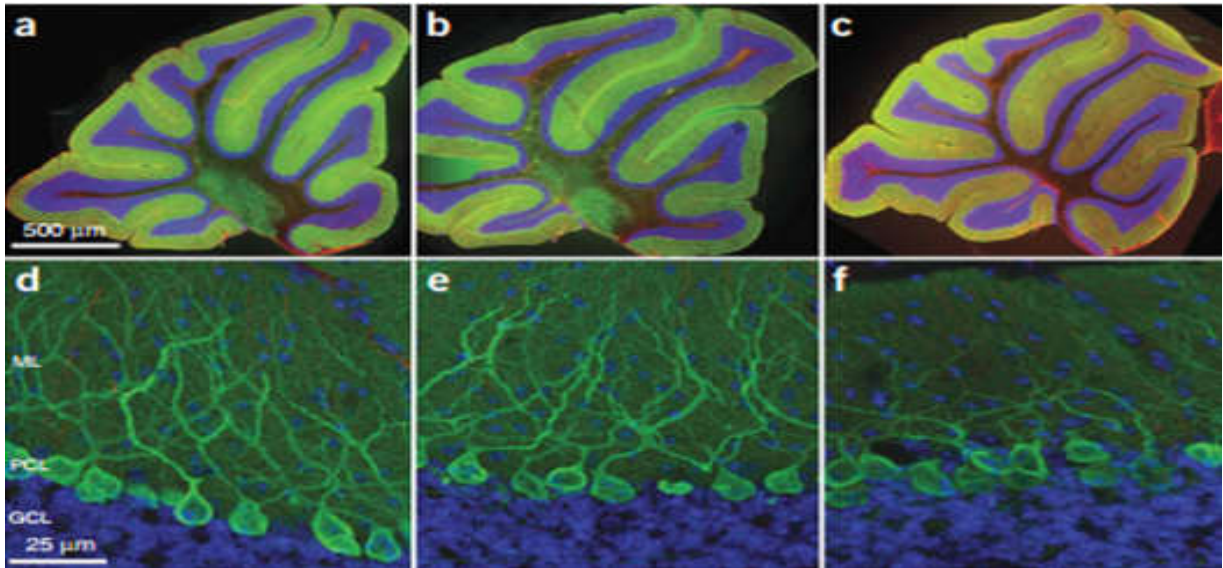


Figura 10.- Degradación de células de Purkinje en un ratón transgénico Gfa2-SCA7 92Q. Se muestra un ensayo de inmunohistoquímica de cortes de cerebelo de ratones de 40 semanas. a) ratón no transgénico, b) ratón transgénico para ataxina-7 con 10 repetidos, Gfa2-SCA7-10Q., c) ratón transgénico para ataxina mutante, Gfa2-SCA7-92Q. (d-f) imágenes con mayor definición. d) niveles normales de CP y dendritas en ratón no transgénico y en ratón transgénico Gfa2-SCA7-10Q. f) ratón transgénico Gfa2-SCA7-92Q muestra atrofia y disminución de células de Purkinje en la capa molecular, así como una ocasional desorientación de los cuerpos de las células de Purkinje. Calbindina: CP, verde; GFAP: CG, rojo; DAPI: núcleo, azul. Modificado de (Custer et al., 2006).

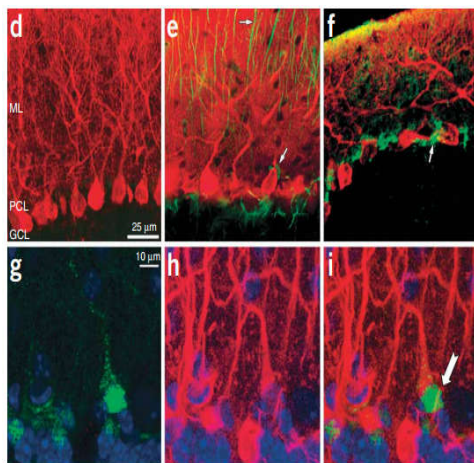
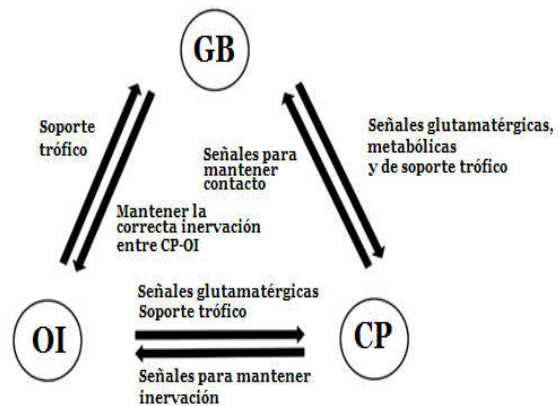


Figura 11.- Efectos de la expresión de ataxina-7 mutante en un ratón transgénico para Gfa2-SCA7. Inmunohistoquímica de secciones de cerebelo de ratones de 12 meses de edad. Calbindina: CP, rojo; Ataxina-7, verde. d) ratón no transgénico. e) Gfa2-SCA7-10Q con anatomía normal. La ataxina-7 fue expresada en GB (flechas blancas). f) Gfa2-SCA7-92Q con acumulación de ataxina-7 mutante (flechas blancas). (g-i) secciones de cerebelo de Gfa2-SCA7-92Q de 12 meses de edad. Expandidos polyQ (verde), anti-GFAP (rojo), DAPI (azul). g) Colocalización de GB y tinción de núcleo. h) Inmunotinción con GFAP de cuerpos celulares de GB y fibras. i) imágenes g y h fusionadas confirmaron que dada la presencia de los repetidos polyQ, la ataxina-7 se acumula en el cuerpo celular y en el núcleo de las GB (flecha). Modificado de (Custer et al., 2006).

En un trabajo posterior, se generó un modelo murino con expresión de ataxina-7 mutante espacial y temporalmente regulada a través de la recombinasa Cre (Furrer *et al.*, 2011). El estudio confirmó que las células gliales tienen una fuerte influencia sobre la toxicidad que la ataxina-7 mutante genera sobre las células de Purkinje en el cerebelo. Adicionalmente este estudio demostró que la expresión de ataxina-7 mutante en células de Purkinje y en el núcleo olivar inferior, pero no en la glía de Bergman produce la pérdida de procesos gliales; indicando que la glía de Bergmann, las neuronas de Purkinje y el núcleo olivar inferior interactúan estrechamente. De esta manera, durante la patogénesis de la SCA7, la disfunción de un tipo celular tiene un impacto sobre otros tipos celulares produciendo una inapropiada señalización, daño celular y propagación de alteraciones a otros tipos de células interconectadas (Figura 12).

Figura 12.- Conexiones entre glía de Bergmann (GB), neuronas de Purkinje (CP) y oliva interior (OI) dan cuenta del múltiple origen celular de la neurodegeneración en la SCA7. GB, CPs y OI participan en interacciones bilaterales para producir una red neuronal-glía interdependiente en la cual, la función y supervivencia de todos los tipos de células están relacionados entre sí. Tomado de (Furrer *et al.*, 2011)



Pocos estudios han profundizado en los mecanismos involucrados en la patogénesis de la SCA7 en células gliales. Un trabajo realizado en cultivos primarios de astrocitos humanos, describió como la expresión de ataxina-7 con repetidos expandidos polyQ disminuye la expresión de reelina (McCullough *et al.*, 2012). La reelina es una proteína con un papel importante en el mantenimiento de la capa de células de Purkinje cerebelosas y en las conexiones sinápticas en la retina, así como en la modulación de la actividad de los receptores de glutamato, y en la regulación de la plasticidad de la sinapsis (Figura 13).

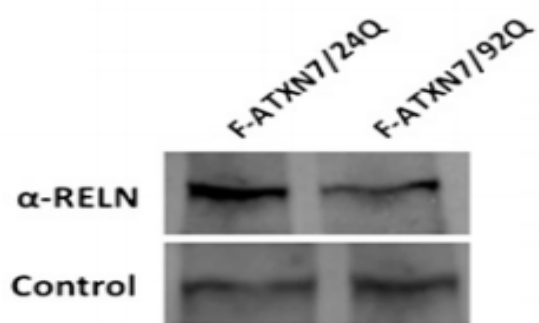


Figura 13.- *Inmunoblot donde se demuestra que la expresión de repetidos expandidos polyQ de ataxina-7 disminuye la expresión de la reelina. Se hace la comparación entre células con 24 repetidos (control) y células con 92 repetidos polyQ. Modificado de (McCullough et al., 2012).*

4. JUSTIFICACIÓN

Los mecanismos moleculares de patogénesis responsables de la SCA7 así como la participación de las células gliales no se conocen con exactitud. Por lo tanto, es importante desarrollar un modelo de expresión de ataxina-7 basado en células gliales para el estudio los mecanismos de patogénesis asociados a la SCA7.

5. HIPÓTESIS

El sistema de expresión Tet-On 3G permitirá generar un modelo de expresión inducible para SCA7 en la línea celular de astrocitos MIO-M1, lo cual permitirá en un futuro, evaluar la participación de los astrocitos en la patogénesis de la enfermedad.

6. OBJETIVOS

6.1 GENERAL

Generar y caracterizar un modelo celular con expresión inducible de ataxina-7 en la línea celular de astrocitos MIO-M1.

6.1.2 PARTICULARES

- 1.-Clonar el gen de ataxina-7 en el vector pTRE3G-myc.
- 2.-Realizar una transfección estable de la construcción generada empleando el sistema de expresión inducible Tet-On 3G.
- 3.-Caracterizar el modelo celular generado.

7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para cubrir el objetivo 1, la estrategia experimental general consistió en la clonación del gen *ATXN7* a partir de RNA de linfocitos de sangre periférica de individuos sanos (con 10 repetidos CAG) y pacientes con SCA7 (53 repetidos CAG). Mediante la técnica de RT-PCR se realizó la amplificación de la región codificante de *ATXN7* y se clonó en el plásmido pTRE3G-Myc. Se transformaron bacterias *E. coli* de las cepas SURE2 y se caracterizaron clones por digestión enzimática y secuenciación (Figura 14).

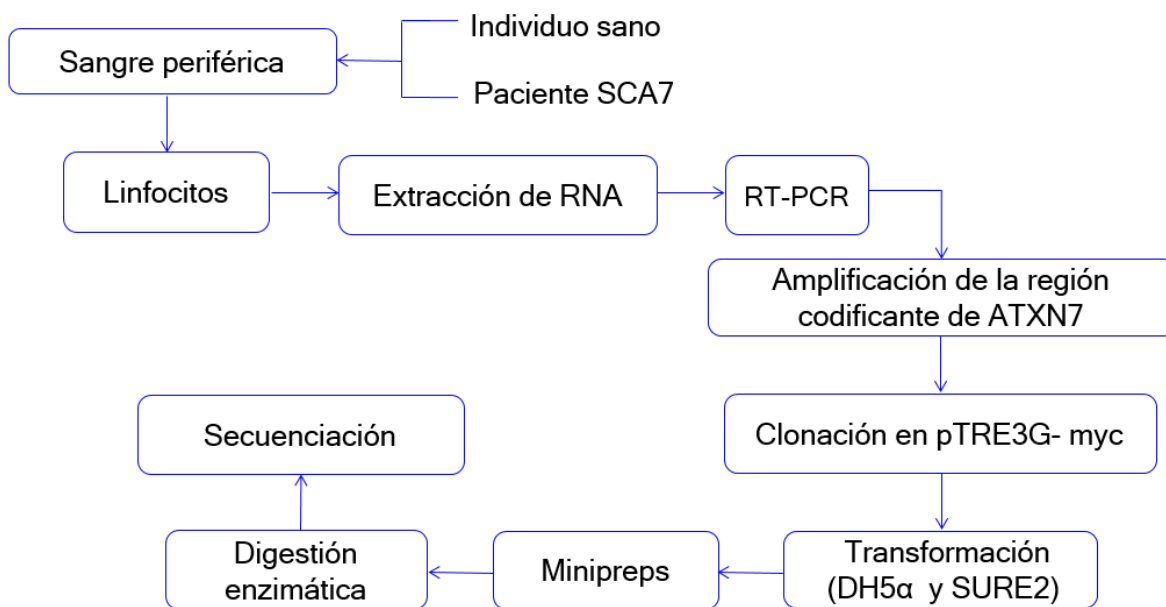


Figura 14.- Estrategia para la clonación del gen en el vector pTRE3G-myc.

Para cubrir el objetivo 2 la estrategia experimental consistió en el uso del sistema de expresión inducible Tet-On (Clontech). El sistema está basado en la expresión constitutiva de una proteína transactivadora (rtTA) y en un plásmido de respuesta (pTRE3G-myc) que expresa el gen de interés bajo el control de un elemento de respuesta a tetraciclina (TRE) o un análogo como la doxiciclina y una bandera de c.myc. Cuando la proteína rtTA se une a doxiciclina experimenta un cambio conformacional que le permite unirse específicamente al elemento TRE en el

promotor y activar la transcripción del gen clonado (*ATXN7*) en el plásmido pTRE3G-myc (Figura 15). Se realizó la transfección de las construcciones de interés (pTRE3G-Myc-ataxina-7CAG10/CAG40-60) en las células MIO-M1 que expresaron de manera estable la proteína transactivadora (Figura 15).

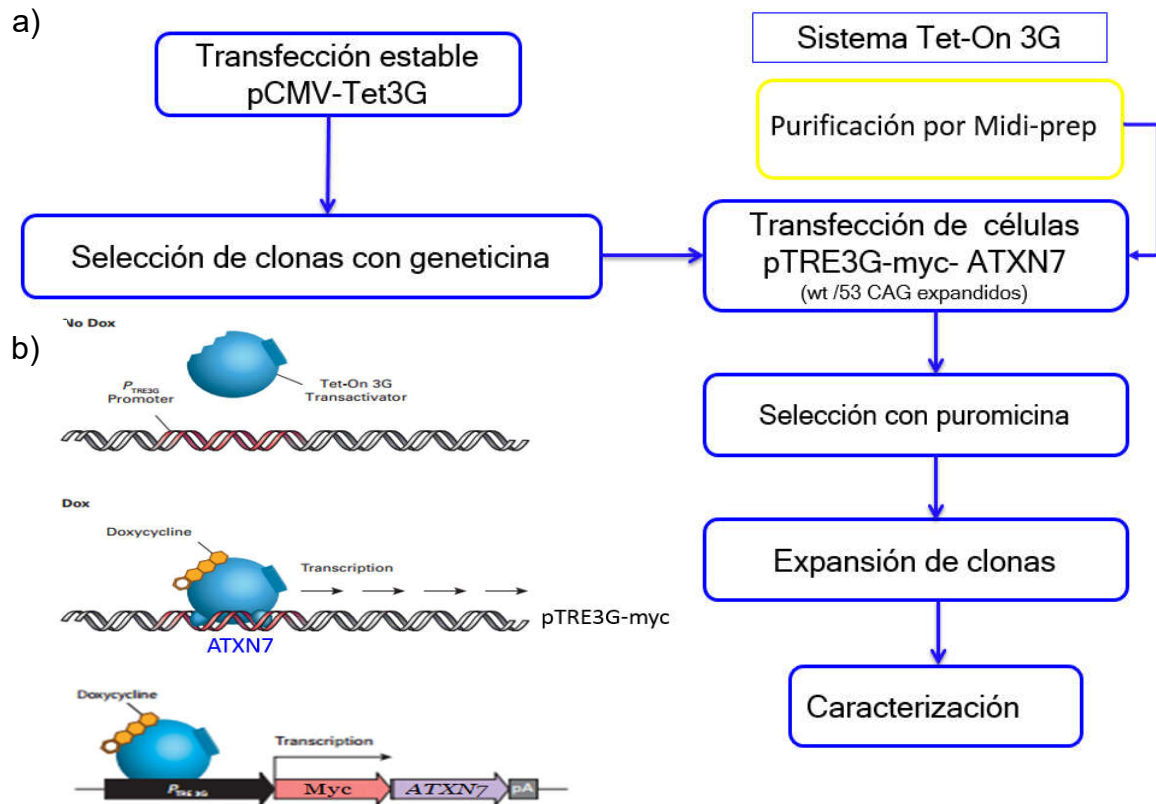


Figura 15.- a) Estrategia para la transfección estable de las construcciones generadas en el sistema Tet-On 3G. b) Los sistemas Tet-On 3G permiten la expresión inducible de un gen en presencia de doxiciclina.

Para cubrir el objetivo 3 la estrategia consistió en la determinación de la expresión de ataxina exógena en presencia y ausencia de doxiciclina mediante RT-PCR y ensayos de WB con un anticuerpo anti-myc. (Figura 16).

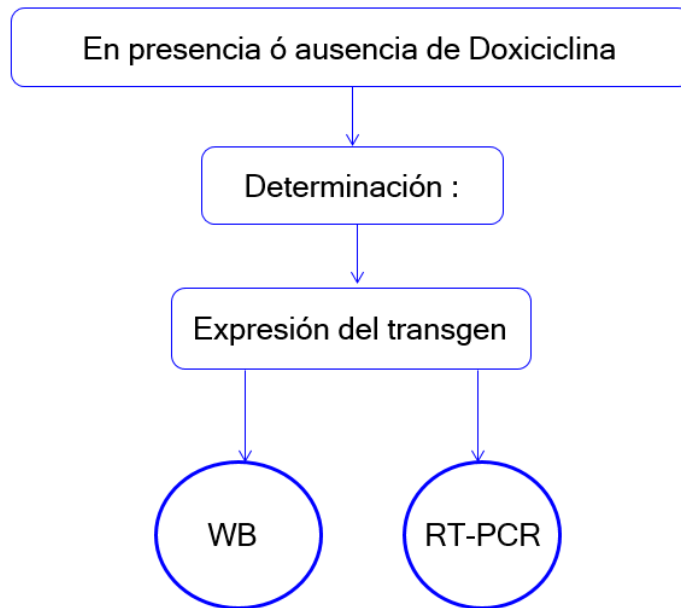


Figura 16.- **Caracterización del modelo celular inducible generado.** Cada una de las determinaciones se realizara para un grupo de células MIO-M1 transfectadas, ya sea inducidas o no inducidas con doxiciclina.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL

Se utilizó el protocolo estándar para extracción de RNA con el reactivo de TRIzol Reagent (Invitrogen). Se extrajeron linfocitos de sangre periférica mediante gradiente de Ficoll de individuos sanos con 10 repetidos CAG en el gen *ATXN7*. Los linfocitos se lavaron dos veces con PBS y la pastilla se resuspendió en 0.75 ml de reactivo de TRIzol® Reagent. Posteriormente las muestras se homogenizaron y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 200 µl de cloroformo y luego se incubó a temperatura ambiente por 3 minutos, las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm 15 min a 4° C para recuperar la fase acuosa. El RNA se precipitó con isopropanol y se lavó con etanol al 75 %. Finalmente el RNA se resuspendió en 50µl de agua estéril tratada con dietilpircarbonato (DEPC) y se almacenó en alícuotas a -80° C. El análisis cuantitativo del RNA extraído se evaluó mediante la medición de la absorbancia a 260-280 nm. La calidad del RNA extraído se monitoreo mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% con tinción con bromuro de etidio.

8.2 SÍNTESIS DE CDNA

La síntesis de cDNA se realizó con el kit *SuperScrip III RT* de la marca *Invitrogen* (No. de catálogo 18080-051). El protocolo fue el recomendado por el fabricante a partir de una mezcla de 1 µg de RNA, 1 µl de Oligo (dT), 1 µl de dNTPs 10 mM en un volumen de 10 µl de agua destilada MiliQ. La reacción fue incubada por 5 min a 65°C y después en hielo por un min. Posteriormente se añadió un segunda mezcla con 2 µl de buffer RT 10X, 4 µl de MgCl₂ 25mM, 2 µl de DTT al 0.1 M, 40 U de RNasa out y 200 U de polimerasa RT SuperScript III. El control negativo no fue adicionado con la enzima. La síntesis de cDNA se llevó a cabo en un termociclador Veriti de marca Life Technologies por 50 min a 50° C; después de inactivar la enzima por 5 min a 85° C, se añadieron 2U de RNasa H para la

remoción del RNA a 37° C por 20 min. La calidad de los cDNAs se comprobó mediante la amplificación por PCR de una región del gen *GAPDH*.

8.3 REACCIÓN DE PCR

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Veriti (Life Technologies). La amplificación de la secuencia codificante de *ATXN7* se realizó mediante el uso de la enzima Herculasa II Fusion (Agilent technologies) de alta fidelidad y de un par de primers que flanquean la secuencia codificante de *ATXN7* con sitios NheI en sus extremos 5' (Forward: 5'-ccc tcg taa agt cga cTA TGT CGG AGC GGG CCG CGG ATG A-3', Reverso: 5'- cag tta cat tgg atc cCG ATC GAG TCC CTG CAC GGA AAC CG-3'). Se prepararon reacciones con un volumen final de 50 µl conteniendo 70ng de vector por cada 100ng de inserto, 1µl de enzima Herculasa II, dNTPs 400µM de cada uno, 0.25 µM de cada primer y DMSO al 8%. Los parámetros de reacción fueron los siguientes: desnaturalización inicial a 96° C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos consistentes en desnaturalización a 96° C por 30 segundos, alineamiento a 66° C por 30 segundos y polimerización a 68° C por 3 minutos, con un paso de extensión final de 68°C durante 10 minutos. Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 1 % teñidos con bromuro de etidio. Para las reacciones de PCR de *GAPDH* la secuencia de los primers fue: forward 5'- TGA TGA CAT CAA GAA GGT GGT GAA-3', reverso 5'-TCC TTG GAG GCC ATG TGG GCC AT-3' y para la detección del mensajero de *ATXN7* los oligos fueron forward 5'-ATC CAG CAG AAG CTG ATC TCA -3', reverso 5'-GCT GCT GCT GCC GGG CGG CC-3'.

8.4 PURIFICACIÓN DE DNA A PARTIR DE GEL DE AGAROSA

Los fragmentos de DNA necesarios para las reacciones subsecuentes de ligación fueron obtenidos a partir de geles de agarosa al 1% teñidos con de bromuro de etidio (5µg/ml). Los fragmentos de interés fueron cortados sobre un transiluminador de luz UV y colocados en un tubo de 1.5 ml. El DNA fue purificado con el kit de extracción PureLink invitrogen (No. De catálogo K2100-12). Las bandas de los geles fueron solubilizadas en Buffer L3 (1.2ml/0.4 µg de muestra) y colocadas en un *Termoblock* a 50° C por 15 minutos. La mezcla fue colocada en una columna de purificación y centrifugada a 12000 rpm por 1 minuto. Posteriormente, la columna se lavó con 500 µl de buffer W1 y se dejó reposar por 2 minutos. Se volvió a centrifugar a 12000 rpm por 1 minuto. El DNA fue recuperado con 30 µl de buffer de elución E5 y cuantificado en un NanoDrop.

8.5 RESTRICCIÓN DE DNA

La caracterización de los plásmidos se realizó mediante digestión enzimática utilizando las enzimas NheI (Thermo Scientific No. De catálogo ER0971) y/o BamHI (Thermo Scientific No. De catálogo ER0051). Se mezclaron 300ng de DNA, 1 µl de Buffer Tango (Tris-acetato 33mM pH 7.9, acetato de magnesio 10 mM, acetato de potasio 66 mM, 0.1 mg/ml de BSA) y 0.5U de la enzima correspondiente. La incubación se realizó por periodos de 15 horas a 37°C seguidas de inactivación por 20 min a 65° C (NheI) y 80° C (Bam HI). Los productos de restricción fueron evaluados por corrimiento electroforético en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio a una concentración de 0.5 µg/ml.

8.6 SISTEMA DE EXPRESIÓN INDUCIBLE

Se utilizó el sistema Tet-On de tercera generación marca Clontech (No. de catálogo 631158) (Figura 17). Los plásmidos fueron amplificados en bacterias competentes DH5- α , purificados y caracterizado por ensayos de doble restricción con EcoR1 y BamH1 como se describió previamente.

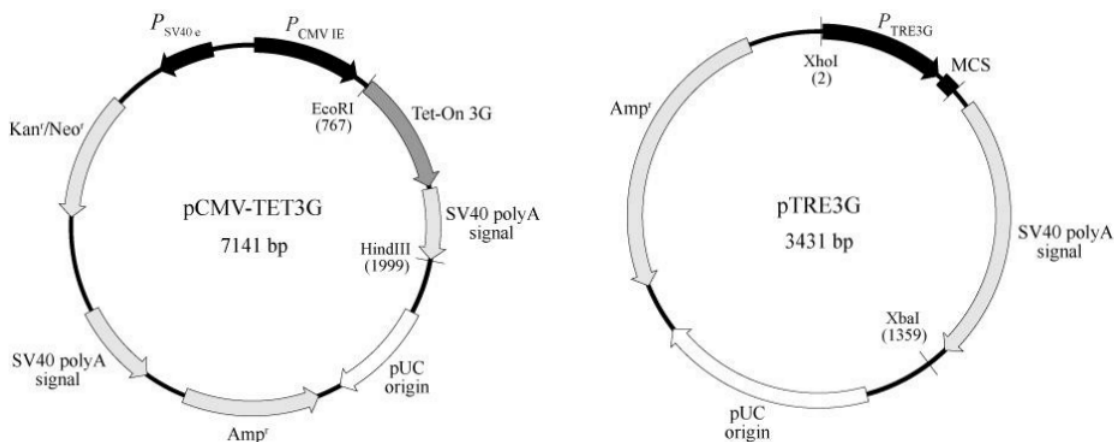


Figura 17.-Vectores del sistema de expresión inducible Tet On. Se muestran las características relevantes de los vectores utilizados del sistema Tet-On de tercera generación: a) plásmido regulador pCMV-Tet3G y b) plásmido responsivo vector pTRE3G.

8.7 LIGACIÓN

La ligación se realizó con la enzima T4 DNA ligasa de Thermo scientific (No. de catálogo #EL001). La reacción consistió en la preparación de una mezcla con 100 ng del vector linearizado y DNA del inserto a una relación molar 1:1, 2 μ l de buffer T4 DNA ligasa (400mM de Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 100mM DTT, 5mM DTT, 5mM ATP, Ph 7.8), 1U de ligasa T4 en un volumen total de 20 μ L. La reacción se incubó a 22° C por 10 minutos.

8.8 PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

Se propagaron cultivos de *E. coli* DH5 α y SURE2 de la marca Stratagene (No. De catálogo 200152) en medio LB hasta una densidad óptica de 0.5 a 590 nm. Las células se centrifugaron a 8000g por 5 min a 4° C y la pastilla se resuspendió en solución TFB1 (acetato de potasio 30mM, KCl 100mM, CaCl₂ 10mM, MnCl₂ 50mM), la mezcla se incubó por 20 minutos en hielo, se centrifugó 5 min a 4° C y la pastilla se resuspendió en 2ml de buffer TFB2 (MOPS 10mM, CaCl₂ 75mM, RbCl₂ 10mM y 15% de glicerol); la mezcla se incubó en hielo por 20 minutos y se finalmente se prepararon alícuotas de 100 μ l y se almacenaron a -70° C.

8.9 TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS

La transformación se llevó a cabo mediante la técnica de choque térmico. Se emplearon células competentes DH5 α o SURE2, las cuales se descongelaron en hielo y se transformaron con 50 ng de DNA plasmídico o con 5 μ l de reacción de ligación. La mezcla se incubó en hielo durante 20 minutos y posteriormente se aplicó un choque térmico consistente en incubación a 42° C por 1.5 min y posteriormente a 4° C. Se agregó 1 ml de medio LB y se incubó a 37° C durante una hora. Finalmente, se sembraron 50 μ l de bacterias en suspensión en cajas Petri con LB y 100 μ g/ml del antibiótico de selección. El resto de la suspensión se centrifugó a 6000 rpm por 5 min, se desechó el medio y se resuspendió en 200 μ l de medio LB. Se sembró el total restante de la reacción en cajas Petri de LB con antibiótico.

8.10 CLONACIÓN

La region codificante de *ATXN7*, obtenida por PCR con primers flanqueados por sitios NheI, se clonó en el vector del sistema Tet-On denominado pTRE3G-Myc. En paralelo, 100 ng de este plásmido fueron digeridos con 10 unidades de la enzimas de restricción NheI y se defosforiló mediante el uso de la fosfatasa alcalina FastAP (Thermo Scientific). Los productos de PCR se purificaron por

columna utilizando el *kit* In-Fusion HD Enzyme Premix (Clontech Laboratories, Inc). Se preparó reacción de ligación como se describió previamente utilizando diferentes relaciones de vector-inserto (1:1, 1:2, 1:3).

8.12 EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO

Se realizó una minipreparación (miniprep) de DNA plasmídico. Para ello se propagó una colonia de células transformadas en 2 ml de medio LB con ampicilina y se incubó 16 horas a 37° C. Se centrifugó a 12000 rpm durante 30 segundos a 4° C. La pastilla se resuspendió en 100 µl de solución Glucosa 50 mM, TrisHCl 25 mM, EDTA 10 mM previamente enfriada en hielo. Después se añadieron 200 µl de solución NaOH 0.2 N, SDS 1% y 150 µl de una solución de Acetato de potasio 5M 60%, ácido acético glacial 12 %. La mezcla se agitó con suavidad y se incubó por 5 min en hielo con agua. Se centrifugó a 12000 rpm a 4° C por 5 min y se agregaron al sobrenadante 2 volúmenes de etanol absoluto. Se mantuvo a temperatura ambiente durante 2 min y se centrifugó a 12000 rpm a 4° C por 5 min. El producto se lavó con etanol al 70 % frío, y se centrifugó a 12000 rpm a 4° C por 3 min. El DNA obtenido fue resuspendido en 30 µl de agua MilliQ, se agregó 1 µl de RNAsa (1 µg/µl) y se incubó a temperatura ambiente por una hora.

Para extracción de DNA a mayor escala se utilizó el kit comercial Midi de purificación de plásmidos de la marca Qiagen (No. De catálogo 12145). En 5 ml de medio LB con ampicilina se inoculo una colonia de bacterias de interés y se incubo por 8 horas a 37° C. El cultivo fue diluido posteriormente 1/500 en 25 ml de medio LB con ampicilina y se dejó creciendo en agitación por 16 horas a 37° C. Transcurrido el tiempo, las bacterias se centrifugaron a 12 000 rpm por 15 minutos a 4° C. La pastilla resultante fue resuspendida en 4ml de buffer P1 (50mM Tris Cl, pH 8.0; 10mM EDTA; 100mg/ml RNAsa A) y se incubo por 5 minutos con 4ml de buffer P2 (200 mM NaOH, 1% SDS), después se añadieron 4ml de buffer P3 (3.0 M Acetato de Potasio pH 5.5) frio y se incubo en huelo por 15 minutos. Posteriormente la mezcla se centrifugó a 12,000 rpm por 30 minutos y el

sobrenadante fue colocado en una columna de purificación previamente equilibrada con buffer QST (750 mM NaCl, 50 mM MOPS, pH 7.0; 15% de isopropanol; 0.15% Triton x-100) y fue lavado con buffer QC (1.0 NaCl; 50 mM MOPS ph 7.0; 15% de isopropanol). El DNA capturado en la columna fue eluido con 5ml de Buffer QF (1.25 M NaCl; 50 mM Tris Cl, pH 8.5; 15% isopropanol). El DNA fue precipitado con un volumen de isopropanol y lavado con etanol al 70%. El producto final fue suspendido en 100µl de agua MiliQ.

8.13 SECUENCIACIÓN DE DNA

Para las reacciones de secuenciación se utilizaron oligonucleótidos específicos que cubren la totalidad de la secuencia codificante de *ATXN7*. Las reacciones fueron realizadas de acuerdo con las especificaciones del kit comercial *Big Dye terminator V3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems). Para la precipitación de DNA se utilizó un método de etanol/EDTA. La secuenciación se llevó a cabo en el equipo ABI PRISM 310 (Applied Biosystems). Los primers utilizados para secuenciar la región codificante de *ATXN7* fueron los siguientes:

5'	3'		Tm
1	cctggagcaattccacaaca	20 nt: A=7.0 T=3.0 C=7.0 G=3.0 CG=50.00%	66.4°C
2	aggcttccaaacttctggg	20 nt: A=4.0 T=5.0 C=6.0 G=5.0 CG=55.00%	66.7°C
3	ccaatgcatcccattcagca	20 nt: A=6.0 T=4.0 C=8.0 G=2.0 CG=50.00%	69.5°C
4	ggctgtccaggtagaagaa	20 nt: A=6.0 T=3.0 C=3.0 G=8.0 CG=55.00%	63.6°C
5	tcaggatcatcatcctcagcc	20 nt: A=4.0 T=5.0 C=8.0 G=3.0 CG=55.00%	65.8°C
6	tcctcttcatcctcatcccc	20 nt: A=2.0 T=7.0 C=11.0 G=0.0 CG=55.00%	65.7°C
7	ccctgctgaatccatcaaga	20 nt: A=6.0 T=4.0 C=7.0 G=3.0 CG=50.00%	65.5°C

8.14 CULTIVO DE CÉLULAS MIO-M1

Las células de MIO-M1 se sembraron en una placa de cultivo de cultivo con 5 ml de medio consistente en DMEM (Gibco ®) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco ®), y 100 U µg/ml de penicilina/estreptomicina (Gibco ® Invitrogen™ Cell Culture, Carlsbad, CA, USA) a 37° C en una atmósfera con 5% CO₂. Se realizó el cambio a medio fresco cada tres días. Las células fueron utilizadas como máximo entre 20-25 pases para cada experimento. Las clonas

estables se mantuvieron en medio con 375 µg/ml de antibiótico de selección genética (G418) para la primera estable y con 0.1 µg/ml de puromicina para la segunda estable. Las dosis fueron determinadas mediante ensayos de viabilidad celular.

8.15 ENSAYO DE VIABILIDAD

Para determinar la dosis óptima de antibióticos de selección se realizó un cultivo de 5×10^5 células con diferentes concentraciones de antibiótico en una placa de 24 pozos. Se utilizaron concentraciones de 0, 400, 600, y 800 µg/ml de genética y 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 y 0.5 µg/ml de puromicina. Los cultivos fueron observados por un periodo de 12 días. Se utilizaron dos pozos para cada condición. Las células fueron observadas en el microscopio cada día para evaluar su estado. El medio fue reemplazado cada 3 días. Alternativamente, se realizaron experimentos utilizando tinción Azul de Tripano para determinar la viabilidad celular.

8.16 TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS

Se utilizaron células MIO-M1 expresando establemente el transactivador del sistema TetOn, previamente generada en nuestro laboratorio. Para la obtención de la segunda estable se utilizó el protocolo siguiente: en una placa de 6 pozos se sembraron células MIO-M1 primera estable a una confluencia del 80% y se realizó una transfección con el Kit comercial Lipofectamine LTX PLUS™ Reagent utilizando 2.5 µg de plásmido pTRE3G-myc-ATXN710Q y 0.25 µg de marcador lineal de puromicina a una relación 20:1 de acuerdo con las instrucciones del proveedor. 48 horas después las células se transfirieron a 4 cajas de 100x15mm. Después de 48 horas se añadió el antibiótico de selección puromicina a una concentración de 0.15 µg/ml y los cultivos se mantuvieron por 2 a 3 semanas con cambio de medio cada 3 días. A los 20 días post-transfección las colonias se aislaron y se sembraron en cajas independientes.

8.17 ENSAYO DE WESTERN BLOT

A partir de cultivos celulares confluentes se realizó la extracción de proteínas con 100 µl de PLB (passive lysis buffer). Las proteínas se analizaron mediante SDS/PAGE, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (no. RPN303D; GE Healthcare) y se realizó el inmunoblot con anticuerpos primarios Anti-Myc y anti-actina. Se utilizó un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa (anti-mouse IgG) (Amersham) usado a una dilución 1:15,000. Finalmente se empleó ECL (GE Healthcare) para detectar mediante quimioluminiscencia la reacción antígeno-anticuerpo. Después de desnudar la membrana se realizó detección de actina como control de carga de cada experimento.

9. RESULTADOS

9.1 CLONACIÓN DE ATAXINA 7 EN EL SISTEMA TET-ON.

Para clonar ataxina-7 en el sistema de expresión inducible Tet-On inicialmente fue necesario determinar el número de repetidos CAG presentes en un individuo sano. Para ello, se realizó la extracción de sangre periférica y a partir de DNA genómico se realizó una PCR de punto final usando primers específicos a *ATXN7* que flanquean la región de repetidos. El producto de esta reacción fue visualizado por electroforesis capilar utilizando el marcador de peso molecular 1200 LIZ (GeneScan) de acuerdo a protocolos establecidos previamente en nuestro laboratorio. En la Figura 18a se observa la presencia de un producto de amplificación correspondiente con 10 repetidos CAG. En contraste, a partir de un paciente con SCA7 se determinó la presencia de 53 repetidos CAG como se observa en la Figura 18b

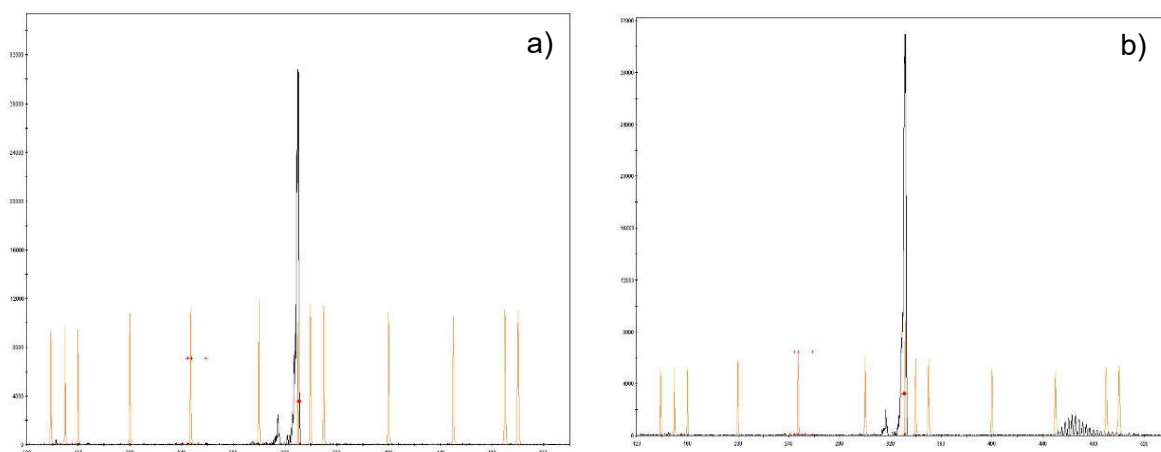


Figura 18.- Diagnóstico de repetidos CAG por PCR punto final y TP-PCR. Se muestra el patrón de electroforesis capilar obtenido por la técnica de PCR punto final: a) individuo sano: 10 repetidos CAG, b) paciente 1: 53 repetidos CAG.

Una vez determinado el número de repetidos CAG, se realizó la extracción de RNA a partir de células mononucleares obtenidas por gradiente de Ficoll de sangre total. La integridad del RNA se evaluó por detección de las bandas de RNA ribosomal 28S y 18S mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (Figura 19 a). Posteriormente, para validar la correcta síntesis del cDNA, se realizó una amplificación por PCR de una región de 254 pb del gen *GAPDH*, (Figura 19b).

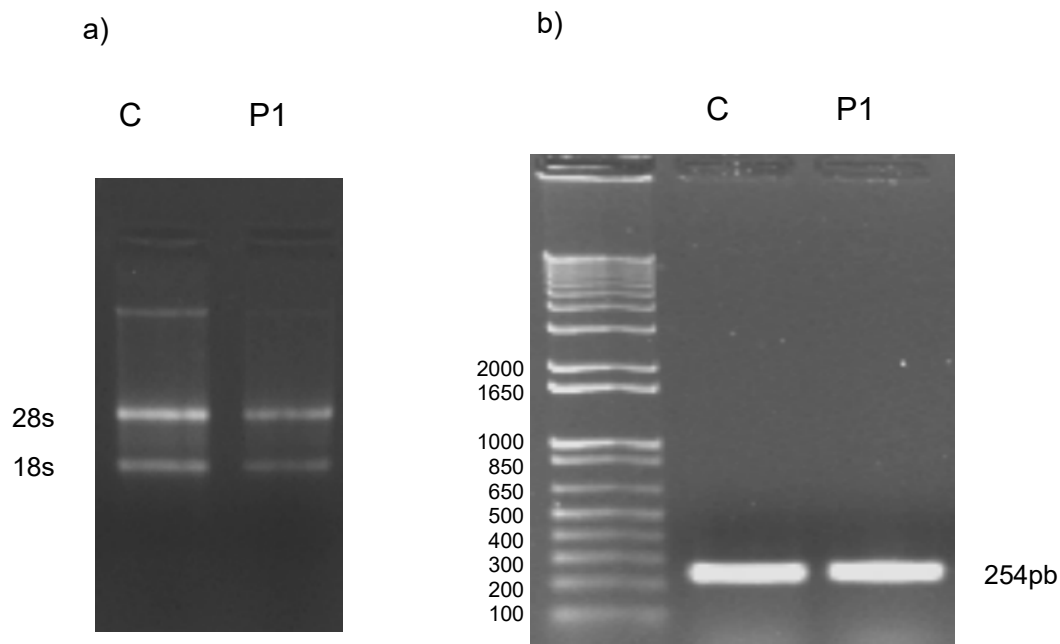


Figura 19. Evaluación de la integridad del RNA total y de la síntesis de cDNA. (a) Corrimiento electroforético en gel de agarosa a 1% de los productos de la extracción de RNA de un paciente con SCA7 y un individuo sano: (b) productos de amplificación de un fragmento del gen *GAPDH* de 254 pares de bases de un paciente y un individuo sano.

Una vez verificada la integridad del cDNA se procedió a la amplificación de la región codificante del gen *ATXN7*. En la figura 20 se muestran los productos de amplificación a partir del cDNA de una muestra control y de un paciente con SCA7 con 53 repetidos CAG.

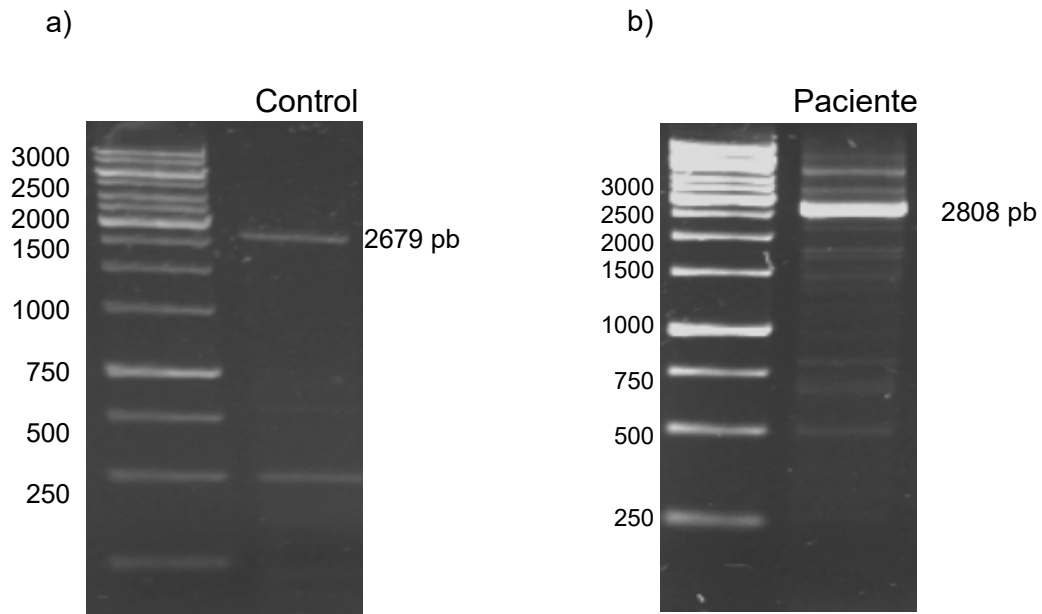
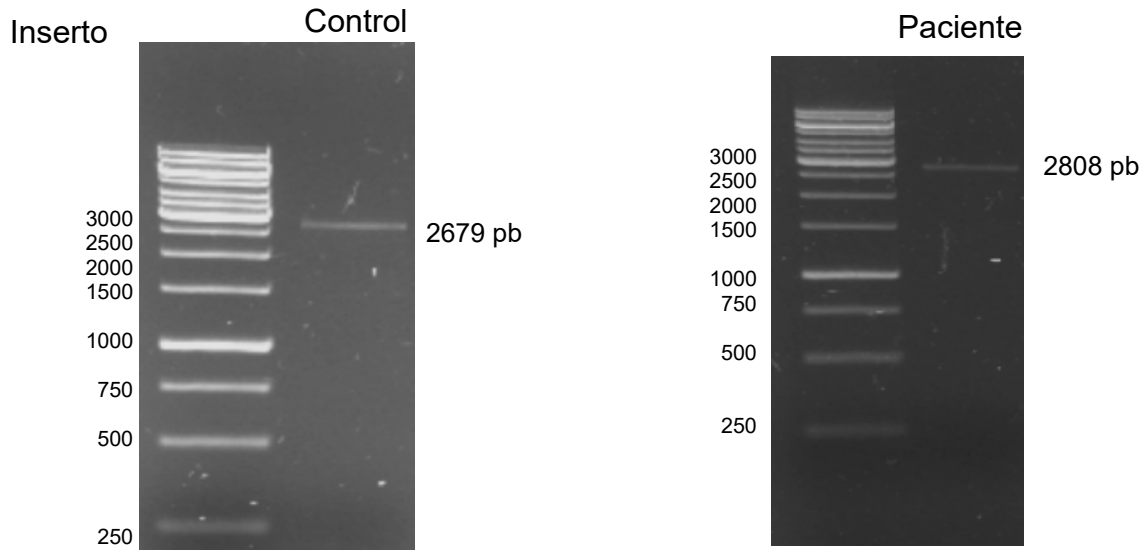


Figura 20.- Amplificación por PCR de la región codificante de ATXN-7. Corrimiento electroforético en gel de agarosa de la amplificación del gen ATXN7 de un individuo sano (a) y de un paciente con 53 repetidos CAG (b).

Como se mencionó en la sección de material y métodos esta amplificación se realizó con *primers* que contienen secuencias con un sitio de corte para la enzima NheI. Con el objetivo de generar extremos cohesivos en el producto de PCR y en el vector pTRE3G-myc, responsivo del sistema Tet-On, se realizaron reacciones de digestión enzimática. Los productos de la digestión se purificaron de geles de agarosa se cuantificaron y se analizaron nuevamente. En la Figura 21 se muestran los productos purificados correspondientes a ATXN7 y al vector pTRE3G-myc linearizado y defosforilado.

a)



b)

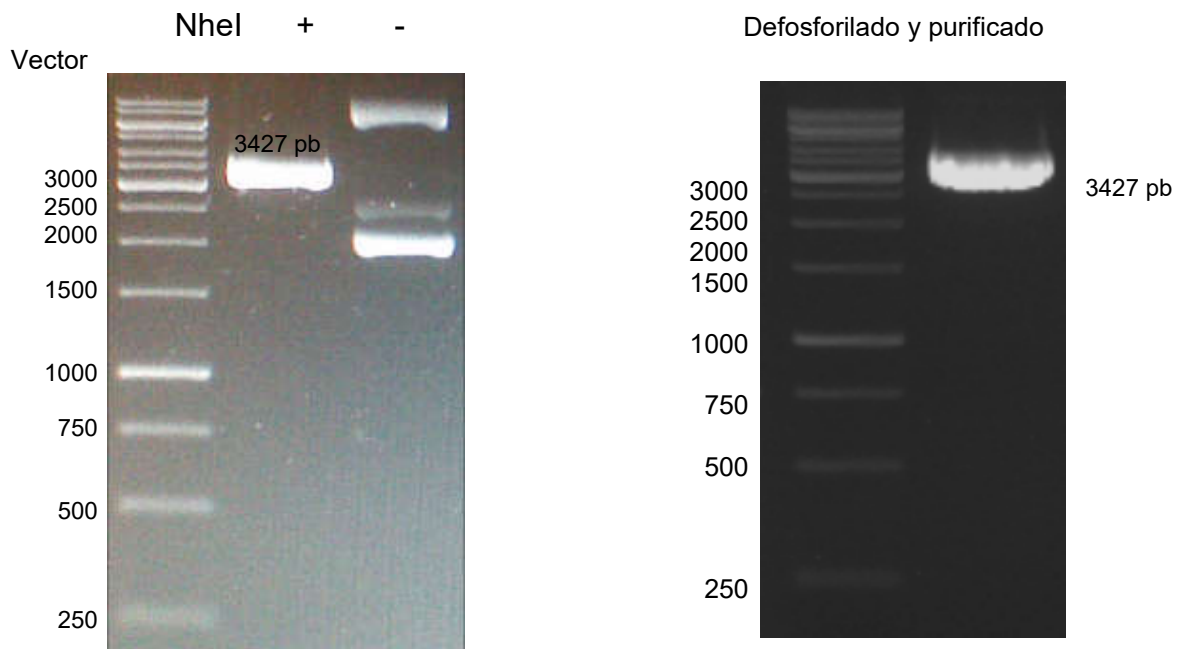


Figura 21.-Purificación de vector e insertos para ensayo de ligación. Corrimiento electroforético en gel de agarosa de los productos purificados de: a) ATXN7 del individuo control y paciente 1; b) vector pTRE3G-myc digerido con la enzima NheI (+ con enzima, - sin enzima) y producto defosforilado y purificado.

Una vez generados el inserto (ATXN7) y vector (pTRE3G-myc) se realizaron ensayos de ligación. En la Figura 22 se muestran las diferentes condiciones que se utilizaron para la reacción de ligación entre vector e inserto.

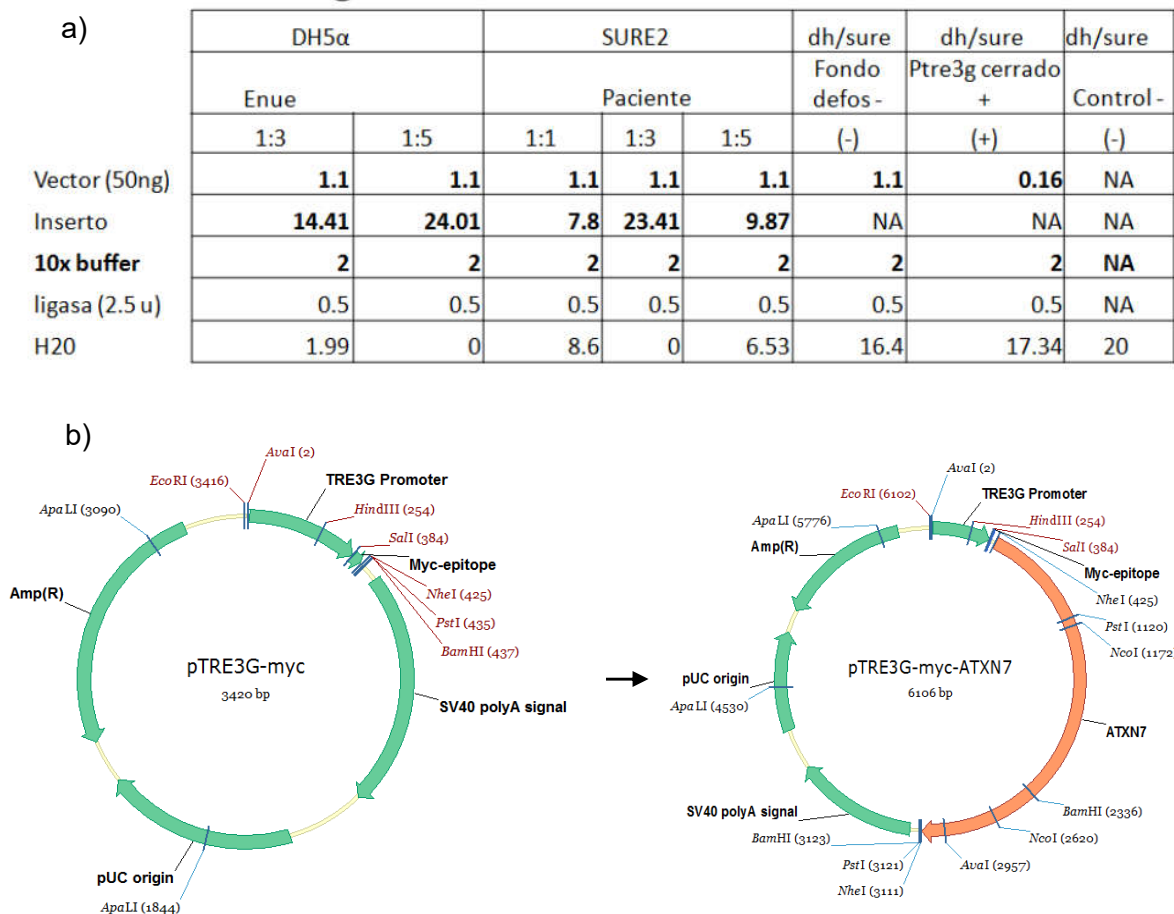


Figura 22.- a) **Condiciones de ligación utilizadas para generar la ligación entre el vector pTRE3G-myc y el inserto de ATXN7 control o mutante.** b) **Clonación por PCR de la región codificante de la ataxina-7 (2.6kb de longitud). Se muestra el epítipo pTRE3G-Myc antes y después de la inserción del gen ATXN7.**

9.2 Caracterización de la clonación

Para analizar la orientación del inserto clonado en el plásmido pTRE3G-myc, se realizaron digestiones con la enzima BamHI. La construcción clonada en sentido correcto libera dos fragmentos, uno de 5319 pb y uno de 787 pb. En contraste, la clonación del inserto en sentido invertido genera dos fragmentos, uno de 4214 pb

y otro de 1892 pb. La Figura 23 muestra los patrones de digestión con la enzima BamHI de diferentes candidatos de la clonación que resultaron tanto en sentido correcto como en sentido invertido.

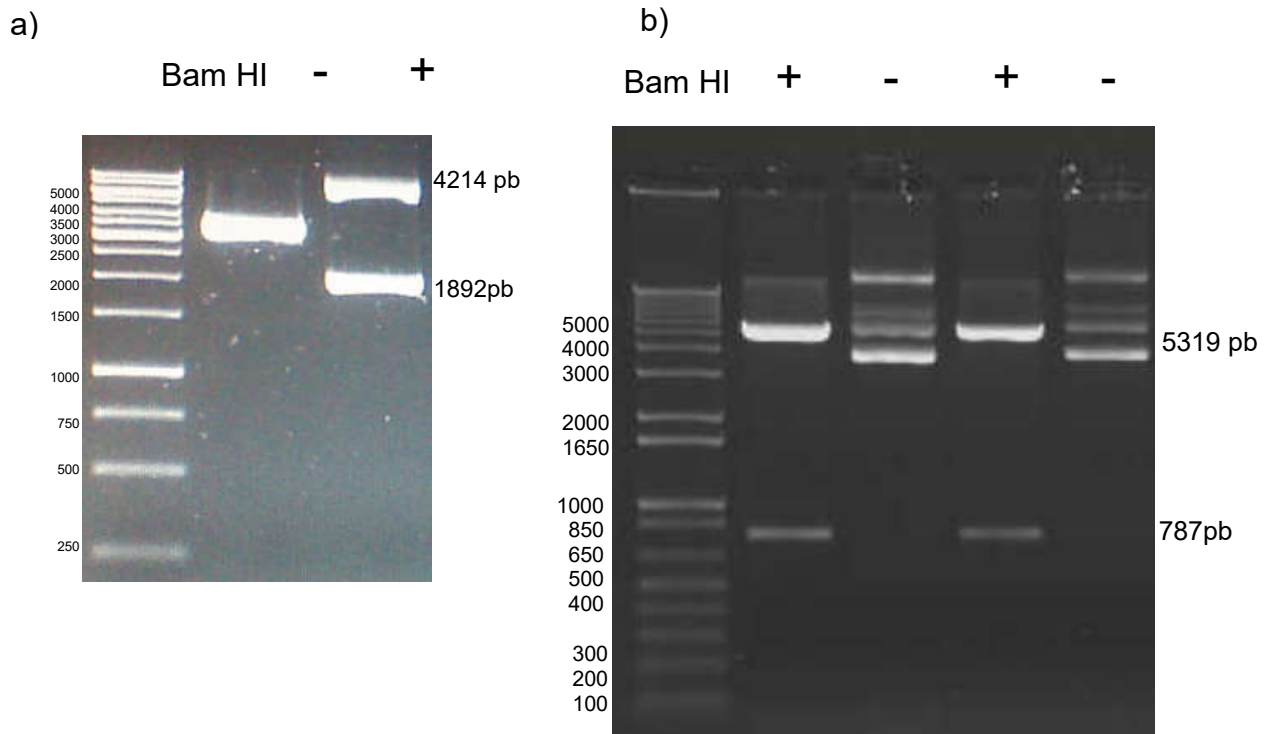


Figura 23.- Análisis de la orientación de la clonación. Corrimiento electroforético en gel de agarosa de los productos de minipreps de: a) Digestión con enzima Bam HI de la colonia 4, se observa que el inserto entro al vector en sentido invertido. Después de cortar este producto y volver a hacer la ligación se realizó una digestión con Bam HI de dos nuevas colonias (b). En esta ocasión se obtuvieron digestiones en sentido correcto.

Una vez analizada la orientación de ATXN7 clonada en el vector pTRE3G-myc, el plasmido se purificó mediante midiprep para realizar ensayos de secuenciación. La secuenciación tuvo como objetivo verificar el número de repetidos, el mantenimiento del marco de lectura y la ausencia de mutaciones a lo largo de la secuencia de ATXN7. La Figura 24 corresponde con un electroferograma que muestra el número de repetidos CAG que porta la construcción generada, el cual

coincide con la determinación inicial por PCR punto final en 10 repetidos CAG. Esta construcción la denominamos pTRE3G-myc-ATXN710Q

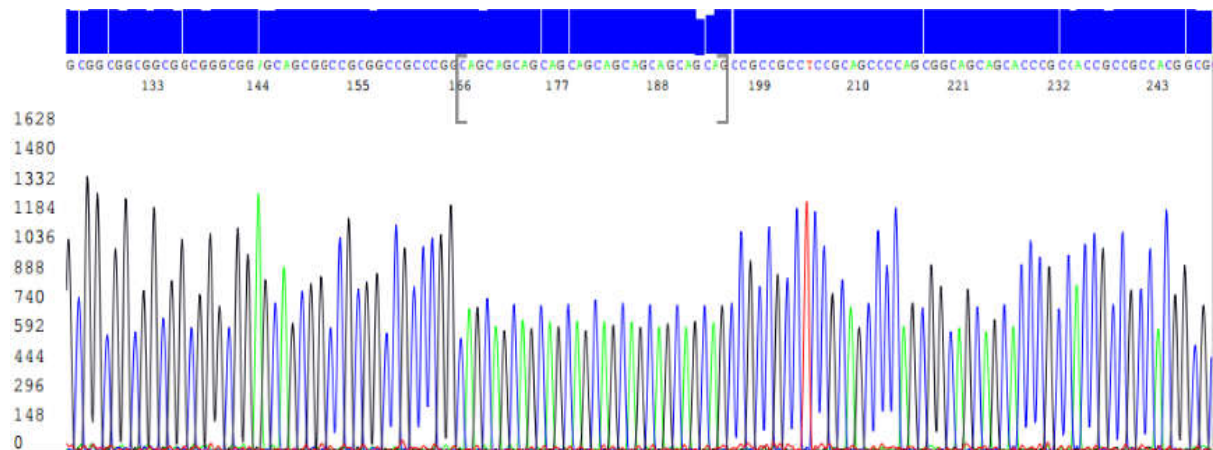


Figura 24.-Electroferograma de la secuenciación de la construcción pTRE3G-myc-ATXN710Q. Entre paréntesis se muestra la región de 10 repetidos CAG.

						Section 9	
PRIMER 1 ATX07	(385)	385	390	400	410	420	432
pTREG-myc-ATX07	(33)	CGACATGGAGCAGAAGCTGATCTCAGAGGAGGACCTGGCGCTAGCTAT					
Consensus	(385)	CGACATGGAGCAGAAGCTGATCTCAGAGGAGGACCTGGCGCTAGCTAT					
							Section 10
PRIMER 1 ATX07	(433)	433	440	450	460	470	480
pTREG-myc-ATX07	(81)	GTCGGAGCGGGCCGCGGATGACGTCAGGGGGAGCCGCGCCGCGGGC					
Consensus	(433)	GTCGGAGCGGGCCGCGGATGACGTCAGGGGGAGCCGCGCCGCGGGC					
							Section 11
PRIMER 1 ATX07	(481)	481	490	500	510		528
pTREG-myc-ATX07	(129)	GGGGGGGGGGGGAGCAGCGGGCCGCGCCCGCCGGCAGCAGCAGCA					
Consensus	(481)	GGGGGGGGGGGGAGCAGCGGGCCGCGCCCGCCGGCAGCAGCAGCA					
							Section 12
PRIMER 1 ATX07	(529)	529	540	550	560		576
pTREG-myc-ATX07	(177)	SCAGCAGCAGCAGCAGCAGCCGCGCTCCGCGAGCCCGAGCGGAGCA					
Consensus	(529)	SCAGCAGCAGCAGCAGCAGCCGCGCTCCGCGAGCCCGAGCGGAGCA					
							Section 13
PRIMER 1 ATX07	(577)	577	590	600	610		624
pTREG-myc-ATX07	(225)	SCACCCGCCACCCGCGCCACGGCGCACACGGCCGGAGGACGGCGGGCC					
Consensus	(577)	SCACCCGCCACCCGCGCCACGGCGCACACGGCCGGAGGACGGCGGGCC					
							Section 14
PRIMER 1 ATX07	(625)	625	630	640	650	660	672
pTREG-myc-ATX07	(273)	CGGCGCCGCTCCACCTCGGCGCCGCAATGGCGACGGTCGGGGAGCG					
Consensus	(625)	CGGCGCCGCTCCACCTCGGCGCCGCAATGGCGACGGTCGGGGAGCG					
							Section 15
PRIMER 1 ATX07	(673)	673	680	690	700	710	720
pTREG-myc-ATX07	(321)	CAGGCCTCTGCCAGTCCCTGAAAGTATGCTGGGACAGTCGTGGAAATCT					
Consensus	(673)	CAGGCCTCTGCCAGTCCCTGAAAGTATGCTGGGACAGTCGTGGAAATCT					
							Section 16
PRIMER 1 ATX07	(721)	721	730	740	750		768
pTREG-myc-ATX07	(369)	GTGGGTTGAGGCTTCCAAACTTCTGGGAAGGACGGGACAGAAATTGGA					
Consensus	(721)	GTGGGTTGAGGCTTCCAAACTTCTGGGAAGGACGGGACAGAAATTGGA					
							Section 17
PRIMER 1 ATX07	(769)	769	780	790	800		816
pTREG-myc-ATX07	(417)	CGAAAAGTTTCAAGGAGTTTGGGAAAAACCGCGAAGTCATGGGGCTCTG					
Consensus	(769)	CGAAAAGTTTCAAGGAGTTTGGGAAAAACCGCGAAGTCATGGGGCTCTG					
							Section 18
PRIMER 1 ATX07	(817)	817	830	840	850		864
pTREG-myc-ATX07	(465)	TCGGGAAGACATGCCAATATTTGGTTTCTGTCCAGCCCATGATGATTT					
Consensus	(817)	TCGGGAAGACATGCCAATATTTGGTTTCTGTCCAGCCCATGATGATTT					
							Section 19
PRIMER 1 ATX07	(865)	865	870	880	890	900	912
pTREG-myc-ATX07	(513)	CTACTTGGTGGTGTGTAACGACTGTAAATCAGGTTGTCAAACCCGAGGC					
Consensus	(865)	CTACTTGGTGGTGTGTAACGACTGTAAATCAGGTTGTCAAACCCGAGGC					
							Section 20
PRIMER 1 ATX07	(913)	913	920	930	940	950	960
pTREG-myc-ATX07	(561)	ATTTCAATCACATTATGAAAAGAACATAGCTCATCCAGCAAGCCGCG					
Consensus	(913)	ATTTCAATCACATTATGAAAAGAACATAGCTCATCCAGCAAGCCGCG					

						Section 21
	(961)	961	970	980	990	1008
PRIMER 1 ATXN7	(609)	TTTGGT	CGTTCCTCCCACCTTCAGTATTTTCCTTCTTCCCTTCTCTGTG			
pTRE3G-myc-ATXN7	(961)	TTTGGC	CGTTCCTCCCACCTTCAGTATTTTCCTTCTTCCCTTCTCTGTG			
Consensus	(961)	TTTGG	CGTTCCTCCCACCTTCAGTATTTTCCTTCTTCCCTTCTCTGTG			
						Section 22
	(1009)	1009	1020	1030	1040	1056
PRIMER 2 ATXN7	(243)	CAAAGCAAAGGAGGCAGTGCAGTGGAAAGCAACCGTTCTTCCAGTGG				
pTRE3G-myc-ATXN7	(1009)	CAAAGCAAAGGAGGCAGTGCAGTGGAAAGCAACCGTTCTTCCAGTGG				
Consensus	(1009)	CAAAGCAAAGGAGGCAGTGCAGTGGAAAGCAACCGTTCTTCCAGTGG				
						Section 23
	(1057)	1057	1070	1080	1090	1104
PRIMER 2 ATXN7	(291)	AGGTGTTCTTAGCGCATCCTCATCAAGTCCAAGTTGTTGAAATCACC				
pTRE3G-myc-ATXN7	(1057)	AGGTGTTCTTAGCGCATCCTCATCAAGTCCAAGTTGTTGAAATCACC				
Consensus	(1057)	AGGTGTTCTTAGCGCATCCTCATCAAGTCCAAGTTGTTGAAATCACC				
						Section 24
	(1105)	1105	1110	1120	1130	1140
PRIMER 2 ATXN7	(339)	CAAAGAGAAACTGCAGCTCAGGGGGAACACCAGGCCAATGCATCCCAT				
pTRE3G-myc-ATXN7	(1105)	CAAAGAGAAACTGCAGCTCAGGGGGAACACCAGGCCAATGCATCCCAT				
Consensus	(1105)	CAAAGAGAAACTGCAGCTCAGGGGGAACACCAGGCCAATGCATCCCAT				
						Section 25
	(1153)	1153	1160	1170	1180	1190
PRIMER 2 ATXN7	(387)	TCAGCAAAGTAGAGTTCCCATGGTAGAATCATGACACCCTCTGTGAA				
pTRE3G-myc-ATXN7	(1153)	TCAGCAAAGTAGAGTTCCCATGGTAGAATCATGACACCCTCTGTGAA				
Consensus	(1153)	TCAGCAAAGTAGAGTTCCCATGGTAGAATCATGACACCCTCTGTGAA				
						Section 26
	(1201)	1201	1210	1220	1230	1248
PRIMER 2 ATXN7	(435)	AGTGGAAAAGATTTCATCCGAAAATGGATGGCACACTACTGAAATCTGC				
pTRE3G-myc-ATXN7	(1201)	AGTGGAAAAGATTTCATCCGAAAATGGATGGCACACTACTGAAATCTGC				
Consensus	(1201)	AGTGGAAAAGATTTCATCCGAAAATGGATGGCACACTACTGAAATCTGC				
						Section 27
	(1249)	1249	1260	1270	1280	1296
PRIMER 2 ATXN7	(483)	GGTGGGGCCAACTGTCTGCTACTGTGAGTTCCTTAGTCAAGCCTGG				
pTRE3G-myc-ATXN7	(1249)	GGTGGGGCCAACTGTCTGCTACTGTGAGTTCCTTAGTCAAGCCTGG				
Consensus	(1249)	GGTGGGGCCAACTGTCTGCTACTGTGAGTTCCTTAGTCAAGCCTGG				
						Section 28
	(1297)	1297	1310	1320	1330	1344
PRIMER 2 ATXN7	(531)	CCTTAACTGCCCTCAATACCAAAGCCAACTTGCCTTCACTGGACA				
pTRE3G-myc-ATXN7	(1297)	CCTTAACTGCCCTCAATACCAAAGCCAACTTGCCTTCACTGGACA				
Consensus	(1297)	CCTTAACTGCCCTCAATACCAAAGCCAACTTGCCTTCACTGGACA				
						Section 29
	(1345)	1345	1350	1360	1370	1380
PRIMER 2 ATXN7	(579)	GATTCTGAATGGCAAAGGGCTTCTGCACCGCCCACTCTGGAAAAGAA				
pTRE3G-myc-ATXN7	(1345)	GATTCTGAATGGCAAAGGGCTTCTGCACCGCCCACTCTGGAAAAGAA				
Consensus	(1345)	GATTCTGAATGGCAAAGGGCTTCTGCACCGCCCACTCTGGAAAAGAA				
						Section 30
	(1393)	1393	1400	1410	1420	1430
PRIMER 2 ATXN7	(627)	ACCTGAAGACAATTCCAATAATAGGAAATTTTAAATAAGAGATTATC				
pTRE3G-myc-ATXN7	(1393)	ACCTGAAGACAATTCCAATAATAGGAAATTTTAAATAAGAGATTATC				
Consensus	(1393)	ACCTGAAGACAATTCCAATAATAGGAAATTTTAAATAAGAGATTATC				

						Section 31	
	(1441)	1441	1450	1460	1470	1488	
PRIMER 2 ATXN7	(675)	AGAAAGAGAGTTTGATCCTGACATCCACTGTGGGGTTATTGATCTCGA					
pTRE3G-myc-ATXN7	(1441)	AGAAAGAGAGTTTGATCCTGACATCCACTGTGGGGTTATTGATCTCGA					
Consensus	(1441)	AGAAAGAGAGTTTGATCCTGACATCCACTGTGGGGTTATTGATCTCGA					
						Section 32	
	(1489)	1489	1500	1510	1520	1536	
PRIMER 2 ATXN7	(723)	CACCAAGAAGCCCTGCACCCGGTCTTTGACATGCAAGACACATTCCTT					
pTRE3G-myc-ATXN7	(1489)	CACCAAGAAGCCCTGCACCCGGTCTTTGACATGCAAGACACATTCCTT					
Consensus	(1489)	CACCAAGAAGCCCTGCACCCGGTCTTTGACATGCAAGACACATTCCTT					
						Section 33	
	(1537)	1537	1550	1560	1570	1584	
PRIMER 3 ATXN7	(360)	AACCCAGCGCAGGGCTGTCCAGGGTAGAAGAAAACGATTTGATGTGT					
pTRE3G-myc-ATXN7	(1537)	AACCCAGCGCAGGGCTGTCCAGGGTAGAAGAAAACGATTTGATGTGT					
Consensus	(1537)	AACCCAGCGCAGGGCTGTCCAGGGTAGAAGAAAACGATTTGATGTGT					
						Section 34	
	(1585)	1585	1590	1600	1610	1620	1632
PRIMER 3 ATXN7	(408)	ATTAGCCGAGCACAAAAACAAAACCCAGGGAAAAGGAATTGATTCGCCA					
pTRE3G-myc-ATXN7	(1585)	ATTAGCCGAGCACAAAAACAAAACCCAGGGAAAAGGAATTGATTCGCCA					
Consensus	(1585)	ATTAGCCGAGCACAAAAACAAAACCCAGGGAAAAGGAATTGATTCGCCA					
						Section 35	
	(1633)	1633	1640	1650	1660	1670	1680
PRIMER 3 ATXN7	(456)	TCCGGACTCTCAGCAACCACCGCAGCCTCTCAGGGACCCGCATCCCGC					
pTRE3G-myc-ATXN7	(1633)	TCCGGACTCTCAGCAACCACCGCAGCCTCTCAGGGACCCGCATCCCGC					
Consensus	(1633)	TCCGGACTCTCAGCAACCACCGCAGCCTCTCAGGGACCCGCATCCCGC					
						Section 36	
	(1681)	1681	1690	1700	1710	1728	
PRIMER 3 ATXN7	(504)	CCCTCCTAGAACGTACAGGAGCCGCACAAAACCCCTCAGGAGTGAT					
pTRE3G-myc-ATXN7	(1681)	CCCTCCTAGAACGTACAGGAGCCGCACAAAACCCCTCAGGAGTGAT					
Consensus	(1681)	CCCTCCTAGAACGTACAGGAGCCGCACAAAACCCCTCAGGAGTGAT					
						Section 37	
	(1729)	1729	1740	1750	1760	1778	
PRIMER 3 ATXN7	(552)	TCCTCCGAATCAAAGCCTTTTGTAGTAGTAAACCTAAACCTCACAC					
pTRE3G-myc-ATXN7	(1729)	TCCTCCGAATCAAAGCCTTTTGTAGTAGTAAACCTAAACCTCACAC					
Consensus	(1729)	TCCTCCGAATCAAAGCCTTTTGTAGTAGTAAACCTAAACCTCACAC					
						Section 38	
	(1777)	1777	1790	1800	1810	1824	
PRIMER 3 ATXN7	(600)	CCCCAGTCTTCCAAGGCCTCCAGGCTGCCCTGCTCAGCAAGGTGGGAG					
pTRE3G-myc-ATXN7	(1777)	CCCCAGTCTTCCAAGGCCTCCAGGCTGCCCTGCTCAGCAAGGTGGGAG					
Consensus	(1777)	CCCCAGTCTTCCAAGGCCTCCAGGCTGCCCTGCTCAGCAAGGTGGGAG					
						Section 39	
	(1825)	1825	1830	1840	1850	1860	1872
PRIMER 3 ATXN7	(648)	TGCCCCATTGACCCTCCTCCAGTCCATGAATCTCCACACCCCTCCCTT					
pTRE3G-myc-ATXN7	(1825)	TGCCCCATTGACCCTCCTCCAGTCCATGAATCTCCACACCCCTCCCTT					
Consensus	(1825)	TGCCCCATTGACCCTCCTCCAGTCCATGAATCTCCACACCCCTCCCTT					
						Section 40	
	(1873)	1873	1880	1890	1900	1910	1920
PRIMER 4 ATXN7	(285)	GCCTGCCACTGAGCCAGCTTCTCGGTTATCCAGTGAGGAGGGCGAAGG					
pTRE3G-myc-ATXN7	(1873)	GCCTGCCACTGAGCCAGCTTCTCGGTTATCCAGTGAGGAGGGCGAAGG					
Consensus	(1873)	GCCTGCCACTGAGCCAGCTTCTCGGTTATCCAGTGAGGAGGGCGAAGG					
						Section 41	
	(1921)	1921	1930	1940	1950	1968	
PRIMER 4 ATXN7	(333)	CGATGACAAAGAAGAGTCTGTTGAAAACTGGACTGTCAATTATTCAGG					
pTRE3G-myc-ATXN7	(1921)	CGATGACAAAGAAGAGTCTGTTGAAAACTGGACTGTCAATTATTCAGG					
Consensus	(1921)	CGATGACAAAGAAGAGTCTGTTGAAAACTGGACTGTCAATTATTCAGG					
						Section 42	
	(1969)	1969	1980	1990	2000	2016	
PRIMER 4 ATXN7	(381)	TCATCATCCTCAGCCAGCATCTTTTGCACATTTGGGAGCCGGCAGAT					
pTRE3G-myc-ATXN7	(1969)	TCATCATCCTCAGCCAGCATCTTTTGCACATTTGGGAGCCGGCAGAT					
Consensus	(1969)	TCATCATCCTCAGCCAGCATCTTTTGCACATTTGGGAGCCGGCAGAT					
						Section 43	
	(2017)	2017	2030	2040	2050	2064	
PRIMER 4 ATXN7	(429)	AGGAAGAGGCTATTACGTGTTTACTCCAGGTGGAATCGACTTCGCTG					
pTRE3G-myc-ATXN7	(2017)	AGGAAGAGGCTATTACGTGTTTACTCCAGGTGGAATCGACTTCGCTG					
Consensus	(2017)	AGGAAGAGGCTATTACGTGTTTACTCCAGGTGGAATCGACTTCGCTG					
						Section 44	
	(2065)	2065	2070	2080	2090	2100	2112
PRIMER 4 ATXN7	(477)	CGCCCTCAACCTCATGGTGGAGAAGCATCTGAATGCACAGCTATGGAA					
pTRE3G-myc-ATXN7	(2065)	CGCCCTCAACCTCATGGTGGAGAAGCATCTGAATGCACAGCTATGGAA					
Consensus	(2065)	CGCCCTCAACCTCATGGTGGAGAAGCATCTGAATGCACAGCTATGGAA					
						Section 45	
	(2113)	2113	2120	2130	2140	2150	2160
PRIMER 4 ATXN7	(525)	GAAAATCCCACCAAGTGCCAGTACCACCTCACCCATCTCCACACGTAT					
pTRE3G-myc-ATXN7	(2113)	GAAAATCCCACCAAGTGCCAGTACCACCTCACCCATCTCCACACGTAT					
Consensus	(2113)	GAAAATCCCACCAAGTGCCAGTACCACCTCACCCATCTCCACACGTAT					

					Section 46		
	(2161)	2161	2170	2180	2190	2208	
PRIMER 4 ATXN7 (573)		TCCTCACCGGACAAACTCTGTGCCGACATCACAAATGTGGAGTCAGCTA					
pTRE3G-myc-ATXN7 (2161)		TCCTCACCGGACAAACTCTGTGCCGACATCACAAATGTGGAGTCAGCTA					
Consensus (2161)		TCCTCACCGGACAAACTCTGTGCCGACATCACAAATGTGGAGTCAGCTA					
						Section 47	
	(2209)	2209	2220	2230	2240	2256	
PRIMER 4 ATXN7 (621)		TCTGGCAGCAGCCACCGTCTCTACATCCCCAGTCTGCTCTCATCTAC					
pTRE3G-myc-ATXN7 (2209)		TCTGGCAGCAGCCACCGTCTCTACATCCCCAGTCTGCTCTCATCTAC					
Consensus (2209)		TCTGGCAGCAGCCACCGTCTCTACATCCCCAGTCTGCTCTCATCTAC					
						Section 48	
	(2257)	2257	2270	2280	2290	2304	
PRIMER 5 (259)		CTGCATCTCCCCAAATAGCAAATCGGTACCAGCTCATGGAACCCACACT					
pTRE3G-myc-ATXN7 (2257)		CTGCATCTCCCCAAATAGCAAATCGGTACCAGCTCATGGAACCCACACT					
Consensus (2257)		CTGCATCTCCCCAAATAGCAAATCGGTACCAGCTCATGGAACCCACACT					
						Section 49	
	(2305)	2305	2310	2320	2330	2340	2352
PRIMER 5 (307)		AAATGCACAGCCTGCTGCTTCAGGGGCGATGGATCCTGTGTGCAGTAT					
pTRE3G-myc-ATXN7 (2305)		AAATGCACAGCCTGCTGCTTCAGGGGCGATGGATCCTGTGTGCAGTAT					
Consensus (2305)		AAATGCACAGCCTGCTGCTTCAGGGGCGATGGATCCTGTGTGCAGTAT					
						Section 50	
	(2353)	2353	2360	2370	2380	2390	2400
PRIMER 5 (355)		GCAATCCAGACAAGTGTCTCTTCATCCTCATCCCCTTCCACGCCCTC					
pTRE3G-myc-ATXN7 (2353)		GCAATCCAGACAAGTGTCTCTTCATCCTCATCCCCTTCCACGCCCTC					
Consensus (2353)		GCAATCCAGACAAGTGTCTCTTCATCCTCATCCCCTTCCACGCCCTC					
						Section 51	
	(2401)	2401	2410	2420	2430	2448	
PRIMER 5 (403)		TGGCCTTTCCTCGGTTCTTCCTCCCCCATGTCCAGGAAACCTCAGAA					
pTRE3G-myc-ATXN7 (2401)		TGGCCTTTCCTCGGTTCTTCCTCCCCCATGTCCAGGAAACCTCAGAA					
Consensus (2401)		TGGCCTTTCCTCGGTTCTTCCTCCCCCATGTCCAGGAAACCTCAGAA					
						Section 52	
	(2449)	2449	2460	2470	2480	2498	
PRIMER 5 (451)		ATTGAAATCCAGCAAATCTTTGAGGCCCAAGGAGTCTTCTGGTAACAG					
pTRE3G-myc-ATXN7 (2449)		ATTGAAATCCAGCAAATCTTTGAGGCCCAAGGAGTCTTCTGGTAACAG					
Consensus (2449)		ATTGAAATCCAGCAAATCTTTGAGGCCCAAGGAGTCTTCTGGTAACAG					
						Section 53	
	(2497)	2497	2510	2520	2530	2544	
PRIMER 5 (499)		CACTAACTGTCAAATGCCAGTAGCAGTACCAGTGGCGGCTCAGGAAA					
pTRE3G-myc-ATXN7 (2497)		CACTAACTGTCAAATGCCAGTAGCAGTACCAGTGGCGGCTCAGGAAA					
Consensus (2497)		CACTAACTGTCAAATGCCAGTAGCAGTACCAGTGGCGGCTCAGGAAA					
						Section 54	
	(2545)	2545	2550	2570	2580	2592	
PRIMER 5 (547)		GAAACGCAAAAACAGTTCGCCACTGTGGTTCACITCTTCTCCTCCTC					
pTRE3G-myc-ATXN7 (2545)		GAAACGCAAAAACAGTTCGCCACTGTGGTTCACITCTTCTCCTCCTC					
Consensus (2545)		GAAACGCAAAAACAGTTCGCCACTGTGGTTCACITCTTCTCCTCCTC					
						Section 55	
	(2593)	2593	2600	2610	2620	2630	2640
PRIMER 5 (595)		TTCCTCCTCCTCCTTCTTCTCATTCCATGGAGICTTTTAGGAAAAA					
pTRE3G-myc-ATXN7 (2593)		TTCCTCCTCCTCCTTCTTCTCATTCCATGGAGICTTTTAGGAAAAA					
Consensus (2593)		TTCCTCCTCCTCCTTCTTCTCATTCCATGGAGICTTTTAGGAAAAA					
						Section 56	
	(2641)	2641	2650	2660	2670	2688	
PRIMER 5 (643)		CTGTGTGGCTCACICTGGGCTCCCTACCCTCAACGGTAACATCTTC					
pTRE3G-myc-ATXN7 (2641)		CTGTGTGGCTCACICTGGGCTCCCTACCCTCAACGGTAACATCTTC					
Consensus (2641)		CTGTGTGGCTCACICTGGGCTCCCTACCCTCAACGGTAACATCTTC					
						Section 57	
	(2689)	2689	2700	2710	2720	2736	
PRIMER 6 ATXN7 (282)		CCATAGCATCGGCCTCAACTGTGTGACGAATAAAGCAAATGCGGTGAA					
pTRE3G-myc-ATXN7 (2689)		CCATAGCATCGGCCTCAACTGTGTGACGAATAAAGCAAATGCGGTGAA					
Consensus (2689)		CCATAGCATCGGCCTCAACTGTGTGACGAATAAAGCAAATGCGGTGAA					
						Section 58	
	(2737)	2737	2750	2760	2770	2784	
PRIMER 6 ATXN7 (330)		CGTCCGGCATGACCAGTCAGGGAGGGGCCCCCACCAGGGAGCCCTGC					
pTRE3G-myc-ATXN7 (2737)		CGTCCGGCATGACCAGTCAGGGAGGGGCCCCCACCAGGGAGCCCTGC					
Consensus (2737)		CGTCCGGCATGACCAGTCAGGGAGGGGCCCCCACCAGGGAGCCCTGC					
						Section 59	
	(2785)	2785	2790	2800	2810	2820	2832
PRIMER 6 ATXN7 (378)		TGAATCCATCAAGAGGATGAGTGTGATGGTGAACAGCAGTGATTCTAC					
pTRE3G-myc-ATXN7 (2785)		TGAATCCATCAAGAGGATGAGTGTGATGGTGAACAGCAGTGATTCTAC					
Consensus (2785)		TGAATCCATCAAGAGGATGAGTGTGATGGTGAACAGCAGTGATTCTAC					
						Section 60	
	(2833)	2833	2840	2850	2860	2870	2880
PRIMER 6 ATXN7 (426)		TCTTTCCTTGGGCCATTCAATCACCAGTCCAATGAATGCCCTGTCAA					
pTRE3G-myc-ATXN7 (2833)		TCTTTCCTTGGGCCATTCAATCACCAGTCCAATGAATGCCCTGTCAA					
Consensus (2833)		TCTTTCCTTGGGCCATTCAATCACCAGTCCAATGAATGCCCTGTCAA					

						Section 61
	(2881)	2881	2890	2900	2910	2928
PRIMER 6 ATXN7 (474)		CTCCACGGCAGTTTTTCCCACTCACACACTCCTCTAGACAAACTCAT				
pTRE3G-myc-ATXN7 (2881)		CTCCACGGCAGTTTTTCCCACTCACACACTCCTCTAGACAAACTCAT				
Consensus (2881)		CTCCACGGCAGTTTTTCCCACTCACACACTCCTCTAGACAAACTCAT				
						Section 62
	(2929)	2929	2940	2950	2960	2976
PRIMER 6 ATXN7 (522)		AGGAAAGAAAAGAAAGTGCTCACCCAGCTCGAGCAGCATCAACAACAG				
pTRE3G-myc-ATXN7 (2929)		AGGAAAGAAAAGAAAGTGCTCACCCAGCTCGAGCAGCATCAACAACAG				
Consensus (2929)		AGGAAAGAAAAGAAAGTGCTCACCCAGCTCGAGCAGCATCAACAACAG				
						Section 63
	(2977)	2977	2990	3000	3010	3024
PRIMER 6 ATXN7 (570)		CAGCAGCAAACCCACAAGGTTGCCAAAGTGCCAGCCGTGAACAATGT				
pTRE3G-myc-ATXN7 (2977)		CAGCAGCAAACCCACAAGGTTGCCAAAGTGCCAGCCGTGAACAATGT				
Consensus (2977)		CAGCAGCAAACCCACAAGGTTGCCAAAGTGCCAGCCGTGAACAATGT				
						Section 64
	(3025)	3025	3030	3040	3050	3060
PRIMER 6 ATXN7 (618)		CCACATGAAACACACAGGCACCATCCCAGGGGCACAAGGACTGATGAA				
pTRE3G-myc-ATXN7 (3025)		CCACATGAAACACACAGGCACCATCCCAGGGGCACAAGGACTGATGAA				
Consensus (3025)		CCACATGAAACACACAGGCACCATCCCAGGGGCACAAGGACTGATGAA				
						Section 65
	(3073)	3073	3080	3090	3100	3110
PRIMER 7 ATXN7 (262)		CAGTTCCTCCTTCATCAGCCAAAGGCACGTCCTGAGCTAGCCTGCA				
pTRE3G-myc-ATXN7 (3073)		CAGTTCCTCCTTCATCAGCCAAAGGCACGTCCTGAGCTAGCCTGCA				
Consensus (3073)		CAGTTCCTCCTTCATCAGCCAAAGGCACGTCCTGAGCTAGCCTGCA				
						Section 66
	(3121)	3121	3130	3140	3150	3168
PRIMER 7 ATXN7 (310)		GGGATCCAATGTAAGTGTATTCAGCGATGACGAAATTCITAGCTATTG				
pTRE3G-myc-ATXN7 (3121)		GGGATCCAATGTAAGTGTATTCAGCGATGACGAAATTCITAGCTATTG				
Consensus (3121)		GGGATCCAATGTAAGTGTATTCAGCGATGACGAAATTCITAGCTATTG				
						Section 67
	(3169)	3169	3180	3190	3200	3216

Figura 25.- **Secuenciación de la construcción pTRE3G-myc-ATXN710Q.** La flecha roja horizontal indica el inicio de la transcripción del vector responsivo y abarca el marco de lectura del epítipo Myc. Por su parte, la flecha azul horizontal indica el inicio del marco de lectura del inserto, así como ambos sitios de corte de la enzima NheI al inicio y fin del inserto. Se indica con una flecha vertical azul, la posición 966 en la cual se presentó el cambio de una timina por una citosina.

Por otra parte, la secuenciación de ATXN7 demostró la conservación del marco de lectura y la ausencia de codones de paro (Figura 25). Únicamente se produjo una sustitución (C por T) que cambia el aminoácido 179 de ataxina7 (valina por alanina, ambos de características similares).

9.2 TRANSFECCIÓN ESTABLE DEL VECTOR PTRE3G-MYC-ATXN710Q

Para realizar la transfección estable de la construcción pTRE3g-myc-ATXN7 10Q en la línea celular MIO-M1 y generar así el modelo inducible, inicialmente se realizaron ensayos de viabilidad celular para determinar la dosis de selección con puromicina (Figura 26). De acuerdo a la curva de viabilidad la dosis de selección determinada fue de 0.15µg/ml.

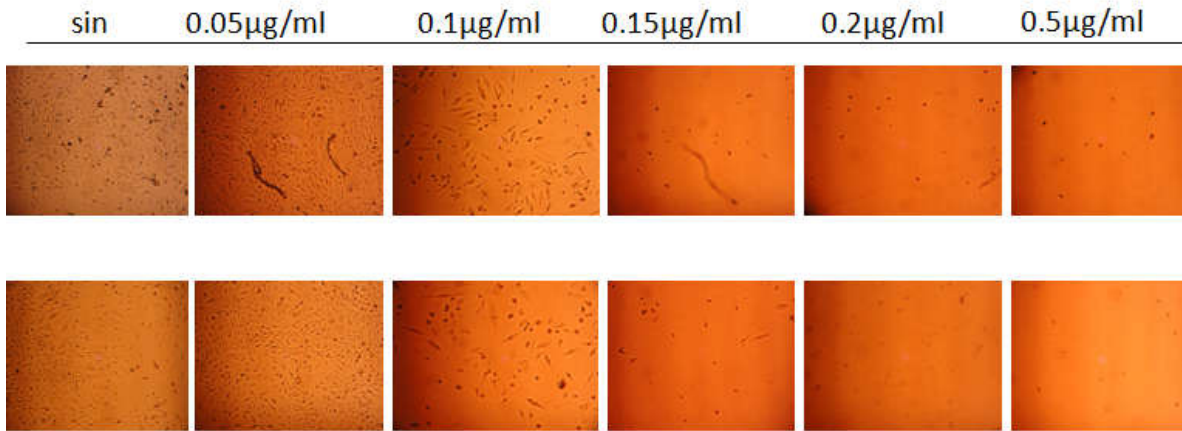


Figura 26.- Ensayo de viabilidad de las células Mio-M1 en presencia de diferentes concentraciones de puromicina. En un ensayo por duplicado, se muestran las células sobrevivientes después de 7 días de observación.

Una vez determinada la dosis de selección de puromicina, se procedió a la realización de la transfección estable de las células MIO-M1 previamente generadas las cuales expresan establemente la proteína transactivadora del sistema inducible. Transcurridas dos semanas en selección se obtuvieron varias colonias candidatas resistentes a puromicina (Figura 27), las cuales se expandieron para su análisis.

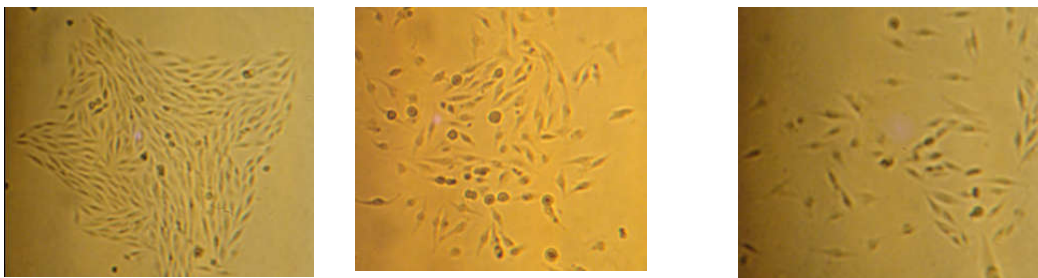


Figura 27.- Transfección estable de células MIO-M1 con la construcción pTRE3g-myc-ATXN7 (wt). Se muestran tres colonias resistentes a medio de cultivo DEMEM con 0.15µg/ml de puromicina.

Una vez obtenidos cultivos confluentes, se obtuvo RNA total de las colonias candidatas de la segunda transfección estable cultivadas en presencia o ausencia de doxiciclina. Se sintetizó cDNA y se analizó mediante PCR la expresión de un transcrito específico de ATXN7 exógena mediante el uso de primers que

reconocen la secuencia de myc y *ATXN7*. Como se observa en la Figura 28, el transcrito específico de *ATXN7* exógena (amplicón de 211 bp) se expresa exclusivamente en presencia de doxiciclina en las células estables.

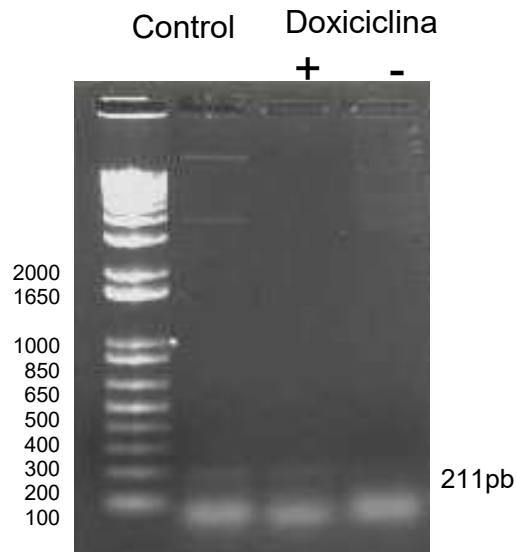


Figura 28.- **Expresión de un transcrito específico de *ATXN7* exógena.** . Corrimiento electroforético en gel de agarosa de una clona candidata con inducción (+) y sin inducir (-), se utilizó como control la construcción *pTRE3g-myc-ATXN7 10Q*

Finalmente se realizaron ensayos de western blot con el propósito de visualizar si el gen *ATXN7* responsivo a la doxiciclina era capaz de expresar la proteína ataxina-7. Como se observa en la Figura 29, la proteína Ataxina-7 se detecta exclusivamente en presencia de doxiciclina utilizando un anticuerpo anti-myc.

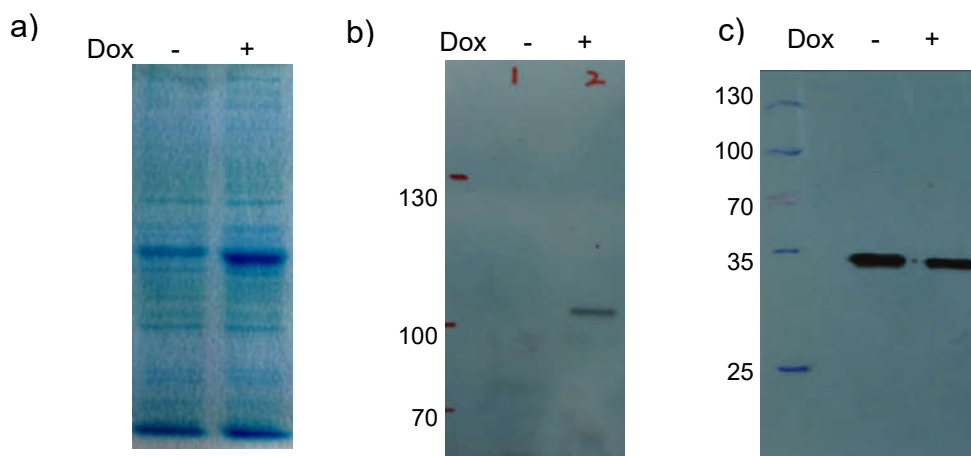


Figura 29.- **Expresión de ataxina-7 en el sistema de expresión inducible Tet-On en presencia o ausencia de doxiciclina:** a) tinción de azul de Coomassie de extractos totales de proteína b) Detección con anticuerpo anti-myc c) Detección con anticuerpo anti-actina como control de carga.

10. DISCUSIÓN

La SCA7 es una enfermedad genética que por su baja prevalencia a nivel mundial es considerada como una enfermedad rara (Filla et al., 2000). Sin embargo, su frecuencia es particularmente elevada en la región central del estado de Veracruz debido a un efecto fundador (Magaña, 2014). La SCA7 es causada por la expansión del trinucleótido repetido CAG en la región codificante del gen *ATXN7*, la presencia de más de 36 repetidos determina la enfermedad (Schöls et al., 2004). Clínicamente, la SCA7 se caracteriza por descontrol progresivo de la capacidad motriz, pérdida de la destreza manual y retinopatía (Berciano, 1982). Esto es provocado por neurodegeneración progresiva en el tejido cerebelar y la retina, específicamente por muerte de las células de Purkinje y de fotorreceptores, respectivamente (Nakamura et al., 2012). Los mecanismos de patogénesis involucrados en la patofisiología de la SCA7 a nivel molecular no se conocen con exactitud. Entre las alteraciones se ha descrito la acumulación de ataxina-7 mutante en inclusiones nucleares y citoplasmáticas de las células afectadas y desregulación de la expresión de genes específicos (Taylor et al., 2006). A nivel celular la muerte neuronal en cerebelo está asociada con expresión de ataxina-7 mutante en la glía de Bergmann (Furrer et al., 2011). De hecho varios estudios apuntan hacia la participación de los astrocitos en la progresión de la enfermedad (Garden et al., 2002) (Custer et al., 2006) (McCullough et al., 2012).

En este sentido, está bien descrita la participación de la glía en funciones relevantes del sistema nervioso central; por ejemplo, los astrocitos promueven la formación y maduración de la sinapsis y modulan la plasticidad, entre otras muchas funciones (Allen & Barres, 2009). Por su parte, existen enfermedades con alteración específica de la fisiología glial, en las que se describe una disminución de conexiones dendríticas, déficit cognitivo, entre otros (Michalik et al., 2004). En el caso particular de la SCA7, reportes de años recientes indican una participación de la glía en la muerte de las células de Purkinje. La expresión específica de ataxina-7 mutante en la glía de Bergman se asocia con muerte neuronal en el cerebelo (Custer et al., 2006), así mismo la expresión de ataxina-7 mutante en

cultivos primarios de astrocitos desregula la expresión de genes específicos como los promotores de reelina (McCullough et al., 2012).

Con el objetivo de explorar el componente glial involucrado en la patogénesis de la SCA7, en este trabajo se propuso la generación de un modelo basado en la línea celular MIO-M1. Las células MIO-M1 son derivadas de las células de Müller, el constituyente glial principal de la retina con funciones bien conocidas de soporte estructural y metabólico (Lawrence et al., 2007). A diferencia de la contraparte en cerebelo, no se sabe si en la retina la expresión de ataxina-7 mutante específicamente en las células de Müller tiene algún efecto y si esta expresión incide sobre la muerte de los conos y bastones. El contar con un modelo celular basado en la línea MIO-M1 nos permitirá evaluar esta y otras preguntas como: la potencial alteración en la expresión de transportadores de glutamato como GLAST, posible alteración en la vía de señalización de mTOR, alteración en la vía PI3K/Akt, Smac/DIABLO, alteraciones en el transporte nuclear, mecanismos de regulación por miRNAs, entre otros.

Para la generación del modelo celular se utilizó el sistema de expresión inducible Tet-On de tercera generación disponible comercialmente (Tet-On 3G). Este sistema permite la expresión específica de un gen de interés en presencia de doxiciclina (Clontech, 2015). El sistema es funcional en células de mamíferos, la expresión de fondo es baja y no propicia efectos pleiotropicos adversos ya que las secuencias reguladoras no existen en los genomas eucariontes. Se pueden obtener niveles relativamente elevados de la proteína de interés en un corto periodo de tiempo y es un sistema que permite evaluar efectos del tipo dosis-respuesta ante la inducción repetitiva de transactivador.

En este trabajo, a partir de RNA de células mononucleares, se logró generar un plásmido conteniendo la región codificante de *ATXN7* con 10 repetidos CAG (plásmido pTRE3G-myc-*ATXN7*-10Q). La transfección transitoria de esta construcción en la línea celular MIO-M1 con expresión estable de la proteína transactivadora (línea MIO-M1 Tet-On 3G), evidenció la presencia de la proteína ataxina-7 evaluada mediante ensayos de western-blot con un anticuerpo anti-myc,

específicamente en presencia de doxiciclina. Esta construcción tiene el potencial de ser transfectada a otras células del tipo Tet-On de diferentes linajes y representa una herramienta útil en estudios comparativos de los efectos que causa la expresión regulada de la proteína ataxina-7.

Por su parte, la transfección estable del plásmido pTRE3G-myc-*ATXN7*-10Q en las células MIO-M1 Tet-On 3G permitió la obtención de varios clones candidatas. De manera interesante, el análisis mediante RT-PCR demostró que algunas de estas clones expresan el transcrito de *ATXN7* sólo en condiciones de inducción. Es importante señalar la necesidad de evaluación adicional de este sistema de expresión. Será necesario estudiar el patrón de localización subcelular de ataxina-7, la expresión de caspasa-3 y medir la toxicidad que se causa en la célula transfectada. Una vez validado en su totalidad, el modelo celular generado en el presente estudio podrá ser útil en el análisis de los efectos de la sobre expresión de la proteína ataxina-7 en condiciones basales y de inducción. Si bien existe una amplia gama de líneas celulares para el estudio de las enfermedades neurodegenerativas asociadas a trinucleotidos repetidos (N1E-115, SHSY5Y, PC12, C6, RG2), a nuestro entender, a la fecha no se ha generado un modelo en células de origen glial como las células MIO-MI que expresen ataxina-7. De esta forma, el modelo aquí presentado, proporciona una nueva herramienta celular importante para tratar de descifrar el componente glial de los mecanismos patogénicos de la SCA7 en el SNC. Se espera que este modelo permita aumentar el entendimiento de esta patología y eventualmente permita evaluar potenciales estrategias terapéuticas.

11. CONCLUSIONES

Se generó el plásmido pTRE3G-myc-ATXN710Q mediante la clonación de la región codificante de *ATXN7* portando 10 repetidos CAG en el plásmido responsivo del sistema Tet-On 3G

Se estableció un modelo celular basado en la línea celular MIO-M1 para la expresión inducible de ataxina-7.

El modelo celular expresa el RNA mensajero de *ATXN7* exclusivamente en condiciones de inducción. De igual manera, el plásmido pTRE3G-myc-ATXN710Q es capaz de expresar la ataxina-7 en las células MIO-M1 sólo en presencia de doxiciclina.

12. REFERENCIAS

- Allen, N. J., & Barres, B. A. (2009). Glia - more than just brain glue. *Nature*, *457*(5), 675–677.
- Baber, Z., & Haghghat, N. (2010). Glutamine synthetase gene expression and glutamate transporters in C6-glioma cells. *Metabolic Brain Disease*, *25*(4), 413–8. <http://doi.org/10.1007/s11011-010-9223-9>
- Benomar, A., Krols, L., Stevanin, G., & Cancel, G. (1995). The gene for autosomal dominant cerebellar ataxia with pigmentary macular dystrophy maps to chromosome 3p12–p21. 1. *Nature ...*, *10*, 84–88. Retrieved from <http://www.nature.com/ng/journal/v10/n1/abs/ng0595-84.html>
- Berciano, J. (1982). Olivopontocerebellar atrophy. A review of 117 cases. *Journal of the Neurological Sciences*, *53*(2), 253–72. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7057212>
- Custer, S. K., Garden, G. A., Gill, N., Rueb, U., Libby, R. T., Schultz, C., ... La Spada, A. R. (2006). Bergmann glia expression of polyglutamine-expanded ataxin-7 produces neurodegeneration by impairing glutamate transport. *Nature Neuroscience*, *9*(10), 1302–11. <http://doi.org/10.1038/nn1750>
- Da Silva, G. R., Lima, T. H., Oréfice, R. L., Fernandes-Cunha, G. M., Silva-Cunha, A., Zhao, M., & Behar-Cohen, F. (2015). In vitro and in vivo ocular biocompatibility of electrospun poly(ϵ -caprolactone) nanofibers. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *73*, 9–19. <http://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.03.003>
- David, G., Abbas, N., Stevanin, G., Dürr, A., Yvert, G., Cancel, G., ... Brice, A. (1997). Cloning of the SCA7 gene reveals a highly unstable CAG repeat expansion. *Nature Genetics*, *17*(1), 65–70. <http://doi.org/10.1038/ng0997-65>
- Dueñas, A. M., Goold, R., & Giunti, P. (2006). Molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxias. *Brain*. <http://doi.org/10.1093/brain/awl081>
- Filla, A., Mariotti, C., Caruso, G., Coppola, G., Coccozza, S., Castaldo, I., ... Di Donato, S. (2000). Relative frequencies of CAG expansions in spinocerebellar ataxia and dentatorubropallidoluysian atrophy in 116 Italian families. *European Neurology*, *44*(1), 31–6. <http://doi.org/8189>
- Furrer, S. a, Mohanachandran, M. S., Waldherr, S. M., Chang, C., Damian, V. a, Sopher, B. L., ... La Spada, A. R. (2011). Spinocerebellar ataxia type 7 cerebellar disease requires the coordinated action of mutant ataxin-7 in

- neurons and glia, and displays non-cell-autonomous bergmann glia degeneration. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 31(45), 16269–78. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4000-11.2011>
- Garden, G., Libby, R., & Fu, Y. (2002). Polyglutamine-expanded ataxin-7 promotes non-cell-autonomous purkinje cell degeneration and displays proteolytic cleavage in ataxic transgenic mice. *The Journal of ...*, 22(12), 4897–905. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12077187>
- Helmlinger, D., Hardy, S., Sasorith, S., Klein, F., Robert, F., Weber, C., ... Devys, D. (2004). Ataxin-7 is a subunit of GCN5 histone acetyltransferase-containing complexes. *Human Molecular Genetics*, 13(12), 1257–65. <http://doi.org/10.1093/hmg/ddh139>
- Helmlinger, D., Tora, L., & Devys, D. (2006). Transcriptional alterations and chromatin remodeling in polyglutamine diseases. *Trends in Genetics: TIG*, 22(10), 562–70. <http://doi.org/10.1016/j.tig.2006.07.010>
- Holmberg, M., Duyckaerts, C., Dürr, A., Cancel, G., Gourfinkel-An, I., Damier, P., ... Brice, A. (1998). Spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7): A neurodegenerative disorder with neuronal intranuclear inclusions. *Human Molecular Genetics*, 7(5), 913–918. <http://doi.org/10.1093/hmg/7.5.913>
- Johansson, J., & Forsgren, L. (1998). Expanded CAG repeats in Swedish spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7) patients: effect of CAG repeat length on the clinical manifestation. *Human Molecular ...*, 7(2), 171–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9425223>
- Koizumi, S., Fujishita, K., & Inoue, K. (2005). Regulation of cell-to-cell communication mediated by astrocytic ATP in the CNS. *Purinergic Signalling*, 1(3), 211–7. <http://doi.org/10.1007/s11302-005-6321-y>
- La Spada, A. R., Fu, Y. H., Sopher, B. L., Libby, R. T., Wang, X., Li, L. Y., ... Chen, S. (2001). Polyglutamine-expanded ataxin-7 antagonizes CRX function and induces cone-rod dystrophy in a mouse model of SCA7. *Neuron*, 31(6), 913–927. [http://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00422-6](http://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00422-6)
- Lawrence, J. M., Singhal, S., Bhatia, B., Keegan, D. J., Reh, T. a, Luthert, P. J., ... Limb, G. A. (2007). MIO-M1 cells and similar muller glial cell lines derived from adult human retina exhibit neural stem cell characteristics. *Stem Cells*, 25(8), 2033–2043. <http://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0724>
- Limb, G., Salt, T., Munro, P., Moss, S., Khaw, P., Newman, E., & Reichenbach, A.

- (2001). In Vitro Characterization of a Spontaneously Immortalized Human Müller Cell Line (MIO-M1). *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43(3), 864–869.
- Lobsiger, C., & Cleveland, D. (2007). Glial cells as intrinsic components of non-cell-autonomous neurodegenerative disease. *Nature Neuroscience*, 10(11), 1355–1360. <http://doi.org/10.1038/nn1988>.Glial
- Magaña, J. (2014). Analysis of CAG repeats in five SCA loci in Mexican population: epidemiological evidence of a SCA7 founder effect. *Clinical ...*, 1–7. <http://doi.org/10.1111/cge.12114>
- McCullough, S. D., Xu, X., Dent, S. Y. R., Bekiranov, S., Roeder, R. G., & Grant, P. a. (2012). Reelin is a target of polyglutamine expanded ataxin-7 in human spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7) astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(52), 21319–24. <http://doi.org/10.1073/pnas.1218331110>
- McMahon, S. (2005). Polyglutamine-expanded spinocerebellar ataxia-7 protein disrupts normal SAGA and SLIK histone acetyltransferase activity. *Proceedings of the ...*, 102(24), 8478–82. Retrieved from <http://www.pnas.org/content/102/24/8478.short>
- Michalik, A., Martin, J.-J., & Van Broeckhoven, C. (2004). Spinocerebellar ataxia type 7 associated with pigmentary retinal dystrophy. *European Journal of Human Genetics : EJHG*, 12(1), 2–15. <http://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201108>
- Nakamura, Y., Tagawa, K., Oka, T., Sasabe, T., Ito, H., Shiwaku, H., ... Okazawa, H. (2012). Ataxin-7 associates with microtubules and stabilizes the cytoskeletal network. *Human Molecular Genetics*, 21(5), 1099–110. <http://doi.org/10.1093/hmg/ddr539>
- Palhan, V. B., Chen, S., Peng, G.-H., Tjernberg, A., Gamper, A. M., Fan, Y., ... Roeder, R. G. (2005). Polyglutamine-expanded ataxin-7 inhibits STAGA histone acetyltransferase activity to produce retinal degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(24), 8472–7. <http://doi.org/10.1073/pnas.0503505102>
- Perea, G., & Araque, A. (2005). Synaptic regulation of the astrocyte calcium signal. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria : 1996)*, 112(1), 127–35. <http://doi.org/10.1007/s00702-004-0170-7>
- Rüb, U., Schöls, L., Paulson, H., Auburger, G., Kermer, P., Jen, J. C., ... Deller, T. (2013). Clinical features, neurogenetics and neuropathology of the polyglutamine spinocerebellar ataxias type 1, 2, 3, 6 and 7. *Progress in*

Neurobiology, 104, 38–66. <http://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.01.001>

- Schöls, L., Bauer, P., Schmidt, T., Schulte, T., & Riess, O. (2004). Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. *The Lancet Neurology*, 3(5), 291–304. [http://doi.org/10.1016/S1474-4422\(04\)00737-9](http://doi.org/10.1016/S1474-4422(04)00737-9)
- Storey, E., du Sart, D., Shaw, J. H., Lorentzos, P., Kelly, L., McKinley Gardner, R. J., ... Nicholson, G. A. (2000). Frequency of spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, 6, and 7 in Australian patients with spinocerebellar ataxia. *American Journal of Medical Genetics*, 95(4), 351–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11186889>
- Ström, A.-L., Forsgren, L., & Holmberg, M. (2005). A role for both wild-type and expanded ataxin-7 in transcriptional regulation. *Neurobiology of Disease*, 20(3), 646–55. <http://doi.org/10.1016/j.nbd.2005.04.018>
- Taylor, J., Grote, S. K., Xia, J., Vandelft, M., Graczyk, J., Ellerby, L. M., ... Truant, R. (2006). Ataxin-7 can export from the nucleus via a conserved exportin-dependent signal. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(5), 2730–9. <http://doi.org/10.1074/jbc.M506751200>
- Yu, X., Ajayi, A., Boga, N., & Ström, A. (2012). Differential degradation of full-length and cleaved ataxin-7 fragments in a novel stable inducible SCA7 model. *Journal of Molecular Neuroscience*, 7, 219–233. <http://doi.org/10.1007/s12031-012-9722-8>
- Yvert, G., Lindenberg, K. S., Picaud, S., Landwehrmeyer, G. B., Sahel, J. a, & Mandel, J. L. (2000). Expanded polyglutamines induce neurodegeneration and trans-neuronal alterations in cerebellum and retina of SCA7 transgenic mice. *Human Molecular Genetics*, 9(17), 2491–506. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11030754>
- Zander, C., Takahashi, J., El Hachimi, K. H., Fujigasaki, H., Albanese, V., Lebre, a S., ... Brice, a. (2001). Similarities between spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7) cell models and human brain: proteins recruited in inclusions and activation of caspase-3. *Human Molecular Genetics*, 10(22), 2569–79. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11709544>