



**CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO  
NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGIA  
MOLECULAR**

REST y HSP90 nuevos blancos terapéuticos contra la  
enfermedad de Huntington

TESIS

Que presenta

**M. en C. Raúl Orozco Díaz**

Para obtener el grado de

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**En la Especialidad de Genética y Biología Molecular**

**Director de tesis: Dr. José Tapia Ramírez**

**Ciudad de México.**

**Noviembre, 2019**

El presente trabajo de investigación fue realizado en el  
Laboratorio 2 del Departamento de Genética y Biología Molecular  
del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto  
Politécnico Nacional (CINVESTAV)

Unidad Zacatenco

Bajo la Dirección y Tutoría del

Dr. José Tapia Ramírez

Para la realización de este trabajo se obtuvo financiamiento del

CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA

(Financiamiento No. 48249-M, Ciencia Básica SEP-CONACYT  
2004)

## DEDICATORIAS

Dedico ampliamente mi trabajo de doctorado principalmente a Dios♥ por darme salud y seguirme dando la dicha de lograr mis metas, a mi madre Silvia Díaz Ríos♥†, a ti madre: por darme la vida, porque sé que desde el cielo iluminas mi camino y porque te amo.

Con mucho amor y cariño a mi hermana Erika♥ por estar siempre al pendiente de mi persona, por demostrarme que desde la distancia estamos siempre cerca en mente y en corazón, por tenderme siempre la mano cuando te necesito, por ofrecerme ayuda económica cuando la necesite y por demostrarme que también me amas, MUCHAS GRACIAS.

A cada uno de mis sobrinos: Ronrris, Lupita, Jorgito, Cinthia, Julio, Edgar, Marquitos♥, Avatan♥, Wendy♥ y a mi hermosa Baby Isabella♥, espero mis logros de vida sean un ejemplo en sus vidas y brillen por siempre, LOS AMO CON TODO MI CORAZON.

## **AGRADECIMIENTOS**

Le agradezco primeramente a Dios por darme la oportunidad de seguir en la vida, darme salud y permitirme cumplir esta meta.

Agradezco ampliamente al Dr. José Tapia Ramírez por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por todas sus enseñanzas, por su amistad, por abrirme las puertas de su casa, por todo su apoyo y por ayudarme a lograr esta meta.

También agradezco a mis asesores de tesis: Dr. Patricio Gariglio Vidal, Dr. José Manuel Hernández Hernández, Dr. Satish Kumar Kamaraj, Luis Y. Kameyama Kawabe y a la Dra. Cecilia Irene Montañez.

Al Dr. Humbert S. por la donación de los plásmidos de expresión para Htt y Httm.

Un gran agradecimiento a mí estimado amigo José Luis Barrera, por tener siempre el material de laboratorio listo para trabajar, por su gran estimación, amistad y todo lo que convivimos juntos., así como al M. en C. Humberto Santana por su apoyo durante mi estancia en el laboratorio L-2.

Agradezco al M. en C. Carlos Cruz Cruz y a Víctor Tapia Ramírez por facilitarme la línea celular SH-SY5Y.

Agradezco al CINVESTAV por las instalaciones y recursos prestados para la realización de este trabajo.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por su apoyo económico para mi formación de este grado.

A cada una de las personas (estudiantes y trabajadores) del departamento de Genética y Biología Molecular y del LaNSE que me apoyaron con algún comentario, equipo o reactivo durante mi estancia en el doctorado y a los que me brindaron su amistad, en especial a la secretaria Gabriela Mora Macias por su amable apoyo con los trámites durante mi estancia en el doctorado y su amistad.

**Muchas Gracias a todo por su apoyo.**

## **INDICE GENERAL**

Abreviaturas.....	i
Indice de figuras.....	iii
Índice de tablas.....	vi
<b>Resumen.....</b>	<b>1</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>2</b>
<b>I. Introducción.....</b>	<b>3</b>
1. Antecedentes generales.....	3
1.1 Epidemiología .....	4
1.2 Mecanismos patogénicos de neurodegeneración celular en la enfermedad de Huntington.....	6
1.3 Htt.....	7
1.4 Httm.....	8
1.5 RE-1 silencing transcription factor (REST).....	10
1.5.1 REST en la enfermedad de Huntington.....	13
1.6 Proteínas de choque térmico.....	16
1.6.1 Heat Shock Protein 90 (Hsp90).....	18
1.7 El neuroblastoma y el ácido retinoico.....	20
<b>II. Justificación.....</b>	<b>23</b>
<b>III. Hipótesis.....</b>	<b>24</b>
<b>IV. Objetivos de este trabajo.....</b>	<b>25</b>

4.1. Objetivo general.....	25
4.2 Objetivos particulares.....	25
<b>V. Estrategia experimental.....</b>	<b>26</b>
<b>VI. Desarrollo experimental.....</b>	<b>27</b>
6.1 Anticuerpos, reactivos biológicos y reactivos químicos.....	27
6.1.1	
Anticuerpos.....	27
6.1.2 Reactivos biológicos.....	27
6.1.3 Reactivos químicos.....	28
6.2 Cultivos y diferenciación celular.....	29
6.2.1 Cultivo de bacterias.....	29
6.2.2 Cultivo de células eucariontes.....	29
6.2.3 Congelación y descongelación de células.....	29
6.2.4 Diferenciación de la línea celular SH-SY5Y.....	30
6.3 Oligo antisentido Hsp90 $\alpha$ (OA Hsp90 $\alpha$ ).....	30
6.4 Tratamiento celular.....	31
6.5 Plásmidos.....	32
6.5.1 Transformación.....	35
6.5.2 Selección y caracterización.....	36
6.5.3 Transfección transitoria.....	37
6.6 Ensayo de viabilidad celular.....	37
6.7 Determinación de muerte celular.....	38
6.8 Determinación de apoptosis.....	38

6.8.1 Determinación de productos degradados de PARP-1.....	38
6.9 Preparación de extractos celulares.....	39
6.9.1 Obtención de extracto total.....	39
6.9.2 Obtención de las fracciones citosólica y nuclear.....	39
6.10 Separación electroforética de proteínas en SDS-PAGE.....	40
6.11 Inmunodetección por Western-Blot.....	40
6.11.1 Electro-transferencia.....	40
6.11.2 Bloqueo de membrana.....	41
6.11.3 Reconocimiento indirecto.....	41
6.11.4 Revelado.....	41
6.12 Ensayo de co-inmunoprecipitación.....	42
6.13 Inmunofluorescencia y microscopia confocal.....	43
6.14 Análisis estadístico.....	45
<b>VII Resultados.....</b>	<b>46</b>
7.1 Análisis bioinformático de alineamiento de la secuencia del OA Hsp90 $\alpha$ mediante herramienta bioinformática.....	46
7.2 Diferenciación de la línea celular SH-SY5Y.....	47
7.2.1 Comparación Morfológica entre las células SH-SY5Y en estado proliferativo y diferenciado.....	47
7.2.2 Comparación de marcadores de diferenciación neuronal entre las células SH-SY5Y en estado proliferativo y diferenciado.....	48
7.2.2.1 Comparación de los marcadores neuronales enolasa específica de neurona (NSE), proteína nuclear neuronal (NeuN) y $\beta$ -tubulina III mediante Western-Blot.....	48
7.2.2.2 Comparación de los marcadores neuronales NSE, NeuN y $\beta$ -tubulina III mediante IF.....	49

7.3 Caracterización de los Plásmidos de Expresión pGFPC2-480-17HA o pGFPC2-480-68HA.....	50
7.4 Expresión y análisis de la proteína Httm y Httm.....	51
7.4.1 Análisis de Western-Blot.....	51
7.4.2 Fluorescencia de la transfección transitoria.....	51
7.5 Distribución subcelular de la proteína Httm.....	52
7.6 Efecto citotóxico de la expresión de Httm.....	53
7.6.1 Efecto de la expresión de Httm sobre la muerte celular.....	53
7.6.2 Efecto de la expresión de Httm sobre la apoptosis celular.....	54
7.6.3 Efecto de la expresión de Httm sobre la expresión de la proteína REST.....	55
7.7 Efecto del oligo antisentido Hsp90 $\alpha$ (OA Hsp90 $\alpha$ ).....	57
7.7.1 Efecto del oligo antisentido Hsp90 $\alpha$ sobre la viabilidad celular..	57
7.7.2 Efecto del oligo antisentido Hsp90 $\alpha$ sobre la traducción de la proteína Hsp90.....	58
7.7.3 Efecto del oligo antisentido Hsp90 $\alpha$ sobre la estabilidad de la proteína REST.....	59
7.8 Inhibición de la proteína Hsp90.....	60
7.8.1 Inhibición de la proteína Hsp90 con GA.....	60
7.8.1.1 Efecto de GA sobre la viabilidad celular.....	61
7.8.1.2 Efecto de GA sobre la síntesis de Hsp90.....	61
7.8.1.3 Efecto de GA sobre la estabilidad de REST.....	61
7.8.1.4 Efecto del tiempo de tratamiento con GA sobre la viabilidad celular.....	62
7.8.2 Inhibición de la proteína Hsp90 con PU-H71.....	63



7.8.2.1 Efecto de PU-H71 sobre la viabilidad celular.....	64
7.8.2.2 Efecto de PU-H71 sobre la síntesis de Hsp90.....	64
7.8.2.3 Efecto de PU-H71 sobre la estabilidad de REST.....	64
7.8.2.4 Efecto del tiempo de tratamiento con PU-H71 sobre la viabilidad celular.....	66
7.9 Interacción de Hsp90 $\alpha$ con REST.....	67
7.9.1 Ensayo de co-inmunoprecipitación.....	67
7.9.2 Ensayo d co-localización.....	67
7.10 Efecto de la inhibición genética o farmacológica de Hsp90 sobre la estabilidad de la proteína htt mutante.....	69
7.11 Interacción de Hsp90 con Httm.....	71
7.11.1 Ensayo de co-inmunoprecipitación.....	71
7.11.2 Ensayo d co-localización.....	72
7.12 La inhibición genética de Hsp90 reduce la apoptosis inducida por Httm.....	73
<b>VIII. Discusión.....</b>	<b>79</b>
<b>IX. Conclusiones.....</b>	<b>91</b>
<b>X. Perspectivas.....</b>	<b>92</b>
<b>XI. Bibliografías.....</b>	<b>93</b>

## ABREVIATURAS

°C	Grados Centígrados
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µM	Micromolar
ADN	Ácido Desoxirribonucleico.
ARN	Ácido Ribonucleíco
AR	Ácido Retinoico.
Células SH-SY5Y	Células de neuroblastoma.
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono.
DMEM	Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco.
DMSO	Dimetilsulfoxido
g	gramos
GA	Geldanamicina
GFP	Proteína Verde Fluorescente.
Hsp90α	Proteína de Choque Térmico α.
HD	Enfermedad de Huntington.
Htt	Huntingtina
Htt <sub>n</sub>	Huntingtina normal.
Htt <sub>e</sub>	Huntingtina endógena

Httm	Huntingtina mutante.
IF	Inmunofluorescencia.
KDa	Kilodalton.
MTT	3-(3,4-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
nM	Nanomolar
OA	Oligo Antisentido
OAm	Oligo Antisentio Mutante
PU-H71	6-Amino-8-[(6-iodo-1,3-benzodioxol-5-yl)thio]- <i>N</i> -(1-methylethyl)- 9 <i>H</i> -purine-9-propanamine
REST	Factor de Transcripción Silenciador del elemento RE1.
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sodio.
SFB	Suero Fetal Bovino

## INDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Prevalencia de la enfermedad de Huntington en la CDMX.....	5
Fig. 2. Diagrama de las regiones de la proteína Htt.....	8
Fig 3. Diferencia entre el gen <i>HTT</i> con repetidos CAG normal y con un excesos de repetidos de CAG.....	9
Fig. 4.- Representación esquemática de la proteína REST.....	11
Fig. 5.- Modelo esquemático de la regulación de la expresión de genes por REST/NRSF.....	12
Fig. 6. Representación esquemática del mecanismo de acción de REST en la enfermedad de Huntington.....	15
Fig. 7.- Representación gráfica de los dominios de Hsp90 y su arquitectura dimerica (izquierda).....	17
Fig. 8. Mecanismo de acción de drogas inhibitoras de Hsp90.....	18
Fig. 9. Secuencia nucleotídica el gen <i>HSP90AA1</i> .....	20
Fig. 10. Mecanismo de acción del ácido retinoico.....	22
Fig. 11. Representación esquemática del plásmido pGFPC2-480-68HA.....	33
Fig. 12. Representación esquemática del plásmido pGFPC2-480-17HA.....	34
Fig. 13. Representación esquemática del vector pEGFP-C2.....	35
Fig. 14. Alineamiento del OA Hsp90 $\alpha$ en la herramienta básica de búsqueda de alineación local (BLAS).....	46
Fig. 15. Microfotografías de la diferencia morfológica entre las células SH-SY5Y en estado proliferativo y diferenciado.....	47
Figura 16. Expresión de marcadores neuronales en células SH-SY5Y en estado proliferativo y en estado diferenciado.....	48

Fig. 17. Expresión de los marcadores neuronales NSE, NeuN y $\beta$ -tubulina III en células SH-SY5Y en estado proliferativo y en estado diferenciado.....	49
Fig. 18. Separación electroforética (gel de agarosa al 0.9 %) de los productos de digestión del vector pEGFP-C2 y de los plásmidos pGFPC2-480-17HA y pGFPC2-480-68HA.....	50
Fig. 19. Análisis de la expresión de Htt <sub>n</sub> y Htt <sub>m</sub> .....	52
Fig. 20. Análisis de Western-Blot de la localización subcelular de Htt <sub>m</sub> .....	53
Fig. 21. Htt <sub>m</sub> aumenta el % de muerte celular, induce apoptosis e incrementa el nivel de REST en células SH-SY5Y diferenciadas.....	56
Fig.22. Efecto del Oligo antisentido Hsp90 $\alpha$ sobre la viabilidad celular.....	58
Figura 23. Efecto del oligo antisentido Hsp90 $\alpha$ sobre la traducción de Hsp90 y la estabilidad de la proteína REST.....	60
Fig. 24. Efecto de la inhibición postraduccional de Hsp90 con GA.....	62
Fig. 25. Efecto del tiempo de la inhibición postraduccional de Hsp90 con GA.....	63
Fig. 26. Efecto de la inhibición postraduccional de Hsp90 con PU-H71.....	65
Fig. 27. Efecto del tiempo de la inhibición postraduccional de Hsp90 con PU-H71.....	66
Fig. 28. Análisis de la interacción entre Hsp90 y REST en Células SH-SY5Y.....	68
Figura 29. Efecto de la inhibición traduccional o farmacológica de Hsp90 sobre la estabilidad de Htt <sub>m</sub> .....	70
Fig.30 Análisis de la interacción entre Hsp90 y Htt <sub>m</sub> .....	73
Fig. 31. La inhibición de Hsp90 disminuye la citotoxicidad celular inducida por Htt <sub>m</sub> .....	76

Fig. 32. La inhibición traduccional o funcional de Hsp90 disminuye el daño citotóxico celular inducido por Httm.....	78
Fig. 33. Modelo Celular (Efecto de GA, PU-H71 y del OA Hsp90 sobre el daño citotóxico inducido por Httm).....	90

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1. Secuencias de los oligonucleótidos Hsp90<math>\alpha</math>.....</b>	<b>31</b>
--	-----------

## RESUMEN

La Httm permite la producción del factor de sobrevivencia BDNF (Factor neurotrófico derivado del cerebro) para neuronas estriatales, mediante el secuestro citoplasmático de REST (Factor de Transcripción del Elemento Represor-1). La Httm ocasiona una sobre regulación aberrantemente activa de REST y permite que se transporte de manera inapropiada al núcleo, resultando en una represión de genes de sobrevivencia neuronal, ocasionando una toxicidad característica de la enfermedad de Huntington. Hsp90 (Proteína de Choque Térmico 90) interacciona con Httm y mantiene su estabilidad, su disrupción ocasiona la ubiquitinación de Httm, no así la de Httm. Mecanismos para reducir el nivel de Httm y de REST podrían ayudar a desarrollar estrategias prometedoras para el tratamiento de la enfermedad de Huntington.

Células de neuroblastoma SH-SY5Y diferenciadas con 10  $\mu$ M de ácido retinoico, fueron transitoriamente co-transfectadas con el vector de expresión GFP-480-68Q para inducir citotoxicidad celular y con oligo antisentido Hsp90 $\alpha$  (OA Hsp90 $\alpha$ ) a 12 $\mu$ M, para evaluar su posible efecto en disminuir el nivel de Httm así como de REST, y por ende, si presenta efecto en disminuir la citotoxicidad celular. Después de realizar ensayos de muerte celular, de inmunofluorescencia, de inmunoprecipitación y de Western-Blot encontramos que REST se asocia a Hsp90, esto es un resultado novedoso, y que Hsp90 se une principalmente a Httm y en menor proporción a Httm. Los inhibidores específicos para Hsp90 geldanamicina (GA) y PU-H71, redujeron dramáticamente la estabilidad de Httm y de REST respectivamente, proporcionando una actividad neuroprotectora excelente. El OA Hsp90 $\alpha$  disminuyó significativamente la estabilidad de las proteínas Httm y REST, con reducción en el porcentaje de células con Httm en el núcleo y disminución en la muerte celular. De esta manera se presentó un efecto protector en la citotoxicidad celular ocasionada por Httm. El OA Hsp90 $\alpha$  mutante, no presentó ningún efecto importante. Nuestros resultados, sugieren que Hsp90 aumenta la estabilidad de REST y de Httm., y que Hsp90 y REST son buenas candidatas como blancos terapéuticos contra la enfermedad de Huntington.



## ABSTRACT

The nHtt sustains the production of the survival factor BDNF for striatal neurons through cytoplasmic sequestering of the repressor element-1 transcription factor (REST). mHtt leads aberrantly activated upregulation of REST and permits it inappropriately be transported to the nucleus, resulting in the repression of neuronal survival genes, leading to toxicity characteristic of Huntington's disease (HD). Heat shock protein 90 (Hsp90) interacts with mHtt and maintains its stability., its interruption causes the ubiquitination of mHtt, not that of nHtt. Mechanisms to reduce the mHtt and REST levels might be helpful for the development promising strategies for treating HD.

SH-SY5Y neuroblastoma cells differentiated with 10  $\mu$ M RA were transiently co-transfected with expression vector GFP-480-68Q for the induction of cellular cytotoxicity and with 12  $\mu$ M Hsp90 $\alpha$  antisense oligonucleotide (Hsp90 $\alpha$  ASO) to assess their possible effect in the reduction of mHtt and REST level and therefore, if there is an effect in decreasing cellular cytotoxicity. Death cell, immunofluorescence, immunoprecipitation and western blot assays were performed. We found that REST is a novel HSP90-associated protein and that Hsp90 binds mainly with mHtt compared to nHtt. Hsp90 specific inhibitors geldanamycin and PU-H71 dramatically reduced the mHtt and REST stability, providing excellent neuroprotective activity. Hsp90 $\alpha$  ASO significantly decreased the mHtt and REST proteins stability, causing a reduction in the percentage of cells with mHtt in nucleus, and a reduction in cell death, thus presenting a protective effect on cellular cytotoxicity caused by mHtt. Hsp90 $\alpha$  mutant ASO, didn't present any important effect.

Our data suggest that Hsp90 increases REST and mHtt stability, and that Hsp90 and REST are good therapeutic targets against Huntington's disease.

# I. INTRODUCCION

## 1. ANTECEDENTES GENERALES

La enfermedad de Huntington, es un desorden neurodegenerativo, autosómico dominante, causado por la expansión de los tripletes CAG del exón 1 del gen *IT15* en el cromosoma 4p16, la traducción de estos repetidos codifica para una región de poliglutaminas (polyQ) en la región amino de la proteína huntingtina, cuando la expansión de estos repetidos es mayor a 36, se produce la proteína huntingtina mutante, que es el aspecto principal causante de esta enfermedad (Buckler A, *et al.*, 1993). También se le conoce como la enfermedad Corea, es hereditaria y es esencialmente una enfermedad del sistema nervioso. Los pacientes presentan movimientos coreicos, involuntarios y bruscos en las extremidades, ya que se presenta un espasmo clónico que afecta el músculo voluntario, los dedos se encojen, las manos son rodantes, piernas y pies en continuo movimiento, un pie cruzado sobre el otro, dificultad para hablar, pérdida de peso por atrofia muscular, pérdida de la memoria, hasta ocasionar la muerte (Huntington G, 2003).

La enfermedad se presenta primordialmente en la región del estriado y se disemina a otras regiones del cerebro conforme avanza la enfermedad, los pacientes presentan una reducción hasta de un 30% del peso total del cerebro, atrofia del estriado, materia gris reducida, disminución del espesor de la cinta cortical, disminución de la perfusión de sangre cerebral, poca conectividad funcional córticoestriatal, propiedades electrofisiológicas alteradas en la actividad de las neuronas piramidales corticales (CPNs) y de las neuronas de espina media (MSNs), por lo tanto desregulación de información entre las neuronas (Estrada S., *et al.*, 2013).

Los pacientes van presentando diferentes grados de neuro-degeneración, por lo que la enfermedad de Huntington se clasifica en 5 grados severos (0 al 4) que se relacionan estrechamente con el grado de discapacidad clínica evaluada por una escala de calificación:

Grado 0: Existe alteración neuropatológica discernible, lo que sugiere que los cambios anatómicos van a la zaga del desarrollo de anomalías clínicas.

Grado 1: Los primeros cambios se observan en las porciones media paraventricular del núcleo caudal (NC), en la cola del núcleo caudal y en la parte dorsal del putamen. En el núcleo caudal se pierde el 50% de neuronas.

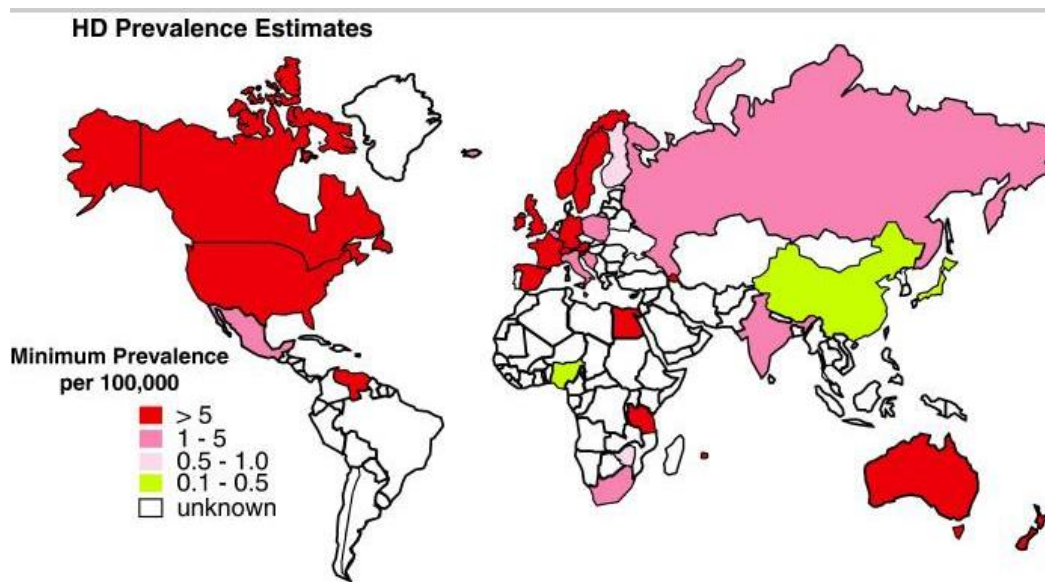
Grado 2 y 3: son caracterizados por una progresiva y severa atrofia del grosor estriado.

Grado 4: En el núcleo caudal se pierde hasta el 95% de las neuronas y atrofia del estriado. (Vonsatte JP, *et al.*, 1985).

### **1.1 Epidemiología**

La enfermedad de Huntington (HD, del inglés Huntington's Disease) muestra una prevalencia estable en la mayoría de las poblaciones de personas blancas, aproximadamente 5 a 7 individuos afectados por cada 100,000. Varía mucho geográficamente como resultado de la etnicidad, la migración local y los últimos patrones de inmigración. Las tasas de prevalencia más altas se registran en las poblaciones occidentales de Europa, donde la prevalencia mínima es de 5 afectados por cada 100,000. La prevalencia mínima de la HD se estima en 0.1 a 0.5 por cada 100,000 en China y Japón, poblaciones africanas muestran una prevalencia reducida de manera similar a la asiática, aunque en las zonas donde existen matrimonios con personas de raza blanca la frecuencia es más alta (Warby SC, *et al.*, 2011). Hay excepciones de prevalencia, por ejemplo un estudio epidemiológico del 2013 de la prevalencia de la enfermedad de Huntington en el Reino Unido entre 1990 a 2010, encontró que la prevalencia media del Reino Unido fue de 12.3 por cada 100,000 (Evans SJ. *et al.*, 2013). La prevalencia más alta se encuentra en las poblaciones aisladas de la región del Lago de Maracaibo de Venezuela, donde se ha reportado personas con HD de hasta a 700 por cada 100,000 personas (Warby SC, *et al.*, 2011). En la figura siguiente (figura 1), se muestra la prevalencia de la enfermedad a nivel mundial.

En México existen alrededor de 8,000 personas con HD, pero las estadísticas exactas son difíciles de obtener porque en nuestro país no se cuenta con la infraestructura para llevar a cabo censos en este tipo de enfermedades, además esta enfermedad es difícil de diagnosticar y muchas personas optan por esconder a sus familiares con la HD (<http://www.innn.salud.gob.mx/interior/atencionapacientes/padecimientos/huntington.html>).



**Fig. 1. Prevalencia de la enfermedad de Huntington en la a nivel mundial.** La prevalencia estimada de la enfermedad de Huntington es mayor en las poblaciones europeas que en el este de Asia. En la actualidad, la región de Maracaibo en Venezuela tiene la más alta prevalencia reportada a nivel mundial con enfermedad de Huntington (700 por 100, 000) (Warby SC., et al. 2011).

La prevalencia estimada para la Ciudad de México es de cuatro de cada 100, 000 personas, una cifra que es probablemente una subestimación, representa un posible límite inferior ya que la talla del alelo normal en individuos controles en México es significativamente más extenso que el de los europeos y venezolanos, lo que sugiere que la frecuencia de esta enfermedad en la población mexicana puede ser más alta, así pues, la prevalencia de esta enfermedad en México es

importante debido al enorme impacto que la enfermedad de Huntington tiene en las familias afectadas por dicha enfermedad (Alonso M E. *et al.*, 2009).

## **1.2 Mecanismos patogénicos de neurodegeneración celular en la enfermedad de Huntington**

Múltiples vías celulares se han implicado en la patogénesis de la enfermedad de Huntington, las cuales pueden ser particulares y producen un alto grado de disfunción.

La mutación en Htt<sup>n</sup> causa un cambio conformacional en la proteína, produciéndose un mal plegamiento, lo cual permite la exposición de varios sitios blancos para caspasas en el citoplasma, produciendo fragmentos de proteína que son ubiquitinados y etiquetados por el sistema proteosomal para su degradación, sin embargo, el sistema proteosomal llega a ser menos eficiente en la enfermedad de Huntington y por lo tanto estos fragmentos no son degradados. Algunos de los efectos de estos fragmentos se describen a continuación:

A: Fragmentos del extremo -NH<sub>2</sub> terminal que contienen el segmento poli Q de diferente tamaño, se acumulan en el citoplasma celular e interaccionan con varias proteínas causando disfunción de la señalización de calcio y homeostasis.

B: Fragmentos del extremo -NH<sub>2</sub> terminal que contienen el segmento poli Q, se agregan en el citoplasma celular formando cuerpos de inclusión.

C: En el citoplasma estos fragmentos interaccionan con varias proteínas de las mitocondrias, alteran su actividad metabólica, causan estrés oxidativo, defectos en la regulación de calcio y por tanto ocasionan disfunción mitocondrial.

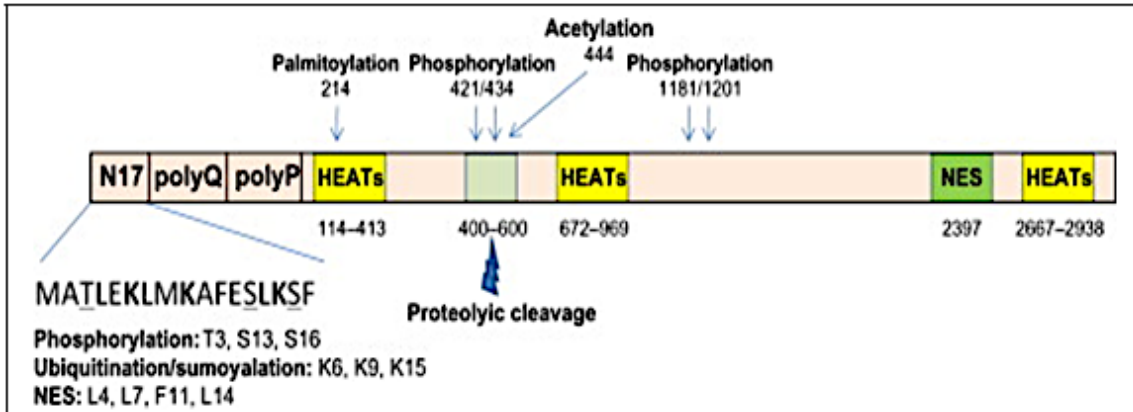
D: Fragmentos del extremo -NH<sub>2</sub> terminal que contienen el segmento poli Q, se traslocan al núcleo, desregulan la transcripción de genes y forman cuerpos de inclusión.

E: Huntingtina mutante altera el transporte vesicular y el reciclaje (Zuccato C. *et al.*, 2010).

### **1.3 Huntingtina (Htt)**

El gen de huntingtina, también llamado *HTT*, es el *IT15* ("interesting transcript 15"), el cual codifica para la proteína que lleva el mismo nombre, huntingtina es una proteína de aproximadamente 348 KDa, el marco de lectura abierto de su gen codificante contiene repeticiones del trinucleótido (CAG)<sub>n</sub> que van de 11 a 34, por lo que su peso molecular (PM) aumenta de acuerdo al número de repeticiones de los tripletes. En los cromosomas de sujetos con la enfermedad de Huntington la longitud de dichas repeticiones se incrementa a más de 35 en el extremo codificante amino terminal (Buckler A, *et al.*, 1993). Existen polimorfismos que producen cambios importantes en la estructura de la proteína ya que se genera un número variable de residuos de glutamina (CAG >>> Glutamina). En la figura 2 se muestra una representación esquemática de la proteína Htt. Está compuesta de 3144 aminoácidos, con un PM de 350 KDa, la región del extremo N-terminal de 17 aminoácidos (N-17) es altamente conservada y contiene modificaciones post traduccionales, tales como fosforilación y ubiquitinación, después de la región N-17 están las regiones poliglutaminas (poliQ) y poliprolina (PoliP), además, presenta múltiples sitios de fosforilación y varios repetidos HEATs con función desconocida. El C-terminal contiene la señal de exporte nuclear rica en leucina (NES) la cual puede ser un blanco para localización de citoplasma de Htt (Zheg Z., *et al.* 2012).

Htt se localiza principalmente en el citoplasma, asociada al retículo endoplasmático, aparato de Golgi, microtúbulos y a membrana celular, algunas veces en cuerpos densos post-sinápticos (Gutekunst CA, *et al.*, 1995). Tiene participación en la



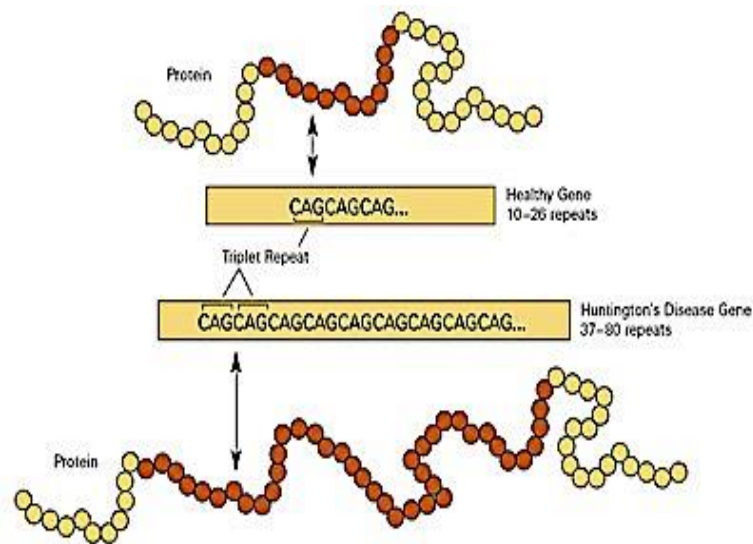
**Fig. 2. Diagrama de las regiones de la proteína Httm.** La longitud completa de Htt está compuesta de 3144 aminoácidos, tiene un PM de 350 KDa. La región de 17 aminoácidos del extremo N-terminal (N-17) es altamente conservada y contiene modificaciones post traducionales, tales como fosforilación y ubiquitinación, después de la región N-17 están las regiones poli glutaminas (poliQ) y poli prolina (PoliP). Presenta múltiples sitios de fosforilación y varios repetidos HEATs con función desconocida. El C-terminal contiene la señal de exporte nuclear rica en leucina (NES) la cual puede ser un blanco para localización de citoplasma de Httm (Zheg Z., *et al.* 2012).

división celular durante la neurogénesis uniéndose al complejo dineína/dinactina para la orientación correcta del uso mitótico (Godin JD., *et al* 2011) y el transporte de vesículas mediado por dineína (Caviston JP, *et al.* 2007).

La función de Httm, consiste en proteger a las células del cerebro de la muerte celular programada (apoptosis), es requerida principalmente en el desarrollo embrionario normal y en el desarrollo prenatal neuronal (Wang R, *et al.* 2012).

### 1.4 Httm

La expansión del triplete CAG, en el gen *IT15* por encima de 36 repetidos, produce una proteína mutada con por lo menos 37 unidades repetidas del aminoácido glutamina, que ocasiona la enfermedad (Buckler A, *et al.*, 1993). En la figura 3 se presenta un gen de una persona sin trastorno neurodegenerativo en comparación con un gen de un paciente con la enfermedad de Huntington (Newman ME. 2011)



**Fig 3. Diferencia entre el gen *HTT* con repetidos CAG normal y con un excesos de repetidos de CAG.** Comparación del gen de una persona sin enfermedad neurodegenerativa (parte superior) en relación a un paciente con enfermedad de Huntington (Parte inferior), con repeticiones de la secuencia de nucleótidos CAG (Citocina-Adenina-Guanina) excesivas. También en los recuadros se muestran los repetidos de glutamina en cada caso (Newman ME. 2011).

Httm se expresa de manera ubicua en los pacientes con la HD, pero el problema se presenta principalmente en las neuronas del cerebro (Sathasivam k, *et al.*, 2013), las cuales presentan morfología celular anormal, falta del desarrollo normal de neuritas, disfunción neuronal, expresión alterada de genes, muerte celular y formación de cuerpos de inclusión de fragmentos de Httm (Li S, *et al.*, 1999). Estos agregados se presentan principalmente en el núcleo y corresponden a fragmentos N-terminal de diferente tamaño, los cuales dependen de la enzima proteolítica que los produzca, (Dorsman, *et al.*, 1999), y/o del cambio en el marco de lectura, un corrimiento +1 en los codones CAG genera proteínas con expansiones de serina (Davies JE. *et al.*, 2006) o -1 genera especies codificantes con regiones poli A (proteínas híbridas poliQ/poliA) (Girstmair, *et al.*, 2013).



En el núcleo, Httm incrementa la expresión de caspasa-1, la cual activa la expresión de caspasa-3, la liberación del citocromo c de la mitocondria y ocasiona inducción de apoptosis, muerte celular que está asociada a la enfermedad de Huntington (Li SH., *et al.* 2000).

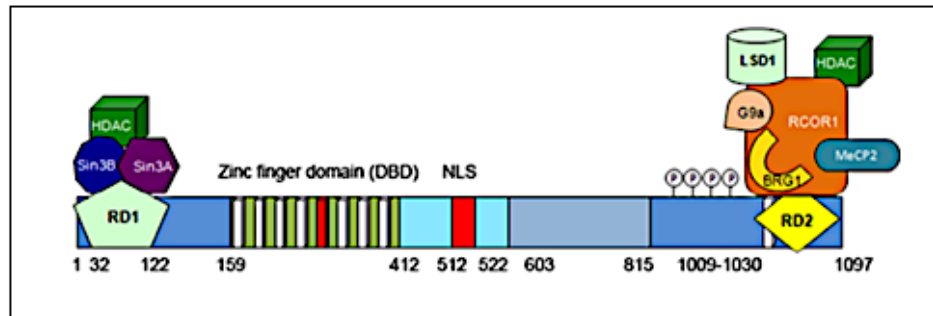
La desregulación transcripcional ocurrida por Httm es a través de su extremo N-terminal, el cual se une de manera errónea a proteínas y/o factores de transcripción, impidiendo su unión a sus secuencias blanco de promotores, ocasionando expresión o represión anormal de genes (Hogel M, *et al.*, 2012). Tiene mayor afinidad al ADN, altera la conformación de la cromatina, las regiones promotoras no quedan accesible a factores de transcripción o bien quedan al descubierto otras regiones promotoras ocasionando la expresión aberrante de ARNm. También se presenta desregulación post-transcripcional de genes que son regulados por microRNAs, ya que se presenta aumento o disminución de algunos microRNAs, ocasionando pérdida funcional neuronal (Johnson R. *et al.*, 2009).

### **1.5 RE1-Silencing Transcription Factor (REST)**

El Factor de Transcripción Restrictivo de RE1 (REST) también llamado Factor Silenciador Restrictivo Neuronal (NRSF), se une al elemento NRSE (Elemento Silenciador Restrictivo Neuronal) o RE1 (Elemento Represor 1) en el ADN (Schoenherr, *et al.*, 1995\*\*), que consiste en un elemento *cis* de 21 pb en las regiones regulatorias de genes blancos para REST. Durante la neurogénesis, REST reprime genes que inhiben la diferenciación neuronal, por lo que permite la expresión positiva de reguladores transcripcionales que actúan en genes de diferenciación terminal (Schoenherr, *et al.*, 1996).

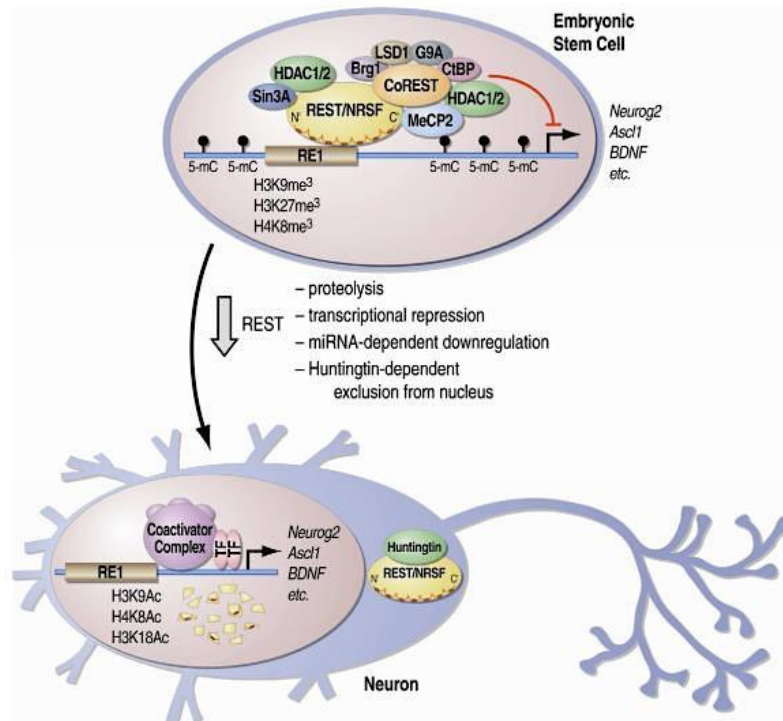
REST tiene un PM de 122 KDa (Faronato M, *et al.* 2011), comprende 2 dominios de represión (RD1 y RD2), un dominio de unión al ADN de 8 dedos de zinc, un fosfodegron (E1009/S1013 o S1027/S1030; señal de degradación) y un noveno dedo zinc C-terminal (Palm K, *et al.* 1999, Coulson JM, *et al.* 2000, Shimojo M, *et al.* 2011), figura 4.

REST recluta y se asocia con un gran número de factores epigenéticos, reguladores y correpresores que actúan en red, incluyendo metil-transferasas del ADN (DNMTs), enzimas remodeladoras de cromatina, subunidades mediadoras de ARN polimerasa II, Med-19 y -26, factores de unión a NADH, CtBP, factor transcripcional Sp3 y Scp1. REST en consecuencia participa como plataforma de la integridad, estabilidad y regulación genómica y represión o activación de genes en un contexto específico, dependiendo del locus donde se posicione (Rossbach M. 2011).



**Fig. 4.- Representación esquemática de la proteína REST.** La secuencia canónica de REST comprende 2 dominios de represión (RD1 y RD2), un dominio de unión al ADN (159-412) de 8 dedos de zinc, 2 señales de localización nuclear (demostrados en rojo), un fosfodegron y un dedo de zinc en el C-terminal (1006-1082). También se muestran en el esquema otras proteínas correpresoras, factores epigenéticos y reguladores que ayudan a REST en la represión de genes.

En células madre embrionarias (durante la diferenciación neuronal), REST es altamente expresada, se localiza en el núcleo y su función consiste en reprimir genes blancos como *BDNF*, *Ascl1*, *Neurog2*, entre otros, pero en células neuronales adultas el nivel de la proteína REST está reducido dramáticamente vía varios mecanismos: proteólisis (REST es degradada vía proteosomal), por baja regulación dependiente de miRNA (miR-9) y por exclusión nuclear dependiente de HttN (Figura 5) (Telese F, *et al.*, 2013).



**Fig. 5.- Modelo esquemático de la regulación de la expresión de genes por REST/NRSF.** En células madre embrionarias, REST está asociada con las secuencias que contiene el elemento RE1 y asegura el silenciamiento de genes blancos con ayuda de componentes represivos como HDAC1/2, LSD1, G9a, Suw39h1, CtBP, MeCP2 y Brg1. Durante la diferenciación celular neuronal el nivel de REST esta reducido dramáticamente vía degradación proteosomal, por baja regulación del RNAm dependiente de miRNA y por exclusión nuclear dependiente de Htt (Telese F, *et al.*, 2013).

La expresión normal de REST está regulada por los factores Sp1 y Sp3 que se unen directamente a la región promotora del gen *REST*, Sp1 actúa como activador de su expresión y dependiendo del estado de diferenciación celular o en el estado diferenciado Sp3 puede actuar como activador o represor en células neuronales y no neuronales (Ravache M, *et al.* 2010); REST también es regulada mediante su interacción con la proteína SCF  $\beta$ -TrCP (SKP1-CUL1-F-bpx-Protein) ubiquitin ligasa, para que sea degradada por el sistema proteosomal durante la fase G2 del ciclo celular, permitiendo la de-represión transcripcional de genes como *Mad2* (Mitotic Arrest deficient 2). *Mad2* es un componente esencial del checkpoint del

ensamblaje del uso mitótico, para que se lleve a cabo tanto la mitosis correcta, la segregación de cromátidas hermanas, la formación del uso mitótico, y la segregación correcta de cromosomas a las células hijas (Guardavaccaro D, *et al.*, 2008). Esta regulación de REST controla la diferenciación neuronal en condiciones fisiológicas y patológicas, la sobre expresión de SCF<sup>β-TrCP</sup> favorece la degradación de REST/NRSF produciendo la transformación oncogénica de células epiteliales de humanos (Westbrook TF, *et al.*, 2008).

RNAs no codificantes también juegan un papel importante en la regulación de REST, los que directamente flanquean el 3'UTR (Región no codificada del extremo 3') del transcrito de REST (Rossbach M. 2011).

En cerebros de personas adultas (de 73 a 106 años), se encontró que hay inducción normal de la expresión de REST, entra de manera normal al núcleo para reprimir genes que participan en la muerte celular que se expresan por estrés oxidativo, esta represión es para proteger a las neuronas de la muerte celular inducida por estrés oxidativo o por toxicidad de la proteína β-amiloide. A su vez REST participa como activador de genes; aumenta la expresión del factor de transcripción FOXO1 para mediar la resistencia al estrés oxidativo y la expresión de enzimas antioxidantes como catalasa y SOD1 (Lu T., *et al.* 2013).

### **1.5.1 REST en la enfermedad de Huntington**

REST es un factor de transcripción que regula la transcripción de microARNs; en la enfermedad de Huntington la regulación post-transcripcional de genes está desregulada por REST, ya que presenta depresión aberrante de algunos microRNAs como mir-135b, mir-132, mir-29a y mir-29b en neuronas, por otro lado un gran número de microRNAs son expresados aberrantemente incluyendo mir-9, mir-9\* y mir-124, ocasionando disfunción neuronal (Johnson R. *et al.*, 2008, 2009).

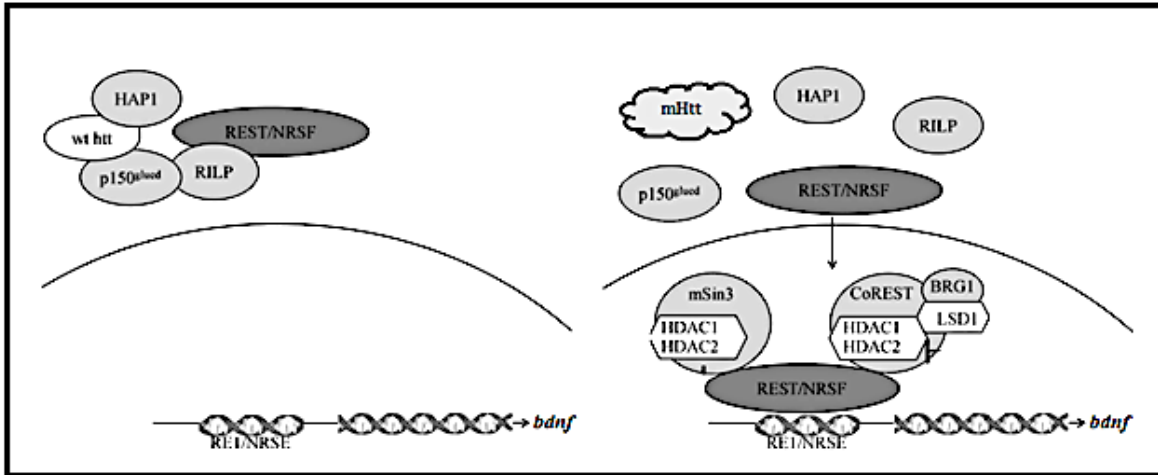
Htt<sup>n</sup> promueve la transcripción de BDNF (Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro), un factor de sobrevivencia de las neuronas del estriado (Zuccato C, *et*

*al.*, 2001) gracias a que se une de manera indirecta con REST para mantenerla en el citoplasma, impidiendo de esta manera que REST entre al núcleo y que se una al elemento NRSE del promotor del gen *BDNF* y se pueda llevar a cabo su transcripción. Esta actividad se pierde en la enfermedad de Huntington, ya que Httm permite la entrada errónea de REST al núcleo, la cual se une al elemento NRSE, permite el reclutamiento de correpresores que van a ocasionar la inhibición de la transcripción del gen *BDNF* y por lo tanto ocurre neurodegeneración (Zuccato, *et al.*, 2003).

La unión de Httm a REST es mediante la proteína RILP (Proteína de dominio LIM, que interactúa con REST/NRSF) formando un complejo en el citoplasma: Httm, dynactin p150<sup>Glued</sup>, RILP y REST; a este complejo se une la proteína HAP1 (Proteína 1 que se asocia a Httm) que impide que el complejo-REST entre al núcleo y se mantenga en el citoplasma., sin embargo, en la enfermedad de Huntington, Httm hace que la formación del complejo adquiera otra conformación y sea menos estable, de tal manera que al unirse HAP1 hace que se libere RILP, por tanto, REST entra de manera anormal al núcleo (Shimojo M., 2008), su extremo N-terminal recluta al correpresor proteína con hélices emparejadas anfipáticas (Sin3A) e histonas deacetilasas (HDAC1 y HDAC2) y su extremo C-terminal recluta una variedad de factores como es el correpresor REST 1 (CoREST) que reprime genes importantes en la regulación de la función de neuronas como la transcripción del gen *BDNF* (Bithell A., *et al* 2009). Una representación esquemática de la localización y del mecanismo de acción de REST en una célula neuronal con Httm y una célula con Httm, se presenta en la figura 6.

REST es un blanco transcripcional de la proteína pro-apoptótica HIPPI (Huntingtin Interacting Protein 1 (HIP1) protein interactor) principalmente en la enfermedad de Huntington, ya que HIPPI se une al promotor de REST e incrementa su expresión, esta actividad depende de la proteína HIP1: la Httm interacciona con HIP1 y la mantiene en el citoplasma, pero en la enfermedad de Huntington HIP1 se libera de Httm e interacciona con HIPPI formando un heterómero, se transloca al núcleo y

desencadena la activación transcripcional de REST, consecuentemente la represión de genes blancos como *PENX* y *BDNF*, aumento de inducción de caspasa-8 y por ende inducción de apoptosis (Datta M. *et al.*, 2011).



**Fig. 6. Representación esquemática del mecanismo de acción de REST en la enfermedad de Huntington.** Se representa la localización y el mecanismo de represión de REST en una célula que expresa Httm. Figura modificada de Rigamonti D., *et al.* 2009).

En la enfermedad de Huntington, Httm induce de manera indirecta y aberrante la activación de la expresión de REST, desencadena una cascada patológica que involucra de manera errónea la activación del factor SP1, el cual se une al promotor del gen *rest* y activa su expresión, por lo tanto, hay un aumento de la entrada de REST al núcleo (Ravache M, *et al.* 2010). Modular la entrada de REST al núcleo y alterar su función en la regulación de genes la hacen ser un blanco terapéutico importante para la enfermedad de Huntington (Chen GL., *and et al.* 2017).

### 1.6 Proteínas del Choque Térmico

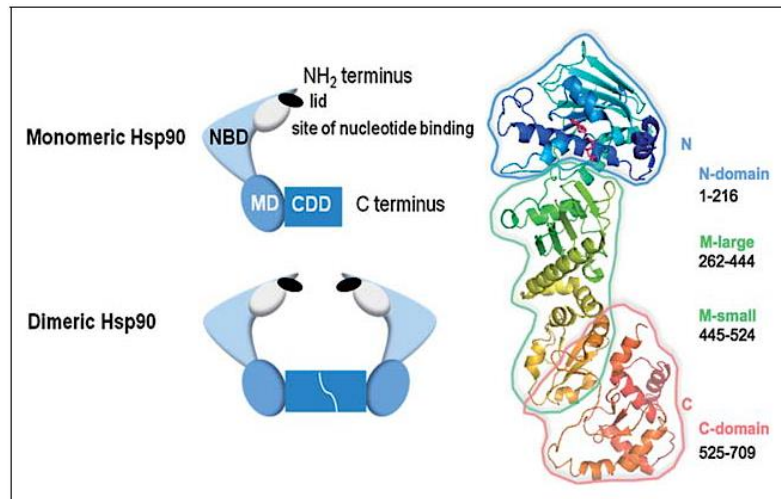
La respuesta molecular al estrés celular, incluye un cambio dramático en el patrón de expresión de genes y un aumento en la síntesis de una familia de proteínas

llamada proteínas del choque térmico (Hsps) que ayudan en el plegamiento de proteínas. La expresión de estas proteínas es regulada por factores de transcripción de choque térmico (HSFs) (Pirkkala L, *et al.*, 2011).

### **1.6.1 Hsp90**

La proteína del choque térmico 90 comprende alrededor del 1-2% del total de las proteínas citoplasmáticas, es translocada al núcleo en respuesta a estímulos y estrés, se encuentra de manera homodimérica (Taipale M, *et al.*, 2010), el monómero tiene 3 dominios funcionales: a) un dominio N-terminal de unión a nucleótidos (NBD) de 25 KDa, que sirve para unión a la moléculas ATP y a inhibidores tales como geldanamicina, b) un dominio medio (MD) de 55 KDa para unión a cochaperonas y proteínas clientes, y c) un dominio C-terminal (CTD) de 10 KDa que se une con el dominio de CTD de otro monómero Hsp90 para dimerizarse, y es un segundo sitio para unión a drogas como novobiocina. Figura 7 (Franke J. *et al.*, 2013).

Hsp90 participa en el plegamiento y maduración de proteínas sustratos mediante hidrólisis de ATP, e interacciona con más de 20 cochaperonas (Taipale M, *et al.*, 2010). Se encuentra unida a ciertas regiones de la membrana externa nuclear unida a NCP (Nuclear Complex Pore) donde está involucrada en la exportación nuclear de proteínas al citoplasma (Schalatter H, *et al.*, 2002), juega un papel importante en la estabilización de proteínas, protege al receptor GR $\beta$  (Glucocorticoid Receptor  $\beta$ ) en el citoplasma para que no sea ubiquitinado y por tanto no sea degradado por el sistema proteosomal (Zbang X, *et al.*, 2006).

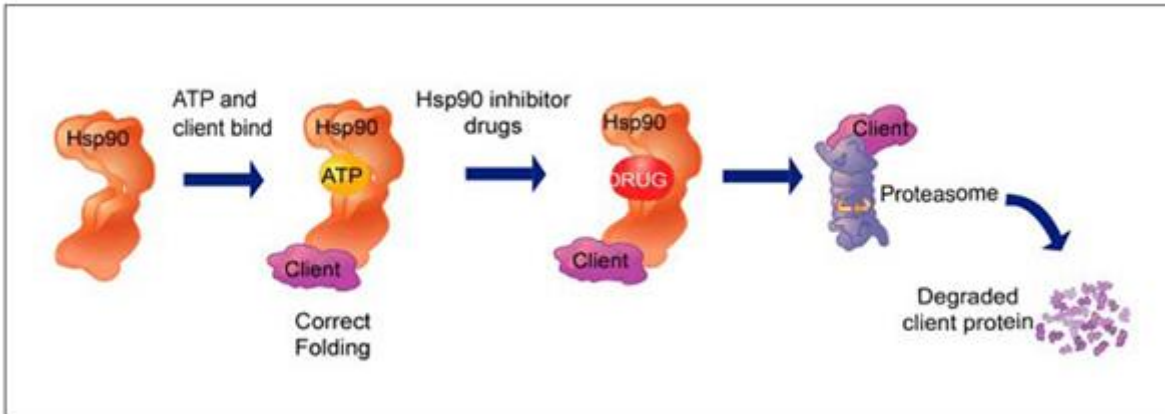


**Fig. 7. Representación gráfica de los dominios de Hsp90 y su arquitectura dimérica (izquierda).** Estructura de cristal del monómero de Hsp90 de levadura con ATP unido, que corresponde a pdb 2CG9<sup>18</sup> y visualizada por el software pymol (derecha).

Hsp90 es crucial para el proceso de motilidad y migración de células neuronales durante el desarrollo del sistema nervioso central, periférico y de melanomas. Se une a proteínas extracelulares de fibroblastos, monocitos, células dendríticas y células NK, interacciona de manera favorable con proteínas de virus y bacterias, por lo que tiene un rol importante en las enfermedades infecciosas (Tsutsumi S, *et al.*, 2007).

Hsp90 se encuentra de manera activa cuando tiene unida una molécula de ATP, de esta manera, tiene la capacidad de estabilizar y plegar proteínas clientes. Agentes que tienen la actividad de inhibir la proteína Hsp90, compiten contra la molécula ATP por la unión al extremo N-terminal de Hsp90, los inhibidores desplazan dicha molécula, entonces Hsp90 libera las proteínas clientes que son dirigidas a degradación por el sistema proteosomal (Figura 8) (<https://www.nextbigfuture.com/2016/05/new-cancer-drugs-could-treat-lethal.html>).





**Fig. 8. Mecanismo de acción de drogas inhibidoras de Hsp90.** Hsp90 es un homodímero que se activa cuando se une en su extremo N-terminal una molécula de ATP y tiene la capacidad de unirse a proteínas clientes. Las drogas inhibidoras de Hsp90 desplazan la molécula de ATP, se inactiva y libera la proteína cliente que se degrada por el proteosoma.

Inhibidores naturales de Hsp90 desplazan las moléculas de ATP y bloquean su función con alta especificidad, geldanamicina y PU-H71 se unen al extremo N-terminal de Hsp90 e inhiben su función, PU-H71 también puede unirse a Hsp90 en su forma monomérica e impedir su dimerización (Beebe K, *et al.* 2013).

Hsp90 se une con mayor afinidad a Httm que a Httn, la inhibición de Hsp90 con la molécula orgánica NVP-AUY 922 hace que se libere htt mutante, para que sea ubiquitinada y degradada, lo cual no ocurre con htt tipo silvestre. Esta inhibición hace que se active el factor HSF1 dejando la inducción de proteínas de choque térmico tales como Hsp70 y Hsp40 sin haber efecto citotóxico. La unión de Hsp90 a htt mutante la protege de la degradación proteosomal (Baldo B, *et al.*, 2012).

Existen 2 isoformas de Hsp90: Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$ , a pesar de estar altamente relacionadas y tener función de manera similar, interaccionan con proteínas clientes diferentes, la primera es inducida por estrés y la segunda es expresada constitutivamente. Las células y ratones que son knockout de Hsp90 $\alpha$ , son viables, pero ratones knockout de Hsp90 $\beta$ , son letales (Voss AK, *et al.* 2000, Zou M, *et al.* 2017). Así pues, Hsp90 $\beta$  es indispensable para la viabilidad celular, función

celular, proliferación celular y desarrollo embrionario de ratones E9.0/E9.5; sin embargo, dicha función no puede ser compensada por Hsp90 $\alpha$  endógena (Voss AK, *et al.* 2000), ni la función de Hsp90 $\alpha$  puede ser compensada por la Hsp90 $\beta$  (Zou M, *et al.* 2017).

PU-H71 y GA tienen gran afinidad de unión con Hsp90, se unen al dominio N-terminal de Hs90, la inhiben e impiden su dimerización para el ciclo de chaperona-producto. Hsp90 sufre modificaciones postraduccionales como fosforilación/desfosforilación, PU-H71 puede unirse e inhibir a Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$  en su estado de fosforilación/desfosforilación, sin embargo GA no se une a Hsp90 cuando está fosforilada (Beebe K., *et al.* 2013).

La inhibición farmacológica de Hsp90 desestabiliza su interacción con Httm e induce su degradación a través del proteosoma (Baldo B., *et al.* 2012). GA activa la respuesta de choque térmico, activándose la expresión de Hsp40, Hsp70 y Hsp90 y se inhibe la formación de agregados del extremo N-terminal de Httm en un modelo celular de enfermedad de Huntington (Sittler A. *et al.* 2001).

En la figura 9, se presenta la secuencia nucleotídica del gen *HSP90AA1*, codificante para la proteína Hsp90 $\alpha$  de humano (NCBI™ Gene ID:3320), la secuencia codificante para el péptido se muestra sombreada en color azul, la secuencia blanco para el oligo antisentido (OA) se muestra en color rojo:

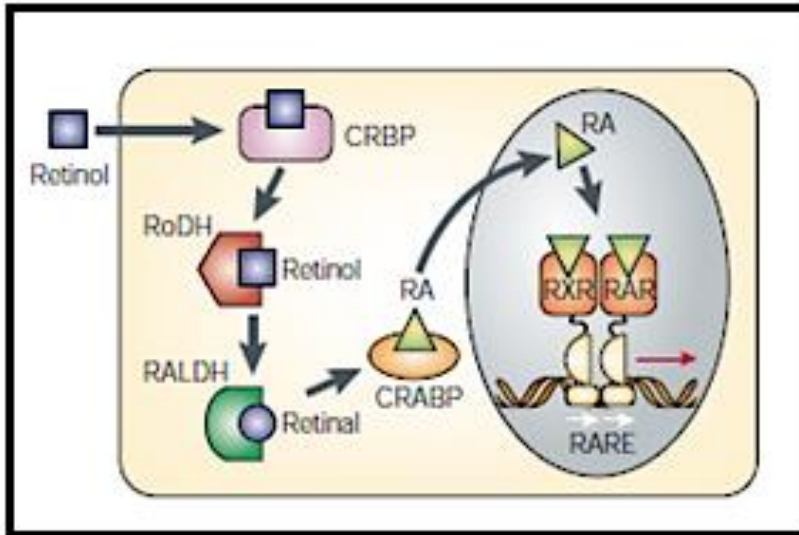


adecuadas, la línea celular noradrenérgica SH-SY5Y es una de estas líneas celulares (Pahlman S. 1995).

La línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y, procede de la tercera subclonación sucesiva de la línea celular SK-N-SH, una línea que se obtuvo en 1970 a partir de una biopsia de un neuroblastoma metastásico en médula ósea, de una paciente de cuatro años de edad con neuroblastoma periférico (Biedlre JL, *and et al.*, 1973, Biedlre JL, *and et al.*, 1978). SH-SY5Y puede ser diferenciada con ácido retinoico, para obtener células tipo neuronal con características bioquímicas y morfológicas de neuronas maduras. Presentan inhibición de la proliferación celular, extensión de neuritas, formación de sinapsis con otras células distantes, así como inducción de marcadores de diferenciación neuronal específicos de neuronas maduras,  $\beta$ -tubulina III y GAP43 (Dwane S, *et al.* 2013).

El ácido retinoico todo-trans (AR) pertenece a los flavonoides, es también conocido como la forma activa de la vitamina A. Está implicado en muchos procesos biológicos, en el desarrollo del sistema nervioso central vertebrado embrionario, regula el desarrollo de neuronas motoras e inter motoras a lo largo del axil dorso ventral, tiene función en la diferenciación neuronal. Las células del organismo cuando requieren ácido retinoico lo toman de la sangre donde se encuentra como retinol, se une a la proteína de unión al retinol y dentro de la célula es convertido enzimáticamente primero a retinal por la enzima retinol deshidrogenasa (RoDH) y posteriormente a ácido retinoico por la enzima retinaldehido deshidrogenasa (RALDH), en el citoplasma el ácido retinoico puede unirse a las proteínas que unen el ácido retinoico citoplasmático (CRABP). AR entra al núcleo y se une a los factores de transcripción: Receptor de ácido retinoico (RAR) y Receptor X retinoide (RXR), los cuales reconocen secuencias consenso RARE (Elementos Responsivos al ácido Retinoico) de genes blanco (Figura 10) (Maden M, 2002), Algunos genes blanco del ácido retinoico codifican para proteínas que participan en proliferación, diferenciación, metabolismo y adhesión celular, durante la embriogénesis y el tejido adulto tales como: *Mrg1* y *Lhx1* (para el desarrollo y reproducción del sistema nervioso), *Gcnf1* (para la

diferenciación neuronal), *Wnt5a* y *Hoxa1* (para la embriogénesis), *Dhrs3* y *Cyp26a1* (para el metabolismo celular), entre otros (Savory JG., et al. 2014).



**Figura 10. Mecanismo de acción del ácido retinoico.** Las células del organismo toman el retinol de la sangre, se une a la proteína de unión al retinol (CRBP), es convertido a retinal por la enzima retinol deshidrogenasa (RoDH) y posteriormente a ácido retinoico por la enzima retinaldehído deshidrogenasa (RALDH). En el citoplasma el ácido retinoico se une a las proteínas que unen el ácido retinoico citoplasmático (CRABP). AR entra al núcleo y se une a los factores de transcripción: Receptor de ácido retinoico (RAR) y Receptor X retinoide (RXR), los cuales reconocen secuencias consenso RARE (Elementos Responsables del Acido Retinoico) de genes blancos.

## II.- JUSTIFICACION

Existe un gran número de terapias disponibles para ayudar en la enfermedad de Huntington., sin embargo, no existen terapias reparativas, la mayoría de las terapias son designadas para mejorar la sintomatología primaria de la enfermedad, por ejemplo: agentes psiquiátricos, para el control del comportamiento de los síntomas motor-sedativos, potenciadores cognitivos y agentes neuroprotectores, pero estas drogas tienen beneficios limitados sin impedir la progresión de la enfermedad (Handley OJ. *et al.*, 2006). A la fecha no existe cura para esta enfermedad, por lo que se requiere identificar y desarrollar componentes novedosos que puedan ser exitosos para su tratamiento. Actualmente nuevos agentes farmacológicos están siendo examinados en células en cultivo y modelos animales de esta enfermedad, pero pocas drogas han sido examinadas en pacientes con algunos beneficios (Zuccato C. *et al.*, 2010).

Existen opciones atractivas para tratar la enfermedad de Huntington basadas en la posibilidad de bloquear la producción de la Httm, una estrategia emplea RNAm de Htm como blanco, usando RNA interferente (iRNA), mientras que otras estrategias son usadas principalmente para bloquear la proteína usando pequeños péptidos sintéticos o anticuerpos que reconocen Httm (Boado RJ, *et al.*, 2000). A pesar de estos resultados que son extremadamente relevantes en términos de terapia para la enfermedad de Huntington, en pacientes humanos el tipo de mutación (>36 repeticiones de CAG) y la pequeña talla (~21 nucleótidos) de los iRNAs, tanto shRNA o siRNA excluye el diseño de pequeños RNAs específicamente dirigidos a la mutación, ya que no discriminan entre alelos mutante y normal (Zuccato C. *et al.* 2010).

Durante la diferenciación neuronal, REST interacciona con las proteínas chaperonas Hsp40, Hsp10 y Grp78 (Proteína regulada por glucosa, de 78 KD), poco se conoce acerca de la estabilidad de REST, por lo tanto, nosotros investigamos si Hsp90 $\alpha$  pudiese tener un efecto en regular la estabilidad de REST (Lee N., *et al.* 2016). En este sentido, Hsp90 pudiera ser una proteína que interacciona con REST y Httm, manteniendo la estabilidad de este complejo.

### **III. HIPOTESIS**

La inhibición del ARNm de Hsp90 a nivel postranscripcional con oligo antisentido Hsp90 $\alpha$  (OA Hsp90 $\alpha$ ) o a nivel funcional con GA y PU-H71, disminuirá el nivel de la proteína REST y Httm, disminuyendo de esta manera el daño y la muerte celular inducida por Httm.

## **IV. OBJETIVOS DEL TRABAJO**

### **4.1 OBJETIVO GENERAL**

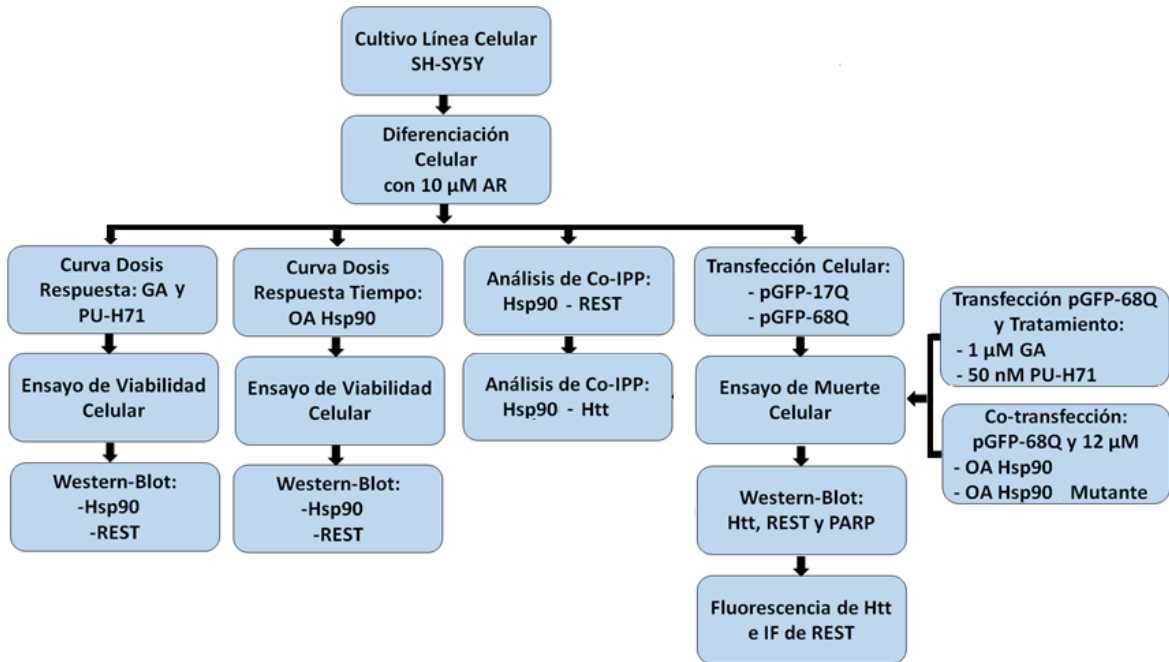
Identificación de nuevos blancos terapéuticos para la enfermedad de Huntington, a través de la inhibición de Hsp90 y analizando su efecto sobre la estabilidad de la proteína REST y Htt.

### **4.2 Objetivos Particulares**

- 1.** Analizar la estabilidad del factor transcripcional REST, en la línea celular SH-SY5Y diferenciada al inhibir la traducción de la proteína Hsp90 con oligo antisentido Hsp90 (OA) o su función con los fármacos GA y PU-H71.
- 2.** Analizar el efecto citotóxico de la proteína Httm en la línea celular SH-SY5Y diferenciada.
- 3.** Analizar la estabilidad de la proteína Httm al inhibir la síntesis (OA) o actividad (GA, PU-H71) de la proteína Hsp90, en la dicha línea celular.
- 4.** Determinar si el efecto de la inhibición de Hsp90 con OA reduce la muerte celular de células SH-SY5Y diferenciadas, que expresan la proteína Httm.



## V. EXTRATEGIA EXPERIMENTAL



## VI. DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 6.1. Anticuerpos, Reactivos Biológicos y Químicos

**6.1.1 Anticuerpos.** Se utilizaron los siguientes anticuerpos policlonales de conejo: anti-NSE (Santa Cruz Biotechnology, sc-14353), anti-PARP-1 (Santa Cruz Biotechnology, sc-7150), anti-Lámina A/C (Santa Cruz Biotechnology, sc-H-110), anti-REST (MILLIPORE, 07-579) y anti- $\beta$ -actina (obsequio del Dr. José Manuel Hernández Hernández del CINVESTAV), los anticuerpo policlonales de ratón: anti- $\beta$ -tubulina III (BioLegend Inc., 801201), anti-GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, sc-32233), así como también los anticuerpo policlonales de cabra: anti-Hsp90 (Santa Cruz Biotechnology, sc-8262) y anti-huntingtina (Santa cruz Biotechnology, sc-8767 o 8768). El anticuerpo monoclonal de ratón: anti-HA (SIGMA, H9658) y anti-Neun (Millipore, MAB377). Se emplearon anticuerpos secundarios anti-ratón, anti-conejo o anti-cabra conjugados con HRP (Santa Cruz Biotechnology) y anti-conejo conjugado con Cy<sup>TM</sup>5 (ZYMED, 81-6116), anti-cabra-FITC (Jackson, 705-095-00), anti-ratón-Alexa Fluor 594 (abcam, Ab150108), anti-conejo-Alexa Fluor 488 (abcam, Ab150077).

**6.1.2 Reactivos Biológicos.** Las digestiones endonucleolíticas fueron realizadas usando las enzimas de restricción NheI de New England Biolabs. Todas estas reacciones se llevaron a cabo utilizando el amortiguador y la temperatura recomendada por el fabricante.

Los marcadores de peso molecular (1 Kb y  $\lambda$ -HindIII) y de proteínas (Protein Marker Broad Range y Prestained Marker Broad Range) fueron obtenidos de New England Biolabs.

Los reactivos adquiridos de la compañía GIBCO by Technologies fueron: Aminoácidos MEM, SFB (Suero Fetal Bovino), tripsina-EDTA, glutamina, medio DMEM, penicilina-streptomina, agar bacto, agar dextrosa de papa, agar para

cuenta en placa, extracto de levadura, peptona, triptona peptona y caldo triptona fosfato.

Los siguientes reactivos biológicos fueron obtenidos de sus respectivas compañías: glicina (ICN Biomedicals), suplemento B-27 (Thermo Fisher SCIENTIFIC), Proteína G recombinante (Invitrogen), BSA (albúmina suero de bovino), Fibronectina, RNAsa A, Ampicilina, y Kanamicina fueron obtenidos de SIGMA-ALDRICH.

**6.1.3 Reactivos Químicos.** Los reactivos químicos y soluciones utilizados fueron de calidad biología molecular (grado BM). 3-(3,4-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), ortovanato de sodio, geldanamicina (GA), coctel inhibidores de proteasas, acetato de sodio, bicarbonato de sodio, Bis-Tris anhidro, deoxicolato de sodio, cloruro de manganeso, bromuro de etidio, EGTA anhidro, EDTA disódico, TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina), piruvato de sodio, HEPES, timidina, paraformaldeido, Tritón X-100, DAPI, cloruro de magnesio, DMEM, Hidróxido de potasio, SDS, glicerol, metanol, isopropanol, ácido clorhídrico, alcohol etílico, acrilamida, bisacrilimida, bromuro de etidio, ácido metílico, ácido acético, Cloroformo, azul de bromofenol, azul de xilencianol, kanamicina, DMSO (dimetil sulfoxido), Tween® 20 y reactivo de Bradford fueron adquiridos de la compañía SIGMA de México. De la compañía MERCK fueron adquiridos los reactivos: acetato de amonio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, fosfato de sodio monobásico, fosfato de sodio dibásico, fosfato de potasio monobásico, fosfato de potasio dibásico, hidróxido de sodio, formaldehido, 2 mercapto-etanol y el tris base. Los siguientes reactivos fueron obtenidos de sus respectivas compañía: Urea (Boehringer Mannheim), etilenglicol (Baker), PMSF (MP Biomeicals), PU-H71 (TOCRIS), Fluoruro de sodio (Merck-Millipore), persulfato de amonio (Gibco BRL) y azul de coomassie brillante R250 (Bio-Rad Labtories).

## **6.2 Cultivo y Diferenciación Celular**

**6.2.1 Cultivo de bacterias:** La cepa *Escherichia coli DH5α* (Stresgene) fue utilizada rutinariamente para competencia de transformación bacteriana mediante choque térmico y para experimentos de biología molecular. Esta cepa fue preparada siguiendo el protocolo estándar de cloruro de calcio (Sambrook, *et al.*, 1989). Los cultivos bacterianos se realizaron en medios líquidos o sólidos (suplementados con agar al 1.7%). Los medios Luria-Bertani se prepararon de acuerdo a las instrucciones estándar de laboratorio (Sambrook, *et al.*, 1989).

**6.2.2 Cultivo de Células Eucariontes:** La línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y fue sembrada y cultivada en medio DMEM 1X suplementado con 10% de SFB, 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sodio, 3.6 gr/L de bicarbonato de sodio, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales y penicilina-estreptomicina al 1X y se mantuvieron en un incubador a 37°C, en atmósfera húmeda y 5 % de CO<sub>2</sub>. Para hacer los pases, las células a 80% de confluencia fueron lavadas con PBS 1X y posteriormente se añadió tripsina en solución. Las células desprendidas por tripsina se suspendieron en medio DMEM IX suplementado y a partir de estas células se sembraron en nuevas cajas de cultivo.

**6.2.3 Congelación y Descongelación de Células:** La línea celular SH-SY5Y se creció a una confluencia aproximada del 80% en placas de cultivo de 100 mm de diámetro, para conservarlas durante largo tiempo, se les aspiró el medio de cultivo, se lavaron 2 veces con PBS 1X, se tripsinizaron, se diluyó con medio. Las células se recuperaron por centrifugación y entre 1-2 millones de células se suspendieron en 1 mL de medio de congelación frío (75 % de DMEM, 10% de SFB y 15% de DMSO), se transfirieron a un criotubo que se guardaron a -80°C y finalmente se almacenó en un contenedor de nitrógeno líquido. Para su descongelación, el criotubo con las células se sacó del nitrógeno líquido, se metió en un baño de agua a 37°C hasta la descongelación de su contenido,

rápidamente se le agregaron 10 ml de medio DMEM suplementado con 10 % de SFB y se centrifugaron a 800xg durante 10 minutos, se resuspendieron en 10 ml de DMEM 1X suplementado con 10% de SFB, 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sodio, 3.6 gr/L de bicarbonato de sodio, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales y penicilina-estreptomocina al 1X, se sembraron en placa y se mantuvieron en un incubador a 37°C, en atmosfera húmeda y 5 % de CO<sub>2</sub>.

**6.2.4 Diferenciación de Células SH-SY5Y:** La diferenciación celular fue inducida durante 4 días con 10 µM de AR en medio (DMEM con SFB al 10 % y suplementos, DMEM 1X, suplementado con 3 % de SFB, B-27 al 0.5 %, 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sodio, 3.6 gr/L de bicarbonato de sodio, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales y penicilina-estreptomocina al 1X), 24 horas después de sembrar las células SH-SY5Y. Diariamente se realizó cambio de la mitad del medio. Para evaluar la diferencia de la morfología de las células en estado proliferativo de las diferenciadas, las observamos en microscopio de contraste de fases con el objetivo de 20 x. Las imágenes fueron capturadas con un microscopio de epifluorescencia marca LEICA DMI6000CS, Brand Leica Microsystems.

### **6.3 Oligo Antisentido Hsp90α (OA Hsp90α)**

El oligo antisentido Hsp90α (OA Hsp90α), fue diseñado en nuestro laboratorio, se mando a sintetizar a la compañía SIGMA Life Science. OA Hsp90α hibrida en la región 5' del ARNm de Hsp90α de humano, justo antes del codón de inicio y su hibridación bloquea la traducción de la proteína Hsp90α. El OA Hsp90α es de cadena sencilla, compuesta de 17 nucleótidos: una secuencia de 6 bases de ARN y una secuencia de 5 bases de ADN en sus extremos 5' y 3'. Sus bases de ADN fueron metiladas para impedir que fueran degradados por endonucleasas extra e intracelulares. Para analizar que hibrida únicamente con el gen *Hsp90αAA1* y en ningún otro gen de humano, se realizó un análisis bioinformático de alineamiento de secuencias del OA Hsp90α con el programa BLAST (Basic Local Alignment

Search Tool) en la base de datos de NCBI (National Center of Biotechnology Information). También se diseñó un oligo que presenta la misma secuencia y composición de bases que el OA Hsp90 $\alpha$ , pero con 4 mutaciones aleatorias, se realizó un BLAST para que no presentara sitio de unión con ninguna región del gen *HSP90 $\alpha$ AA1* y ni con otro gen de humano, este oligo mutante se utilizó como control de la especificidad del OA Hsp90 $\alpha$ . Las secuencias y características de los oligos se muestran en la tabla 1.

Células SH-SY5Y diferenciadas fueron transfectadas con diferentes concentraciones de OA Hsp90 $\alpha$  (0  $\mu$ M, 8  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 12  $\mu$ M o 14  $\mu$ M) usando lipofectamina 2000 de acuerdo al protocolo del fabricante. Después fueron incubadas a 37°C y CO<sub>2</sub> continuando el procedimiento de diferenciación celular. A las 0, 24, 48 y 72 horas postransfección las células fueron analizadas para ensayo de viabilidad celular o cosechadas para estudios de Western-Blot.

**Tabla 1. Secuencias de los Oligonucleótidos Hsp90 $\alpha$**

Oligonucleótido	Secuencia
<b>Antisentido (AO)</b>	5'-mG mG mA mC dG dC dT dG dA dA dG dC mA mA mC mU mG-3'
<b>Mutante</b>	5'-mA mG mA mC dG dA dT dG dA dA dG dC mC mA mC mU mU-3'

2' O-metil ARN = mG, mC, mA, mU  
Bases de ADN entre el oligo de ARN = dA, dG, dC, dT

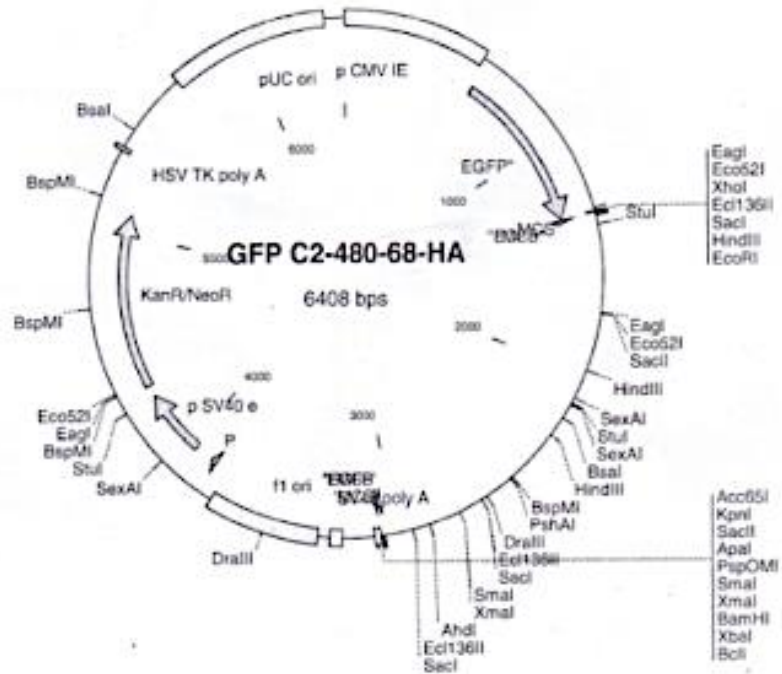
#### 6.4 Tratamiento Celular

Los inhibidores de Hsp90, GA y PU-H71 fueron disueltos en DMSO de acuerdo a la hoja técnica del fabricante. Células SH-SY5Y diferenciadas fueron tratadas con diferentes concentraciones de GA (0  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 2  $\mu$ M, o 3  $\mu$ M) o diferentes concentraciones de PU-H71 (0 nM, 50 nM, 100 nM, 200 nM o 300 nM). Luego,

fueron incubadas a 37°C y CO<sub>2</sub> continuando el procedimiento de diferenciación celular. A las 24, 48 y 72 horas fueron analizadas por ensayo de viabilidad celular o cosechadas para estudios de Western-Blot.

## **6.5 Plásmidos**

El plásmido pGFPC2-480-68HA, portador de la secuencia de nucleótidos codificante para la proteína reportera GFP fusionada al polipéptido del extremo amino N-terminal de Htt de humano con 68 glutaminasde (Figura 11) y el plásmido pGFP C2-480-17HA portador de la secuencia codificante para la proteína GFP fusionada al polipéptido del extremo amino N-terminal de Htt de humano con 17 glutaminas (Figura 12) fueron donados por el Dr. Humbert S. del instituto Curie-UMR, de la universidad Orsay de Francia. Además de la secuencia codificante para la proteína GFP-Htt, estos plásmidos presentan el gen que proporciona resistencia a Kanamicina (Km<sup>r</sup>), para verificar la presencia del plásmido en las bacterias utilizadas para la propagación del mismo. Contienen el promotor CMV (Citomegalovirus) para expresión constitutiva de la proteína GFP-Htt en células eucariontes.



**Fig. 11. Representación esquemática del plásmido pGFPC2-480-68HA.** Se muestran algunas de las características moleculares: El plásmido pGFPC2-480-68HA tiene la secuencia clonada del gen *GFP* fusionado al extremo 5' del gen *HTT* (con 68 repetidos de CAG) bajo el control del promotor CMV (Citomegalovirus).







Para la transformación, en un tubo eppendorf de 1.5 ml se colocaron 50  $\mu$ l de las bacterias competentes y se agregaron 2 – 20 ng/ $\mu$ l de ADN plasmídico (pGFP-C2, pGFPC2-480-17HA, pGFPC2-480-68HA), se incubaron por 15 minutos en hielo y se aplicó un choque térmico en un baño María a 42°C por 60 segundos., inmediatamente se pasó el tubo a un baño de hielo donde se mantuvieron por 5 minutos. Se añadió 1 ml de medio LB y se incubó a 37°C con agitación constante a 250 rpm. Terminado el tiempo de incubación las bacterias transformadas se empaquetaron por centrifugación a 12,000 x g durante 1 minuto, enseguida la pastilla se suspendió y fue dispersada en cajas con medio LB agar suplementado con 25  $\mu$ g/ml de Kanamicina. Las cajas se incubaron en posición invertida a 37°C toda la noche para la selección de transformantes estables.

**6.5.2 Selección y caracterización.** Las transformantes capaces de crecer en presencia del antibiótico fueron consideradas como candidatas. Para la selección de clonas positivas, es decir que contengan el plásmido con el cual fueron transformadas, el ADN plasmídico de las candidatas se recuperó en mini preparaciones utilizando la solución tampón STET (Sambrook, *et al.*, 1989); Se realizó un análisis endonucleolítico utilizando 0.5  $\mu$ g de plásmido, que fue digerido con 10 U de la endonucleasa NheI durante 4 horas en las condiciones recomendadas por el fabricante. Los productos de digestión fueron analizadas mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, con 0.5  $\mu$ g/mL de bromuro de etidio. Las clonas positivas fueron aquellas que presentaron el tamaño real esperado.

Posteriormente, a partir de las clonas positivas estables se realizó la transformación de la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$  competente, con el ADN plasmídico, se recuperó y se purificó utilizando los estuches comerciales QIAprep® Spin Midiprep Kit. El procedimiento sugerido por el fabricante fue utilizado sin modificaciones.

Para la visualización de los geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio, se utilizó el foto documentador High performance UV Transilluminator UVP, model TFML-26.

**6.5.3 Transfección Transitoria.** Células SH-SY5Y diferenciadas fueron transfectadas transitoriamente con el plásmido pGFPC2-480-17HA o pGFPC2-480-68HA usando lipofectamina 2000 de acuerdo al protocolo del fabricante, a las 6 horas post-transfección las células fueron tratadas con 1  $\mu$ M de GA o 50 nM de PU-H71. Células SH-SY5Y diferenciadas fueron cotransfectadas con el plásmido pGFPC2-480-68HA y con 12  $\mu$ M de OA Hsp90 $\alpha$  o 12  $\mu$ M de OA Hsp90 $\alpha$  mutante (como control) usando lipofectamina 2000 de acuerdo al protocolo del fabricante. A las 24, 48 y 72 horas las células fueron analizadas para ensayos de viabilidad celular o cosechadas para análisis de Western-Blot.

## **7.6 Ensayo de Viabilidad Celular**

Este ensayo fue realizado mediante la reducción del MTT, que mide la reducción del MTT a formazan en las células metabólicamente activas. Para la determinación de la viabilidad celular, fueron sembradas células SH-SY5Y en microplacas de 96 pozos a una densidad de 13,000 células por pozo en 100  $\mu$ l de DMEM suplementado y fueron diferenciadas durante 4 días. Después de los tiempos correspondientes a los tratamientos, a la transfección o cotransfección, el medio fue remplazado con DMEM que contiene MTT al 10% e incubadas durante 3 horas, en un incubador a 5% de CO<sub>2</sub> y a 37°C en atmosfera húmeda. La solución del medio con el MTT fue descartada y los cristales de formazan formados fueron solubilizados con 100  $\mu$ l de solución solubilizante de MTT, se agito por 10 minutos y se determinó la absorbancia a 570 nm en un lector de ELISA marca Synergy<sup>H4</sup> Hybrid Reader, BioTek.

Se utilizaron como control, células sin tratar o células tratadas con el solvente DMSO en el caso de cada experimento requerido, el valor obtenido de las células control corresponde al 100% de viabilidad celular. El ensayo se realizó por triplicado, los resultados de células vivas se expresan como % de viabilidad celular y se obtiene de la siguiente formula:

$$\% \text{ de viabilidad celular} = \frac{(DO \text{ de células tratadas})(100)}{DO \text{ de células control}}$$

Donde DO = densidad óptica.

### **6.7 Determinación de Muerte Celular**

La muerte celular se determinó una vez realizado el ensayo de viabilidad mediante la siguiente formula:

$$\% \text{ de muerte celular} = 100 \% - \% \text{ de viabilidad celular}$$

### **6.8 Determinación de Apoptosis.**

Para analizar la muerte celular por apoptosis utilizamos criterios bioquímicos.

**6.8.1 Determinación de productos degradados de PARP-1.** Células SH-SY5Y diferenciadas fueron transfectadas transitoriamente con los plásmidos pGFPC2-480-17HA o el pGFPC2-480-68HA o cotransfectadas con el plásmido pGFPC2-480-68HA 12  $\mu$ M del OA Hsp90 $\alpha$  o oligo nucleótido mutado. 24 horas post transfección se hicieron extractos celulares, se realizó una electroforesis de SDS-PAGE y análisis de western-Blot con un anticuerpo específico contra el indicador de apoptosis: la proteína Poli ADP-Ribosa polimerasa-1 (PARP-1).

## **6.9 Preparación de extractos Celulares.**

**6.9.1 Obtención de Extracto Total.** Para obtener el extracto total de células SH-SY5Y diferenciadas, la monocapa celular se lavó 2 veces con PBS 1X frío, se suspendieron en buffer de lisis I: Tris (50 mM, pH 7.9), NaCl (100 mM), urea (8 M), tritón X-100 (1%), glicerol (5%), SDS (0.1%), Nonidet P-40 (0.5%), EDTA (0.1 mM), EGTA (2 mM), NaF (50 mM), Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (1 mM), Phenylmethylsulfonyl fluoride (1 mM), DTT (0.1 mM) y coctel de inhibidores de proteasas (SIGMA-ALDRICH, P8340), y se incubó 10 minutos en hielo, las células se recogieron con un gendarme, se sonicaron 3 veces durante 15 segundos con descanso de 15 segundos entre cada periodo de sonicación, se centrifugaron a 18,300 × g por 15 minutos a 4°C. El SN se guardó como extracto celular total, se hizo la cuantificación de proteínas por el método de Bradford usando un espectrómetro de microplacas *Microplate Reader 680* (Biorad) y se realizaron análisis de Western-Blot.

**7.9.2 Obtención de las Fracciones Citosólica y Nuclear.** Para aislar las fracciones citosólica y nuclear, células SH-SY5Y diferenciadas y transfectadas transitoriamente con los plásmidos pGFPC2-480-17HA o el pGFPC2-480-68HA, fueron lavadas 2 veces con PBS 1X frío a las 16 horas postransfección, la monocapa celular fue obtenida con un gendarme y las células lisadas en buffer II frío (Tris 20 mM, pH 8.0, NaCl 15 mM, KCl 60 mM, EGTA 0.5 mM, sacarosa 0.3 M, Nonidet P-40 0.25%, 2-mercaptoethanol 0.5 mM, Phenylmethylsulfonyl fluoride 1 mM y coctel de inhibidores de proteasas), se agitaron durante 15 minutos a 4°C, se centrifugaron a 1,800 × g durante 10 minutos a 4 °C y el SN se guardó como fracción citosólica. El pellet fue suspendido en buffer RIPA frío (Tris (50 mM, pH 7.4, NaCl 150 Mm, SDS 0.1%, Nonidet P-40 0.5%, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, NaF 1 mM, Phenylmethylsulfonyl fluoride 1 mM, deoxicolato de sodio 0.5% y coctel de inhibidores de proteasas), fue sonicado 3 veces durante 15 segundos con descanso de 15 segundos entre cada periodo de sonicación, se centrifugaron a 18,300 × g por 15 minutos a 4°C, el SN se guardó como fracción nuclear. A

ambas fracciones se les realizó la cuantificación de proteínas por el método de Bradford usando un espectrómetro de microplacas *Microplate Reader 680* (Biorad) y se realizaron análisis de Wester-blot.

## **6.10 Separación electroforética de proteínas en SDS-PAGE**

La separación de proteínas se realizó siguiendo la técnica de electroforesis vertical en placa de vidrio. La cuantificación de proteínas se realizó de acuerdo al método de Bradford usando un espectrómetro de microplacas *Microplate Reader 680* (Biorad). Se prepararon geles de acrilamida-bisacrilamida a una concentración de 8, 10 o 12 % dependiendo las proteínas a determinar. Se prepararon muestras que contenían 40, 80 o 100 µg de proteína dependiendo de la proteína a determinar. Las proteínas se desnaturalizaron y redujeron en una solución tampón de muestra de proteínas en una proporción 2:1 (v/v) (Laemmli, 1970), se calentaron a 100°C durante 20 minutos y se cargaron en los pozos del gel concentrador. La electroforesis se realizó en una solución tampón de corrida 1X durante 20 minutos a 80 V, seguido de 120 minutos a 120 V.

Para visualización e identificación de proteínas, el gel fue teñido con solución de azul de coomassie (25% de isopropanol; 10% de ácido acético; 0.2% de azul de coomassie R-250) durante 1-2 horas y desteñido con solución alcohol-ácido (10% de isopropanol; 10% de ácido acético) durante 8-12 h. Las imágenes de los geles se capturaron en el fotodocumentador High performance UV Transilluminator UVP, model TFML-26. Para la inmunodetección, el gel fue utilizado inmediatamente.

## **6.11. Inmunodetección por Western-blot**

**6.11.1 Electro-transferencia.** Posterior a la separación electroforética, las proteínas fueron electro-transferidas a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm, utilizando el sistema Criterion<sup>TM</sup> Blotter (BioRad), siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. El gel fue equilibrado en el amortiguador de

transferencia frío (25 mM de Tris; 192 mM de glicina; 10% de metanol); posteriormente, se preparó el sistema de transferencia tipo emparedado (gel/membrana); y enseguida, se aplicaron 60 V durante 1.5 horas para favorecer la electro-transferencia.

**6.11.2 Bloqueo de membrana.** Previamente al reconocimiento, la membrana fue bloqueada durante toda la noche con una solución al 10 % de leche semi-descremada (Svelty™ \*Nestle®) en solución TBST (10 mM de Tris-HCl, pH 7.5; 150 mM de NaCl; 0.05% de Tween® 20) en agitación a 4°C.

**6.11.3 Reconocimiento indirecto.** Las membranas que contenían las proteínas transferidas, se usaron para la identificación de las proteínas  $\beta$ -actina, NSE,  $\beta$ -tubulina III, NeuN, Lamina A/C, GAPDH, REST, Hsp90 $\alpha$ , Htt normal y Htt mutante, mediante el reconocimiento con un anticuerpo primario específico, durante 2 horas en agitación a temperatura ambiente, seguido de 3 ciclos de lavado con TBST durante 10 minutos cada ciclo de lavado. Inmediatamente, se realizó el reconocimiento del anticuerpo específico con un policlonal secundario durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente, seguido de 3 ciclos de lavado con TBST durante 10 minutos cada ciclo de lavado.

**6.11.4 Revelado.** Finalmente, el reconocimiento indirecto de la inmunodetección se realizó mediante quimioluminiscencia, usando el kit Western Lightning Plus-ECL, las bandas fueron visualizadas en películas de rayos X (Kodak). El análisis densitométrico de las bandas de Western-Blot se llevó a cabo con el software Image Studio™ Lite Ver 4.0. La intensidad de cada banda se normalizó en relación a la señal de  $\beta$ -actina.



## 6.12 Ensayo de Co-inmunoprecipitación.

- Para determinar la interacción entre Hsp90 y REST, la monocapa de células SH-SY5Y diferenciadas fue lavada 2 veces con PBS 1X frío y cosechadas en buffer de lisis de frío: HEPES (20 mM, pH 7.6), NaCl (150 mM), glicerol (2.5%), Nonidet P-40 (1%), EDTA (13.4 mM), EGTA (2 mM), NaF (50 mM), Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (1mM), Phenylmethylsulfonyl fluoride (1 mM) y coctel de inhibidores de proteasas. Se agitaron durante 30 minutos a 4°C, se centrifugaron a 12,000 x g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se cuantificó por el método de Bradford. 500 µg de proteínas totales se diluyó 1:1 con buffer de lisis frío sin Nonidet P-40 y se pre aclaró con 10 µl de suspensión de rProteína G-Agarosa, se incubó durante 2 horas a 4°C en agitación, se centrifugó a 3,500 x g durante 5 minutos a 4°C. El pellet que contiene las esferas se descartó y el sobrenadante fue sometido a inmunoprecipitación con 2.5 µg de anticuerpo anti-REST de conejo o anti-Hsp90 de cabra, el anticuerpo anti-HA de ratón fue utilizado como control negativo, se incubó 20 horas a 4°C en agitación. Se agregaron 10 µl de rProteína G-Agarosa precipitada, y se dejó incubar 4 horas a 4°C en agitación, se centrifugó a 3,500 x g durante 5 minutos a 4°C, el precipitado se lavó 3 veces con buffer de lisis sin Nonidet P-40 durante 5 minutos a 4°C y agitación. El pellet formado por las perlas de agarosa se resuspendió en 20 µl de buffer de carga, se hirvió durante 20 minutos a 100°C, se sometieron a SDS-PAGE y Western-Blot para determinar la proteína REST o Hsp90.

- Para determinar la interacción entre Hsp90-Htt<sup>n</sup> y Hsp90 y-Htt<sup>m</sup>, células SH-SY5Y diferenciadas fueron transfectadas transitoriamente con los plásmidos pGFPC2-480-17HA o el pGFPC2-480-68HA, 14 horas postransfección, la monocapa celular fue lavada 2 veces con PBS 1X frío y cosechadas en buffer de lisis frío: 8 M urea, HEPES (20 mM, pH 7.6), NaCl (150 mM), glicerol (2.5%), Nonidet P-40 (1%), EDTA (13.4 mM), EGTA (2 mM), NaF (50 mM), Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (1mM), Phenylmethylsulfonyl fluoride (1 mM) y coctel de inhibidores de proteasas. Se agitaron durante 30 minutos a 4°C, se centrifugaron a 12,000 x g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se cuantificó por el método de Bradford. 1,000 µg

de proteínas totales se diluyó 1:1 con buffer de lisis frío sin Nonidet P-40 y se preacclaró con 10 µl de suspensión de rProteína G-Agarosa, se incubó durante 2 horas a 4°C en agitación, se centrifugó a 3,500 x g durante 5 minutos a 4°C. El pellet que contiene las esferas se descartó y el sobrenadante fue sometido a inmunoprecipitación con 2.5 µg de anticuerpo anti-Hsp90 de cabra o anti-HA de ratón como control negativo, se incubó 20 horas a 4°C en agitación. Se agregaron 10 µl de rProteína G-Agarosa precipitada y se dejó incubar 4 horas a 4°C en agitación, se centrifugó a 3,500 x g durante 5 minutos a 4°C, el precipitado se lavó 3 veces con buffer de lisis sin Nonidet P-40 durante 5 minutos a 4°C y agitación. El pellet formado por las perlas de agarosa se resuspendió en 20 µl de buffer de carga, se hirvió durante 20 minutos a 100°C, se sometieron a SDS-PAGE y Western-Blot para determinar la proteína Htt<sub>n</sub> y Htt<sub>m</sub>. La membrana se desnudó y se hizo Western-blot con anti-Hsp90.

### **6.13. Inmunofluorescencia y Microscopia Confocal.**

Las células SH-SY5Y se sembraron sobre cubreobjetos cubiertos con fibronectina, fueron diferenciadas y transitoriamente transfectadas con los plásmidos pGFPC2-480-17HA o el pGFPC2-480-68HA, después de los tratamientos según correspondió en los Western-blots, se lavaron con PBS 1X, se fijaron con paraformaldehído al 3.5 % durante 20 minutos a temperatura ambiente, se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.2% durante 10 minutos y se bloquearon con tampón de fosfatos (gelatina al 0.5%, BSA al 0.5 % en PBS) durante 20 minutos a 37°C. Las células fijadas fueron incubadas con anticuerpo primario anti-REST, anti-Htt, anti-Neun, anti-NSE, anti-Hsp90 o anti-β-tubulina III toda la noche a 4°C, fueron lavadas 3 veces con PBS 1X e incubadas con anticuerpo secundario conjugado a Cy<sup>TM</sup>5, FITC, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 594 según corresponda durante 1 hora a 37°C. Las células se lavaron con PBS 1X y el núcleo de las células fue teñido con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, 4',6-diamidinofenyl-indol) durante 15 minutos, se lavó 3 veces con PBS 1X.

- Para la determinación de interacción de anti-Hsp90 con Htt normal y Htt mutante, Las células SH-SY5Y se sembraron sobre cubreobjetos cubiertos con fibronectina, fueron diferenciadas y transitoriamente transfectadas con los plásmidos pGFPC2-480-17HA o el pGFPC2-480-68HA, se lavaron con PBS 1X, se fijaron con paraformaldehído al 3.5 % durante 20 minutos a temperatura ambiente, se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.2% durante 10 minutos y se bloquearon con tampón de fosfatos (gelatina al 0.5%, BSA al 0.5 % en PBS) durante 20 minutos a 37°C. Las células fijadas fueron incubadas con anticuerpo primario anti-Hsp90 toda la noche a 4°C, fueron lavadas 3 veces con PBS 1X e incubadas con anticuerpo secundario conjugado a Cy<sup>TM</sup>5 por 1 hora a 37°C. Las células se lavaron con PBS 1X y el núcleo de las células fue teñido con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, 4',6-diamidinofenyl-indol) durante 15 minutos, se lavó 3 veces con PBS 1X.

- Para la determinación de interacción de anti-Hsp90 con REST, Las células SH-SY5Y se sembraron sobre cubreobjetos cubiertos con fibronectina, fueron diferenciadas, se lavaron con PBS 1X, se fijaron con paraformaldehído al 3.5 % durante 20 minutos a temperatura ambiente, se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.2% durante 10 minutos y se bloquearon con tampón de fosfatos (gelatina al 0.5%, BSA al 0.5 % en PBS) durante 20 minutos a 37°C. Las células fijadas fueron incubadas con anticuerpo primario anti-Hsp90 y anticuerpo primario anti-REST toda la noche a 4°C, fueron lavadas 3 veces con PBS 1X e incubadas con anticuerpo secundario anti cabra conjugado a Cy<sup>TM</sup>5 y anticuerpo secundario anti conejo conjugado a FITC por 1 hora a 37°C. Las células se lavaron con PBS 1X y el núcleo de las células fue teñido con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, 4',6-diamidinofenyl-indol) durante 15 minutos, se lavó 3 veces con PBS 1X.

Los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos utilizando el medio de montaje VECTASHIELD. Las imágenes se adquirieron en microscopio confocal LEICA DMI4000B, Brand Leica microsistemas con el objetivo de aceite de 63 aumentos.

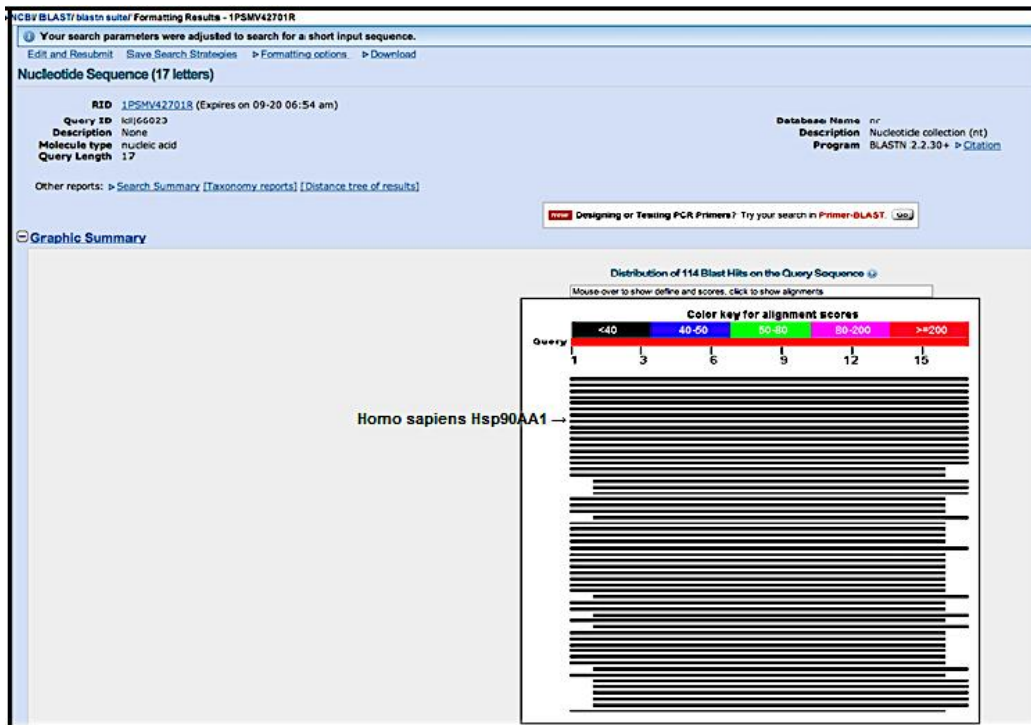
## **6.14 Análisis Estadísticos**

Para las comparaciones estadísticas, los datos cuantitativos se analizaron mediante un análisis de varianza one-way o two-way (ANOVA), usando el programa GraphPad Prism versión 5.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California, EE.UU., [WWW.graphpad](http://WWW.graphpad). Un valor de  $P < 0.05$  se refiere a que es un valor significativo. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  S.E.M. a partir de tres experimentos independientes.

## VII. RESULTADOS

### 1. Análisis bioinformático de alineamiento de la secuencia del OA Hsp90 $\alpha$ mediante herramienta bioinformática

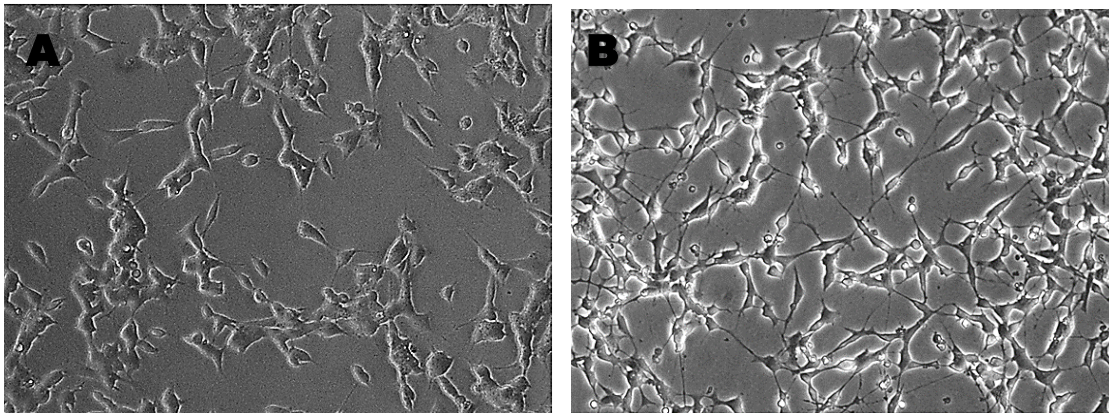
Para comprobar que el OA Hsp90 $\alpha$  es dirigido específicamente para el gen *HSP90AA1* y no hibrida con ningún otro gen de homo sapiens, se realizó un análisis bioinformático de alineamiento de secuencias del OA Hsp90 $\alpha$  con el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) en la base de datos de NCBI (National Center of Biotechnology Information), la comparación mostró una identidad y una cobertura del 100% con el gen *HSP90AA1* de homo sapiens, no presentó similitud ni cobertura con ningún otro gen de humano (Figura 14).



**Fig. 14. Alineamiento de los OA Hsp90 $\alpha$  en la herramienta básica de búsqueda de alineación local (BLAS). Distribución de los hits BLAST del OA Hsp90 $\alpha$ . Se presenta una identidad del 100% y una cobertura del 100% únicamente en el gen *Hsp90AA1* de humano.**

## 2. Diferenciación de la línea Celular SH-SY5Y.

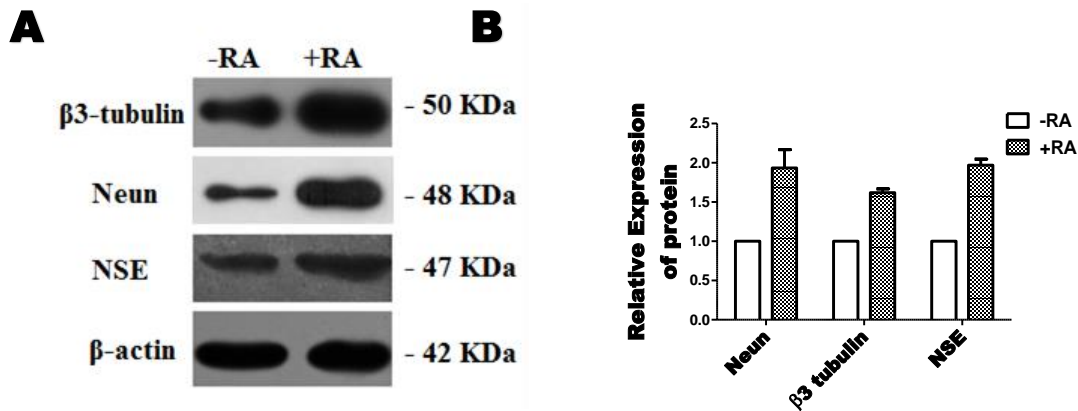
**2.1 Comparación Morfológica entre las células SH-SY5Y en estado proliferativo y diferenciado.** La línea celular SH-SY5Y posee muchas cualidades de las neuronas humanas, para obtener un modelo celular y poder estudiar mejor la enfermedad de Huntington, se llevó a cabo su diferenciación celular con 10  $\mu$ M de AR y disminuyendo la concentración del SFB al 3% durante 4 días. Para observar los cambios morfológicos que ocurren en este proceso, al cuarto día de diferenciación celular se evaluaron las diferencias morfológicas de las células SH-SY5Y en estado proliferativo y diferenciadas, mediante un microscopio de contraste de fases con el objetivo 20 X. Las células en estado proliferativo se observan agrupadas entre ellas y con neuritas poco desarrolladas (Figura 15A), las células diferenciadas dejaron de proliferar y presentaron cambios morfológicos: se observan alargadas, cuerpo celular delgado y desarrollaron neuritas maduras (Figura 15B).



**Fig. 15. Microfotografías de la diferencia morfológica entre las células SH-SY5Y en estado proliferativo y diferenciado.** A) Las células SH-SY5Y sin diferenciar (-AR) y B) Las células SHS-Y5Y diferenciadas durante 4 días (+AR).

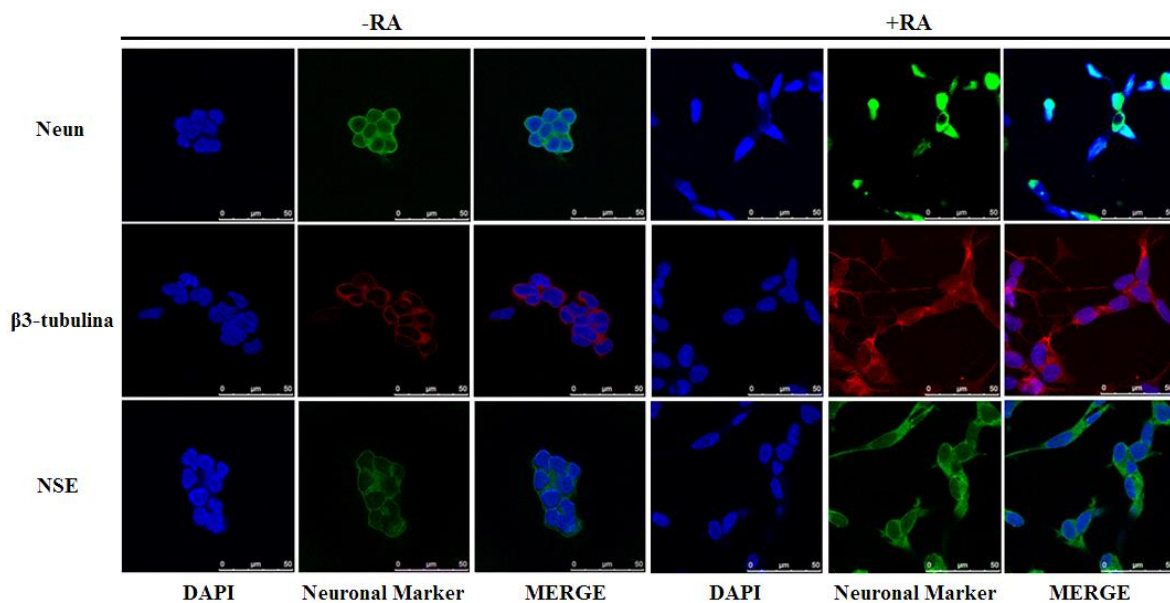
**2.2 Comparación de marcadores de diferenciación neuronal entre las células SH-SY5Y en estado proliferativo y diferenciado.** Además de los cambios morfológicos, durante el proceso de diferenciación neuronal, se producen cambios bioquímicos para la neurotransmisión y señalización eléctrica, la expresión de marcadores de maduración neuronal tales como: Enolasa específica de neurona, Proteína 2 asociada a microtúbulos, Doublecortina,  $\beta$ -tubulina III y la proteína nuclear específica de Neurona (Sarnat HB., 20113).

**2.2.1 Comparación de los marcadores neuronales NSE, NeuN y  $\beta$ -tubulina III mediante Western-blot.** El proceso de diferenciación de las células SH-SY5Y fue corroborado con la detección de los marcadores neuronales enolasa específica de neurona (NSE), proteína nuclear neuronal (NeuN) y  $\beta$ -tubulina III (Figura 16A), las células diferenciadas (+AR) presentaron un incremento de aproximadamente el doble en los niveles de estos marcadores neuronales en comparación con los niveles de las células sin diferenciar (-AR) (Figura 16B).



**Figura 16. Expresión de marcadores neuronales en células SH-SY5Y en estado proliferativo y en estado diferenciado.** A) Western-Blot de los marcadores neuronales Enolasa específica de Neurona (NSE), Proteína nuclear neurona (NeuN) y de  $\beta$ -tubulina III en células sin diferenciar (-AR) y células diferenciadas (+AR) y B) Cuantificación del nivel de proteínas de los Western-blot.

**2.2.2 Comparación de los marcadores neuronales, NSE, NeuN y  $\beta$ -tubulina III mediante IF.** Con la finalidad de observar en las células SH-SY5Y diferenciadas el aumento de expresión de NSE, NeuN y  $\beta$ -tubulina III, células SH-SY5Y en estado proliferativo (-AR) sembradas en cubreobjetos cubiertos con fibronectina y células SH-SY5Y diferenciadas (+AR) sembradas en cubreobjetos cubiertos con fibronectina antes de diferenciar, fueron fijadas, se realizaron IFs con el anticuerpo anti-NSE y anti-conejo-Alexa Fluor 488, anti-NeuN y anti-ratón-Alexa Fluor 488 y el anticuerpo anti- $\beta$ -tubulina III y anti-ratón-AlexaFluor 594. El núcleo fue teñido con DAPY. La figura 17 muestra que las células SH-SY5Y diferenciadas (+AR) presentaron mayor intensidad de color que las células SH-SY5Y en estado proliferativo (-AR), lo que indica que de acuerdo con la figura 17, hay una mayor expresión de los marcadores neuronales, NSE, NeuN y  $\beta$ -tubulina III en células SH-SY5Y diferenciadas que en células en estado proliferativo.

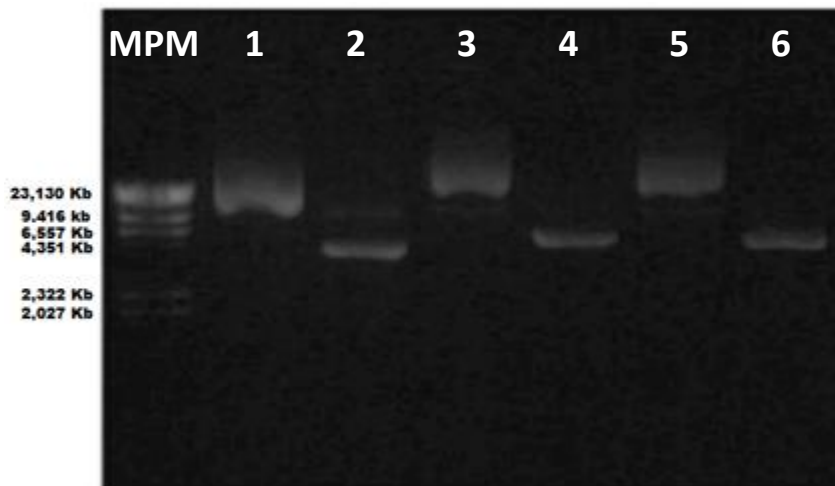


**Fig. 17. Expresión de marcadores neuronales NSE, NeuN Y  $\beta$ -tubulina III en células SH-SY5Y en estado proliferativo y en estado diferenciado.** Inmunofluorescencia de marcadores neuronales NSE, NeuN y  $\beta$ -tubulina III en células sin diferenciar (-AR) y células diferenciadas (+AR): Se observa mayor intensidad de color en las células SH-SY5Y diferenciadas en cada uno de los marcadores neuronales, correspondiente a mayor expresión de los marcadores neuronales.



### 3. Caracterización de los Plásmidos de Expresión pGFPC2-480-17HA o pGFPC2-480-68HA.

El vector pEGFP-C2 y los plásmidos pGFPC2-480-17HA y pGFPC2-480-68HA, fueron utilizados por separado para transformar células *E. coli* DH5 $\alpha$  y seleccionados mediante resistencia a Kanamicina. De las unidades formadoras de colonia transformantes estables, los plásmidos fueron aislados, purificados, se les realizó una digestión con la endonucleasa NheI y se analizaron en electroforesis de agarosa (0.9 %, 100 V) para identificar su integridad y el tamaño de PM esperado. Como se observa en la figura 18, el vector pEGFP-C2 presenta integridad y tamaño de aproximadamente 4.7 Kb cuando está digerido, coincidente con el tamaño esperado. Los plásmidos pGFPC2-480-17HA y pGFPC2-480-68HA presentan integridad y tamaño de aproximadamente 6.2 Kb y 6.4 Kb respectivamente cuando están digeridos, correspondiendo a los tamaños esperados. Los plásmidos digeridos presentan una banda por encima de la del vector, el cual no contiene la secuencia codificante para Htt.



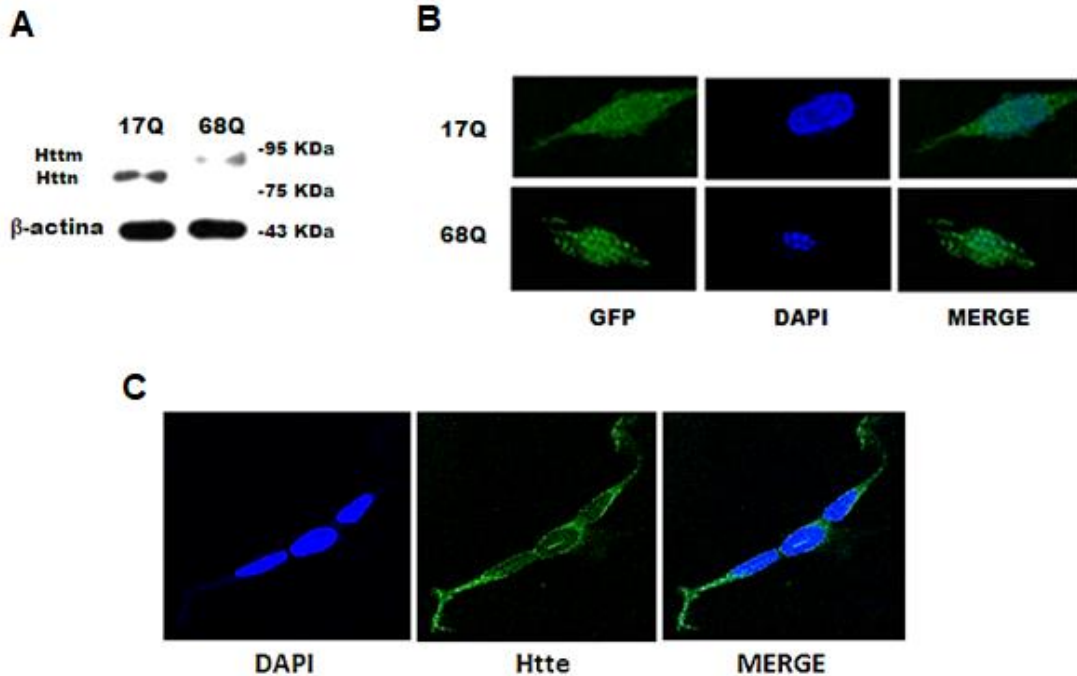
**Fig. 18. Separación electroforética de los productos de digestión del vector pEGFP-C2 y de los plásmidos pGFPC2-480-17HA y pGFPC2-480-68HA.** Los plásmidos fueron digeridos con la enzima Nhe I: MPM ( $\lambda$ Hind III), 1 y 2 (vector pEGFP-C2 sin digerir y digerido respectivamente), 3 y 4 (plásmido pGFPC2-480-17HA sin digerir y digerido respectivamente) y 5 y 6 (plásmidos pGFPC2-480-68HA sin digerir y digerido respectivamente) **la separación electroforética se realizó en un gel de agarosa al 0.9 %.**

#### **4. Expresión y análisis de la proteína Htt<sub>n</sub> y Htt<sub>m</sub>.**

Una vez caracterizado los plásmidos pGFPC2-480-17HA y pGFPC2-480-68HA, se determinó su expresión, la secuencia codificante para Htt en ambos plásmidos se encuentra bajo el promotor constitutivo de CMV, se llevó a cabo la transfección transitoria en células SH-SY5Y diferenciadas.

**4.1. Análisis de Western-Blot.** Células SH-SY5Y diferenciadas fueron transfectadas transitoriamente con el plásmido pGFPC2-480-17HA o pGFPC2-480-68HA, 24 horas post transfección, se hicieron extractos celulares, se realizó una electroforesis de SDS-PAGE y análisis de Western-blot con un anticuerpo específico contra el extremo NH<sub>3</sub>-terminal de la proteína Htt, en la figura 17A, se observa una banda de aproximadamente 75 KDa correspondiente a la proteína Htt<sub>n</sub> y una banda de aproximadamente 95 KDa correspondiente a Htt<sub>m</sub>.

**4.2. Fluorescencia de la transfección transitoria.** Para poder visualizar la presencia de la proteína Htt<sub>n</sub> y Htt<sub>m</sub>, células SH-SY5Y se sembraron sobre cubreobjetos cubiertos con fibronectina, fueron diferenciadas y transfectadas transitoriamente con los plásmidos pGFPC2-480-17HA o el pGFPC2-480-68HA, 24 horas post transfección, las células fueron teñidas con DAPY, los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos utilizando el medio de montaje VECTASHIELD y se observaron en microscopio con el objetivo 63X para observar las proteína reportera (GFP) de Htt. Las células que expresan Htt<sub>n</sub> (17Q) presentan una morfología nuclear y celular intacta, Htt<sub>n</sub> se localiza exclusivamente en citoplasma, las células que expresan Htt<sub>m</sub> (68Q) presentan cambios morfológicos, membrana irregular, neuritas más cortas, algunas ocasiones fragmentación nuclear y agregados de Htt<sub>m</sub> (Figura 19B). Para poder visualizar la presencia y localización de Htt<sub>e</sub> en células SH-SY5Y diferenciadas, se realizó un ensayo de IF con anticuerpo primario anti-Htt y anticuerpo secundario anti-cabra-FITC. Htt<sub>e</sub> se distribuye exclusivamente en citoplasma (Figura 19c), la morfología celular con Htt<sub>n</sub> (17Q) es similar a la morfología de la célula sin transfectar, donde la distribución de Htt<sub>n</sub> es similar a Htt<sub>e</sub>.

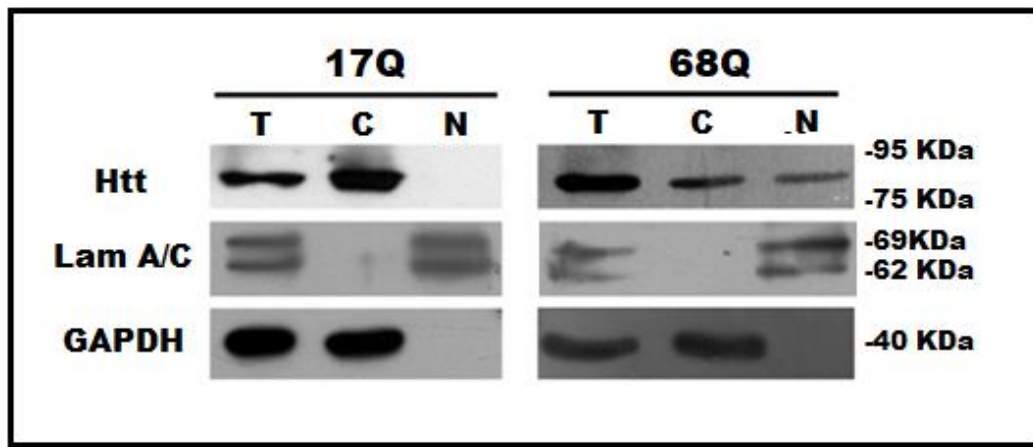


**Fig. 19. Análisis de la expresión de Httm y Httn.** Células SH-SY5Y diferenciadas y transfectadas transitoriamente con los plásmidos pGFPC2-480-17HA (17Q) o el pGFPC2-480-68HA (68Q), 24 horas post transfección se llevó a cabo: A) Análisis de Western-blot utilizando un anticuerpo anti-Htt, en el segundo carril se puede observar una banda de mayor PM correspondiente a Httm, y B) Análisis de Fluorescencia de la proteína reportera (GFP) de Htt, las células se observaron en microscopio con el objetivo 63X para observar la proteína reportera (GFP) de Htt. Las células que expresan Httm (17Q) presentan una morfología nuclear y celular intacta, las células que expresan Httm presentan cambios morfológicos, membrana irregular, neuritas más cortas, fragmentación nuclear y algunas ocasiones agregados de Httm. C) Análisis de IF en célula sin transfectar muestra que Htte se distribuye exclusivamente en citoplasma, su morfología celular es similar a la célula que expresa Httm (17Q).

### 5. Distribución subcelular de la proteína Httm.

Para evaluar distribución subcelular de Httm y Httm, células SH-SY5Y diferenciadas fueron transfectadas transitoriamente con el plásmido pGFPC2-480-17HA o pGFPC2-480-68HA, 16 horas post transfección, se realizó extracto celular total, citosólico y nuclear, se realizó una electroforesis de SDS-PAGE y análisis de Western-blot con un anticuerpo específico contra el extremo NH<sub>3</sub>- terminal de la

proteína huntingtina. Anticuerpos específicos contra GAPDH y contra Lam A/C se utilizaron como control de pureza de extracto citosólico y nuclear respectivamente, en la figura 20 se observa que la proteína Httm se encuentra localizada en el citoplasma de las células SH-SY5Y a las 16 horas de transfección con el plásmido pGFPC2-480-17HA, mientras que Httm se distribuye tanto en citoplasma como en núcleo a las 16 horas de transfección con el plásmido pGFPC2-480-68HA.



**Fig. 20. Análisis de Western-blot de la localización subcelular de Httm.** Células SH-SY5Y diferenciadas fueron transfectadas transitoriamente con el plásmido que codifica para Httm o con el plásmido que codifica para Httm. Las células fueron cosechadas 16 horas post transfección, se realizó extracto total, citosólico y nuclear, se sometieron a análisis de Wester-blot utilizándose un anticuerpo anti Htt para observar su localización, anticuerpo anti LamA/C y GAPDH fueron utilizados como control de pureza de los extractos.

## 6. Efecto citotóxico de la expresión de Httm.

**6.1. Efecto de la expresión de Httm sobre la muerte celular.** Para investigar el efecto de la expresión de Httm sobre la muerte celular, células SH-SY5Y diferenciadas fueron transfectadas transitoriamente con el plásmido pGFPC2-480-17HA o pGFPC2-480-68HA, a las 24 horas post transfección se realizó el ensayo de viabilidad celular por el método de MTT y posteriormente se calculó la muerte celular como se explica desarrollo experimental. Las células

transfectadas con el plásmido pGFPC2-480-17HA fueron usadas como control, presentan un porcentaje de muerte celular de aproximadamente el 5%, Las células transfectadas con el plásmido pGFPC2-480-68HA presentan un porcentaje de muerte celular por encima de 20%. Estos resultado indican que Httm ocasiona un índice de muerte celular mayor, el cual es, estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) (Figura 21A).

**6.2 Efecto de la expresión de Httm sobre la citotoxicidad celular.** El evento inicial de la apoptosis es la deshidratación celular, la pérdida de agua intracelular produce un cambio en la forma y el tamaño de la célula: las células se alargan y disminuyen de tamaño. La condensación de la cromatina comienza en la periferia nuclear, en etapas posteriores de la apoptosis, ocurre la fragmentación nuclear (Darzynkiewicz Z., et al. 1996). La apoptosis es una forma de muerte celular programada, un proceso coordinado dependiente de energía, involucra la activación de caspasas y una compleja cascada de eventos que unen el estímulo inicial con la desaparición de la célula. La apoptosis puede determinarse por la observación de: 1) alteraciones cito morfológicas; 2) Fragmentación del ADN; 3) Detección de caspasas, degradación de sustratos como la enzima Poli ADP-Ribosa polimerasa (PARP); 4) alteraciones de membrana y 5) ensayos mitocondriales (Elmore S. 2007).

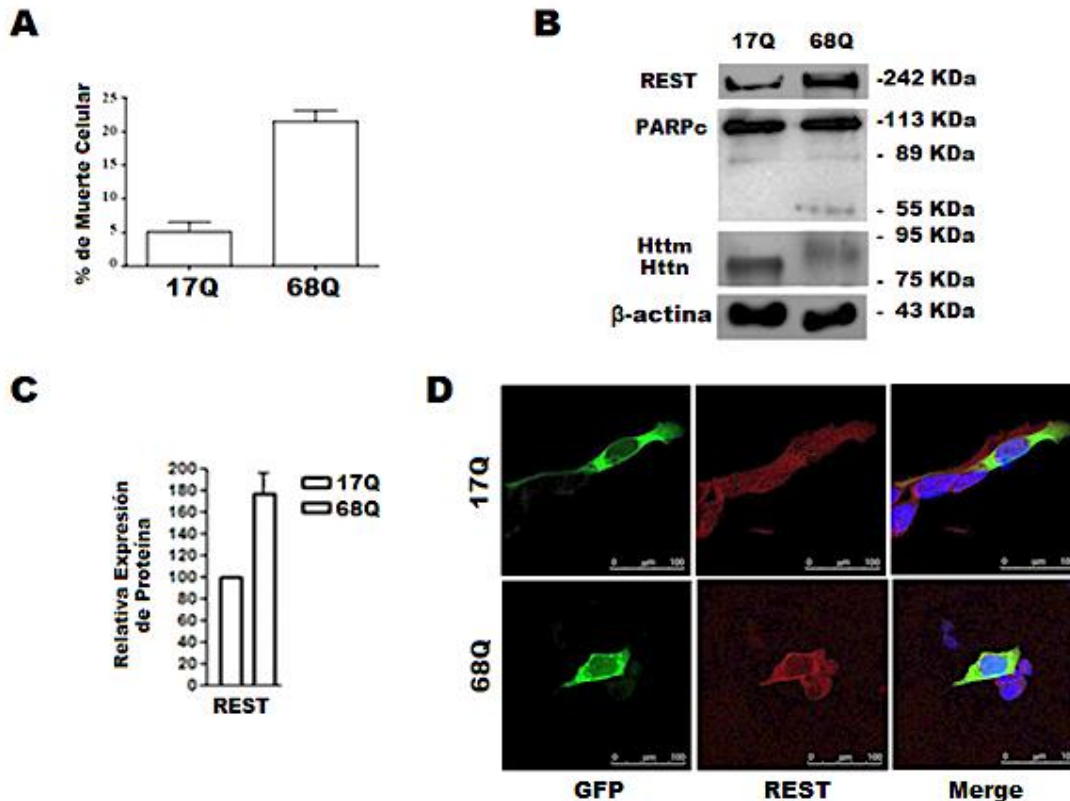
Para investigar el efecto de la expresión de Httm sobre la inducción de citotoxicidad celular, células SH-SY5Y diferenciadas fueron transfectadas transitoriamente con el plásmido pGFPC2-480-17HA o pGFPC2-480-68HA, a las 24 horas post transfección se hicieron extractos celulares, se realizó una electroforesis de SDS-PAGE y análisis de Western-Blot con un anticuerpo específico contra el indicador de apoptosis: la proteína Poli ADP-Ribosa polimerasa (PARP), cuyo PM es de 116KDa, en el proceso de apoptosis se fragmenta por la acción de caspasa 3 generando fragmentos de 89 y 55 KDa, por lo tanto, la detección de estos fragmentos será indicativo de muerte celular. En la figura 21B, se observan productos de degradación de PARP de aproximadamente 55 KDa únicamente en las células transfectadas con el plásmido pGFPC2-480-

68HA, no así en las células transfectadas plásmido pGFPC2-480-17HA. Esto indica que Httm induce signos de apoptosis al degradar la enzima Poli ADP-Ribosa polimerasa (PARP).

**6.3 Efecto de la expresión de Httm sobre la expresión de la proteína REST.** Para investigar el efecto de la expresión de Httm sobre la expresión de REST, células SH-SY5Y diferenciadas fueron transfectadas transitoriamente con el plásmido pGFPC2-480-17HA o pGFPC2-480-68HA, a las 24 horas post transfección se hicieron extractos celulares, se realizó una electroforesis de SDS-PAGE y análisis de Western-Blot con un anticuerpo específico contra REST. Como se observa en la figura 21B, las células transfectadas con el plásmido pGFPC2-480-68HA presentaron una banda de mayor intensidad, este incremento correspondió aproximadamente el doble en el nivel de expresión de la proteína REST comparadas con las células transfectadas con el plásmido pGFPC2-480-17HA ( $p < 0.05$ ) (Figura 21C).

Con la finalidad de observar en las células el efecto de la expresión de Httm sobre el aumento de expresión de REST y la citotoxicidad celular, células SH-SY5Y fueron sembradas en cubreobjetos con fibronectina, diferenciadas y transfectadas transitoriamente con el plásmido pGFPC2-480-17HA o pGFPC2-480-68HA. A las 24 horas post transfección, fueron fijadas y se realizó un ensayo de IF con el anticuerpo primario anti-REST y anticuerpo secundario anti conejo acoplado a Cy<sup>TM</sup>5., el núcleo se tiñó con DAPI. Las preparaciones se observaron en un microscopio confocal LEICA DMI4000B, Brand Leica microsystems con el objetivo 63 de aceite. En la figura 21D se observa la proteína reportera de Htt (Proteína GFP), las células que expresan Httm (17Q) presentan una morfología nuclear y celular intacta, Httm se localiza exclusivamente en el citoplasma, su morfología y localización es similar a la célula que expresa Htte. Las células que expresan Httm (68Q) presentan cambios morfológicos, membrana irregular, neuritas más cortas, algunas ocasiones fragmentación nuclear y agregados de Httm, que son signos de

citotoxicidad celular. La morfología celular y distribución de Httm (17Q) es similar a la morfología celular de una célula sin transfectar con Htte (Figura 19C).



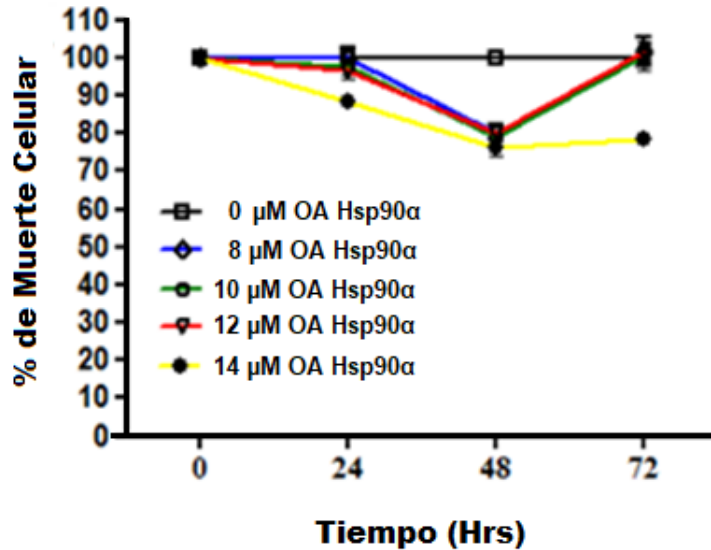
**Fig. 21. Httm aumenta el % de muerte celular, induce apoptosis e incrementa el nivel de REST en células SH-SY5Y diferenciadas.** Células SH-SY5Y diferenciadas y transfectadas transitoriamente con el plásmido pFGP-480-17HA (17Q) o con el plásmido pFGP-480-68HA (68Q). A) Efecto de la expresión de Httm sobre la muerte celular. Porcentaje de muerte celular, como se indica en el desarrollo experimental, los valores que se muestran son el promedio de tres experimentos independientes ( $p < 0.05$ ). B) Efecto de la expresión de Httm sobre la degradación de PARPc y sobre la expresión de REST. En el segundo carril se observa una banda de aproximadamente 55 KDa que indica que Httm induce mayor degradación de PARP completa que Htt normal, así como un aumento en la intensidad de banda de REST. C) Cuantificación de la intensidad de bandas de REST. D) Transfección y análisis de IF muestran que Httm (GFP reportera) se localiza en el citoplasma celular, presentan una morfología nuclear y celular intacta. Httm (GFP reportera) está localizada en el citoplasma y núcleo celular, se presentan cambios morfológicos: células reducidas de tamaño, membrana irregular, neuritas más cortas y condensación celular.

## **7. Efecto del oligo antisentido Hsp90 $\alpha$ .**

El OA Hsp90 $\alpha$  fue diseñado para hibridar en una región del extremo 5' del RNAm de Hsp90 $\alpha$ , justo antes del codón de inicio., esta hibridación produce un bloqueo en la traducción de la proteína Hsp90 $\alpha$ .

**7.1 Efecto del oligo antisentido Hsp90 $\alpha$  sobre la viabilidad celular.** Para evaluar el efecto del oligo antisentido Hsp90 $\alpha$  sobre la viabilidad celular, células SH-SY5Y diferenciadas, fueron expuestas a una curva dosis respuesta tiempo del OA Hsp90 $\alpha$  con las concentraciones: 0, 8, 10, 12 y 14  $\mu$ M, a los tiempos de 24, 48 y 72 horas post transfección se realizó un ensayo de MTT por triplicado. En la figura 22, se observa el efecto de las diferentes concentraciones del oligo antisentido Hsp90 $\alpha$  a los diferentes tiempos postransfección del OA Hsp90 $\alpha$ . A las 24 horas post transfección no hubo diferencia significativa en la viabilidad celular en ninguna de las concentraciones respecto al control, a excepción de la concentración de 14  $\mu$ M que disminuyó 10%, a las 48 horas post transfección existe una disminución de viabilidad celular del 20% en todas las concentraciones comparadas con el control, a las 72 horas post transfección este porcentaje de viabilidad celular se mantuvo a la concentración de 14  $\mu$ M, sin embargo existe una recuperación de viabilidad celular del 100% con las concentraciones de 8, 10 y 12  $\mu$ M ( $p < 0.001$ ). Estos datos indican que el OA Hsp90 $\alpha$  tiene un efecto sobre la viabilidad celular, presentando un mínimo de viabilidad celular de 80 % a las 48 horas postransfección.



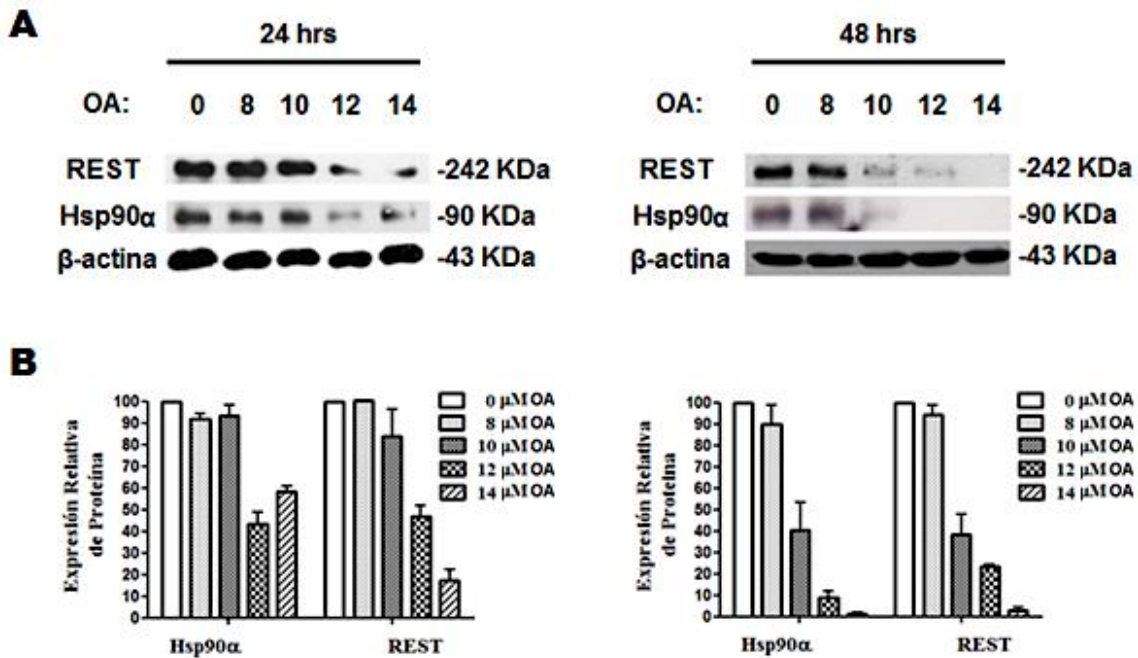


**Fig. 22. Efecto del Oligo antisentido Hsp90α sobre la viabilidad celular.** Curva dosis respuesta tiempo del oligo antisentido Hsp90α sobre viabilidad celular en las células SH-SY5Y diferenciadas, a las concentraciones de: 0, 8, 10, 12 y 14 μM, a las 24, 48 y 72 horas postransfección, el ensayo se realizó por triplicado ( $p < 0.0001$ ).

**7.2 Efecto del oligo antisentido Hsp90α sobre la traducción de la proteína Hsp90.** Para evaluar el efecto del oligo antisentido Hsp90α sobre la traducción de la proteína Hsp90 en las células SH-SY5Y diferenciadas, se determinó la concentración óptima del oligo antisentido mediante ensayo de Western-blot, realizándose una curva dosis respuesta tiempo a las concentraciones de 0, 8, 10, 12 y 14 μM, el ensayo se realizó a las 24 y 48 horas postransfección, por triplicado. A las 24 horas postransfección, las concentraciones de 12 y 14 μM del oligo antisentido Hsp90, tienen un efecto inhibitorio en la traducción de la proteína Hsp90 por encima del 40% respectivamente, a las 48 horas postransfección, las concentraciones de 10, 12 y 14 μM del oligo antisentido Hsp90α, tienen un efecto inhibitorio en la traducción de la proteína Hsp90 por encima del 50% (Figura 23A). Estos resultados, muestran que el OA Hsp90α tiene un efecto drástico en disminuir de la traducción de Hsp90,

donde las concentraciones 12 y 14  $\mu\text{M}$  son las más efectivas, disminuyendo más del 90% el nivel de Hsp90 a las 48 horas postransfección (Figura 23B).

**7.3 Efecto del oligo antisentido Hsp90 $\alpha$  sobre la estabilidad de la proteína REST.** La proteína REST tiene un efecto importante en la enfermedad de Huntington. Durante la diferenciación neuronal, REST interacciona con las proteínas chaperonas Hsp40, Hsp10 y Grp78 (Proteína regulada por glucosa, de 78 KD), poco se conoce acerca de la estabilidad de REST, por lo tanto, nosotros investigamos si Hsp90 pudiese tener un efecto en regular la estabilidad de REST (Lee N., *et al.* 2016). Primero se determinó la concentración óptima del oligo antisentido mediante ensayo de Western-Blot, realizándose una curva dosis respuesta tiempo a las concentraciones de 0, 8, 10, 12 y 14  $\mu\text{M}$ , el ensayo se realizó a las 24 y 48 horas postransfección, por triplicado. El oligo antisentido Hsp90 $\alpha$ , a las 24 y 48 horas postransfección tienen un efecto de inhibición en la expresión de Hsp90 y la estabilidad de la proteína REST, la inhibición es de manera dosis dependiente (Figura 23A). Estos resultados muestran que la inhibición de la traducción de Hsp90 con OA Hsp90 $\alpha$  ocasiona que la estabilidad de REST disminuya drásticamente, donde a partir de las 24 horas postransfección, a las concentraciones 12 y 14  $\mu\text{M}$  de OA Hsp90 $\alpha$ , ocasionaron una disminución por encima del 40%, esta disminución es estable y se reduce a más del 70% a las 48 horas, respectivamente en el nivel de REST. Estos resultados muestran que el OA Hsp90 $\alpha$  tiene un efecto indirecto en la estabilidad de la proteína REST y que la proteína Hsp90 tiene un efecto importante en aumentar la estabilidad de REST, probablemente porque REST es una proteína cliente de Hsp90 (Figura 23B).



**Fig. 23. Efecto del oligo antisense Hsp90α sobre la traducción de Hsp90 y la estabilidad de la proteína REST.** Células SH-SY5Y diferenciadas fueron transfectadas con varias concentraciones de OA Hsp90α: 0, 8, 10, 12 y 14 μM. A) Análisis de Western-Blot de Hsp90α y de REST, 24 y 48 horas postransfección y B) Cuantificación del nivel de las proteínas Hsp90 y de REST de los Western-Blot, se presenta la media y desviación estándar de tres experimentos independientes ( $p < 0.05$ ).

## 8. Inhibición de la proteína Hsp90.

Para poder corroborar si efectivamente Hsp90 tiene un efecto en la estabilidad de REST, se llevó a cabo su inhibición con GA o con PU-H71. Estos inhibidores se unen específicamente al dominio N-terminal de Hsp90, en el sitio de unión del ATP, desestabilizando la asociación entre Hsp90 y sus proteínas clientes (Beebe K., *et al.* .2013).

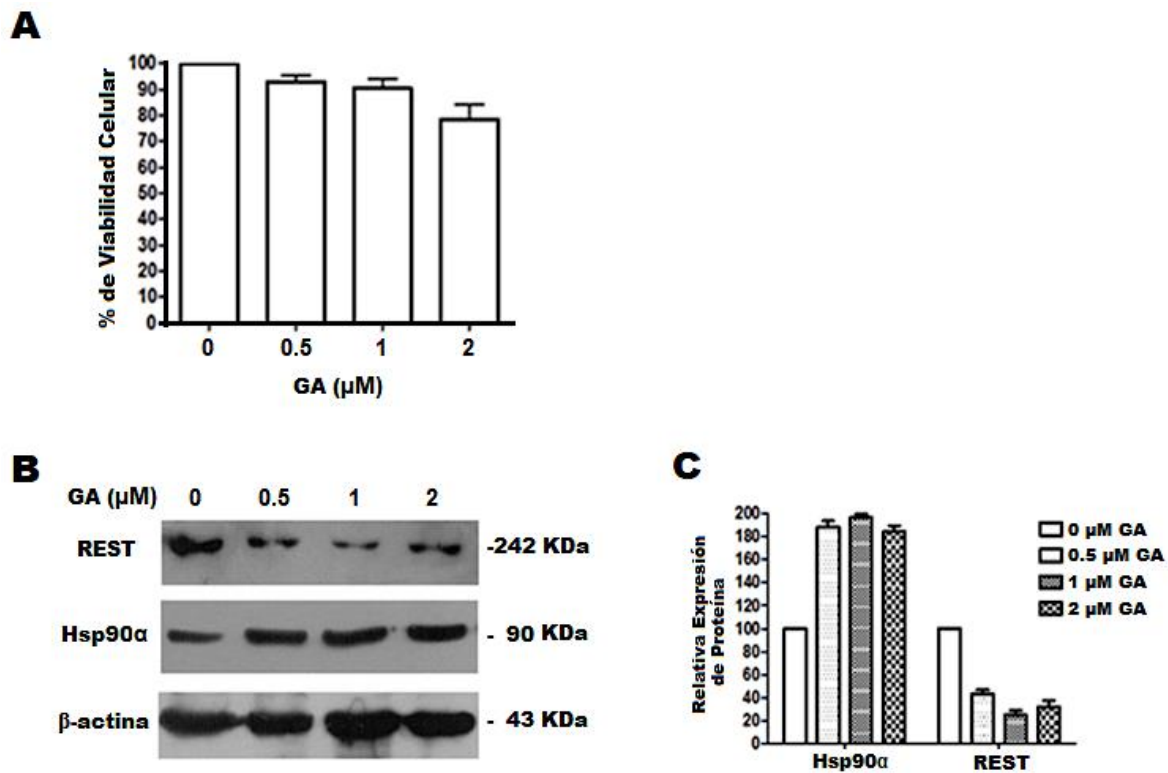
**8.1. Inhibición de Hsp90α con GA:** Para analizar el efecto de GA sobre la actividad de Hsp90, células SH-SY5Y diferenciadas fueron tratadas con una curva dosis respuesta de GA, utilizándose las concentraciones: 0, 0.5, 1 y 2 μM.

**8.1.1. Efecto de GA sobre la viabilidad celular:** Para analizar el efecto de GA, sobre la viabilidad celular, células SH-SY5Y diferenciadas, fueron expuestas a una curva dosis respuesta de GA con las concentraciones: 0, 0.5, 1 y 2  $\mu\text{M}$ , a las 24 horas de exposición se realizó un ensayo de MTT por triplicado. En la figura 24A se observa el efecto de las diferentes concentraciones de GA a las 24 horas de exposición, donde podemos observar que conforme aumenta la concentración de GA hay una disminución de la viabilidad celular, lo que indica que GA tiene un efecto dosis dependiente sobre la viabilidad celular ( $p < 0.05$ ).

**8.1.2. Efecto de GA sobre la síntesis de Hsp90 $\alpha$ :** Para analizar el efecto de GA, sobre la síntesis de Hsp90, células SH-SY5Y diferenciadas, fueron expuestas a una curva dosis respuesta de GA con las concentraciones: 0, 0.5, 1 y 2  $\mu\text{M}$ , a las 24 horas de exposición se realizó un ensayo de Western-Blot por triplicado. En la figura 24B se observan los Western-Blot de la proteína Hsp90 y en la figura 24C se observa la cuantificación de la intensidad de las bandas, así como el efecto de las diferentes concentraciones de GA a las 24 horas de exposición, podemos observar que conforme aumenta la concentración de GA hay un aumento aproximadamente del doble en el nivel de Hsp90 ( $p < 0.05$ ), ya que la inhibición de Hsp90 ocasiona que se active el HSF1 (Factor de Choque Térmico 1) y con ellos la expresión de la familia de proteínas de choque térmico. Estos resultados indican que GA tiene un efecto dosis dependiente sobre sobre la síntesis de Hsp90.

**8.1.3. Efecto de GA sobre la estabilidad de REST:** Para analizar el efecto de GA, sobre la estabilidad de REST, células SH-SY5Y diferenciadas, fueron expuestas a una curva dosis respuesta de GA con las concentraciones: 0, 0.5, 1 y 2  $\mu\text{M}$ , a las 24 horas de exposición se realizó un ensayo de Western-Blot por triplicado. En la figura 24B se observan los Western-Blot de la proteína REST y en la figura 24C se observa la cuantificación de la intensidad de las bandas, así como el efecto de las diferentes concentraciones de GA a las 24 horas de exposición. Podemos observar que con la exposición de 0.5  $\mu\text{M}$  de GA hay una disminución de aproximadamente el 60% del nivel de REST y a las concentraciones de 1 y 2

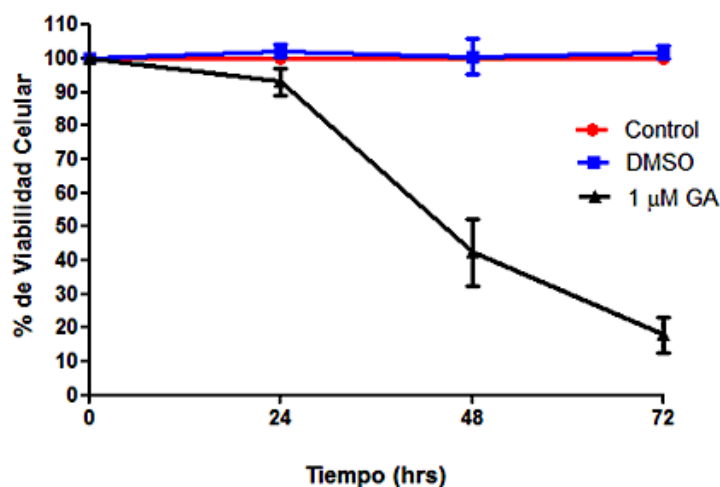
$\mu\text{M}$  de GA hay una disminución de aproximadamente el 80% del nivel de REST ( $p < 0.05$ ), estos resultados indican que Hsp90 tiene un efecto sobre la estabilidad de REST.



**Fig. 24. Efecto de la inhibición postraduccional de Hsp90 con GA.** Curva dosis respuesta de GA sobre la estabilidad de Hsp90, a las concentraciones de 0, 0.5, 1 y 2  $\mu\text{M}$  de GA. A) Porcentaje de viabilidad celular a las 24 horas post tratamiento, los valores que se muestran son el promedio de tres experimentos independientes ( $p < 0.05$ ). B) Análisis de Western-Blot de Hsp90 y de REST y C) Cuantificación del nivel de las proteínas Hsp90 y de REST de los Western-Blot, se presenta la media y desviación estándar de tres experimentos independientes ( $p < 0.005$ ).

**8.1.4. Efecto del tiempo de tratamiento con GA sobre la viabilidad celular:** Para analizar el efecto del tiempo de tratamiento con GA sobre la viabilidad celular, se realizó una cinética de tiempo con la dosis de 1  $\mu\text{M}$  de GA. Células SH-SY5Y diferenciadas, fueron expuestas a 1  $\mu\text{M}$  de GA durante a las 24,

48 y 72 horas, se realizó un ensayo de MTT por triplicado. En la figura 25 se observa el efecto del tiempo de tratamiento con 1  $\mu\text{M}$  de GA sobre la viabilidad celular, podemos observar que a las 24 horas existe una ligera disminución viabilidad celular del 10%, conforme aumenta el tiempo hay una disminución drástica de la viabilidad celular, en la figura 24 también se observan los valores obtenidos con el DMSO (solvente de GA) el cual no presento diferencias significativas con el control (células sin tratar). Estos datos indican que el tiempo de tratamiento con 1  $\mu\text{M}$  de GA tiene un efecto dosis dependiente sobre la viabilidad celular ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 25. Efecto del tiempo de la inhibición postraducciona de Hsp90 con GA.** Curva dosis tiempo de 1  $\mu\text{M}$  GA sobre la viabilidad celular, a los tiempos 0, 24, 48 y 72 horas post-tratamiento. Porcentaje de viabilidad celular, los valores que se muestran son el promedio de tres experimentos independientes ( $p < 0.05$ ).

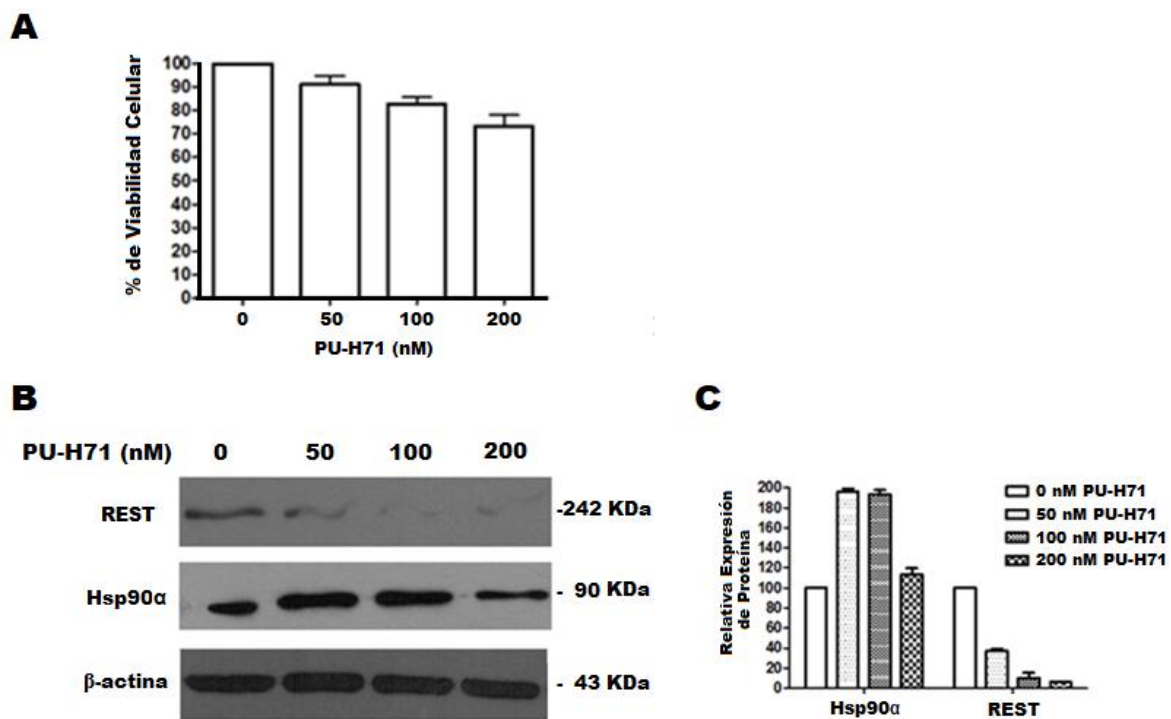
**8.2. Inhibición de Hsp90 con PU-H71:** Para analizar el efecto de PU-H71 sobre la actividad de Hsp90, células SH-SY5Y diferenciadas fueron tratadas con una curva dosis respuesta de PU-H71, utilizándose las concentraciones: 0, 50, 100 y 200 nM.

**8.2.1. Efecto de PU-H71 sobre la Viabilidad Celular:** Para analizar el efecto de PU-H71, sobre la viabilidad celular, células SH-SY5Y diferenciadas, fueron expuestas a una curva dosis respuesta con PU-H71 a las concentraciones: 0, 50, 100 Y 200 nM, a las 24 horas de exposición se realizó un ensayo de MTT por triplicado. En la figura 26A se observa el efecto de las diferentes concentraciones de PU-H71 a las 24 horas de exposición, donde podemos observar que conforme aumenta la concentración de PU-H71 hay una disminución de la viabilidad celular, lo que indica que PU-H71 tiene un efecto dosis dependiente sobre la viabilidad celular ( $p < 0.05$ ).

**8.2.2. Efecto de PU-H71 sobre la síntesis de Hsp90 $\alpha$ :** Para analizar el efecto de PU-H71, sobre la síntesis de Hsp90, células SH-SY5Y diferenciadas, fueron expuestas a una curva dosis respuesta de PU-H71 con las concentraciones: 0, 50, 100 y 200 nM, a las 24 horas de exposición se realizó un ensayo de Western-Blot por triplicado. En la figura 26B se observan los Western-Blot de la proteína Hsp90 $\alpha$  y en la figura 26C se observa la cuantificación de la intensidad de las bandas, así como el efecto de las diferentes concentraciones de PU-H71 a las 24 horas de exposición, podemos observar que conforme aumenta la concentración de PU-H71 hay un aumento aproximadamente del doble en el nivel de Hsp90 ( $p < 0.05$ ), ya que la inhibición de Hsp90 ocasiona que se active el HSF1 (Factor de Choque Térmico 1) y con ellos la expresión de la familia de proteínas de choque térmico. Estos resultados indican que PU-H71 tiene un efecto dosis dependiente sobre sobre la síntesis de Hsp90.

**8.2.3. Efecto de PU-H71 sobre la estabilidad de REST:** Para analizar el efecto de PU-H71, sobre la estabilidad de REST, células SH-SY5Y diferenciadas, fueron expuestas a una curva dosis respuesta de PU-H71 con las concentraciones: 0, 50, 100 y 200 nM, a las 24 horas de exposición se realizó un ensayo de Western-Blot por triplicado. En la figura 26B se observan los Western-

Blot de la proteína REST y en la figura 26C se observa la cuantificación de la intensidad de las bandas, así como el efecto de las diferentes concentraciones de PU-H71 a las 24 horas de exposición. Podemos observar que con la exposición de 50 nM de PU-H71 hay una disminución del nivel de REST de aproximadamente el 60% mientras que a las concentraciones de 100 y 200 nM de PU-H71 la disminución del nivel de REST fue de aproximadamente el 80% ( $p < 0.05$ ). Estos resultados indican que Hsp90 $\alpha$  tiene un efecto sobre la estabilidad de REST.

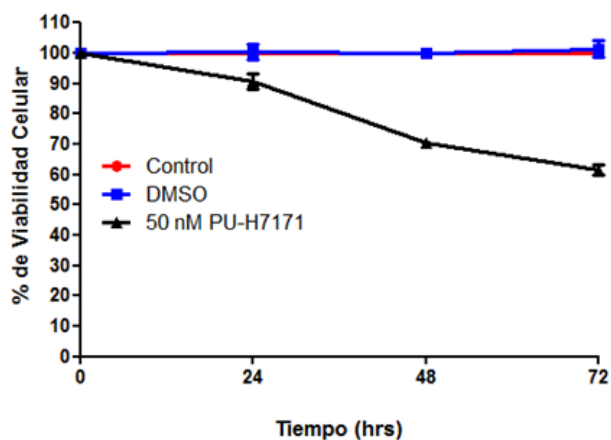


**Fig. 26. Efecto de la inhibición postraduccional de Hsp90 con PU-H71.** Curva dosis respuesta de PU-H71 sobre la estabilidad de Hsp90, a las concentraciones de 0, 50, 100 y 200 nM de PU-H71. A) Porcentaje de viabilidad celular a las 24 horas post tratamiento, los valores que se muestran son el promedio de tres experimentos independientes ( $p < 0.05$ ). B) Análisis de Western-Blot de Hsp90 y de REST, y C) Cuantificación del nivel de las proteínas Hsp90 y de REST de los Western-Blot, se presenta la media y desviación estándar de tres experimentos independientes ( $p < 0.005$ ).



#### **8.2.4. Efecto del tiempo de tratamiento con PU-H71 sobre la viabilidad**

**celular:** Para analizar el efecto del tiempo de tratamiento con PU-H71 sobre la viabilidad celular, se realizó una cinética de tiempo con la dosis de 50 nM de PU-H71. Células SH-SY5Y diferenciadas, fueron expuestas a 50 nM de PU-H71 durante 24, 48 y 72 horas, durante este tiempo se realizó un ensayo de MTT por triplicado. En la figura 27 se observa el efecto del tiempo de tratamiento con 50 nM de PU-H71 sobre la viabilidad celular a las 24, 48 y 72 horas de exposición, donde podemos observar que a las 24 horas existe una ligera disminución de viabilidad celular del 10%, conforme aumenta el tiempo hay una disminución drástica de la viabilidad celular, en la figura 27 también se observan los valores obtenidos con el DMSO (solvente de PU-H71) el cual no presento diferencias significativas con el control (células sin tratar). Estos datos indican que el tiempo de tratamiento con 50 nM de PU-H71 tiene un efecto dosis dependiente sobre la viabilidad celular ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 27. Efecto del tiempo de la inhibición postraducciona de Hsp90 con PU-H71.** Curva dosis tiempo de 50 nM PU-H71 sobre la viabilidad celular, a los tiempos 0, 24, 48 y 72 horas post-tratamiento. Porcentaje de viabilidad celular, los valores que se muestran son el promedio de tres experimentos independientes ( $p < 0.05$ ).

## 9. Interacción de Hsp90 con REST

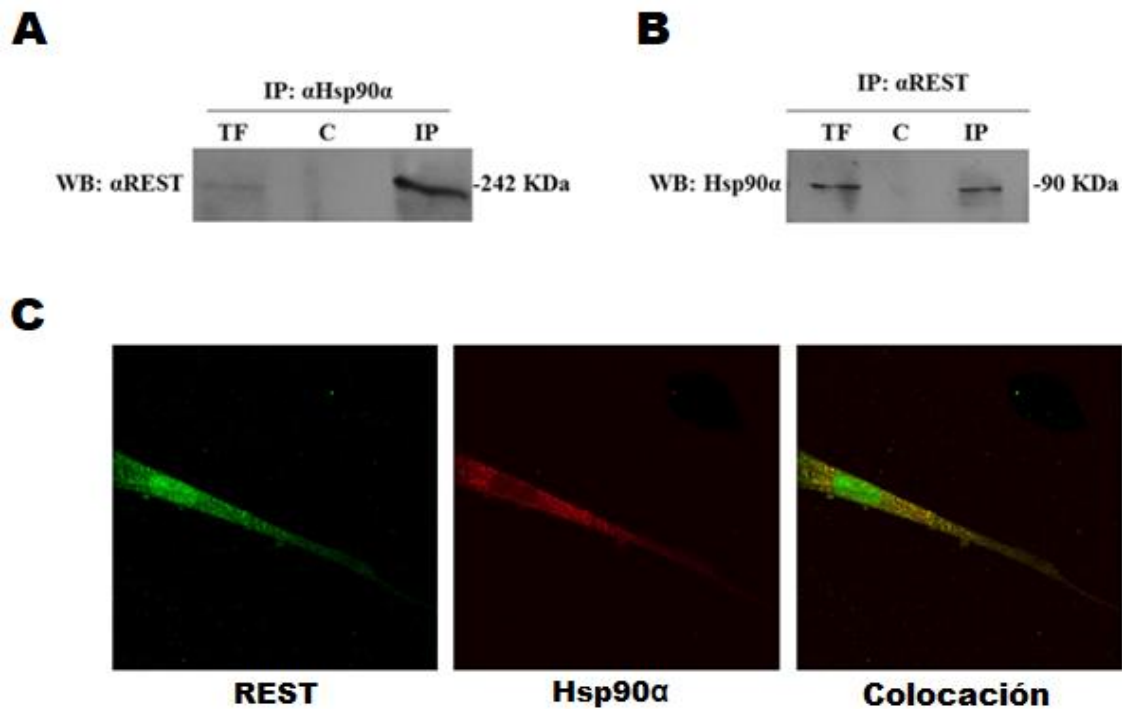
Al inhibir la traducción de Hsp90 con OA Hsp90 $\alpha$  o al inhibir su actividad con GA o PU-H71, podemos observar que hay una disminución en la estabilidad de REST, para determinar si este mecanismo es porque hay interacción proteína-proteína, se llevó a cabo la técnica de co-inmunoprecipitación y de co-localización de Hsp90 y de REST.

**9.1. Ensayo de co-inmunoprecipitación:** Esta técnica sirve para identificar proteínas que interactúan entre sí. Consiste en inmunoprecipitar con un anticuerpo específico una de las proteínas de interés, la cual sirve como antígeno, este complejo arrastra a la otra proteína con la cual está interaccionando la proteína antígeno. El complejo se separa mediante cromatografía de afinidad utilizando proteína G (que se une específicamente al anticuerpo por la fracción Fc) acoplada a resina de Sephrose® por centrifugación, finalmente se analiza el resultado mediante Wester-Blot. Este ensayo se llevó a cabo en extractos totales de células SH-SY5Y diferenciadas, utilizando anticuerpo anti-REST, anti-Hsp90 y anti-HA como control.

En la figura 28 se observa el resultado obtenido de este ensayo, donde podemos observar que al inmunoprecipitar a Hsp90 con un anticuerpo anti- Hsp90, REST es arrastrada en el complejo, no así con el anticuerpo anti-HA, (Figura 28A), y al inmunoprecipitar a REST con un anticuerpo anti-REST, Hsp90 es arrastrada en el complejo, no así con anti-HA (Figura 28B), lo que significa que Hsp90 interacciona a nivel endógeno con REST. IP corresponde al inmunoprecipitado, TF corresponde a la fracción total del extracto, y C corresponde al control.

**9.2. Ensayo de co-localización:** Para que una interacción entre proteínas sea biológicamente funcional, requiere que las proteínas co-localicen en algún lugar de la célula. Tras confirmar la interacción de Hsp90 y REST por co-

inmunoprecipitación, decidimos reconfirmar esta interacción por la técnica de co-localización. Células SH-SY5Y fueron sembradas en cubreobjetos cubiertos con fibronectina, se diferenciaron, fueron fijadas y se realizó un ensayo de doble IF con los anticuerpos primarios anti-REST y anti-Hsp90 durante toda la noche, posteriormente se realizaron 3 lavados y se incubaron con un anticuerpo secundario anti conejo acoplado a FITC y anticuerpo secundario anti ratón acoplado a CY5. La figura 28C muestra el experimento de co-localización, donde se muestra ampliamente que existe co-localización entre las proteínas Hsp90 y REST tanto en núcleo como en citoplasma, pero principalmente en citoplasma.



**Fig. 28. Análisis de la interacción entre Hsp90 y REST en Células SH-SY5Y.** Co-inmunoprecipitación: A) Se utilizó anti-Hsp90 para inmunoprecipitar esta proteína, anti-REST fue utilizado en el Western-Blot para ver la interacción, o anti-HA como control y B) Se utilizó anti REST para inmunoprecipitar esta proteína y anti-Hsp90 fue utilizado en el Western-Blot para ver la interacción, o anti-HA como control. C) Co-localización: Análisis por microscopia confocal de la colocación entre REST (verde) y Hsp90 (rojo), se observa una amplia co-localización de estas 2 proteínas, la cual se observa tanto en el citoplasma como en el núcleo.

Experimentos adicionales de doble híbrido y de pull-down podrían aclarar si estas 2 proteínas realmente interactúan, ya que se trata de métodos mucho más precisos a la hora de confirmar la interacción entre proteínas.

#### **10. Efecto de la inhibición genética o farmacológica de Hsp90 sobre la estabilidad de la proteína Httm.**

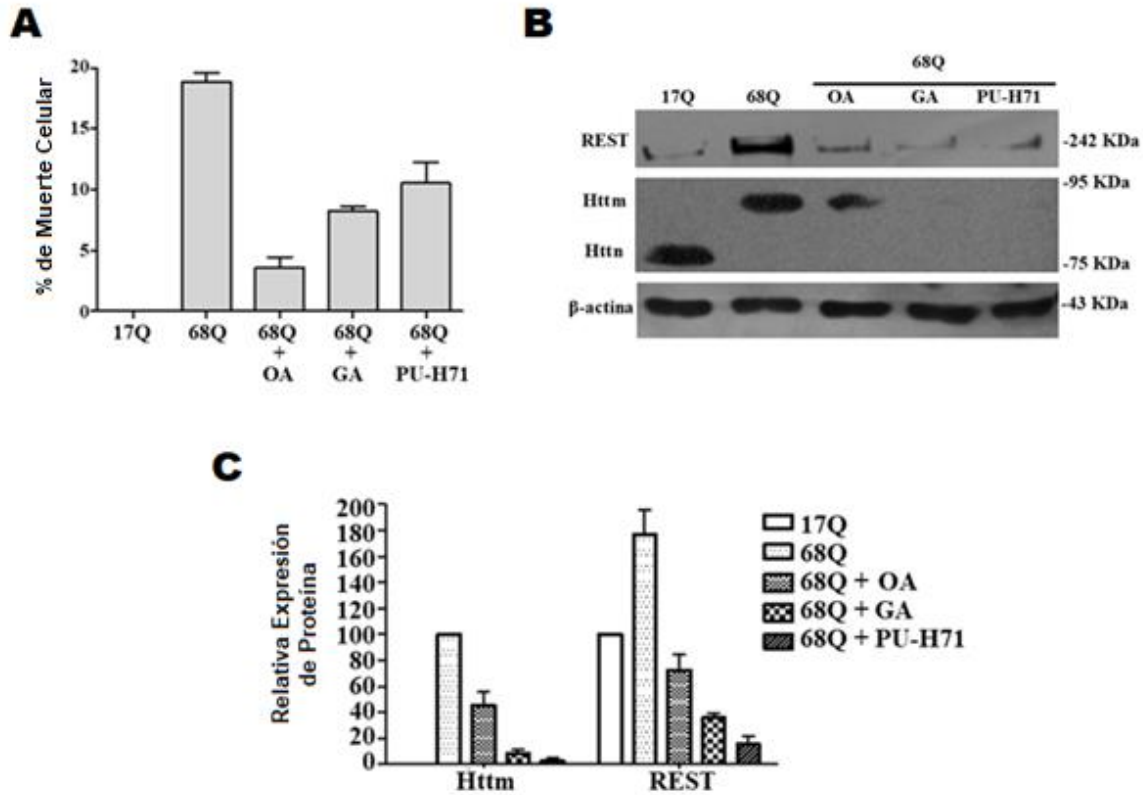
La Httm, es la proteína causante de la enfermedad de Huntington, poco se conoce acerca de su estabilidad., desde que observamos que la inhibición traduccional de Hsp90 con OA Hsp90 $\alpha$ , o la inhibición funcional de Hsp90 con GA y PU-H71 son efectivos en disminuir el nivel de REST, analizamos si Hsp90 tiene un efecto en regular la estabilidad de Httm.

Células SH-SY5Y diferenciadas fueron transfectadas transitoriamente con el vector de expresión pGFP-480-68HA, 6 horas postransfección las células fueron tratadas con 1 $\mu$ M de GA o con 50 nM de PU-H71., células SH-SY5Y diferenciadas fueron co-transfectadas transitoriamente con el vector de expresión pGFP-480-68HA y con 12  $\mu$ M de OA Hsp90 $\alpha$ . 24 horas post-tratamiento o post-co-transfección las células fueron analizadas por ensayo de MTT o cosechadas para análisis de Western-Blot.

El OA Hsp90 $\alpha$ , GA y PU-H71 respectivamente, presentaron un efecto significativo en la disminución de la muerte celular inducida por Httm, dicha muerte celular disminuyó más del 50% (Figura 29A), presentaron un efecto significativo en la disminución del nivel de Httm y de REST (Figura 29B)., El OA Hsp90 $\alpha$  eficientemente disminuyó más del 50% del nivel de las proteínas Httm y REST., GA y PU-H71 respectivamente disminuyeron aproximadamente más del 90% el nivel de Httm y más del 60% el nivel de REST (Figura 29C). El nivel de Httm mutante de estos resultados fue comparado con el nivel de Httm de células que fueron transfectadas transitoriamente con el vector de expresión GFP-480-17Q.

El nivel de REST de estos resultados fue comparado con el nivel de REST de células que fueron transfectadas transitoriamente con el vector de expresión GFP-480-17Q (Figura 29C).

Estos resultados demuestran que Hsp90 tiene un efecto importante en la estabilidad de las proteínas REST y Httm, y así como REST, Httm puede ser una proteína cliente de Hsp90.



**Fig. 29. Efecto de la inhibición traduccional o farmacológica de Hsp90 sobre la estabilidad de Httm y de REST.** Inhibición de la traducción de Hsp90 con OA Hsp90 $\alpha$  o inhibición post traduccional de Hsp90 con GA o PU-H71. A) Porcentaje de muerte celular a las 24 horas post tratamiento o post-co-transfección, los valores que se muestran son el promedio de tres experimentos independientes ( $p < 0.05$ ). B) Análisis de Western-Blot de Httm, Httm y de REST, y C) Cuantificación del nivel de las proteínas Httm y de REST de los Western-Blot, se presenta la media y desviación estándar de tres experimentos independientes ( $p < 0.005$ ).

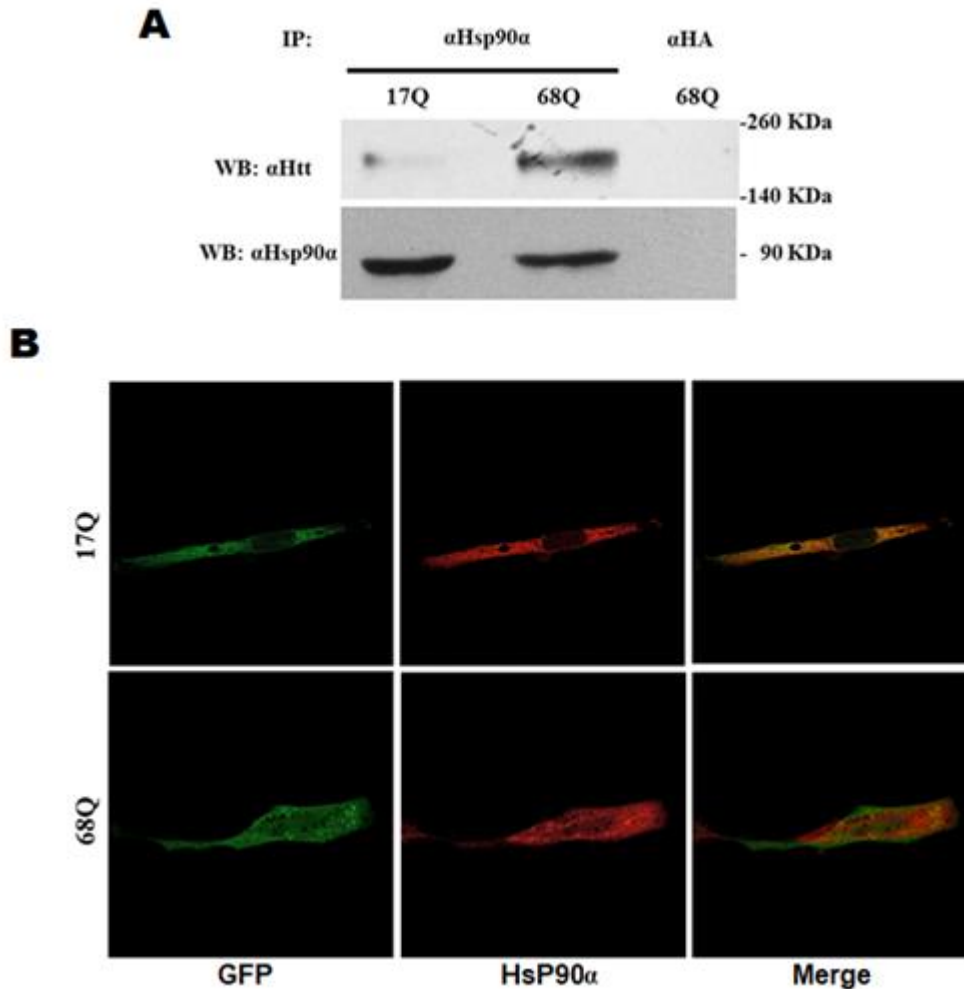
## 11. Interacción de Hsp90 con Httm

Al inhibir la traducción de Hsp90 con OA Hsp90 $\alpha$  o al inhibir su actividad con GA o PU-H71, podemos observar que hay una disminución en la estabilidad de Httm. Para determinar si este mecanismo es porque hay interacción proteína-proteína, se llevó a cabo la técnica de co-inmunoprecipitación y de co-localización de Hsp90 y de Httm.

**11.1. Ensayo de co-inmunoprecipitación:** Esta técnica sirve para identificar proteínas que interactúan entre sí, consiste en inmunoprecipitar con un anticuerpo específico una de las proteínas de interés, la cual sirve como antígeno, este complejo arrastrará a la otra proteína con la cual está interactuando la proteína que está actuando como antígeno, el complejo se separa mediante cromatografía de afinidad utilizando proteína G (que se une específicamente al anticuerpo) acoplada a resina de Sepharose® por centrifugación, finalmente se analiza el resultado mediante Western-Blot. Este experimento se llevó a cabo en células SH-SY5Y diferenciadas, transfectadas transitoriamente con el vector de expresión GFP-480-17Q o con el vector de expresión GFP-480-68Q, los extractos totales se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-Hsp90 $\alpha$  o anti-HA como control.

En la figura 30A se muestra el resultado obtenido, donde podemos observar en la parte superior que al inmunoprecipitar a Hsp90 con un anticuerpo anti-Hsp90, Httm y Httm son arrastradas en el complejo, principalmente Htt mutante., el anticuerpo anti-HA no arrastra ninguna proteína. En la parte inferior del Western-Blot se observa que el anticuerpo anti-Hsp90 arrastró a la proteína Hsp90, lo que significa que Hsp90 interactúa con mayor afinidad con Httm exógena y presenta muy poca interacción o baja afinidad con Httm exógena.

**11.2. Ensayo de co-localización:** Para que una interacción entre proteínas sea biológicamente funcional, requiere que las proteínas co-localicen en algún lugar de la célula. Tras confirmar la interacción de Hsp90 y Httm por co-inmunoprecipitación, decidimos confirmar esta interacción por la técnica de co-localización. Células SH-SY5Y fueron sembradas en cubreobjetos cubiertos con fibronectina, se diferenciaron y se transfectaron transitoriamente con el plásmido pGFP-480-17Q o con pGFP-480-68Q, a las 24 horas post transfección, fueron fijadas y se realizó un ensayo de IF con el anticuerpo primario anti-Hsp90, posteriormente con el anticuerpo secundario anti conejo acoplado a Cy<sup>TM</sup>5. El núcleo fue teñido con DAPY. La figura 30B muestra el experimento de co-localización, donde se muestra ampliamente que existe co-localización entre las proteínas Hsp90 y Httm en citoplasma, e interacción entre Hsp90 y Httm tanto en núcleo como en citoplasma. Experimentos adicionales de doble híbrido y de pull-down podrían aclarar si estas 2 proteínas realmente interaccionan, ya que se trata de métodos mucho más precisos a la hora de confirmar la interacción entre proteínas.



**Fig. 30. Análisis de la interacción entre Hsp90 y Httm.** A) Co-inmunoprecipitación: Se utilizó anti-Hsp90 para inmunoprecipitar esta proteína, anti-Htt o anti-Hsp90 fue utilizado en el Western-Blot para ver la interacción, o anti-HA como control. B) Co-localización: Análisis por microscopia confocal de la co-localización entre Hsp90 $\alpha$  y Htt (GFP reportera) en células SH-SY5Y diferenciadas, se observa una amplia co-localización de REST y Httm en citoplasma, y una amplia co-localización entre REST y Httm en citoplasma como en núcleo.

## 12. La inhibición genética de Hsp90 reduce la apoptosis inducida por Httm

La inhibición traduccional de Hsp90 con OA Hsp90 $\alpha$ , a las 24 horas, ocasiona la disminución del nivel Httm y de REST, por tanto, analizamos a las 48 horas si el



OA Hsp90 tiene una función importante en disminuir la citotoxicidad celular inducida por Httm.

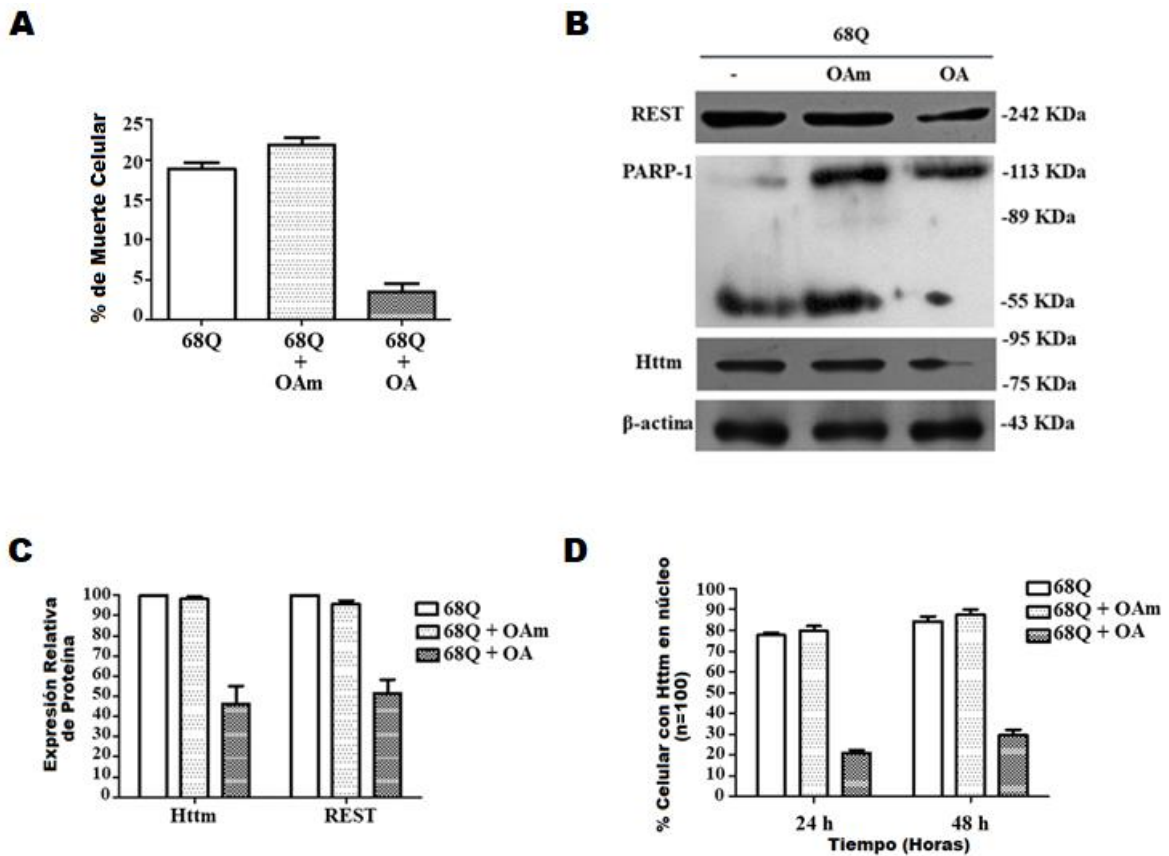
Células SH-SY5Y diferenciadas fueron co-transfectadas transitoriamente con el vector de expresión GFP-480-68Q y con 12  $\mu$ M de OA Hsp90 $\alpha$ , como control se utilizaron con 12  $\mu$ M de OA Hsp90 $\alpha$  mutante, 48 horas post-co-transfección las células fueron analizadas por ensayo de MTT, para IF o cosechadas para análisis de Western-Blot.

El OA Hsp90 $\alpha$ , ocasionó una disminución significativa en la muerte celular inducida por Httm, dicha muerte celular correspondió al 5%, en tanto el OA Hsp90 $\alpha$  mutante, no ocasionó ningún efecto favorable, ya que presentó muerte celular cerca del 22%, estos valores se compararon con la muerte celular que se presentó en células SH-SY5Y diferenciadas transfectadas transitoriamente con el vector de expresión GFP-480-68Q, las cuales presentaron una muerte celular de aproximadamente el 20% ( $p < 0.05$ ) (Figura 31A).

Para investigar si el OA Hsp90 $\alpha$  tienen un efecto en disminuir la apoptosis celular inducida por Httm, se llevó a cabo una electroforesis de SDS-PAGE y análisis de Western-Blot con un anticuerpo específico contra el indicador de apoptosis: la proteína Poli ADP-Ribosa polimerasa completa (PARPc), cuyo PM es de 116KDa, cuando hay apoptosis celular, caspasa 3 tiene la acción de degradar PARP completa, generando fragmentos de 89 y 55 KDa, por lo tanto, la detección de estos fragmentos será indicativo de muerte celular. Como se observa en la figura 30B, se aprecia una banda menos intensa de PARPc aproximadamente 55 KDa (menos productos de degradación de PARPc) en las células co-transfectadas con el OA Hsp90 $\alpha$  en comparación con las células control y las células co-transfectadas con el OA Hsp90 $\alpha$  mutante ( $p > 0.05$ ) (figura 31B), también podemos observar que el OA Hsp90 $\alpha$ , presentó una disminución significativa en la estabilidad de las proteínas Httm y REST (Figura 31B), presentando una disminución del nivel de ambas proteínas de más del 50% en comparación con las células control (células SH-SY5Y diferenciadas transfectadas transitoriamente con

el vector de expresión GFP-480-68Q), el OA Hsp90 $\alpha$  mutante no presentó diferencia significativa con las células control, lo que indica que no tiene efecto en disminuir el nivel de la proteínas Httm y REST ( $p>0.005$ ) (Figura 31C).

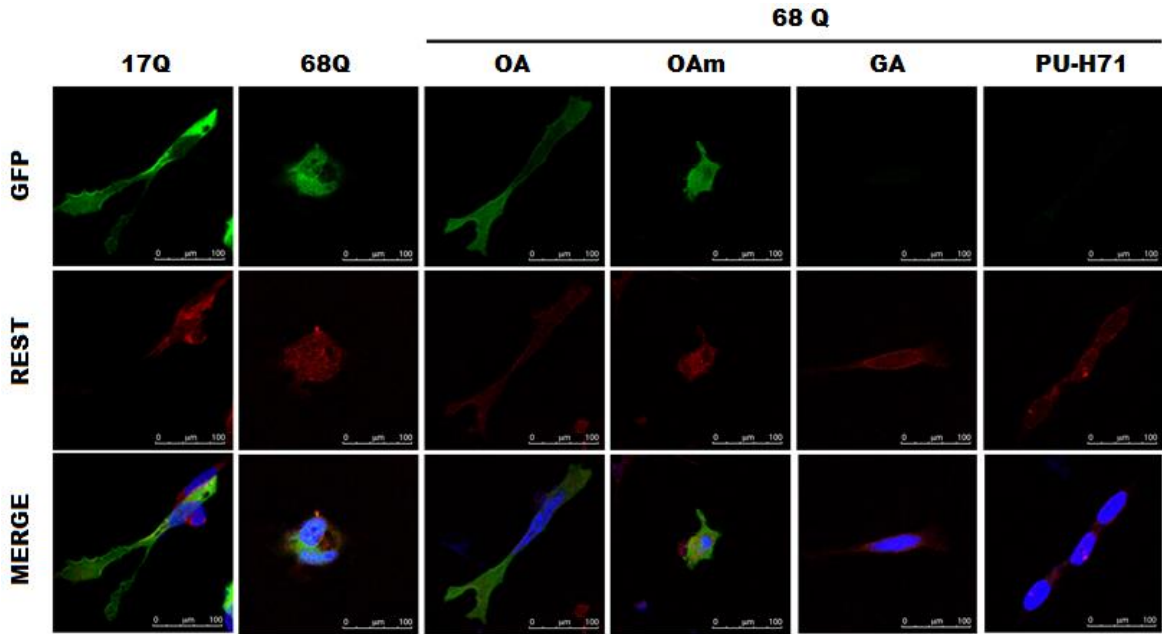
La Httm es transportada al núcleo e incrementa la expresión de caspasa-1, la cual activa la expresión de caspasa-3, la liberación del citocromo c de la mitocondria y ocasiona inducción de apoptosis, para poder observar si el OA Hsp90 $\alpha$  tiene un efecto en disminuir el porcentaje de células con Httm en núcleo, una población de 300 células transfectadas con el vector de expresión GFP-480-68Q, fueron cuantificadas para determinar el porcentaje celular con Httm en núcleo, encontramos que a las 24 y 48 horas, la población celular co-transfectadas con el OA Hsp90 $\alpha$  presentó un porcentaje celular con Httm en núcleo de 21.1 y 29.66% respectivamente, en comparación con la población celular control (células sin OA Hsp90 $\alpha$ ), la cual fue de 77.66% a las 24 horas y 84.33% a las 48 horas. El OA Hsp90 $\alpha$  mutante presentó efectos negativos en disminuir el porcentaje de la población celular con Httm en núcleo, el cual fue de 79.66% y 87.66% a las 24 y 48 horas respectivamente. No hubo diferencia estadísticamente significativa entre la población control y la población con el OA Hsp90 $\alpha$  mutant, pero si diferencia estadísticamente significativa con el OA Hsp90 $\alpha$ , los resultados se presentan en serie de 3 experimentos por separados ( $n=100$ ) ( $p<0.05$ ), figura 31D.



**Fig. 31. La inhibición traduccional de Hsp90 disminuye la citotoxicidad celular inducida por Httm.** Efecto de la inhibición de la traducción de Hsp90α con OA Hsp90α, 48 horas post-co-transfección. A) Porcentaje de muerte celular, los valores que se muestran son el promedio de tres experimentos independientes ( $p < 0.05$ ). B) Análisis de Western-Blot de Httm y de REST, β actina fue usada como control de carga. C) Cuantificación del nivel de las proteínas Httm y de REST de los Western-Blot, se presenta la media y desviación estándar de tres experimentos independientes ( $p < 0.005$ ). D) Porcentaje de células con Httm en núcleo a las 24 y 48 horas, los resultados presentan la media y DS ( $n = 100$ ) de series de 3 experimentos por separado ( $p < 0.05$ ).

Con la finalidad de observar en las células SH-SY5Y, el efecto del OA Hsp90α, de GA o de PU-H71, sobre la reducción del nivel de Httm y de REST, y disminución del daño citotóxico celular, células SH-SY5Y fueron sembradas en cubreobjetos cubiertos con fibronectina, se diferenciaron, se transfectaron transitoriamente con el plásmido pGFPC2-480-17HA o pGFPC2-480-68HA, se llevó a cabo el tratamiento correspondiente, a las 24 horas post tratamiento o post-co-

transfección, las células fueron fijadas, se realizó un ensayo de IF con el anticuerpo primario anti-REST y anticuerpo secundario anti conejo acoplado a Cy<sup>TM</sup>5 y el núcleo fue teñido con DAPI (Azul). En las células SH-SY5Y co-transfectadas con el OA Hsp90 $\alpha$  se observa una disminución de Httm (GFP), la cual se observa únicamente en el citoplasma, no se presentan cambios morfológicos celulares, no hubo reducción en el núcleo, ni en el tamaño de neuritas, sus características morfológicas celulares son similares a la célula control (SH-SY5Y transfectada transitoriamente con el plásmido pGFPC2-480-17HA). En contraste, el OA Hsp90 $\alpha$  mutante no presentó disminución en el daño citotóxico celular, se observa localización de Httm (GFP) en citoplasma y núcleo, el daño morfológico celular es similar al que se observa en la célula SH-SY5Y transfectada transitoriamente con el plásmido pGFPC2-480-68HA. GA y PU-H71, ocasionaron una disminución total de la proteína Httm (GFP) y de un gran porcentaje del nivel de REST. Estos resultados obtenidos demuestran claramente que el OA Hsp90 $\alpha$ , GA y PU-H71 respectivamente, tienen un efecto de protección frente a la toxicidad celular inducida por Httm (Figura 32).



**Fig. 32. La inhibición traduccional o funcional de Hsp90 disminuye el daño citotóxico celular inducido por Httm.** Células SH-SY5Y diferenciadas fueron transitoriamente transfectadas, 24 horas post tratamiento o post-co-transfección, las células fueron fijadas y se realizó un ensayo de IF con el anticuerpo primario anti-REST y anticuerpo secundario anti conejo acoplado a Cy<sup>TM</sup>5 (rojo), el núcleo celular fue teñido con DAPI (Azúl). El OA Hsp90 $\alpha$  ocasionó una reducción del daño citotóxico celular, reduciendo el nivel de Httm (GFP), la cual se localiza únicamente en núcleo, la morfología celular es similar a la que se presenta en la célula control (célula transfectada con el plásmido pGFPC2-480-17HA). GA o PU-H71 ocasionaron una disminución total en el nivel de Httm (GFP) y una disminución en la estabilidad de REST, presentaron una morfología celular intacta. El OA Hsp90 $\alpha$  mutante no ocasionó reducción en el daño citotóxico celular, el nivel de Httm (GFP) y el daño morfológico celular es similar al que se presenta en la célula transfectada con el plásmido pGFPC2-480-68HA.

## VIII. DISCUSIÓN.

La enfermedad de Huntington es un desorden neurodegenerativo, autosómico dominante, causado por la expansión de los tripletes CAG del exón 1 del gen *IT15* en el cromosoma 4p16, la traducción de estos repetidos codifica para una región de poliglutaminas (polyQ) en la región amino de la proteína Htt. La proteína mutada se produce cuando la expansión de los repetidos es mayor de 36, dicha proteína es el aspecto principal causante de la enfermedad (Buckler A, *et al.*, 1993). Es una enfermedad hereditaria y es esencialmente una enfermedad del sistema nervioso, los pacientes presentan movimientos coreicos involuntarios y bruscos en las extremidades, los dedos se encojen, las manos son rodantes, piernas y pies en continuo movimiento, un pie cruzado sobre el otro, dificultad para hablar, pérdida de peso por atrofia muscular, hasta ocasionar la muerte (Huntington G, 2003).

La enfermedad se presenta primordialmente en la región del estriado y se disemina a otras regiones del cerebro conforme avanza la enfermedad, propiedades electrofisiológicas alterada en la actividad de las neuronas piramidales corticales (CPNs) y de las neuronas de espina media (MSNs), por lo tanto desregulación de información entre las neuronas con pérdida de la memoria (Estrada S., *et al.*, 2013).

Esta enfermedad, muestra una prevalencia aproximadamente de 5 a 7 individuos afectados por cada 100,000. Varía mucho geográficamente como resultado de la etnicidad, la migración local y los últimos patrones de inmigración (Warby SC, *et al.*, 2011). La prevalencia más altas se encuentra en las poblaciones aisladas de la región del Lago de Maracaibo de Venezuela, donde se ha reportado personas con HD de hasta a 700 por cada 100,000 personas (Warby SC, *et al.*, 2011). La prevalencia estimada para la Ciudad de México sería cuatro de cada 100,000 personas, una cifra que es probablemente una subestimación, representa un posible límite inferior ya que la talla del alelo normal en individuos controles en México es significativamente más grande que los europeos y venezolanos, lo que sugiere que la frecuencia de esta enfermedad en la población mexicana puede ser

más alta, la prevalencia de esta enfermedad en México es importante debido al enorme impacto, incluyendo la genética y sus implicaciones pronósticas que la enfermedad de Huntington tiene en las familias afectadas (Alonso M E. *et al.*, 2009).

Htt es una proteína compuesta de 3144 aminoácidos, de aproximadamente 348 KDa, el marco de lectura abierto de su gen codificante contiene repeticiones del trinucleótido (CAG)<sub>n</sub> que van de 11 a 34, por lo que su peso molecular (PM) aumenta de acuerdo al número de repeticiones de los tripletes. En cromosomas de sujetos con la enfermedad de Huntington la longitud de dichas repeticiones es por encima de 35 repetidos en el extremo codificante amino terminal (Buckler A, *et al.*, 1993). Htt se localiza principalmente en el citoplasma, asociada al retículo endoplasmático, aparato de Golgi, microtúbulos y a membrana celular, algunas veces en cuerpos densos post-sinápticos (Gutekunst CA, *et al.*, 1995). Tiene participación en la división celular durante la neurogénesis uniéndose al complejo dineína/dinactina para la orientación correcta del uso mitótico (Godin JD., *et al.* 2011) y el transporte de vesículas mediado por dineína (Caviston JP, *et al.* 2007).

La función de Httn consiste en proteger a las células del cerebro de la muerte celular programada (apoptosis.), es requerida principalmente en el desarrollo embrionario normal, y en el desarrollo prenatal neuronal (Wang R, *et al.* 2012).

La mutación en Httn causa un cambio conformacional en la proteína y produce un mal plegamiento, lo cual permite la exposición de varios sitios blancos a caspasas en el citoplasma, produciendo fragmentos que son ubiquitinados y etiquetados por el sistema proteosomal para su degradación, sin embargo, el sistema proteosomal llega a ser menos eficiente en la enfermedad de Huntington y por lo tanto estos fragmentos se mantienen estables. Algunos de los efectos de estos fragmentos son: se acumulan en el citoplasma celular e interaccionan con varias proteínas causando disfunción de la señalización de calcio y homeostasis, se agregan en el citoplasma celular formando cuerpos de inclusión, interaccionan con varias proteínas de las mitocondrias, alteran su actividad metabólica, causan estrés oxidativo, defectos en la regulación de calcio y por tanto ocasionan disfunción

mitocondrial, alteran el transporte vesicular y el reciclaje, se traslocan al núcleo, desregulan la transcripción de genes y forman cuerpos de inclusión (Zuccato C. *et al.*, 2010).

Httm en el núcleo, incrementa la expresión de caspasa-1, la cual activa la expresión de caspasa-3, la liberación del citocromo c de la mitocondria e inducción de apoptosis, muerte celular que está asociada a la enfermedad de Huntington (Li SH., *et al.* 2000). Httm se expresa de manera ubicua en los pacientes con la enfermedad de Huntington, pero el problema se presenta principalmente en las neuronas del cerebro (Sathasivam k, *et al.*, 2013), las cuales presentan morfología celular anormal, falta del desarrollo normal de neuritas, disfunción neuronal, expresión alterada de genes, muerte celular y formación de cuerpos de inclusión de fragmentos de Httm (Li S, *et al.*, 1999).

El Factor de Transcripción Restringido de RE1 (REST) también llamado Factor Silenciador Restringido Neuronal (NRSF), tiene una función importante en la neurogénesis, reprime genes que inhiben la diferenciación neuronal, por lo que permite la expresión positiva de reguladores transcripcionales que actúan en genes de diferenciación terminal (Schoenherr, *et al.*, 1996).

En células madre embrionarias, REST es altamente expresada, localizada en el núcleo y su función consiste en reprimir genes blancos como *BDNF*, *Ascl1*, *Neurog2*, entre otros, pero durante la diferenciación neuronal, el nivel de proteína de REST es dramáticamente reducido vía varios mecanismos: proteólisis (REST es degradada vía proteosomal), baja regulación dependiente de miRNA (miR-9) y por exclusión nuclear dependiente de Htt (Telese F, *et al.*, 2013).

Httm promueve la transcripción de *BDNF* (Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro), un factor de sobrevivencia de las neuronas del estriado (Zuccato C, *et al.*, 2001) mediante la unión indirecta de REST para mantenerla en el citoplasma, impidiendo de esta manera que entre al núcleo y no se una al elemento NRSE (secuencia palindrómica en el promotor *BDNF*) y se pueda llevar a cabo la transcripción de gen *BDNF*. Esta actividad se pierde en la enfermedad de



Huntington, ya que Httm permite la entrada patológica de REST al núcleo, la cual se une al elemento NRSE, permite el reclutamiento de co-represores que van a ocasionar la inhibición de la transcripción de *BDNF* y por lo tanto neurodegeneración (Zuccato, *et al.*, 2003).

La unión de Htt a REST es mediante la proteína RILP (Proteína de dominio LIM, que interactúa con REST/NRSF) formando un complejo en el citoplasma, este complejo está formado por: Htt, dynactin p150<sup>Glued</sup>, RILP y REST; a este complejo se une la proteína HAP1 (Proteína 1 que se asocia a Htt) que impide que el complejo-REST entre al núcleo y se mantenga en el citoplasma, sin embargo en la enfermedad de Huntington, Httm hace que la formación del complejo sea de conformación diferente y menos estable, de tal manera que al unirse HAP1 hace que se libere RILP, por tanto REST entra de manera anormal al núcleo (Shimojo M., 2008), su extremo N-terminal recluta al co-represor proteína con hélices emparejadas anfipáticas (Sin3A) e histonas deacetilasas (HDAC1 y HDAC2) y su extremo C-terminal recluta una variedad de factores como el correpresor REST 1 (CoREST) para reprimir genes importantes en la regulación de la función de neuronas por ejemplo, la transcripción del gen *BDNF* (Bithell A., *et al* 2009).

REST es un blanco transcripcional de la proteína pro-apoptótica HIPPI (Huntingtin Interacting Protein 1 (HIP1) protein interactor) principalmente en la enfermedad de Huntington, ya que HIPPI se une al promotor de *REST* e incrementa su expresión, desencadena la activación transcripcional de *REST*, consecuentemente la represión de genes blancos como *PENX* y *BDNF*, aumento de inducción de caspasa-8 y por ende inducción de apoptosis (Datta M. *et al.*, 2011).

Httm induce de manera indirecta y aberrante la activación de la expresión de *REST*, en la enfermedad de Huntington, Httm desencadena una cascada patogénica que involucra de manera errónea la activación del factor SP1, el cual se une al promotor del gen *REST* y activa su expresión, por lo tanto hay un aumento en la producción y entrada de REST al núcleo (Ravache M, *et al.* 2010). Modular la entrada de REST al núcleo y su función en la regulación de genes la

hacen ser un blanco terapéutico importante para la enfermedad de Huntington (Chen GL., and *et al.* 2017).

La proteína del choque térmico 90 (Hsp90) participa en el plegamiento y maduración de proteínas sustratos en etapas intermedias del plegamiento mediante hidrólisis de ATP, e interacciona con más de 20 co-chaperonas (Taipale M, *et al.*, 2010).

Hsp90 se activa cuando en su extremo N-terminal, mantiene unida una molécula de ATP, de manera activa, tiene la capacidad de estabilizar y plegar proteínas clientes. Agentes que tienen la actividad de inhibir la proteína Hsp90, se desplazan la molécula de ATP, se unen a Hsp90 para inhibirla, entonces Hsp90 libera las proteínas clientes que son dirigidas a degradación por el proteasoma.

Existen 2 isoformas de Hsp90: Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$ , a pesar de estar cercanamente relacionadas y tener función de manera similar, interaccionan con proteínas clientes diferentes. La primera es inducida por estrés y la segunda es expresada constitutivamente, mientras que células y ratones Hsp90 $\alpha$ -knockout son viables, ratones Hsp90 $\beta$ -knockout son letales (Voss AK, *et al.* 2000, Zou M, *et al.* 2017).

Hsp90 $\beta$  es indispensable para la viabilidad celular, función celular, proliferación celular y desarrollo embrionario de ratones E9.0/E9.5, su función no puede ser compensada por Hsp90 $\alpha$  endógena (Voss AK, *et al.* 2000), ni la función de Hsp90 $\alpha$  puede ser compensada por la Hsp90 $\beta$  (Zou M, *et al.* 2017).

La inhibición farmacológica de Hsp90, desestabiliza su interacción con Httm e induce su degradación a través del proteosoma (Baldo B., *et al.* 2012). En un modelo celular de enfermedad de Huntington, GA activa la respuesta de choque térmico, activándose la expresión de Hsp40, Hsp70 y Hsp90, y se inhibe la formación de agregados del extremo N-terminal de Httm (Sittler A. *et al.* 2001).

En virtud de lo anterior, el objetivo general, propuesto en este estudio, consistió en llevar a cabo la disminución de la estabilidad de las proteínas Httm y REST, y el daño citotóxico celular inducido por Httm utilizando GA, PU-H71 y OA Hsp90 $\alpha$

respectivamente, en células SH-SY5Y diferenciadas con ácido retinoico, transfectadas transitoriamente con el plásmido pGFPC2-480-68HA, el cual codifica para el extremo N-terminal de la proteína Htt humana con 68 repetidos de glutamina.

La línea celular SH-SY5Y en estado proliferativo y diferenciado ha sido ampliamente usada para estudiar la neurotoxicidad que se presenta en la enfermedad de Huntington (Bjørkøy, G., et al. 2005 and Bañez, coronel., et al. 2012).

En el presente trabajo, primero diferenciamos la línea celular SH-SY5Y a un fenotipo tipo neuronal, la diferenciación celular fue durante 4 días, usando 10  $\mu$ M ácido retinoico y 3% de SFB, para obtener un mejor modelo celular de enfermedad de Huntington, ya que esta línea celular poseen muchas cualidades de neuronas de humano.

Las células SH-SY5Y en estado proliferativo (sin diferenciar) presentan una morfología epitelial típica, las células diferenciadas dejaron de proliferar y presentaron cambios morfológicos, desarrollaron neuritas más extensas y maduras, bioquímicamente presentaron un incremento de aproximadamente el doble de los marcadores neuronales enolasa específica de neurona (NSE), proteína de núcleo neuronal (NeuN) y de  $\beta$ -tubulina III.

Mediante la transfección transitoria del plásmido pGFPC2-480-17HA en el modelo celular SH-SY5Y diferenciado, y por análisis de Western-Blot se puede observar la expresión y la presencia de Htt<sub>n</sub> en la región citosólica, su localización fue visible por la proteína reportera GFP mediante microscopia confocal, mientras que en las células transfectadas transitoriamente con plásmido pGFPC2-480-68HA, proteína Htt<sub>m</sub> presentó una distribución en la región citosólica y nuclear, las células presentaron productos de degradación de la proteína Poli-ADP-ribosa-polimerasa-1 (PARP-1), la cual es una señal de inducción de apoptosis, presentaron morfología celular más pequeña e irregular, neuritas más cortas y condensación celular, Htt<sub>n</sub> (17Q) presentó una distribución similar a Htt<sub>e</sub>.

Se ha demostrado que huntingtina interacciona con la proteína HIP1 (Proteína 1 que interacciona con Htt) en el citoplasma, la débil interacción entre Httm y HIP1 resulta en la liberación de HIP1, por ende su interacción con HIP1 (Proteína que se une a la proteína 1 que interacciona con Htt) y su acumulación nuclear, HIP1 se une al promotor REST, desencadenando su activación transcripción y consecuente represión de REST en genes blancos que contribuyen a la patogénesis de la enfermedad de Huntington (Datta, M., *et al.* 2011). Para observar si la presencia de Httm en esta línea celular ocasiona un incremento en el nivel de REST, células SH-SY5Y diferenciadas fueron transfectadas transitoriamente con plásmido pGFPC2-480-68HA, mediante análisis de Western-Blot se observó un incremento del doble en el nivel de la proteína REST comparado con las células transfectadas transitoriamente con el plásmido pGFPC2-480-17HA.

Los inhibidores naturales de Hsp90 desplazan las moléculas de ATP y bloquean su función con alta especificidad, geldanamicina y PU-H71 se unen al extremo N-terminal de Hsp90 cuando está de manera homodimérica para inhibir su función, PU-H71 también puede unirse a Hsp90 en su forma monomérica e impedir su dimerización (Beebe K, *et al.* 2013).

Mediante ensayo de MTT, se pudo observar que las drogas GA y PU-H71 presentaron un efecto importante de manera dosis dependiente y de manera tiempo dependiente en la disminución de viabilidad de las células SH-SY5Y diferenciadas. Por análisis de Western-Blot se pudo observar que la inhibición de la proteína Hsp90 $\alpha$  con GA o PU-H71, ocasionaron un incremento del doble de Hsp90 $\alpha$  y tienen un efecto importante en disminuir aproximadamente el 50% de la presencia de la proteína REST.

En nuestro grupo de laboratorio, se diseñó el oligo antisentido: OA Hsp90 $\alpha$  (tabla No. 1), dirigido contra el ARNm que codifica para la proteína Hsp90., su transfección en células SH-SY5Y diferenciadas, a las 48 horas postransfección, tuvo un efecto del 20% en disminuir la viabilidad celular, la cual fue recuperada a las 72 horas postransfección. Las concentraciones de 12 o 14  $\mu$ M de OA Hsp90 $\alpha$

tuvieron un efecto en disminuir la presencia de Hsp90 por encima del 40% a las 24 horas postransfección y del 90% a las 48 horas postransfección, la disminución del nivel de Hsp90 tuvo un efecto en disminuir el nivel de REST por encima del 40% y 70%, a las 24 y 48 horas, respectivamente.

Durante la diferenciación neuronal, REST interacciona con las proteínas chaperonas Hsp40, Hsp10 y Grp78 (Proteína regulada por glucosa, de 78 KD) (Lee N., *et al.* 2016). Poco se conoce acerca de la estabilidad de la proteína REST, dada su importancia en esta enfermedad, y dado que la inhibición de Hsp90 $\alpha$  a nivel traduccional con OA Hsp90 $\alpha$  o a nivel postraduccional con GA o PU-H71, ocurre una disminución en el nivel de REST, investigamos su posible interacción con Hsp90 endógena, por medio de ensayo de co-inmunoprecipitación y análisis de co-localización encontramos que Hsp90 interacciona con REST. Estos resultados obtenidos indican que Hsp90 tiene una función importante en mantener la estabilidad y función de REST.

La inhibición farmacológica de Hsp90, utilizando 50 nM de PU-H71 o 1  $\mu$ M de GA, a las 24 horas, ocasionó una disminución en el porcentaje de muerte celular inducida por Httm, por encima del 40% y del 50% respectivamente, PU-H71 disminuyó más del 90% el nivel de Httm y más del 80% el nivel de REST inducida por Httm, GA disminuyó aproximadamente el 90% el nivel de Httm y más del 70% el nivel de REST inducida por Httm. Estos resultados demuestran que GA y PU-H71, tienen un efecto indirecto en la estabilidad de las proteínas Httm y REST, presentando un efecto neuroprotector en el daño citotóxico inducido por Httm.

La disminución traduccional de Hsp90, con 12  $\mu$ M de OA Hsp90 $\alpha$ , ocasionó una disminución en el porcentaje de muerte celular inducida por Httm, por encima del 75% a las 24 horas, la cual se mantuvo hasta las 48 horas, disminuyó más del 50% la estabilidad de Httm y más del 50% el nivel de REST inducida por Httm a las 24 y 48 horas. OA Hsp90 $\alpha$  mutante no tuvo ningún efecto en la disminución del porcentaje de muerte celular inducida por Httm, ya que presentó un porcentaje de muerte celular por encima de las células control, tampoco presentó disminución en los niveles de Httm ni de REST.

Dado el efecto importante obtenido del OA Hsp90 $\alpha$ , analizamos si también tenía un efecto importante en disminuir degradación de PARP-1 completa, por análisis de western-Blot pudimos observar que las células tratadas con el OA Hsp90 $\alpha$  presentaron menos productos de degradación de la proteína PARP-1 completa (productos de aproximadamente 55 KDa) comparado a los productos que presentaron las células control, el OA Hsp90 $\alpha$  mutante no tuvo efecto en disminuir el nivel de productos de degradación de PARP-1 completa.

Httm es transportada al núcleo e incrementa la expresión de caspasa-1, la cual activa la expresión de caspasa-3, la liberación del citocromo c de la mitocondria y ocasiona inducción de apoptosis (Li SH., *et al.* 2000). Para poder observar si el OA Hsp90 $\alpha$  tiene un efecto en disminuir el porcentaje de células con Httm en núcleo, el OA Hsp90 $\alpha$  presentó un porcentaje celular con Httm en núcleo de 21.1 y 29.66% a las 24 y 48 horas respectivamente, células control (células sin OA Hsp90 $\alpha$ ), presentaron un porcentaje con Httm en núcleo de 77.66% a las 24 horas y 84.33% a las 48 horas. El OA Hsp90 $\alpha$  mutante tuvo efectos negativos presentando el 79.66% y 87.66% a las 24 y 48 horas respectivamente.

Estos resultados demuestran que el OA Hsp90 $\alpha$  tiene un efecto importante e indirecto en disminuir la estabilidad de Httm, el nivel de REST, la presencia de Httm en núcleo y el daño citotóxico inducido por Httm, el efecto depende de su secuencia de las bases de nucleótidos, desde que la secuencia de las bases de nucleótidos del OA Hsp90 $\alpha$  mutante presentó efectos negativos o similares a las células control, células sin tratar.

Hsp90 se une con mayor afinidad a Httm que a Httn. La unión de Hsp90 a Httm la protege de la degradación proteosomal (Baldo B, *et al.*, 2012). Poco se conoce si Hsp90 tiene una función importante en la estabilidad de la proteína Httm, dada su importancia en esta enfermedad y dado que la inhibición de Hsp90 a nivel traduccional con el OA Hsp90 $\alpha$  o a nivel funcional con GA o PU-H71, ocurre una disminución en el nivel de Httm, investigamos la posible interacción de Httm con Hsp90 endógena, por medio de co-inmunoprecipitación y análisis de co-localización encontramos que Hsp90 interacciona con Httm, observándose una

banda de gran intensidad cuando inmunoprecipitamos con un anticuerpo anti-Hsp90 y revelamos el Western-Blot con un anticuerpo anti-Htt, la interacción de Hsp90 con Httm fue mínimo de baja afinidad. Estos resultados obtenidos indican que Hsp90 tiene una función importante en mantener la estabilidad y función de Httm, no así de Htt.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, fueron confirmados y visualizados a las 24 horas por microscopia confocal de fluorescencia, las células SH-SY5Y diferenciadas co-transfectadas transitoriamente con el plásmido de expresión pGFPC2-480-68HA con el OA Hsp90 $\alpha$  presentaron una disminución de la proteína Httm, la cual se localizó únicamente en el citoplasma, las células no presentaron cambios morfológicos, ni reducción nuclear, ni disminución de las neuritas, presentaron una disminución en la estabilidad de la proteína REST, estas características fueron similares a las células que se transfectaron transitoriamente con el plásmido de expresión control, pGFPC2-480-17HA., El OA Hsp90 $\alpha$  mutante, no presentó efecto de protección en el daño celular inducido por huntingtina mutante, las células presentaron características morfológicas similares a las que se presentan en las células transfectadas transitoriamente con el plásmido de expresión pGFPC2-480-68HA, las cuales presentaron reducción nuclear y celular, con Httm en núcleo y citoplasma, en nivel de REST aumentado, reducción de neuritas y signos de deshidratación.

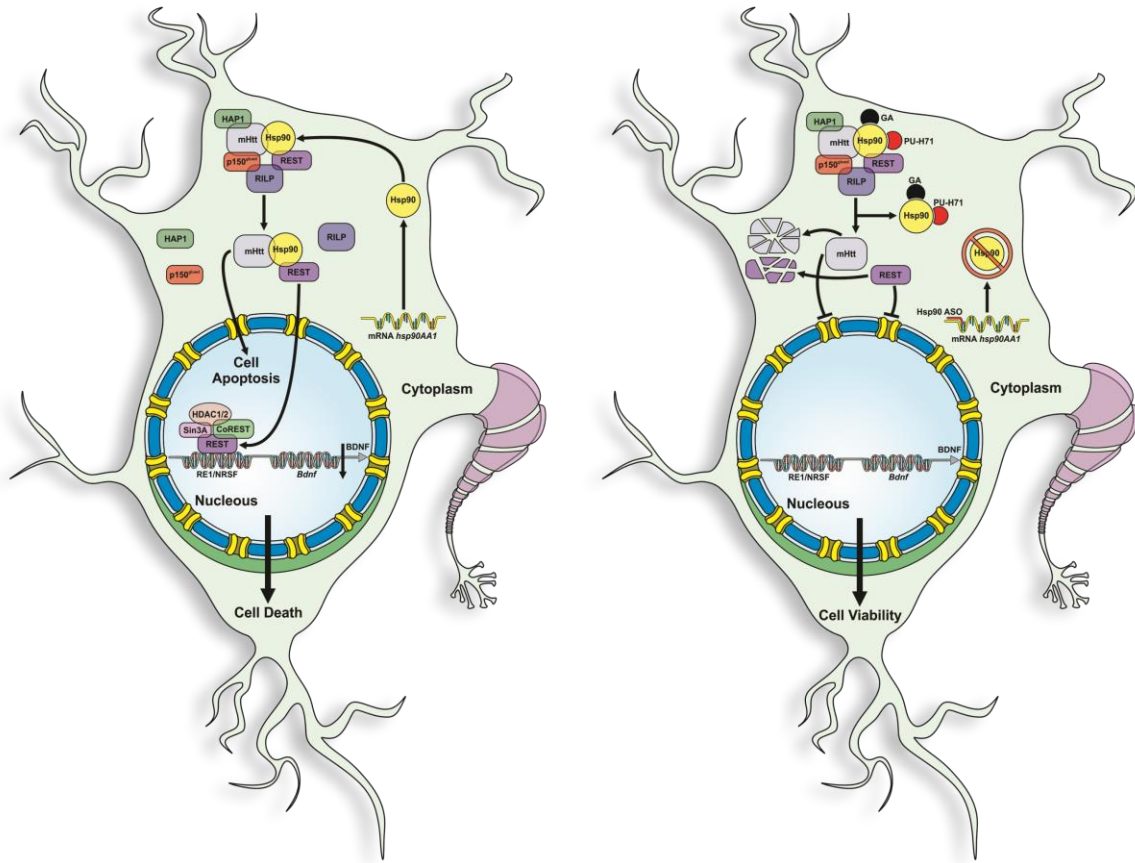
Las células transfectadas transitoriamente con el plásmido de expresión pGFPC2-480-68HA y tratadas con GA o con PU-H71 presentaron una disminución significativa de aproximadamente el 100% de la presencia de Httm, una disminución en el nivel de REST, no presentaron características de daño celular. GA y PU-H71 respectivamente tienen un efecto de neuroprotección celular frente a daño citotóxico inducido por Httm.

Los resultados obtenidos en este trabajo, sobre el efecto de GA, PU-H71 y del OA Hsp90, respectivamente, son presentados en la figura 33, donde se muestra el modelo celular que estamos proponiendo, huntingtina mutante es estabilizada por la proteína Hsp90, entra al núcleo, aumenta la expresión de REST e induce

apoptosis celular, REST es estabilizada por la proteína Hsp90, entra al núcleo y reprime genes blancos importantes para la viabilidad celular como *BDNF*. Huntingtina mutante y REST son proteínas clientes de Hsp90, la inhibición funcional de Hsp90 $\alpha$  con GA o con PU-H71, desestabiliza a Httm y a REST, la estabilidad de estas proteínas es disminuida, por lo tanto hay neuroprotección de la citotoxicidad inducida por Httm. La inhibición traduccional de Hsp90 con OA Hsp90 $\alpha$ , disminuye la presencia de Hsp90, al estar disminuido el nivel de Hsp90, el nivel de sus proteínas clientes Httm y REST es disminuido, por lo tanto hay disminución del daño citotóxico celular inducida por Httm.

Estos resultados demuestran que la proteína Hsp90 protege la estabilidad de Httm y de REST, su inhibición traduccional o funcional desestabiliza a estas proteínas, disminuyendo su nivel y el daño citotóxico celular inducido por Htt mutante, así pues Hsp90 y REST se convierten en candidatos ideales como nuevos blancos terapéuticos contra la enfermedad de Huntington. OA Hsp90 $\alpha$  puede ser una estrategia exitosa para el desarrollo de terapia génica en la enfermedad de Huntington.





**Fig. 33. Modelo Celular (Efecto de GA, PU-H71 y del OA Hsp90 sobre el daño citotóxico inducido por Httm).** Httm es estabilizada por la proteína Hsp90, entra al núcleo, aumenta la expresión de REST e induce apoptosis celular, REST es estabilizada por la proteína Hsp90, entra al núcleo y reprime genes blancos importantes para la viabilidad celular. Httm y REST son proteínas clientes de Hsp90, la inhibición funcional de Hsp90 con GA o con PU-H71, o la inhibición traduccional de Hsp90 con OA Hsp90 $\alpha$ , impide la presencia de Hsp90, por lo tanto, la estabilidad de sus proteínas clientes Httm y REST es disminuida, consecuentemente hay disminución de daño citotóxico celular inducida por Httm.

Estudios resultados obtenidos fueron publicados en la revista PLOS ONE, el nombre del artículo es: The interaction between RE1-silencing transcription factor (REST) and heat shock protein 90 as new therapeutic target against Huntington's disease.

## IX. CONCLUSIONES

En el presente trabajo, demostramos en la línea celular SH-SY5Y diferenciada, que la expresión de la proteína Httm (con 68 repetidos de glutamina), se localiza en el citoplasma y de manera errónea en el núcleo, presenta un efecto citotóxico, ocasionando disminución en el tamaño del núcleo y de las neuritas, así como condensación nuclear, presenta aumento del nivel de REST y ocasiona un porcentaje de muerte celular 3 veces mayor al que se presenta con la expresión de la proteína Httm (con 17 repetidos de glutamina).

Hsp90 $\alpha$  interacciona y tiene una función importante en mantener la estabilidad REST y de Htm, no así la de Httm. GA y PU-H71, respectivamente, tuvieron un efecto significativo en inhibir la proteína Hsp90 $\alpha$ , el OA Hsp90 $\alpha$  tuvo un efecto significativo en reducir la expresión de Hsp90 $\alpha$ .

GA, PU-H71 y OA Hsp90 $\alpha$ , respectivamente, presentaron un efecto significativo en reducir el nivel de Httm y de REST, disminuyendo de esta manera el porcentaje de muerte celular y el efecto citotóxico inducido por Httm, teniendo de esta manera un excelente efecto neuroprotector frente a la citotoxicidad inducida por Httm. El OA Hsp90 $\alpha$  mutante no presentó ninguna efecto importante en disminuir el daño citotóxico inducido por Httm.

Estos datos sugieren que Hsp90 $\alpha$  y REST pueden ser blancos potenciales en la enfermedad de Huntington, y que el OA Hsp90 $\alpha$  puede ser una herramienta útil para el desarrollo de estrategias terapéuticas, basadas en oligo antisentido *in vivo* contra la enfermedad de Huntington.

## **X. PERSPECTIVAS**

**1.-** Analizar el efecto del fármaco PU-H71 al inhibir Hsp90 en la cepa de ratones transgénicos R6/2, sobre su periodo de sobrevivencia y fenotipo conductual.

**2.-** Analizar el efecto de la transfección vía intra-estriatal del oligo antisentido Hsp90 (OAHsp90) contra Hsp90, en la cepa de ratones transgénicos R6/2, sobre su periodo de sobrevivencia y fenotipo conductual.

**3.-** Analizar la estabilidad de las proteínas REST y Httm al inhibir la síntesis (OA Hsp90) o actividad (PU-H71) de la proteína Hsp90, en la región del estriado de la cepa de ratones transgénicos R6/2.

**4.-** Determinar si el efecto de la inhibición de Hsp90 con OA Hsp90 o PU-H71 reduce el daño citotóxico de la región del estriado de la cepa de ratones transgénicos R6/2.

## XI.- BIBLIOGRAFÍAS

Alonso M E, Ochoa A, Boll MC. *et al.* Clinical and genetic characteristics of Mexican Huntington's disease patients. *Mov disord.* 2009; 24(13): 2012-5.

Arrasete M and Finkbeiner. ELSEVIER. Protein aggregates in Huntington's disease. 2012; 238(1); 1-11.

Baldo B, Weiss A, Parker CN, *et al.* A screen for enhancer of clearance identifies huntingtin as a heat shock protein 90 (Hsp90) client protein. *J Biol Chem.* 2012; 287 (2): 1406-1414.

Bano D, Zanetti F, Mende Y, Nicotera P. Neurodegenerative processes in Huntington's disease. *Cell Death and Disease.* (2011); 1-7.

Bañez-Coronel, M., Porta, S., Kagerbauer, B., Mateu-Huertas, E., Pantano, L., Ferrer, I., Guzmán, M., Estivil, X. and Martí, E. (2012). A Pathogenic Mechanism in Huntington's Disease Involves Small CAG-Repeated RNAs with Neurotoxic Activity. *PLos Genet.* 8(2): e1002481.

Beebe, K., Mollapour, M., Scroggins, B., Prodromou, C., Xu, W., Tokita, M., Taldone, T., Pullen, L., Zierer, B. K., Lee, M. J., Trepel, J., Buchner, J., Bolon, D., Chiosis, G. and Neckers, L. Post-translational modification and conformational state of Heat Shock Protein 90 differentially affect binding of chemically diverse small molecule inhibitors. *Oncotarget.* 2013; 4(7):1065-74.

Biedlre JL, Helson L and Spengler BA. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res.* 1973; 33(11): 2643-52.

Biedlre JL, Roffler-Tarlov S, Schachner M, *et al.* Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res.* 1978; 38(11pt 1):3751-7.

Bithell A, Jhonson R and Buckley NJ. Transcriptional dysregulation of coding and non-coding genes in cellular models of Huntington's disease. *Biochem Soc Trans.* 2009; 37(Pt 6): 1270-5.

Boado RJ, Kazantsev A, Apostol BL, *et al.* Antisense-mediated down regulation of the human huntingtin gen. *The Journal of Pharmacology and Experiments Therapeutics.* 2000; 295(1): 239-243.

Buckler A, *et al.* A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell Press.* 1993; 72 (6): 971-983.

Bjørkøy, G., Lamark, T., Brech, A., Outzen, H., Perander, M., Overvatn, A., Stenmark H. and Johanse, T. (2005) p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol.* **171**(4):603-14.

Caviston JP, Ross JL, Antony SM and Holzbaur EL.. Huntingtin facilitates dynein/dynactin-mediated vesicle transport. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104(24):10045-50.

Chen GL., Ma, Q., Goswami, D., Shang, J., Miller, GM. Modulation of nuclear REST by alternative splicing: a potential therapeutic target for Huntington's disease. *J Cell Mol Med.* (2017). Doi: 10.1111/jcmm. 13209.

Coulson JM, *et al.* A splice variant of the Neuron-restrictive silencer factor repressor is expressed in small cell lung cancer: a potential role in derepression of neuroendocrine genes and a useful clinical marker.

Datta M. and Bhattacharyya N. Regulation of RE1 protein silencing transcription factor (REST) expression by HIP1 protein interactor (HIPPI)\*. 2011; 286(39): 33759-33769.

Darzynkiewicz Z, and Li X. Analysis of cell death by flow cytometry. In: Jacquamin-Sablon A. (eds) flow and image cytometry. NATO ASI series (series H: cell biology). 1996: vol 95. Springer, Berlin, Heidelberg.

Davies JE and Rubinsztein DC. Polyalanine and polyserine frameshift products in Huntington's disease. *Journal of Medical Genetics*. 2006; 43; 893-896.

Dorsman JC, Smoor MA, *et al.* Analysis of the subcellular localization of huntingtin with a set of rabbit polyclonal antibodies in cultured mammalian cells of neuronal origin: comparison with the distribution of huntingtin in Huntington's disease autopsy brain. *The Royal Society*. 1999; 354 (1386): 1061-1067.

Dwane S, Durack E and Kiely PA. Optimising parameters for the differentiation of SH-SY5Y cells to study cell adhesion and migration. *BMC Res Notes*. 2013; 6(366).

Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell Death. 2007; 35(4):495-516.

Estrada S and Rebec GV. Role of cerebral cortex in the neuropathology of Huntington's disease. 2013; 7(19): 1-7.

Evans SJ, Douglas I, Rawlins MD, *et al.* Prevalence of adult Huntington's disease in the UK based on diagnoses recorded in general practice records. *J Neural Neurosurg Psychiatry*. 2013.

Faronato M and Coulson JM. RES (RE1-silencing transcription factor). *Atlas Genet Oncol Haematol*. 2011; 15(2):208-213.

Franke J, Eichner S, Zeilinger C, *et al.* Targeting heat-shock-protein 90 (Hsp90) by natural products: geldanamycin, a show case in cancer therapy. *Nat Prod Rep*. 2013; 30 (10):1299-1323.

Gambarotta G, Garzotto D, Destro E. ErbB4 expression in neural progenitor cells (ST14A) is necessary to mediate neuregulin-1 $\beta$ 1-induced migration. *JBC*. 2004; 279(47):48808-816.

Girstmair H. *et al.* Depletion of cognate charged transfer RNA causes translational frameshifting within the expanded CAG stretch in huntingtin. 2013; 3: 148-159.

Godin JD and Humbert S. Mitotic spindle: focus on the function of huntingtin. *Int J Biochem Cell Biol.* 2011;43(6):852-6.

Guardavaccaro D, *et al.* Control of chromosome stability by the  $\beta$ -TrCP-REST-Mad2 axis. *Nature.* 2008; 452(7185): 365-369.

Gutekunst CA, Levey AI, Heilman CJ, *et al.* Identification and localization of huntingtin in brain and human lymphoblastoid cell lines with anti-fusion protein antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1995; 92: 8710-8714.

Handley OJ, Dunnett SB, Naji JJ, and *et al.* Pharmaceutica, cellular and genetic therapies for Huntington's disease. *Clinical Science.* 2006; 110:73-88.

Huntington G. On chorea. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 2003; 15 (1): 109-112.

Hogel M, Laprairie RB and Denovan-Wright EM. Promoters are differentially sensitive to N-terminal mutant huntingtin mediated transcriptional repression. *Plos One.* 2012;7(7): 1-12.

Johnson R. *et al.* A microRNA-based gene dysregulation pathway in Huntington's disease. *Neurobiology of diseases.* 2008;29: 438-445.

Johnson R. and Buckley NJ. Gene dysregulation in huntington's disease: rest, microRNAs and beyond. *Neuromol Med* (2009); 11(3):183-199.

Lee N, Park SJ, Haddad G, Kim DK, Park SM, Park SK, Choi Y. Interactomic analysis of REST/NRSF and implications of its functional links with the transcription suppressor TRIM28 during neuronal differentiation. *Scientific reports.* 2016; 6:39049

Li S, Cheng AL, Li H, Li XJ. Cellular defects and altered gene expression in PC12 cells stably expressing mutant huntingtin. *The Journal Neuroscience*. 1999; 19 (13): 5159-5172.

Li SH, Lam S, Cheng AL, Li XJ. Intranuclear huntingtin increases the expression of casapase-1 and induces apoptosis. *Human Molecular Genetics*. 2000; 9 (19): 2859-2867.

Lu T, Aron L, Zullo J, et al. REST and stress resistance in ageing ans Alzheimer´s disease. *Nature*. 2013; 507(7493):448-54.

Maden M. Retinoid signaling in the development of the central nervous system. *Nat Rev Neurosci*. 2002; 3(11): 843-53.

Newman ME. New SRM helps improve diagnosis of Huntington´s Disease. *Medical Xpress*. 2011; 1-2.

Pahlman S., Hoehner JC, Nanberg E, et al. Differentiation and survival influences of growth factors in human neuroblastoma. *Eur J Cancer*. 1995; 31(4): 453-458.

Palm K, *et al*. Neuron-specific splicing of zinc finger transcription factor REST/NRSF/XBR is frequent in neuroblastomas and conserved in human, mouse and rat. *Elsevier*. 1999; 72(1999): 30-39.

Pirkkala L, Nykanen P, Sistonen L. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *The FASEB Journal*. 2011; 15: 1118-1129.

Ravache M, *et al*. Transcriptional activation of REST by Sp1 in Huntington´s disease models. *Plos One*. 2010; 5(12): 1-12.

Rigamonti D., Mutti C., Zuccati C, Cattaneo E. and Contini A. (2009) Turning REST/NRSF dysfunction in Huntington´s disease into a pharmaceutical target. *Curr Pharm Des*. 15(334):3958-67.

Rosbach M. Non-coding RNAs in neural networks, REST-assured. 2011; 2(8): 1-5.



Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Sathasivam K, *et al.* Aberrant splicing of HTT generates the pathogenic exon 1 protein in Huntington disease. PNAS. 2013; 110(6): 2366-2370.

Savory JG, Edey C, Hess B. *et al.* Identification of novel retinoic acid target genes. Dev Biol. 2014. 395;(2): 199-208.

Schalatter H, *et al.* A novel function for the 90 Kda heat-shock protein (Hsp90): facilitating nuclear export of 60 S ribosomal subunits. Biochem. J. 2002; 15(362): 675-684.

Schoenherr CJ, Anderson J.\*\* Silencing is golden negative regulation in the control of neuronal gene transcription. Curr Opin Neurobiol. 1995\*\*; 5 (5): 566-571.

Schoenherr CJ, Paquette AJ, Anderson DJ. Identification of potential target genes for the neuron-restrictive silencer factor. Proc. Natl. Acad. Csi. 1996; 93: 9881-9886.

Schor NF. Neuroblastoma as a neurobiological disease. J Neurooncol. 1999; 41(2): 159-166.

Shimojo M. Huntingtin regulates RE1- silencing transcription factor/neuron-restrictive silencer factor (REST/NRSF) nuclear trafficking indirectly through a complex with REST/NRSF-interacting LIM domain protein (RILP) and dynactin p150<sup>Glued</sup>. Journal of Biological Chemistry. 2008; 283(50); 34880-34886.

Shimojo M, *et al.* Role of zinc finger domains of the transcription factor neuronrestrictive silencer factor/repressor element-1 silencing. The journal of biological chemistry. 2011; 276 (16):13121-13126

Sittler A, Lurz R, Lueder G, *et al.* Geldanamycin activates a heat shock response and inhibits huntingtin aggregation in a cell culture model of Huntington's disease. 2001; 10(12): 1307-15.

Taipale M, Jorosz DF, Lindquist S. Hsp90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2010; 11 (7): 515-528.

Telese F, Gamliel A, Skowronska-Krawczyk D. et al. "Seq-ing" insights into the epigenetics of neuronal gene regulation. *Cell press.* 2013; 77: 606-623.

Tsutsumi S and Neckers L. Extracellular heat shock protein 90: A role for a molecular chaperone in cell motility and cancer metastasis. *Cancer Sci.* 2007; 98(10): 1536-1539.

Vonsatte JP, et al. Neuropathological classification of Huntington's disease. *J. Neuropathol. EXP. Neurol.* 1985; 44; 559-577.

Voss, A. K., Thomas, T. and Gruss, P. (2000). Mice lacking HSP90beta fail to develop a placental labyrinth. *Development.* **127**(1),1-11.

Wang R, et al. Sp1 regulates human huntingtin gene expression. *J. Mol. Neurosci.* 2012; 47; 311-321.

Warby SC, Visscher H, Collins JA, et al. HTT haplotypes contribute to differences in Huntington disease prevalence between Europe and East Asia. *European Journal of Human Genetics* (2011) 19, 561–566.

Westbrook TF, et al. SCF  $\beta$ -TrCP controls oncogenic transformation and neural differentiation through REST degradation. *Nature.* 2008; 452(7185): 370-374.

Zhang X, Clark AF, Yorio T. Heat shock protein 90 is an essential molecular chaperone for nuclear transport of glucocorticoid receptor  $\beta$ . *IOVS.* 2006; 47(2): 700-708.

Zheng Z and Diamond MI. Huntington Disease and The Huntingtin Protein. *Prog Mol Biol and Transl Sci.* 2012; 107:189-214.

Zou, M., Bhatia, A., Dong, H., Jayaprakash, P., Guo, J., Shau, D., Hou, Y., Tsen, F., Tong, C., O'Brien, K., Situ, AJ., Schmidt, T., Chen, M., Ying, Q., Ulmer, TS., Woodley, DT. And Li, W. Evolutionarily conserved dual lysine motif determines the

non-chaperone function of secreted Hsp90alpha in tumour progression. *Oncogene*. 2017; 36, 2160-2171.

Zuccato C, Ciammola A, Rigamonti D, *et al.* Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science*. 2001; 293(5529): 493-498.

Zuccato C, Tartari M, Crotti A, *et al.* Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes. *Natural Genetic*. 2003; 35(1): 76-83.

Zuccato C, Valenza M and Cattaneo E. Molecular Mechanisms and Potential Therapeutic Targets in Huntington's Disease. *Physiol Rev*. 2010; 90:905-981.

## APENDICE DE REACTIVOS

### PBS 1X

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24 g

Ajustar a PH 7.4, aforar a 1 L y esterilizar.

### Medio Luria

Bacto Triptona	10 g
Bacto Extracto d Levadura	5 g
NaCl	10 g
H <sub>2</sub> O bidestilada estéril	1 L

### STET 1X

NaCl	0.1 M
Tris-HCl pH 8.0	10 mM
EDTA pH 8.0	1 mM
Triton X-100	5 %

### **TAE 50X**

Trizma Base	242 g
Acido acético glacial	57.1 ml
EDTA 0.5 M pH 8.0	200 ml

Aforar a 1 L con H<sub>2</sub>O bidestilada y esterilizar.

### **Solución tampón de electroforesis de proteínas 10X**

Tris base	15.1 g
Glicina	72.1 g
SDS	5 ml

Aforar a 500 ml y ajustar a pH 8.6

### **Solución tampón de transferencia de proteína**

Tris.base (48 mM)	5.8 g
Glicina (39 mM)	2.9 g
SDS	0.37 g
Metanol	200 ml

Ajustar pH a 8.3 y aforar a 1 L

### **Solución para desteñir geles**

Isopropanol al 10 %

Acido acético al 10%

### **TBST**

Tris-HCl      pH 8.0      10 mM

NaCl                      150 mM

Tween 20                      0.05 %

### **Buffer de carga para proteínas al 2X**

Tris-HCl pH 6.8      0.05M

Glicerol al 10 %

SDS al 2.5 %

2-mercapto etanol al 5 %

Azul de bromofenol al 0.00 2%

### **Solución de tinción de geles con azul coomassie**

Isopropanol al 25 %

Ácido acético al 10 %

Azul coomassie R250 al 0.2 %