



Cinvestav

**Centro de Investigación y de Estudios
Avanzados del Instituto Politécnico
Nacional**

Departamento de Biología Celular

**“Efecto de la expresión exógena de la proteína
Tau truncada sobre el transcriptoma de células
de neuroblastoma cultivadas in vitro”**

Tesis que presenta:

Luis German Muñoz Giles

Para obtener grado de:

Maestro en Ciencias

En la especialidad de:

Biología Celular

Directores de tesis:

Dr. Francisco García Sierra

Dr. Jonathan Javier Magaña Aguirre

Asesores:

Dr. Guillermo Elizondo Azuela

Dr. Juan Pedro Luna Arias

Ciudad de México

1 de Julio del 2021

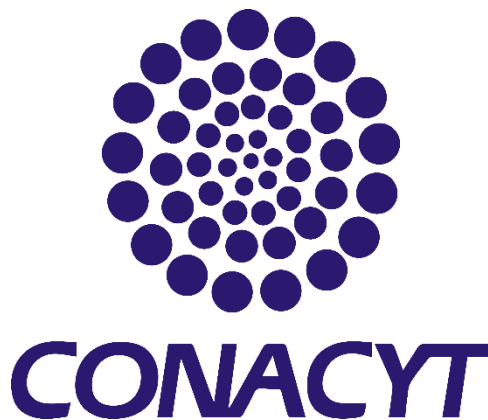
Dedicatoria:

Este trabajo no pudo ser posible sin el apoyo incondicional de mis padres, gracias por estar ahí en cada momento.

Agradecimientos Institucionales:

Este trabajo se realizó en el Laboratorio (Laboratorio 25) del Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), bajo la tutoría del Dr. Francisco García Sierra y Co-tutoría del Dr. Jonathan Javier Magaña Aguirre. Para el desarrollo de este proyecto el sustentante contó con una beca de Maestría (CVU: 943299) que otorga el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) bajo la convocatoria de Becas Nacionales a estudiantes inscritos en Programas de Posgrado de Calidad (PNPC) de Agosto 2019-Julio 2021.

Agradezco al INR por el espacio proporcionado durante el periodo Enero 2020-Julio2021



1 CONTENIDO

1.	Abstract.....	5
2.	Resumen	7
3.	Introducción.....	9
1.1	La enfermedad de Alzheimer.....	9
1.2	Estructura de la proteína Tau	13
1.3	Hiperfosforilación de la proteína Tau	14
1.4	Sistema ubiquitina-proteosoma y la degradación de Tau.....	16
1.5	Caspasas y truncaciones de la proteína Tau.....	23
1.6	La proteína Tau y su localización nuclear	38
2	Justificación.....	41
3	Objetivos	42
3.1	Objetivo General	42
3.2	Objetivos particulares	43
4	Diseño Experimental.....	44
5	METODOLOGÍA.....	45
5.1	Modelo de transfección estable en la línea de Neuroblastoma SH-SY5Y	45
5.1.1	Cultivo Celular.....	45
5.1.2	Plásmidos y transfección	45
5.1.3	Extracción de RNA y Análisis de transcriptoma	58
5.1.4	Validación de la técnica de microarreglos.....	60
5.1.5	Análisis de vías ontológicas	61
5.1.6	Evaluación de Genes de interés mediante qRT-PCR.....	61
5.2	Construcciones de Tau con variable número de dominios repetidos	62
6	Referencias:	65

1. ABSTRACT

Alzheimer's disease is the most common type of dementia in the human elderly. The loss of functional properties and abnormal aggregation of Tau into the cytoplasmic space of neurons of the cerebral cortex are two key factors associated with cell death and the onset of this neurodegenerative disorder. Tau undergoes some abnormal posttranslational modifications such as hyperphosphorylation and proteolytic cleavage that affect its functional activities, subcellular localization, induce its aggregation and cause toxicity. Recently, a novel caspase-2 dependent cleavage of Tau at aspartic acid 314 (D314) has been described, producing two fragments which are referred to as Tau 1-314 and Tau 315-441. Interestingly, in neuroblastoma cells the exogenous expression and distribution of Tau 315-441 was observed not only in the cytoplasm, but also invading the nuclear compartment, which may produce pathologic effects on the cell functioning. The aim of this study is to analyze the pathologic consequences of the expression of caspase-2-produced Tau-fragments on gene-transcription of undifferentiated neuroblastoma cells (SH-SY5Y) by analyzing their transcriptome, as well as the morphological alterations that may be produced in these cells. To reach this aim, for the transcriptome analysis of Tau-expressing cells we will use a microarray platform from Affimetrix. By using this approach we will be able to analyze metabolic pathways that may be affected under the expression of distinct truncated-Tau variants. From the Tau 315-441 fragment, we will also prepare several recombinants carrying a reconstructed N-terminus that under their expression in the same cell context we will determine which inserted-N-terminus domains will avoid the transport of Tau to the nucleus. Morphological

analysis of Tau-expressing cells will be conducted by immunofluorescence and confocal microscopy

Key words: Alzheimer, Tau protein, Caspase-2, Tau truncation, transcriptome

2. RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más común de demencia en el humano de edad avanzada. La pérdida funcional y agregación anormal de la proteína Tau dentro del espacio citoplásmico de las neuronas de la corteza cerebral, son factores que se han asociado estrechamente con la muerte neuronal y el establecimiento de este proceso neurodegenerativo. Tau sufre de ciertas modificaciones postraduccionales anormales como hiperfosforilación y cortes proteolíticos que conllevan a su alteración funcional, cambios en su localización subcelular, agregación y toxicidad. Recientemente se ha identificado un nuevo corte proteolítico por caspasa-2 en el ácido aspártico 314 (D314) de la molécula de Tau, que produce los fragmentos Tau 1-314 y Tau 315-441. De manera interesante, en células de neuroblastoma se encontró que la expresión del fragmento Tau 315-441 se distribuyó en el citoplasma, pero también invadió el compartimento nuclear, con lo cual suponemos que esta acción podría tener un significado patológico a nivel celular. El propósito de este estudio es analizar los efectos que la expresión de estos fragmentos de Tau podría tener sobre la transcripción de genes, evaluando el transcriptoma de células de neuroblastoma humano no diferenciadas (SH-SY5Y), así como los cambios morfológicos que puedan ocurrir en dichas células. Para cumplir nuestro objetivo, el análisis del transcriptoma de células expresando a las variantes de Tau se realizará con una plataforma de microarreglos de affymetrix. Con este abordaje se podrá analizar qué rutas biológicas podrían estar siendo afectadas bajo la acción de estas especies truncadas. También se realizarán diversas recombinantes para reconstruir el amino terminal de Tau 315-441, y bajo su expresión en las mismas células se evaluará qué segmentos insertados impedirían su ingreso al compartimento nuclear.

La caracterización morfológica de las células bajo la expresión de los distintos fragmentos de Tau se realizará por inmunofluorescencia y microscopía confocal.

3. INTRODUCCIÓN

1.1 LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más común de demencia, un término asociado a la pérdida de memoria y habilidades cognitivas, con un 60-80% de los casos a nivel mundial presentando esta enfermedad. Actualmente, más de 50 millones de personas viven con demencia y este número se duplica cada 20 años (Alzheimer's Disease International) (Figura 1).

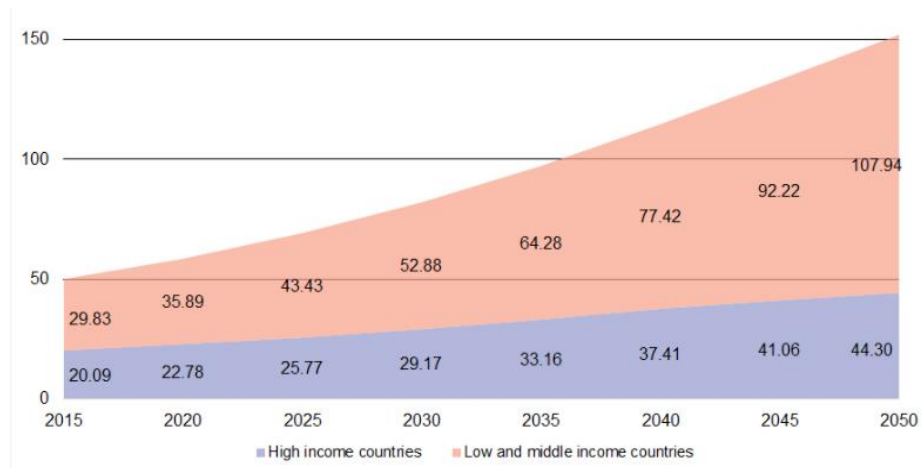


Figura 1. Personas con demencia. Proyección del número de personas (millones) que desarrollarán demencia comparando el nivel de ingresos económicos (Alzheimer's disease international).

A nivel anatómico, la demencia de tipo EA se debe a la muerte selectiva de ciertas poblaciones neuronales del hipocampo, corteza entorrinal, amígdala y la corteza cerebral (Arriagada et al., 1992) (Figura 2).

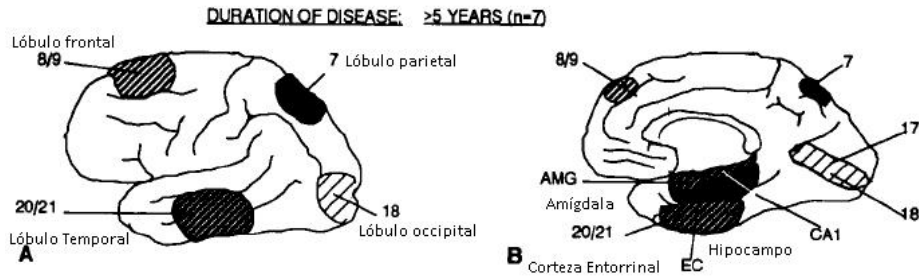


Figura 2. Acumulación de Marañas Neurofibrilares. Representación esquemática de la distribución y densidad de las marañas neurofibrilares en pacientes con más de 5 años de evolución de la EA (Arriagada et al., 1992).

En las neuronas afectadas en la EA se presenta una autoagregación anormal de la proteína Tau, formando polímeros intracelulares anormales denominados filamentos helicoidales apareados (FHAs). La ultraestructura detallada y precisa de estos filamentos es todavía motivo de análisis; sin embargo, se sabe que la autoagregación de Tau comienza por la unión anormal de sus dominios repetidos del extremo carboxilo terminal, lo cual es mediado específicamente por la presencia de ciertas secuencias de hexapéptidos (Figura 3).

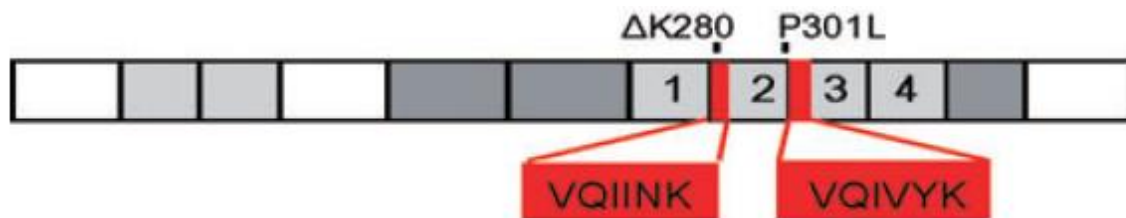


Figura 3. Esquema de la molécula de Tau. Los dominios repetidos de la molécula de Tau se indican con números, y en rojo se resalta la presencia de los motivos de hexapéptidos que son críticos para la asociación y autoagregación de Tau en forma de FHAs (Mandelkow, 2007).

La asociación hidrofóbica de los mencionados motivos favorece la aparición de una estructura de lámina β -antiparalela, la cual forma la parte central de los FHAs. Durante esta agregación, los extremos amino y carboxilo terminal quedan flanqueando al exterior del núcleo del FHA y estos extremos son la parte más expuesta de la molécula a sufrir un procesamiento postraduccional variable durante la evolución de la EA (Mandelkow, 2007) (Figura 4).

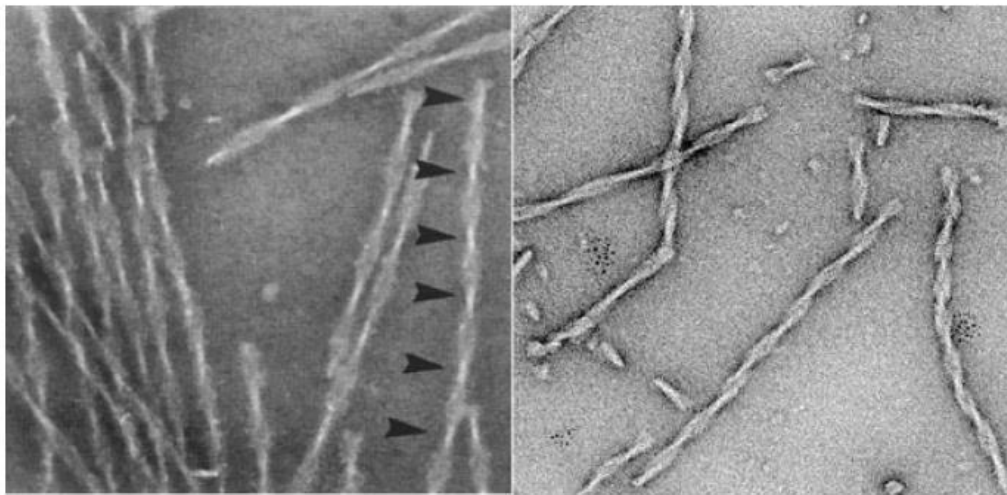


Figura 4. Filamentos Helicoidales Apareados (FHAs). Micrografías electrónicas de FHAs nativos aislados del cerebro de un paciente que falleció por la EA (izquierda), y filamentos ensamblados in vitro (derecha) utilizando la molécula de Tau recombinante que se obtiene por expresión y purificación en células procariontas (Mandelkow, 2007).

Cuando los FHAs se acumulan en gran cantidad en el citoplasma, se forman agregados masivos de estos, formando las marañas neurofibrilares (MNFs). Éstas son lesiones cerebrales fibrilares características de la EA y se reconocen bajo el microscopio como estructuras con forma de flama por medio de técnicas histológicas y de inmunomarcaje (Figura. 4). Con base en estas estructuras en el cerebro, se encontró que la severidad clínica de la demencia de tipo EA correlaciona positivamente con el

número de MNFs, apareciendo organizadamente en la corteza entorrinal, hipocampo y amígdala en las etapas tempranas, pero colonizando la neocorteza cerebral en etapas más avanzadas de este padecimiento (Arriagada et al.,1992) (Figura 5).

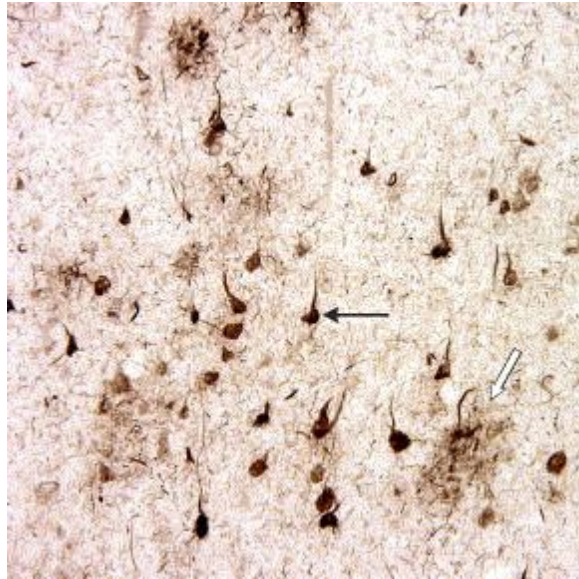


Figura 5. Marañas Neurofibrilares. La flecha negra señala a una MNF con su típica forma de flama, revelada por la técnica de inmunohistoquímica bajo microscopía de campo claro (Binder, 2005).

Con base en el número de MNFs en el parénquima cerebral, se estableció la evolución neuropatológica de la EA como un criterio de diagnóstico *postmortem* confirmatorio de haber padecido en vida de la EA. Dependiendo de su localización y número en las subregiones anteriormente mencionadas, la progresión neuropatológica de la enfermedad se correlacionó con los síntomas clínicos del paciente antes de su muerte. Este diagnóstico neuropatológico se conoce como “Estadios de Braak”, dividiéndose en 6 etapas: I y II de una EA incipiente, son etapas parecidas al envejecimiento normal con un número limitado de las MNF en la corteza entorrinal. III y IV, las MNF aparecen en el hipocampo y esto se correlaciona con la aparición de síntomas clínicos iniciales e

intermedios de la EA. V y VI, las MNF alcanzan la neocorteza cerebral y se presenta una demencia severa (Braak & Braak, 1991). Lamentablemente, esta evaluación es el único estudio confiable para determinar el estadio de la EA; no obstante, en los últimos años se han propuesto otros métodos no invasivos para determinar la severidad de la enfermedad a través de imagenología más resolutive, la cual ayudará a precisar mejor los diagnósticos en vida y proponer un mejor tratamiento a los pacientes dependiendo del estadio de desarrollo en el que se encuentren.

1.2 ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA TAU

La proteína Tau, que pertenece a la familia de las MAPs (proteínas asociadas a microtúbulos), es codificada en el humano por un gen de 16 exones (MAPT) ubicado en el cromosoma 17q21. Debido al splicing alternativo de los exones 2, 3 y 10, se producen 6 isoformas maduras de la proteína en el Sistema Nervioso Central (SNC). Los exones 2 y 3 codifican dos insertos en el extremo amino-terminal, mientras que el exón 10 codifica para un dominio repetido de unión a microtúbulos (Pîrşcoveanu, 2017) (Figura 6). En condiciones normales, la proteína se localiza en los axones de las neuronas unida a los microtúbulos para proporcionar estabilidad a estas estructuras de soporte (Binder et al., 1985).

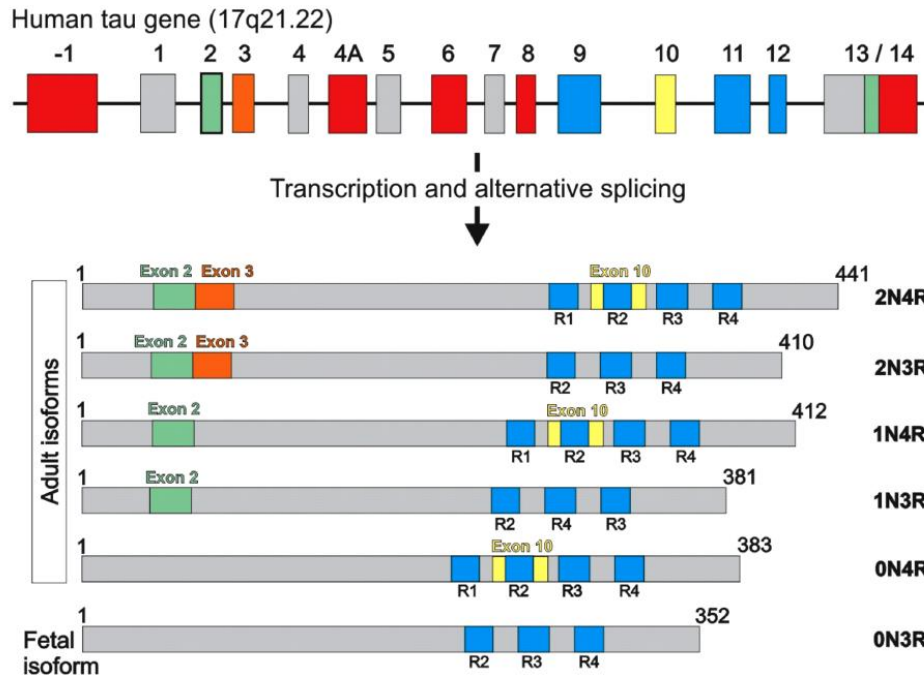


Figura 6. Gen de Tau. Las seis diferentes isoformas de Tau se presentan en el SNC adulto, mientras que, en etapa fetal, solo se presenta la isoforma más pequeña por la pérdida de los exones 2, 3 y 10 (Pîrșcoveanu, 2017).

1.3 HIPERFOSFORILACIÓN DE LA PROTEÍNA TAU

Aunque no se conoce el mecanismo por el cual Tau deja de ser una proteína funcional y termina autoensamblándose anormalmente, se ha propuesto que son diversas modificaciones postraduccionales que convierten a esta proteína en una entidad no funcional que pierde su capacidad de asociarse a los microtúbulos de los axones. A pesar de que Tau puede sufrir múltiples modificaciones postraduccionales como glicosilación, glicación, acetilación, ubiquitinación, etc., la función de la proteína se regula principalmente por su nivel de fosforilación en diversos residuos de Serina, Treonina y Tirosina a lo largo de su estructura. La fosforilación en estos residuos regula

negativamente la unión de Tau a los microtúbulos, permitiendo un mecanismo dinámico para el ensamblaje y remodelación de estos elementos subcelulares. Se ha identificado un alto número de residuos fosforilables de Tau en la EA, que cuando son procesados por diversas cinasas, no sólo se produce una pérdida en la afinidad por los microtúbulos, sino que esta proteína tiende a redistribuirse al soma neuronal y es allí donde se agrega en forma de FHAs y MNFs (Arendt et al., 2016; Hefti et al., 2019) (Figura 7).

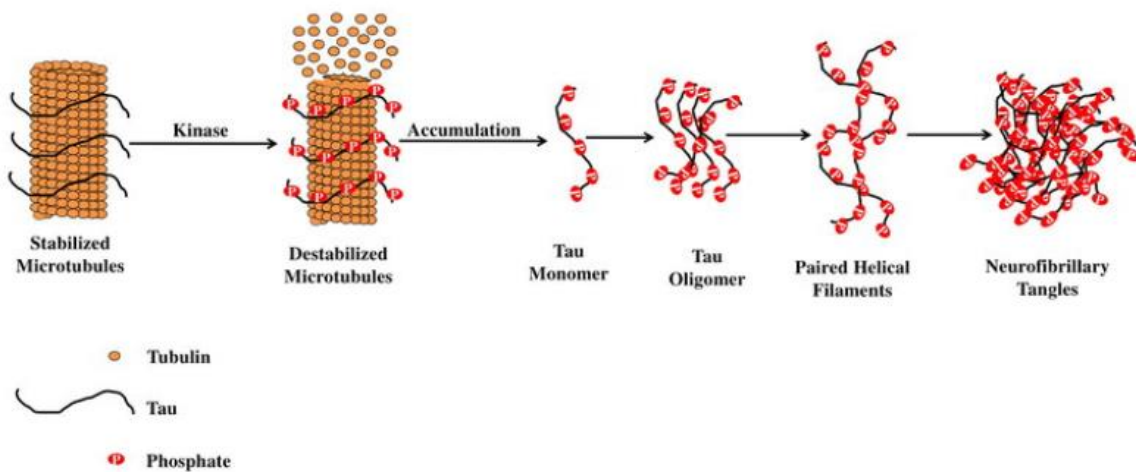


Figura 7. Hiperfosforilación de Tau. La formación de FHAs y MNFs está asociada a la Hiperfosforilación de Tau, modificación que promueve la pérdida de afinidad por los microtúbulos y promueve su agregación anormal en el soma neuronal (Obtenido de Neural Regeneration Research).

Alternativamente, se ha propuesto que al dejar de funcionar normalmente, la proteína Tau también puede estar sujeta a otras modificaciones postraduccionales que la procesan anormalmente y complementan su alteración estructural y funcional. Al hiperfosforilarse, la proteína Tau puede sufrir de cambios conformacionales en su estructura (García-Sierra et al., 2003) que la hacen más susceptible para ser procesada

proteolíticamente por distintos sistemas de eliminación de moléculas mal plegadas y anormalmente funcionales en el citoplasma. Se sabe que Tau puede ser ubiquitinada y aunque no se conoce el mecanismo completamente, se piensa que es procesada por el sistema Ubiquitina-proteosoma (UPS) (Tang et al., 2019) y también por degradación del sistema Autofagia-lisosoma (ALP) (Lee et al., 2013).

1.4 SISTEMA UBIQUITINA-PROTEOSOMA Y LA DEGRADACIÓN DE TAU

La degradación de las proteínas celulares, incluida la proteína Tau, puede ocurrir en diferentes compartimentos celulares desde el citoplasma, membrana, lisosomas, retículo endoplasmático, etc. Sin embargo, la mayoría de la degradación se lleva a cabo en el citoplasma, específicamente en el sistema UPS (Zhang et al., 2017). El UPS requiere de la participación de la subunidad proteosomal 26S dependiente de ATP y del marcaje por ubiquitinación de las proteínas blanco para ser degradadas. La ubiquitina es una proteína conservada de 76 aminoácidos que se une covalentemente a la proteína diana. Esta unión requiere de la activación de la ubiquitina por las enzimas E1, dependientes de ATP, el acarreamiento por las proteínas E2, y finalmente la unión ubiquitina-proteína por las proteínas E3. En esta interacción, se forma un enlace peptídico entre la glicina carboxilo-terminal de la ubiquitina y una lisina de la proteína a degradar. De la misma forma, un enlace peptídico se puede generar entre diferentes moléculas de ubiquitina, formando cadenas laterales de poliubiquitina (Figura 8).

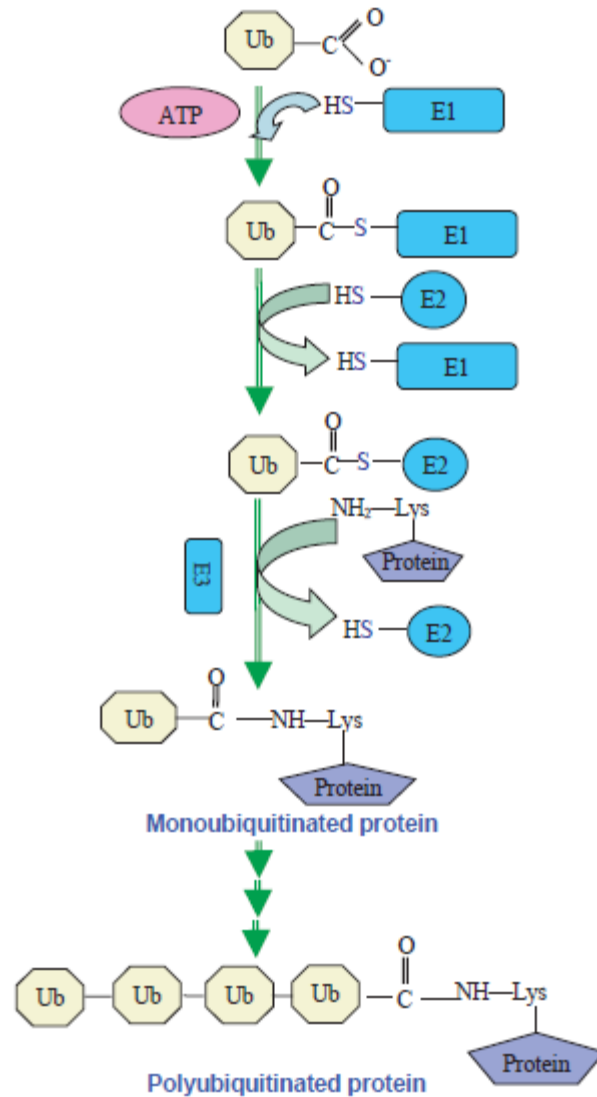


Figura 8. La ruta de ubiquitinación. La ubiquitina es activada por la enzima E1, transferida a la enzima E2 y finalmente transferida a la proteína blanco mediante una enzima específica E3. Mediante este proceso se puede generar una poliubiquitinación, que es la marca-síntal de degradación terminal que ocurre en el proteosoma (Nandi et al., 2006).

Dependiendo del residuo de lisina donde ocurre la ramificación de poliubiquitinación, se determina el tipo de procesamiento proteosomal o si se dirige a otro tipo de degradación. La poliubiquitinación ramificando a partir de Lys-48 y Lys-29, es reconocida para su degradación por el proteosoma; mientras que otras cadenas de ubiquitina unidas

en diferentes lisinas, son marcadores de reparación celular, activación de factores de transcripción, etc. (Nandi et al., 2006). A pesar de que el marcaje de ubiquitina es importante para el reconocimiento del UPS, el proteosoma 20S no puede degradar proteínas ubiquitinizadas. Por ello se requiere de la unión a un complejo proteico 19S llamado PA700. Este complejo contiene subunidades con diferentes actividades como ATPasa, unión a ubiquitina, desubiquitinación, chaperonas reversas, etc. La unión del proteosoma 20S y de PA700 forman la versión madura del proteosoma 26S, el cual se encarga de la degradación de las proteínas en el UPS (Nandi et al., 2006).

La degradación de la proteína Tau en condiciones normales se lleva a cabo en el UPS. Si hay cambios conformacionales cambia el sistema de degradación. Si la proteína se encuentra soluble y en exceso, es degradada por el UPS. Este es el sistema más eficiente de eliminación cuando la proteína Tau se encuentra en forma monomérica. Sin embargo, cuando la proteína Tau se agrega, esta no puede ser procesada terminalmente por el sistema UPS y se activa la macroautofagia como mecanismo alternativo que intenta llevar a cabo la degradación proteica (Jan Lee et al., 2013).

Se ha propuesto que la desregulación y pérdida de eficiencia del sistema UPS es un factor importante en el establecimiento y desarrollo de algunas de las enfermedades neurodegenerativas como la EA. Cuando Tau debe ser eliminada del citoplasma de manera normal, su degradación se lleva a cabo a través de la formación de cadenas de poliubiquitina en los residuos Lys-254, Lys-257, Lys-311 y Lys-317, que conlleva a la localización de la proteína Tau en el proteosoma 26S. Sin embargo, en la EA hay una alteración en la activación y ligación de la ubiquitina (afectación de E1 y E2), disfuncionalidad de las deubiquitininas por oxidación y acumulación de ubiquitina

mutada que producen a una alteración y afectación de las subunidades del proteosoma (Zhang et al., 2017).

Debido a la desregulación de los mecanismos de degradación proteica en el cerebro de pacientes afectados con la EA, existe controversia si Tau no es completamente reciclada y procesada en la neurona, teniendo como consecuencia que una proteólisis parcial de la misma favorezca su agregación y toxicidad dentro de la neurona. Nuestro grupo de investigación al analizar el tejido cerebral de pacientes que padecieron de la EA, encontró que en el 30% de las MNFs la proteína Tau se encuentra ubiquitinada (García-Sierra et al., 2012). Al analizar a Tau bajo esta modificación, se observó que diversas especies de esta molécula se asociaban con un nivel elevado de ubiquitinación: la proteína completa, la proteína fosforilada en diversos residuos y la variante truncada en D421 (Tau-421), que aparece en etapas iniciales e intermedias en este padecimiento. La especie truncada en E391 de aparición avanzada en la EA, no parece ser blanco de ubiquitinación. Con estos datos se concluyó que la proteína Tau es blanco de ubiquitinación en las etapas tempranas e intermedias de la enfermedad, y que esta modificación ocurriendo en las formas agregadas de la proteína, es el resultado de una ineficiente degradación de esta molécula por el sistema UPS (García-Sierra et al., 2012) (Figura 9).

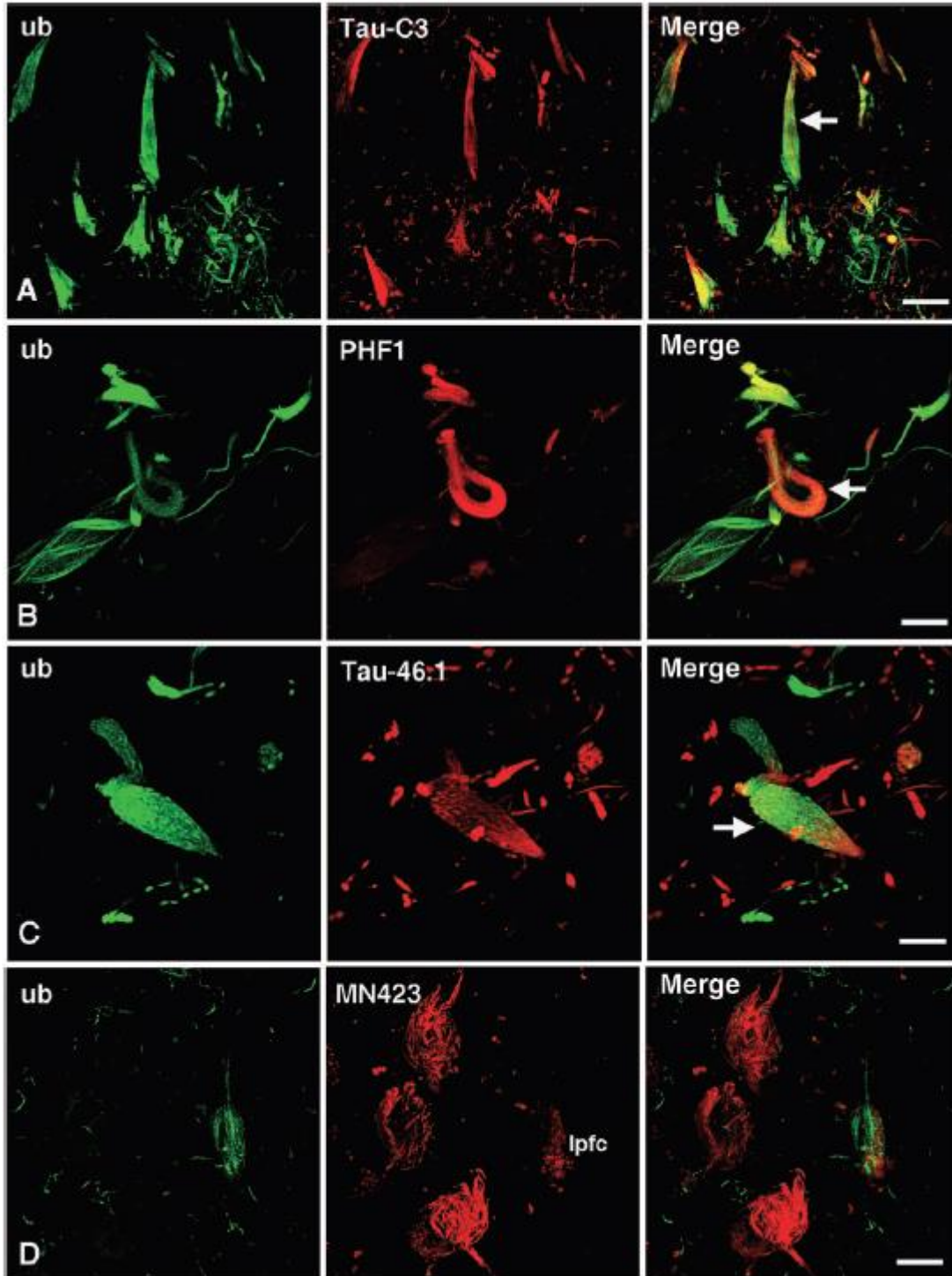


Figura 9. Colocalización de ubiquitina con la proteína Tau. Marcaje doble de inmunofluorescencia y microscopía confocal, para observar los patrones de colocalización de ubiquitina y Tau en las marañas neurofibrilares. A-C) Se observa colocalización (marcada por las flechas) entre ubiquitina y Tau. Los anticuerpos usados para Tau, corresponden a Tau truncada en D421, Tau

fosforilada en Ser-396, -404 y Tau con el extremo carboxilo terminal intacto. Estos anticuerpos son: Tau-C3, PHF1 y Tau 46.1, respectivamente. D) No se observa colocalización entre la especie truncada de Tau en E391 (reconocida por el anticuerpo MN423) y ubiquitina (García-Sierra et al., 2012).

Bajo el mismo tipo de análisis, nuestro grupo encontró una asociación entre un alto nivel de ubiquitinación de Tau con respecto a la facultad de esta proteína a desarrollar cambios conformacionales, que se han descrito en las etapas tempranas de la EA. Cuando la molécula de Tau madura y desarrolla cambios conformacionales tardíos, involucrando el plegamiento extremo del amino terminal sobre la zona de dominios repetidos, el nivel de ubiquitinación es muy limitado. Esto se puede deber a que la región rica en prolinas de la proteína (aminoácidos 155-244) se une a su tercer dominio repetido de unión a microtúbulos, evitando así el acceso de las enzimas ligadas a la ubiquitinación de Tau (Ibarra-Bracamontes et al., 2020) (Figura 10).

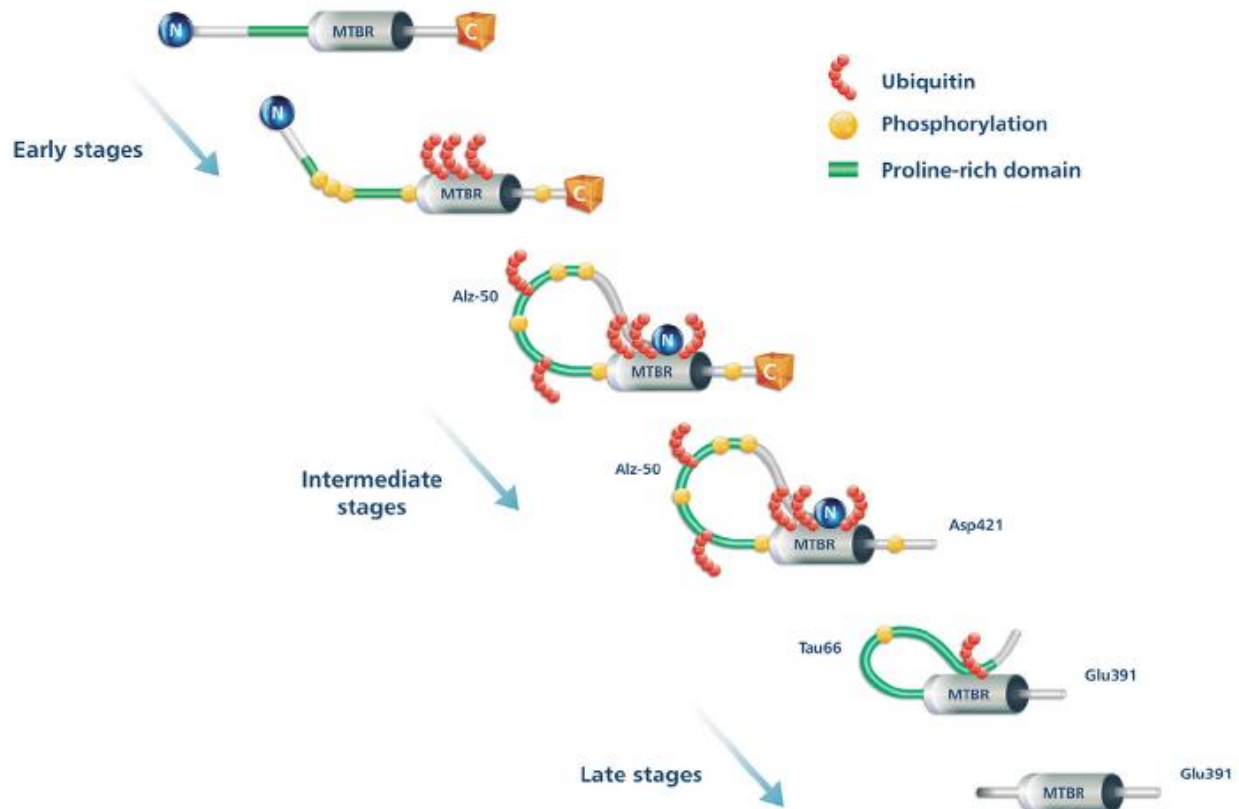


Figura 10. Modificaciones postraduccionales de la proteína Tau durante la evolución de la EA. En las etapas tempranas de la EA, la proteína Tau se encuentra hiperfosforilada y ubiquitinada. Sin embargo, como progresa la EA, la proteína sufre de cambios conformacionales y/o truncaciones que conllevan a la pérdida u ocultamiento de los sitios de fosforilación y ubiquitinación. (Ibarra-Bracamontes et al., 2020).

Además del UPS, existen otros mecanismos de degradación de la proteína Tau. La degradación por macroautofagia que, a pesar de no ser la forma canónica de degradación de los monómeros de Tau, se ha visto que puede degradar hasta cierto punto los agregados de Tau (Zhang et al., 2017). En la EA se ha observado una acumulación de autofagosomas y de autolisomas, lo cual se ha asociado a una desregulación del proceso de autofagia, puesto que se ha encontrado un impedimento de la degradación en estas vesículas (Jan Lee et al., 2013).

No solo los sistemas de degradación proteínicas, mencionados anteriormente, son los responsables de proteolizar a la proteína Tau en la EA. Se ha encontrado que diversas enzimas con actividad proteolítica pueden cortar a la proteína Tau en las diferentes etapas de la EA, entre las que se encuentran catepsinas, calpaínas y caspasas. Nuestro grupo de investigación se ha enfocado en estudiar el papel neuropatológico de diversas especies truncadas de Tau y sus posibles mecanismos de citotoxicidad. Coincidentemente, diversos grupos evidenciaron que en el tejido cerebral proveniente de pacientes con la EA se presentaron diversos marcadores de muerte celular programada (apoptosis) describiendo neuronas con núcleos apoptóticos y elevación en la expresión de diversas caspasas (Raina et al., 2001).

1.5 CASPASAS Y TRUNCACIONES DE LA PROTEÍNA TAU

Las caspasas juegan un papel importante como moléculas reguladoras de la inducción, transducción y amplificación de las señales apoptóticas dentro de la célula durante el desarrollo y control de algunos procesos fisiológicos como la inflamación (Fan et al., 2005). Son una familia de catorce enzimas de tipo cisteín proteasas que cortan específicamente en residuos de ácido aspártico. Su sitio de activación es un pentapéptido conservado y sus precursores son zimógenos nombrados procaspasas. Estas enzimas se dividen en subfamilias dependiendo de su función. Las caspasas con prodominios largos, localizados en el extremo amino terminal, se encargan de procesos inflamatorios o de ser iniciadoras de la cascada apoptótica, debido a que los dominios largos contienen motivos como “Death Effector Domain” (DED) o “Caspase Recruitment Domain” (CARD), lo que les permite interactuar con otras proteínas de señalización. Por

su parte, las caspasas con prodominios cortos, son las efectoras de la cascada apoptótica y procesamiento proteolítico de diversos sustratos. Todas las procaspasas se activan por la escisión de sus prodominios y la dimerización de sus subunidades (Orzáez et al., 2009) (Figura 11).

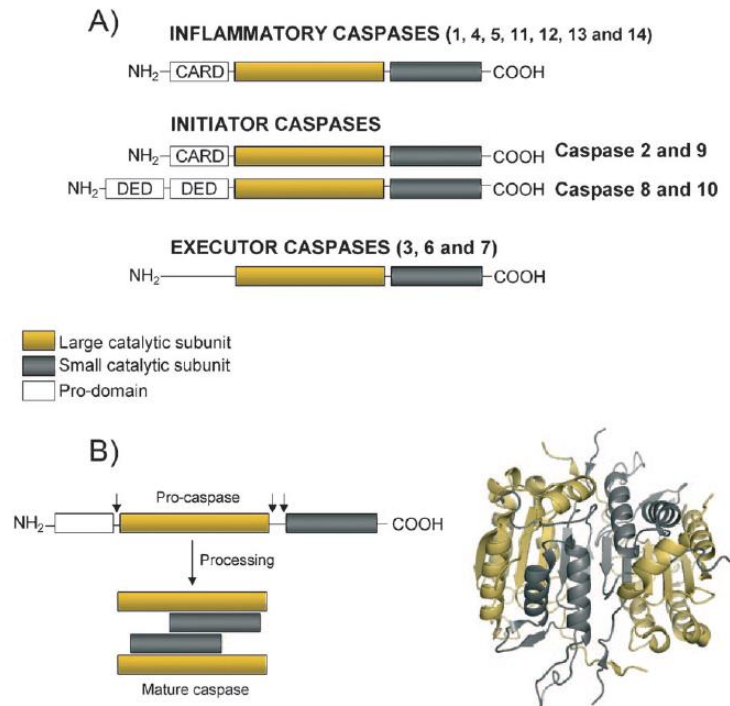


Figura 11. Estructura de las Subfamilias de caspasas. A) Estructura de las tres subfamilias de caspasas. El dominio amino terminal CARD de las caspasas inflamatorias es reconocido en la activación de los inflamosomas, conllevando al corte de la procaspasa y su activación. Las caspasas iniciadoras 2, 8 y 10 requieren de señalización por el complejo de señales que induce la muerte (DISC); mientras que la caspasa-9 se activa por una cascada de señalización de la mitocondria inducida por estrés. Las caspasas 3, 6 y 7 son factores importantes en la ejecución de la apoptosis río abajo. B) Mecanismo de escisión y activación de las caspasas. La activación de las caspasas requiere de la proteólisis de sus extremos amino y carboxilo terminal, además de la unión de sus unidades catalíticas y homodimerización (Orzáez et al., 2009).

En los cerebros de pacientes con la EA, a través de la medición de los niveles de proteína y de RNA mensajeros se ha encontrado una elevada expresión de diversas

caspasas, incluyendo las caspasas 3, 7, y 6, (LeBlanc et al., 1999; Zhang et al., 2000; Guo et al., 2004). Esto ha dado la pauta para investigar cuál es la relación entre estas enzimas proteolíticas y el desarrollo de la EA.

El grupo del Dr. Binder en Chicago, se dedicó a investigar la relación patológica entre Tau y la actividad de caspasas, encontrando que Tau es un sustrato putativo para la acción de estas enzimas, al poseer varios sitios canónicos de corte por estas enzimas, particularmente la caspasa-3 (Gamblin et al., 2003). Se encontró *in vitro* que varias caspasas podrían cortar a Tau en la posición del ácido aspártico-421 (D421), pero la enzima más eficiente en hacerlo fue la caspasa-3. Para comprobar que la caspasa-3 generaba este corte específicamente, se produjo un anticuerpo que reconoce al extremo carboxilo de Tau terminando en D421. Dicho anticuerpo monoclonal fue denominado Tau-C3, por ser esta enzima la encargada de cortar a la molécula de Tau (Gamblin et al., 2003) (Figura12) y fue utilizado para la demostración de este evento en diversos modelos de estudio.

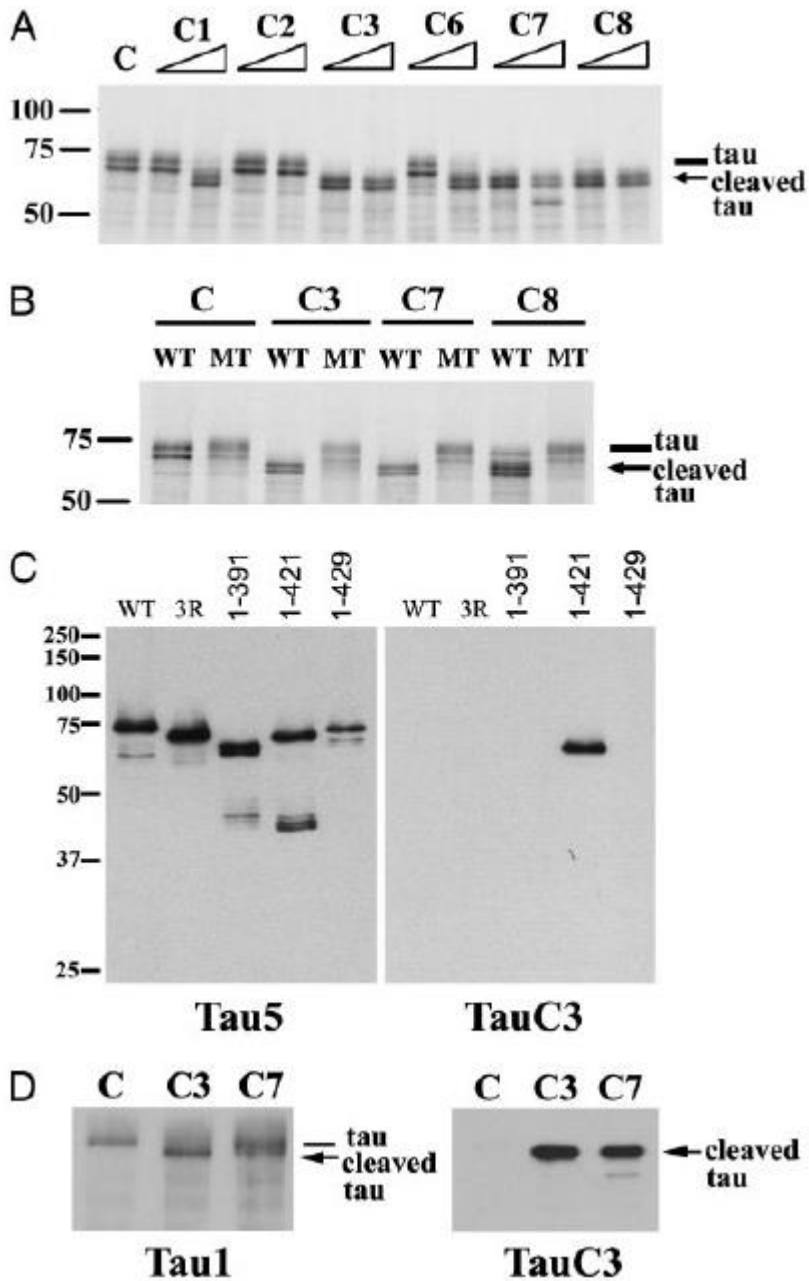


Figura 12. Corte de la proteína Tau en D421 por la caspasa-3.

A) La proteína Tau recombinante fue incubada con buffer control (Carril 1 en A) o con 2.5/25 ng de la caspasa de interés. B) Se incubó Tau nativa y Tau mutada resistente al corte en D421, con las caspasas 3,7 y 8. Se confirmó que este corte es realizado por la actividad de las caspasas. C) Se determinó que el anticuerpo monoclonal TC3 reconoce específicamente el corte en D421, mientras que el anticuerpo Tau5, que reconoce los residuos 210-230, fue positivo para las distintas recombinantes de Tau ensayadas. D) Se confirmó que TauC3 reconoce el producto de corte por caspasas 3 y 7, pero no a la especie nativa intacta. (Gamblin et al., 2003).

Nuestro grupo de investigación y el del Dr. Binder se dedicaron a buscar si efectivamente la especie truncada de Tau existía en el cerebro de sujetos con la EA y utilizando el anticuerpo monoclonal Tau-C3 se confirmó que esta molécula truncada formaba parte de las estructuras fibrilares anormales y se presentaba en gran proporción

en etapas tempranas en el desarrollo de las manifestaciones clínicas y neuropatológicas de la EA (Basurto-Islas et al., 2008; Jarero-Basulto et al., 2013). Con esta evidencia se trató de entender si la truncación de Tau en este sitio favorecía su agregación, para lo cual el grupo del Dr. Binder encontró el dato *in vitro*, al demostrar que la especie truncada de Tau en D421, que mantiene su amino intacto (Tau 1-421), tenía propiedades de agregación incrementadas por encima de la molécula completa de Tau (Tau nativa de 441 aminoácidos) (Gamblin et al., 2003, Gamblin et al., 2003) (Figura 13).

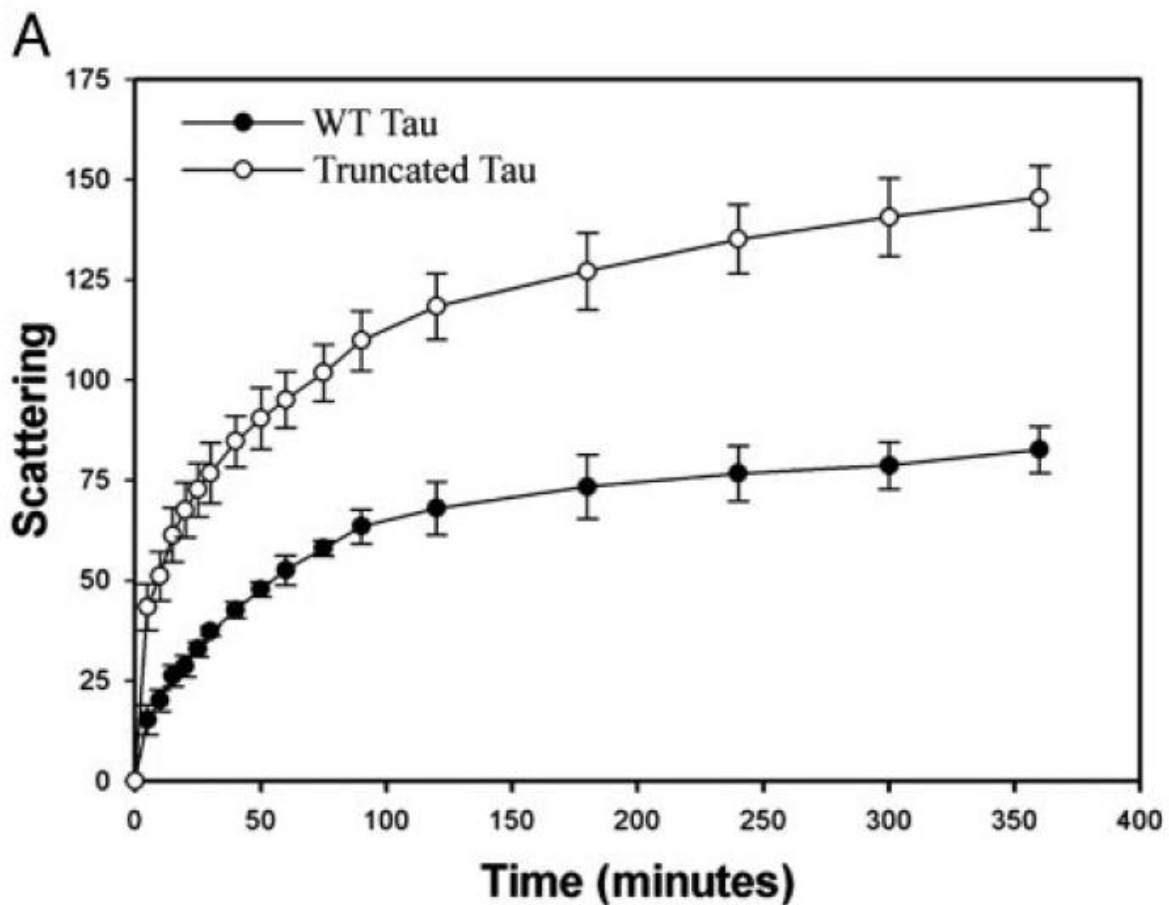


Figura 13. El corte de Tau en D421 incrementa la agregación de la proteína. A) Cinética de polimerización de Tau 1-421 *in vitro*. La polimerización de las moléculas de Tau se indujo por la presencia de ácido araquidónico (Carmel et al., 1996). Se observó una mayor polimerización del fragmento Tau 1-421, con respecto a la recombinante de Tau intacta (Gamblin et al., 2003).

Con esto, se supuso que, al presentarse dicho corte en la molécula, se incrementaría su propiedad anormal de autoagregación y formación de MNFs en el parénquima cerebral de sujetos con la EA. Nuestro grupo de investigación y otros más han encontrado en las MNFs del tejido cerebral de pacientes con la EA, la presencia del fragmento Tau D421 y se estableció la relación de aparición de este fragmento truncado, con la temporalidad de la EA. En el esquema de progresión de la agregación de Tau en la MNFs, se encontró que la molécula truncada de Tau en D421 apareció más tempranamente y en asociación con otras moléculas intactas de esta proteína en las MNFs. La otra especie truncada de Tau terminando en el E391 (corte descrito previamente, pero no definida la enzima que lo produce) apareció en las etapas tardías y en esas MNFs no se encontraron moléculas intactas de Tau (Figuras 14 y 15). Esto sugiere que los cortes en la proteína Tau siguen un orden de aparición y de distribución durante la evolución de la EA (Basurto-Islas et al., 2008).

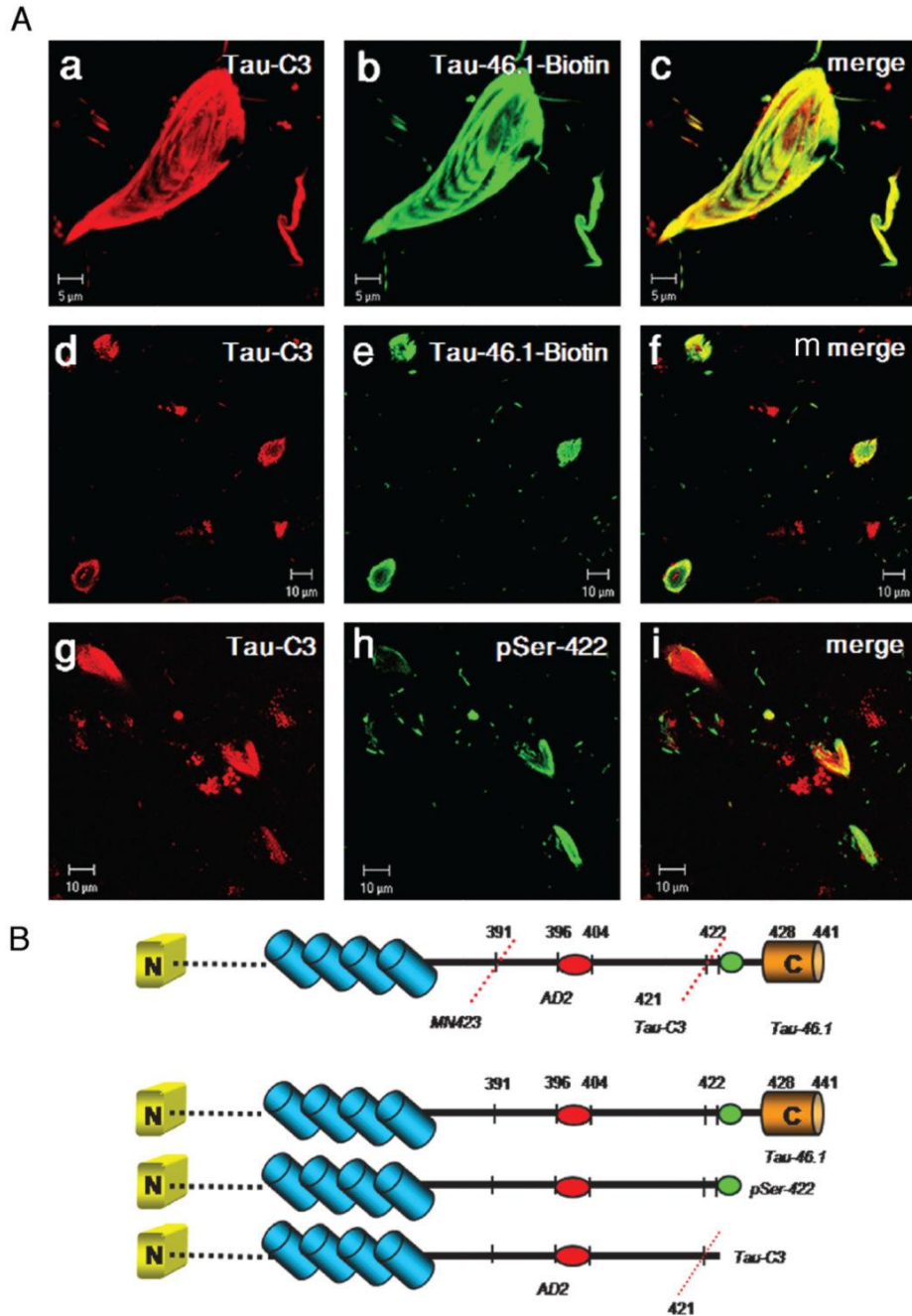


Figura 14. Marañas neurofibrilares tempranas y su asociación con Tau D421.

A) La molécula truncada de Tau en D421 colocalizó con otros epitopes de la molécula intacta de Tau –incluida la fosforilación– en las MNFs de aparición temprana (a, d, g). El anticuerpo Tau-C3 reconoce a Tau truncada en D421, el anticuerpo Tau-46.1 reconoce el extremo carboxilo intacto de la molécula de Tau. El anticuerpo anti-pSer-422 reconoce a Tau fosforilada en Ser 422. B) Diagrama de la proteína Tau con sus epítomos de reconocimiento y sus interacciones en las MNFs tempranas (Basurto-Islas et al., 2008).

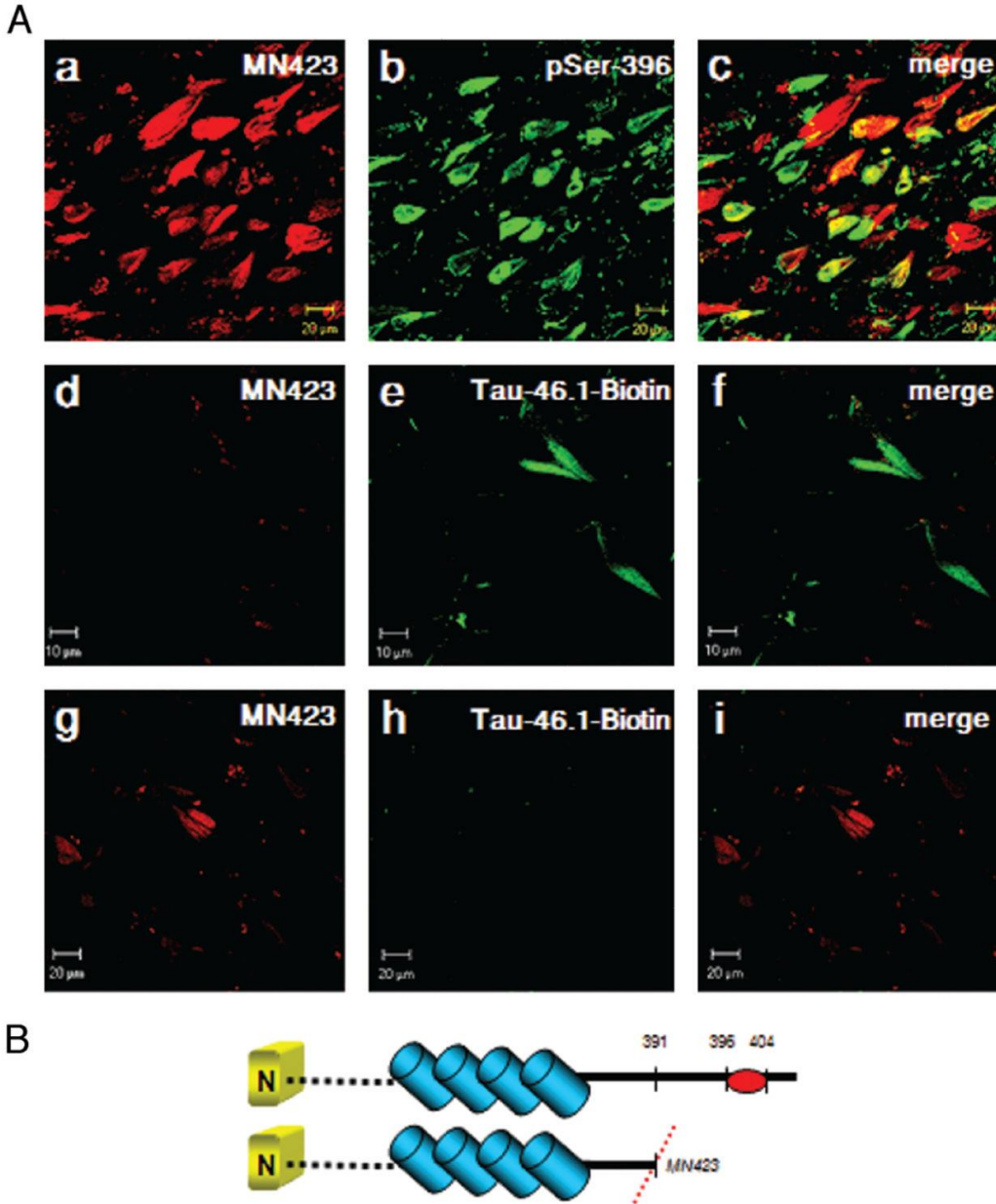


Figura 15. Marañas neurofibrilares maduras y su asociación con Tau E391.

A) En las mismas condiciones experimentales descritas en la Figura 14, se encontró que el fragmento de Tau 1-391 no colocalizó con moléculas de Tau que tuvieran su extremo carboxilo intacto (d-i), al no ser positivas al anticuerpo Tau-46.1. El anticuerpo MN423 reconoce a la especie truncada de Tau en E391, el anticuerpo pSer-422 reconoce a Tau fosforilada en Ser 422. Este último sí colocalizó en las mismas MNFs con moléculas de Tau truncadas en E391 (a-c), lo que indica una naturaleza quimérica de estas MNFs, al contener especies diferentes de Tau con diverso grado de proteólisis del carboxilo terminal. B) Diagrama de las asociaciones encontradas para la variante de Tau truncada en E391 (Basurto-Islas et al., 2008).

Tratando de contribuir en la definición del significado patológico de esta truncación, otros grupos han utilizado modelos celulares *in vitro*, donde han expresado a la proteína Tau intacta y a su variante truncada en D421 en células neuronales y no-neuronales (Fasulo et al., 2000). Los resultados han sido contradictorios y al inicio se encontró que, al expresarse esta molécula truncada en neuronas, ésta era muy tóxica y producía muerte neuronal por apoptosis. Dichos hallazgos han sido cuestionados por más grupos, incluyendo el nuestro, debido a que en diversos sistemas de células cultivadas *in vitro*, la expresión y toxicidad de Tau truncada en el D421, no exactamente lleva a una muerte inmediata; más bien, hemos encontrado que se presentan daños más sutiles, pero no menos patológicos, sobre la organización estructural y funcional del citoesqueleto y diversos compartimentos membranosos (Monroy-Ramírez., 2013; Torres-Cruz et al., 2016; Rodríguez-Cruz et al., 2018) (Figura 16), que podrían corresponder y correlacionar con las alteraciones iniciales que ocurrirían en las neuronas del parénquima cerebral de sujetos con la EA, cuando esta especie truncada aparece en forma monomérica en el soma de las neuronas afectadas.

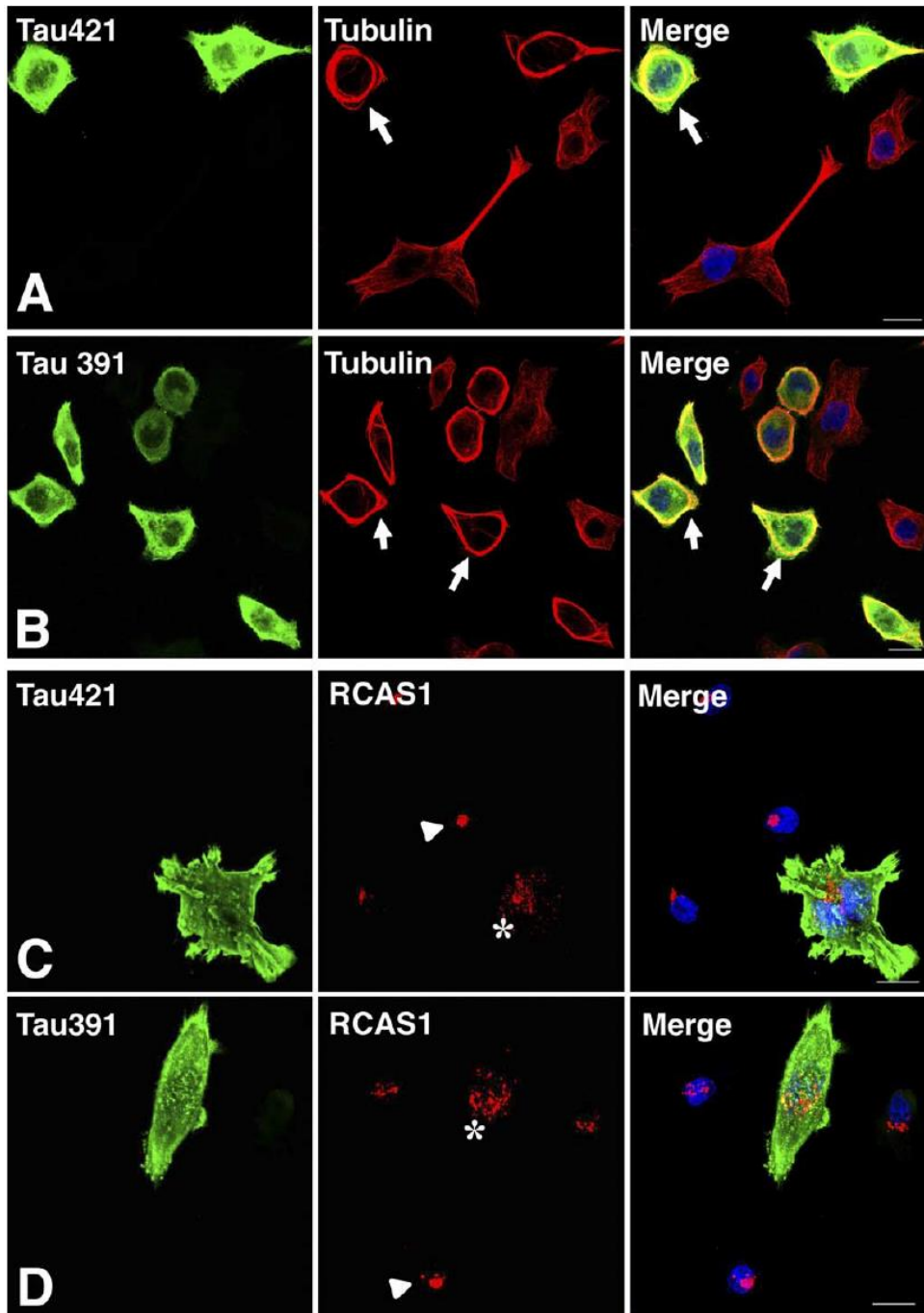


Figura 16. Tau truncada produce fragmentación del aparato de Golgi (GA). A, B) La expresión de las especies truncadas de Tau: Tau-421 y Tau-391, causa que los microtúbulos se reestructuren y formen anillos pericéntricos en el citoplasma de las células (flechas). C, D) El marcaje con RCAS1, proteína transmembranal del aparato de Golgi, muestra una fragmentación de este organelo (asterisco) (Rodríguez-Cruz et al., 2018).

Estos hallazgos resultaron interesantes en función de que la toxicidad neuronal en el cerebro de sujetos con la EA ha sido atribuida y en correlación directa con la aparición de estructuras fibrilares dentro del soma neuronal como son los FHAs y las MNFs (Braak & Braak, 1991; Arriagada et al, 1992); sin embargo, con los estudios en cultivos celulares se ha evidenciado que en su forma no agregada, pero presentando modificaciones anormales como su truncación, Tau puede ser una entidad patológica produciendo alteraciones estructurales y funcionales en las neuronas, reflejándose en la manifestación de los primeros síntomas clínicos de la EA, aun cuando no existan lesiones fibrilares en abundancia en el cerebro de sujetos afectados por la EA.

Con este abordaje experimental en mente y considerando el papel patológico que podrían tener las caspasas en la EA, el grupo de investigación del Dr. Zhao encontró una nueva truncación de la proteína Tau. En su modelo de ratón transgénico para la expresión de una especie de Tau mutada asociada a ciertas Tauopatías, encontró un fragmento de Tau con peso de 37 KDa. Al analizar este fragmento de 314 aminoácidos por espectrometría de masas, se encontró que su extremo carboxilo finalizaba en ácido aspártico (D314) (Figura 17). En virtud de esto, a partir de la molécula nativa de Tau, se investigó si el corte en este sitio (D314) podría generarse *in vitro* por la actividad de algún componente de la familia de las caspasas, encontrando que la caspasa-2, era la única responsable de realizar esta acción (Figura 18).

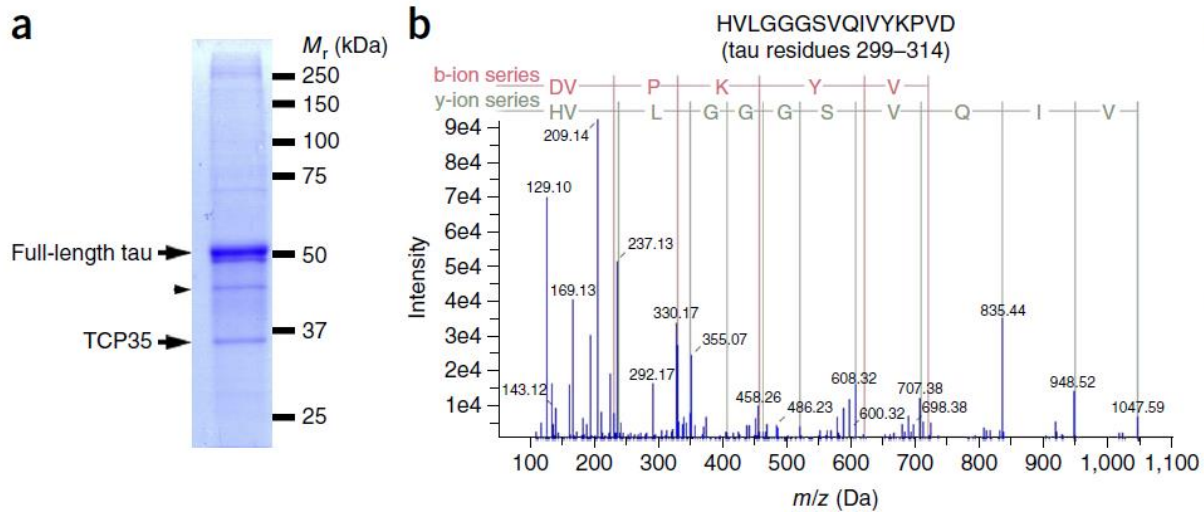


Figura 17. Fragmento de Tau de 37 KDa identificado por espectrometría de masas. a) Separación electroforética de las variantes de Tau a partir de extractos de cerebro de ratón transgénico, identificándose a la proteína Tau de longitud completa y un fragmento con peso de 37 KDa. b) Análisis del fragmento de Tau de 37 KDa por digestión trípica y espectrometría de masas. El residuo carboxilo terminal es D314 (Zhao et al. 2016).

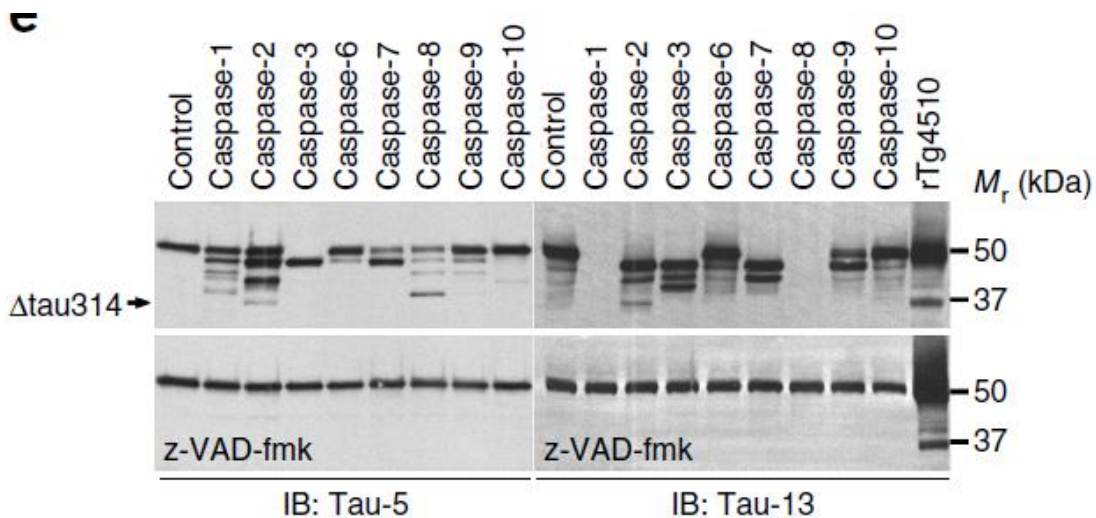


Figura 18. Determinación de los productos de proteólisis de Tau por diversas caspasas. Debido a que se comprobó que el residuo C-terminal del nuevo fragmento de Tau era un ácido aspártico, se realizaron experimentos *in vitro* incubando separadamente diversas caspasas con Tau nativa, para encontrar la candidata que produce este fragmento de 34 KDa. Se encontró que este corte lo genera la caspasa-2 (Zhao et al., 2016).

Debido al sitio de corte por caspasa-2, la ruptura ocurre en la zona de los dominios repetidos, generando un fragmento amino de 314 aminoácidos (1-314 aa) y un fragmento carboxilo de 127 aminoácidos (315-441 aa) (Zhao et al., 2016) (Figura 19). Es interesante que esta truncación de Tau producida por acción de la caspasa-2, es una acción relevante puesto que esta enzima no es una proteasa asociada con actividad ejecutora terminal en el desarrollo de la vía apoptótica (Fan et al., 2005). No obstante, se sabe que en el cerebro de sujetos con la EA, la actividad y capacidades de acción de estas enzimas se encuentra desregulada y sería factible que, en ciertas circunstancias y en forma particular, ciertos integrantes de la familia de las caspasas podrían estar sobreactivados y participar indistintamente en acciones específicas a nivel celular, proteolizando diferentes sustratos. Posterior a este primer hallazgo, otros investigadores demostraron que esta truncación de Tau por caspasa-2 también se presentó en el cerebro de sujetos con otras enfermedades neurodegenerativas, como la demencia de cuerpos de Lewy (Smith et al., 2019) y la demencia asociada a la enfermedad de Huntington (Liu et al., 2019), demostrando una aparición promiscua de esta truncación en varios procesos demenciales.

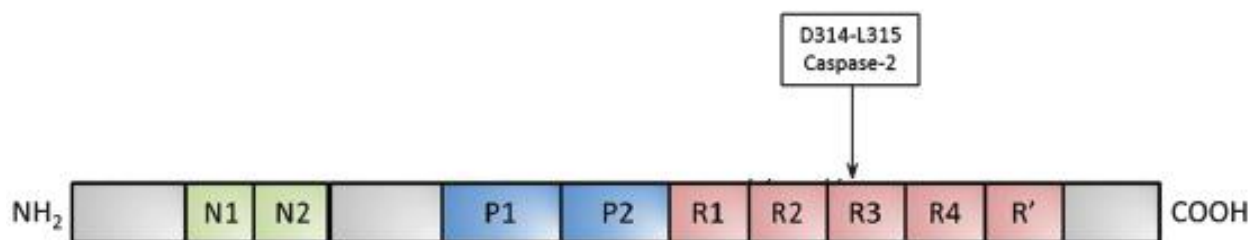


Figura 19. Corte de Tau en D314-L315 por la actividad de la caspasa-2. La caspasa-2 corta en D314, en el tercer dominio repetido de unión a microtúbulo (R3). N1 y N2 representan los exones variantes en splicing, P1 y P2 representan los dominios ricos en prolina y, R1-R4, los dominios repetidos de unión a microtúbulos. R' no es un repetido como tal, es más bien una zona donde ocurren otras truncaciones. Modificado de Quinn 2018.

En el primer estudio de Zhao et al. (2016) en que se describió esta truncación, se analizaron, además, las propiedades de agregación *in vitro* de la especie truncada de Tau en D314; sin embargo, no se encontró un incremento de esta acción por encima de la capacidad para agregarse de la Tau-nativa. Esto pareció significar que, al cortarse la zona de dominios repetidos de Tau por esta proteasa, posiblemente se afecta su capacidad de autoagregación, tal y como se ha demostrado en otros estudios donde se ha ponderado que la zona de dominios repetidos de Tau es relevante para su polimerización anormal *in vitro* (Abraha et al., 2000). Dichos resultados han generado más controversia sobre el papel patológico de las truncaciones de Tau por la familia de las caspasas. En nuestro laboratorio nos hemos dedicado a contribuir en el esclarecimiento del papel patológico de esta nueva especie truncada, y aprovechando nuestro sistema de expresión de Tau en células de neuroblastoma no diferenciadas, encontramos que efectivamente, la especie truncada de Tau en D314 con su amino intacto, no parece producir las mismas alteraciones subcelulares a nivel de organización y restructuración del citoesqueleto de tubulina o alteraciones en la estructura de componentes membranales como núcleo, aparato de Golgi y membrana plasmática que producen otras especies truncadas de Tau, así como la especie nativa. Sin embargo, algo que fue interesante es que, al expresar el fragmento complementario del corte, el fragmento carboxilo de Tau (315-441), en el mismo sistema celular, se encontró que este fragmento se distribuyó en el citoplasma de las neuronas, pero también una poza abundante del mismo, invadió anormalmente el compartimento nuclear (López-Aviña, 2020) (Figura 20). Este hallazgo despertó nuestro interés para tratar de explicar esta localización anormal y encontrar un posible significado patológico a dicha acción.

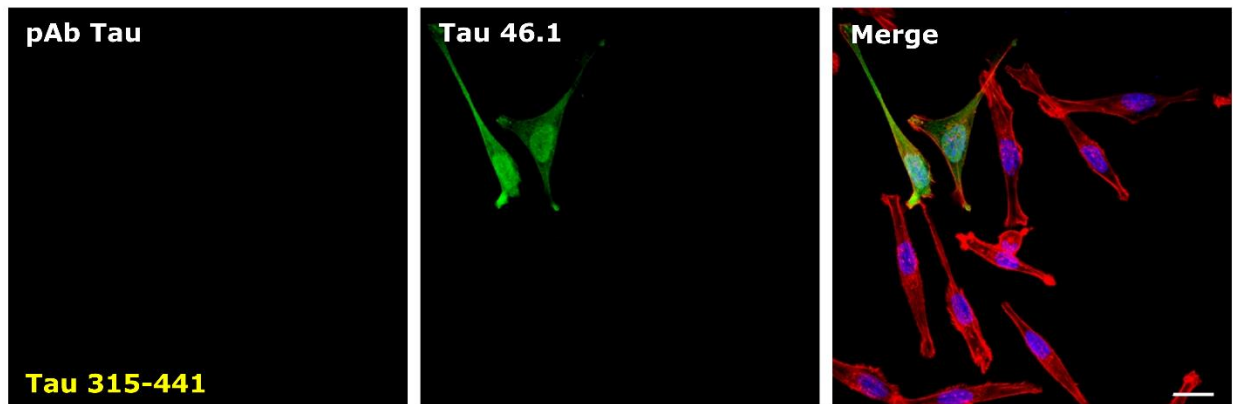
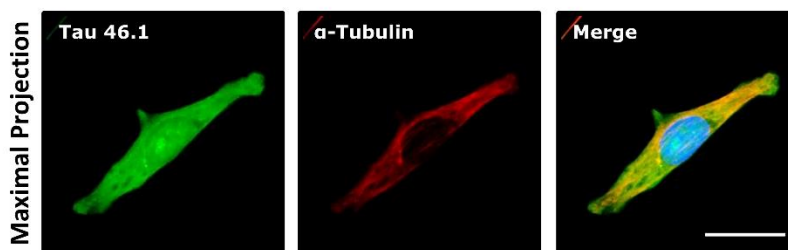
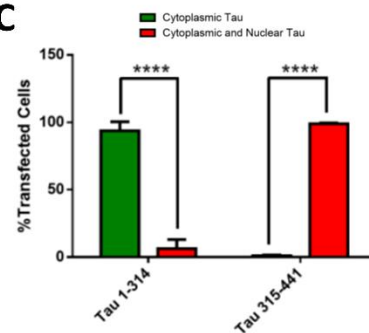
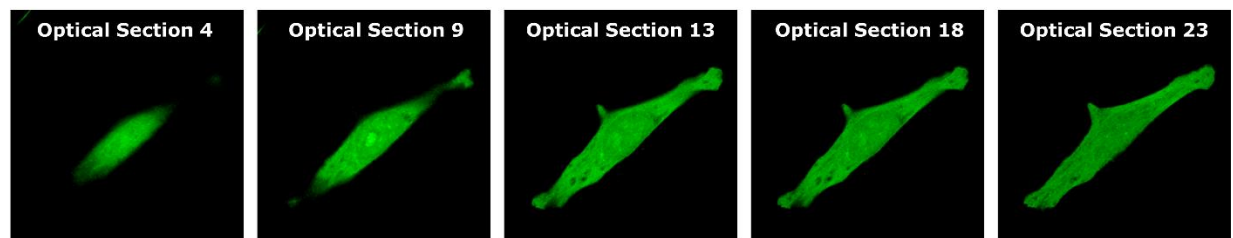
A**B****C****D**

Figura 20. Distribución subcelular de la variante truncada Tau 315-441 en células de neuroblastoma SH-SY5Y. A) Las células se transflectaron con un plásmido que codifica para la secuencia de Tau 315-441, y la expresión se monitoreo por inmunofluorescencia con el anticuerpo Tau-46.1 (reconoce los aminoácidos 428-441) (canal verde. El citoesqueleto de F-actina y el compartimento nuclear se tiñeron con Faloidina-Rodamina (señal roja) y Hoechst-33258 (señal azul) respectivamente, evidenciándose en el canal merge. B) Proyección Máxima de una célula inmunoteñida con un anticuerpo anti- α -tubulina (en canal rojo) y Tau-46.1 (canal verde). C) Cuantificación de la distribución citoplásmica y citoplásmica/nuclear de células expresando a Tau 1-314 o Tau 315-441. D) Secciones ópticas representativas de la imagen en B evidencian la distribución de Tau 315-441 en citoplasma y compartimento nuclear (López-Aviña, 2020).

1.6 LA PROTEÍNA TAU Y SU LOCALIZACIÓN NUCLEAR

Es importante mencionar que, en neuronas maduras y diferenciadas, Tau no es una molécula que se localice en el compartimento nuclear y pocos son los reportes que mencionan que esta proteína tiene un papel patológico al estar en esta estructura subcelular (Lu et al., 2014). Se ha entendido que posiblemente su presencia en este sitio se podría deber a su participación durante la formación del uso acromático en células en división, asociándose a condiciones no patológicas y en neuronas en cultivo, pero no en las células diferenciadas del parénquima cerebral. No obstante, en la literatura existe mucha controversia y diversidad de resultados sobre la presencia o no de Tau en el compartimento nuclear.

En algunos estudios en células en cultivo se ha reportado la presencia de Tau completa y fosforilada (Thr 181, 212 y Ser 404) en el compartimento nuclear, como respuesta a daños en el DNA (Ulrich et al., 2018). En contraste a lo que hemos encontrado en nuestro laboratorio, la especie truncada Tau 315-441, no posee estos sitios de fosforilación, descartando así, que esta modificación sea la causa de su localización nuclear.

De la misma forma, también se reportó la localización de la proteína Tau en los nucléolos de células de neuroblastoma SH-SY5Y en cultivo. En esta estructura, Tau colocalizó con factores asociados a la regulación de la estructura de la heterocromatina y estabilidad del DNA ribosomal. Sin embargo, esta localización sólo se observó cuando las células estuvieron sometidas a estrés celular, lo que se ha interpretado como una

consecuencia de la acción de otros factores y no de una asociación natural (Maina et al., 2018) (Figura 21).

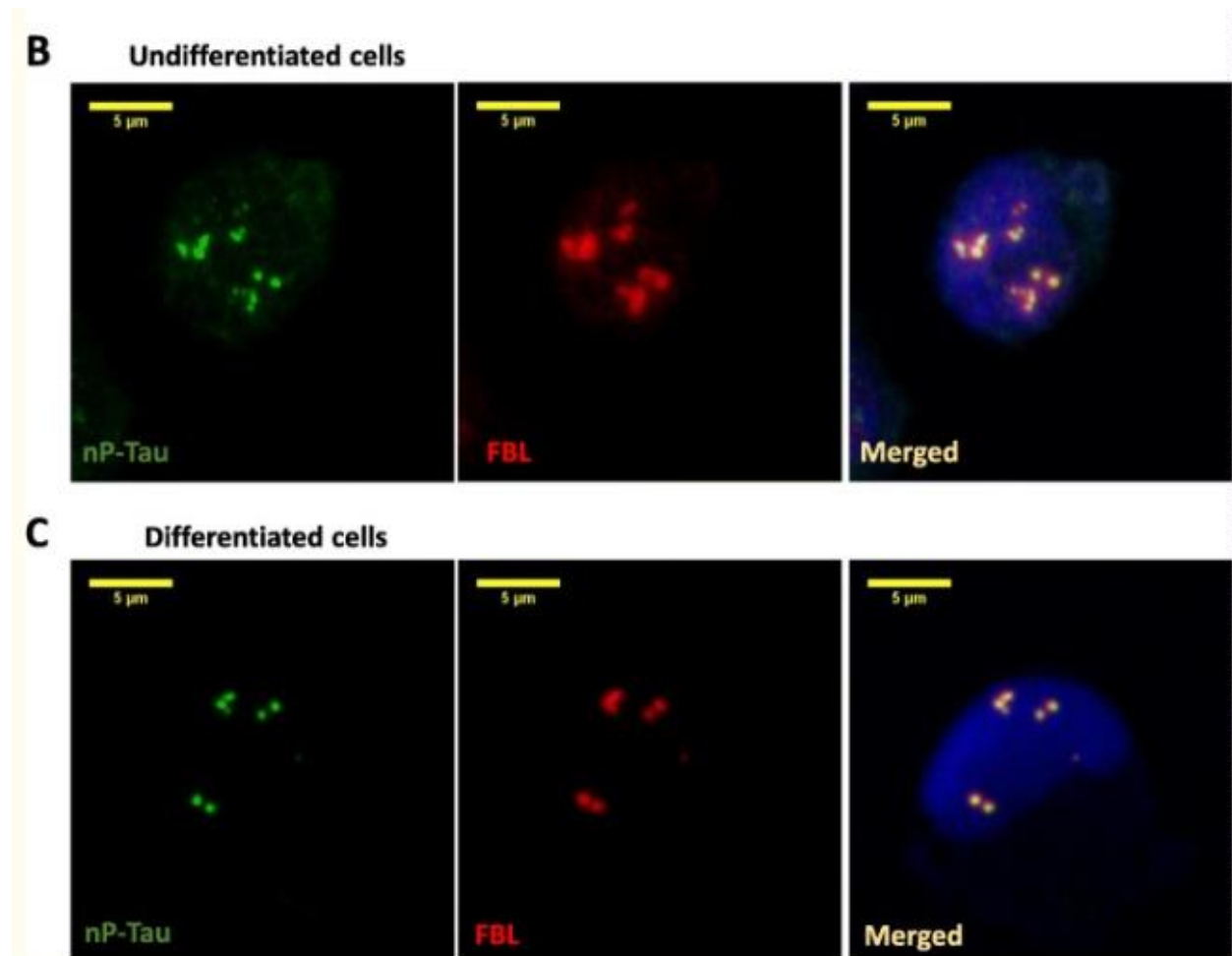


Figura 21. Localización de la proteína Tau en los nucleolos de células SH-SY5Y. Tanto en células no diferenciadas como en células diferenciadas se realizaron ensayos de inmunofluorescencia para la proteína Tau no fosforilada y para FBL, un marcador de nucleolos. Se puede observar colocalización en ambos marcadores (Maina et al., 2018).

Como uno de los pocos hallazgos que describen la presencia de una Tau patológica alcanzando el compartimento nuclear, en nuestro modelo de transfección en células de neuroblastoma no diferenciadas, nuestro grupo ha encontrado que la invasión de la variante truncada de Tau (Tau 315-441) a este compartimento, alteró el patrón de

expresión de proteínas totales, en comparación al evaluado en otro grupo de células que expresaron a su fragmento complementario (Tau 1-314) con localización enteramente citoplásmica (López-Aviña, 2020). Estos resultados parecen indicar que el fragmento carboxilo de Tau de 127 aminoácidos (Tau315-441) al ingresar al compartimento nuclear, altera la expresión de genes de proteínas que podrían ser importantes para la estabilidad estructural y funcional de las neuronas. Es interesante entonces evaluar si este fragmento de Tau expresado en las células SH-SY5Y produce también alteraciones en su transcriptoma.

La invasión de la especie Tau 315-441 al núcleo de las células transfectadas, correlacionó con un incremento en la expresión de proteínas relacionadas con el mantenimiento del DNA, control del ciclo celular, señalización, choque térmico y estructura celular. Mientras que en aquellas células donde se expresó la variante Tau 1-314 y que se mantuvo en el citoplasma, se encontró una elevación en la expresión de proteínas de mantenimiento del DNA y síntesis de nucleótidos (López-Aviña, 2020). Debido a que ambos fragmentos de la proteína Tau producidos por acción de caspasa-2 podrían alterar procesos relacionados con la expresión genética, también sería posible que se presenten alteraciones en la transcripción y en la expresión de transcritos no codificantes, por lo que un análisis del transcriptoma podría confirmar esta suposición.

Por otra parte, nuestro laboratorio también estudia los mecanismos celulares involucrados en el transporte de esta especie truncada de Tau al núcleo, enfocándose en la estructura y propiedades de transporte de moléculas a lo largo de la envoltura nuclear. En este sentido, se sabe que los repetidos de Tau son secuencias importantes para que esta proteína pueda unirse a los microtúbulos y facilitar su estabilidad

estructural y funcionalidad. Cabe destacar que el corte proteolítico causado por caspasa-2 se localiza dentro del tercer dominio repetido de unión a los microtúbulos. Suponemos que este corte de la proteína, al fragmentar a estos dominios, los productos resultantes de Tau deberán tener menos afinidad por estos polímeros de tubulina. También podemos suponer que la integridad de los dominios repetidos es un factor determinante para que Tau permanezca en el espacio citoplásmico, al tener una notable afinidad por los dímeros de α - y β -tubulina que conforman a los microtúbulos. Sería interesante conocer si la adición de estos dominios repetidos y otros segmentos en dirección del extremo amino del fragmento de Tau315-441, reestablecerían su localización en el espacio citoplásmico.

2 JUSTIFICACIÓN

Las truncaciones de la proteína Tau producidas por varias caspasas son eventos importantes en la inducción de algunas propiedades patológicas de Tau, como agregación y citotoxicidad, pero no todas sus acciones han sido clarificadas. La mayor parte de los trabajos se han enfocado al estudio de la truncación de Tau en el D421 producida por caspasa-3 y su papel patológico en la EA y otras demencias. Dicha truncación es un evento temprano que aparece durante la formación de las MNFs que proliferan en casos iniciales e intermedios de la EA, por lo cual se le ha llegado a considerar como un marcador patológico para intervención farmacológica.

Recientes estudios han descrito una nueva truncación de Tau producida por caspasa-2 en el sitio D314 de la molécula, la cual se corroboró estar presente en el cerebro de

sujetos con la EA; sin embargo, su caracterización y contribución integral en estas alteraciones está en proceso de investigación. En nuestro grupo se ha iniciado el estudio de esta nueva truncación. La expresión del fragmento amino, finalizando en D314, no parece afectar la integridad estructural de los componentes subcelulares de las neuronas en comparación a la variante nativa o truncada en D421; sin embargo, al expresarse el fragmento carboxilo (Tau315-441), parece cambiar su distribución, alcanzando de manera anormal el componente nuclear en adición a observarse también en el espacio citoplásmico. Las consecuencias fisiológicas que esta localización nuclear pudiera generar, sería una alteración del proteoma celular, misma que no fue tan evidente en aquellas células que expresaron el fragmento amino truncado de Tau (Tau1-314) (López-Aviña, 2020).

En virtud de esto, es necesario profundizar y corroborar si hay alguna alteración a nivel transcripcional evaluando el transcriptoma de estas células. Actualmente estamos evaluando los mecanismos celulares y de transporte por los cuales Tau315-441 puede ingresar al núcleo, enfocándonos a los componentes de la envoltura nuclear; Sin embargo, es interesante también precisar y conocer qué dominios del extremo amino de Tau podrían impedir que la especie truncada Tau315-441 ingrese al núcleo de las células.

3 OBJETIVOS

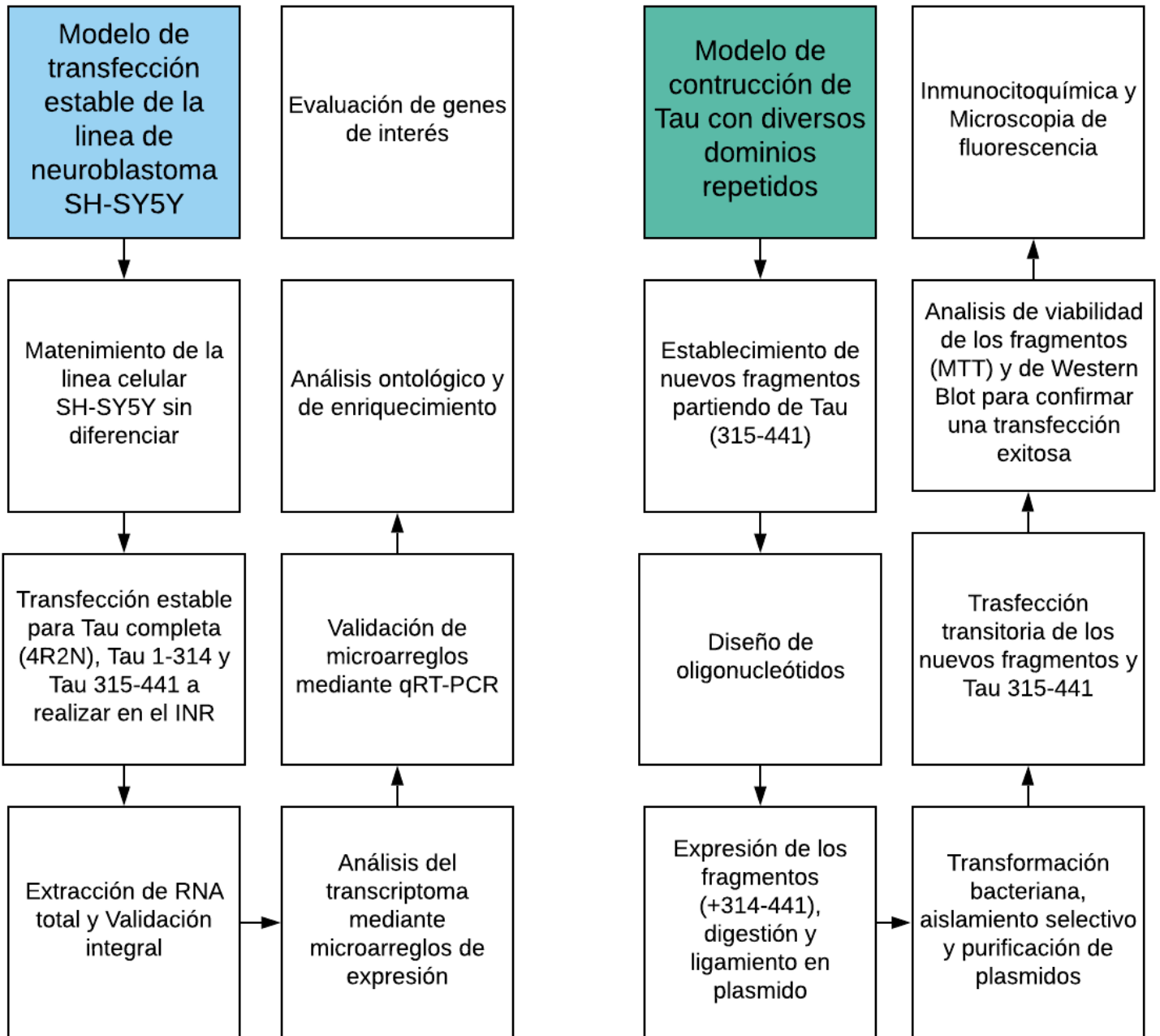
3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar los cambios en el transcriptoma de células de neuroblastoma como efecto de la expresión estable de la variante truncada Tau 315-441, y estudiar qué dominios de la molécula de Tau evitaría que esta especie truncada se transporte anormalmente al núcleo celular.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Establecer un modelo de células de neuroblastoma no diferenciadas que independientemente expresen en forma estable a Tau nativa y a los dos fragmentos de Tau producidos por el corte proteolítico de caspasa-2.
2. Evaluar posibles alteraciones del transcriptoma en células de neuroblastoma que expresan a la variante truncada de Tau 315-441 que presenta transporte al núcleo celular, en comparación al de células expresando a Tau 1-314 y a la proteína Tau nativa completa.
3. Caracterizar a través de diversas recombinantes de Tau los dominios de la molécula que evitarían el transporte de la especie truncada Tau 315-441 al núcleo de las células de neuroblastoma.

4 DISEÑO EXPERIMENTAL



5 METODOLOGÍA

5.1 MODELO DE TRANSFECCIÓN ESTABLE EN LA LÍNEA DE NEUROBLASTOMA SH-SY5Y

5.1.1 Cultivo Celular

Se utilizará la línea celular SH-SY5Y derivada de neuroblastoma humano no diferenciada (ATCC). Se cultivará en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium F12 (DMEM F12) a 4.5 g/L de glucosa, suplementado con suero fetal bovino al 5%, L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/mL y estreptomycin 100 mg/mL (Gibco-Thermo Fisher, MA, USA). Las células se mantendrán en incubación (Incubadora Panasonic) a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa y se llevará a un máximo de 20 pases usando Tripsina-EDTA al 0.25% (Gibco-Thermo Fisher, MA, USA) para su cosecha y resiembra. Estos pases se realizarán en proporción 1:10 para obtener una confluencia del 80% en cajas Petri p100. Se cambiará el medio cada 3 días impidiendo su diferenciación.

Otra línea a utilizar para propósitos comparativos será la COS-7 derivada de riñón de mono verde africano (ATCC). Se cultivará con las mismas condiciones que la línea SH-SY5Y, pero usando medio Dulbecco's Modified Eagle Medium al 4.5 g/L de glucosa (DMEM) suplementado con suero fetal bovino al 10%. Los antibióticos y tiempos de resiembra se mantienen igual que para la línea celular SH-SY5Y.

5.1.2 Plásmidos y transfección

5.1.2.1 Secuencias y PCR

Para poder generar transfecciones estables con el gen *MAPT* (*Microtubule Associated Protein Tau*) que codifica la proteína Tau humana completa y con aquellos segmentos del gen que codifican los fragmentos de Tau humana que comprenden los aminoácidos 1-314 (Tau1-314) y 315-441 (Tau315-441), primero se generarán los insertos de *MAPT* usando los oligonucleótidos en la tabla 1. Se usará como molde el plásmido pRK5-GFP-Tau (Figura 22).

Restriction map of pRK5-EGFP-Tau.xdna - 6519 nt
<Serial Cloner V2.5> -- <Thu, Jul 1, 2021 4:33 PM>

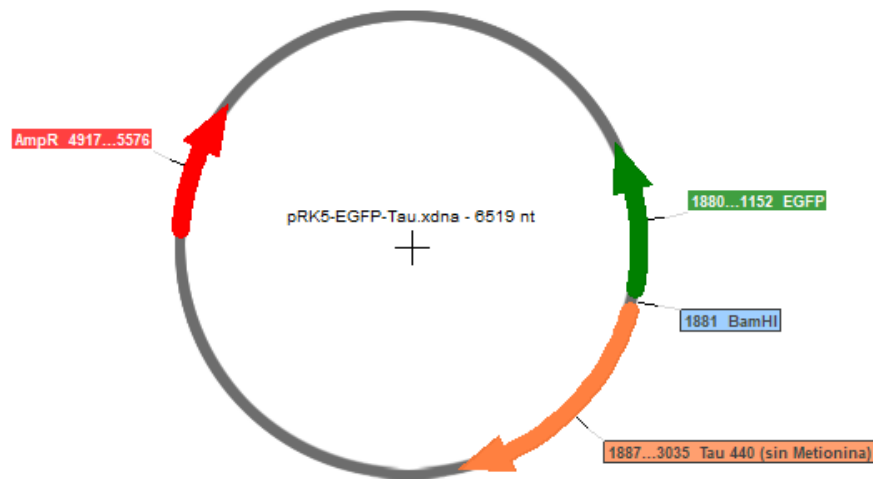


Figura 22. Mapa de pRK5-EGFP-Tau. Sitio de corte de la enzima endonucleasa *Bam* HI y que contiene el gen de resistencia a Ampicilina (Generado en Serial Cloner)

TABLA 1. OLIGONUCLEÓTIDOS PARA AMPLIFICAR LOS FRAGMENTOS DEL GEN *MAPT* PARA GENERAR LAS LÍNEAS CELULARES ESTABLES

	Oligonucleótido sentido 5'	Oligonucleótido antisentido 3'
TAU COMPLETA	5'-TAT GGA TCC ATG GCT GAG CCC CGC	5'-CGG GAA TTC TCA CAA ACC CTG CTT GG
TAU 1-314	5'-TAT GGA TCC ATG GCT GAG CCC CGC	5'-CGG GAA TTC TCA GTC AAC TGG TTT GTA GAC TAT T
TAU 315-441	5'-CGC GGA TCC ATG CTG AGC AAG GTG A	5'-CGG GAA TTC TCA CAA ACC CTG CTT GG

Los fragmentos se amplificarán mediante PCR siguiendo las siguientes condiciones usando un termociclador de Applied Biosystems™ Veriti.

CONDICIONES PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DEL GEN *MAPT* POR PCR

DESNATURALIZACIÓN	95°C durante 5 min
CICLOS (35)	Desnaturalización: 94°C durante 1 min. Alineamiento: 62°C para cada juego de oligonucleótidos durante 30 segundos. Extensión de DNA: 72°C durante 2 min.
EXTENSIÓN FINAL	72°C durante 5 min.
TERMINACIÓN	Mantener a 16 °C

MEZCLA PARA LA REACCIÓN DE PCR VF 20 µL

	Volumen	Concentración final
AGUA LIBRE DE NUCLEASAS	A 20 µL	

BUFFER PHUSION 5X	4 μ L	1x
10 MM DNTPS	.04 μ L	200 μ M
10μM OLIGONUCLEÓTIDO SENTIDO	1 μ L	0.5 μ M
10μM OLIGONUCLEÓTIDO ANTISENTIDO	1 μ L	0.5 μ M
PRK5-EGFP-TAU1 NG/ML	2 μ L	0.1 ng
PHUSION DNA POLIMERASA	0.2 μ L	1.0 units/50 μ L PCR

Para comprobar la amplificación de los productos de las PCRs, se separarán las mezclas de reacción de las PCR por electroforesis en un gel de agarosa al 1% conteniendo GelRed 1X para teñir los ácidos nucleicos. Para esta prueba se usarán 2 μ L del volumen final de las reacciones de PCR. Se visualizarán los amplicones utilizando un transiluminador de luz ultravioleta ChemiDoc XRS+ de Bio-Rad.

5.1.2.2 Precipitación y digestión de los productos de PCR

Una vez corroborados los tamaños de los productos esperados de las PCRs, estos serán purificados como describimos a continuación. Para purificar el DNA, el volumen restante de los ensayos de PCR se mezclará por inversión con 1/10 del volumen (de la solución de DNA) de acetato de sodio 3 M pH 5.2 (2.3 μ L) y 3 volúmenes de etanol absoluto (75 μ L). El acetato de sodio y el etanol facilitarán la precipitación al aumentar la fuerza iónica y disminuir la capacidad de solvatación del DNA. Después se congelarán las mezclas con nitrógeno líquido para dejarse reposar por 2 minutos a temperatura ambiente. Finalizado este tiempo, las muestras de DNA se colectarán mediante

centrifugación a 13,000 rpm ($7369 \times g$) durante 15 min a 4°C en una microcentrífuga MiniSpin, Eppendorf. El sobrenadante será desechado y la pastilla se lavará 2 veces con 500 μL de etanol al 70%, centrifugando en cada lavado bajo las mismas condiciones por 10 min, y se descartará de nuevo el etanol. Finalmente, las pastillas obtenidas se dejarán secar a temperatura ambiente y se solubilizarán en la siguiente mezcla de digestión. Utilizando las enzimas endonucleasas *Bam* HI (10 U/ μL) y *Eco* RI (10 U/ μL) ambas de la compañía Thermo Fisher.

DIGESTIÓN DOBLE			VOLUMEN	CONCENTRACIÓN EN 20 μL Vf
AGUA MOLECULAR	GRADO	BIOLOGÍA	7 μL	
2X BUFFER TANGO			2 μL	
DNA (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)			10 μL	0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
<i>Bam</i> HI (10 U/ μL)			.5 μL	.25 U/ μL
<i>Eco</i> RI (10 U/ μL)			.5 μL	.25 U/ μL

BamH I



EcoR I



Figura 23. Sitios de corte de las endonucleasas. Sitio de corte de las enzimas endonucleasas *Bam* HI y *Eco* RI respectivamente (Obtenido de Sigma-Aldrich)

Para poder expresar las secuencias de Tau será necesario incorporarlas a un vector de expresión. Los fragmentos se incorporarán en el plásmido pQBI25deltaGFP utilizando las enzimas endonucleasas *Bam* HI y *Eco* RI. Estos sitios de corte se tomarán en cuenta al crear los oligonucleótidos (Figura 23 y tabla 1). El sitio *Bam* HI para el oligonucleótido sentido y el sitio *Eco* RI para el oligonucleótido antisentido. Se usará el protocolo de Thermo Fisher para la digestión doble de los productos de PCR y del vector. La mezcla de digestión se incubará por 3 horas a 37°C. Al terminar este tiempo, las enzimas se deberán inactivar para continuar con la ligación de los fragmentos de Tau y el vector. Las endonucleasas son sensibles a la temperatura, así que para inactivarlas se incubará la mezcla a 65 °C por 20 min. El mismo procedimiento de digestión doble se utilizará para el vector pQBI25deltaGFP (Figura 24).

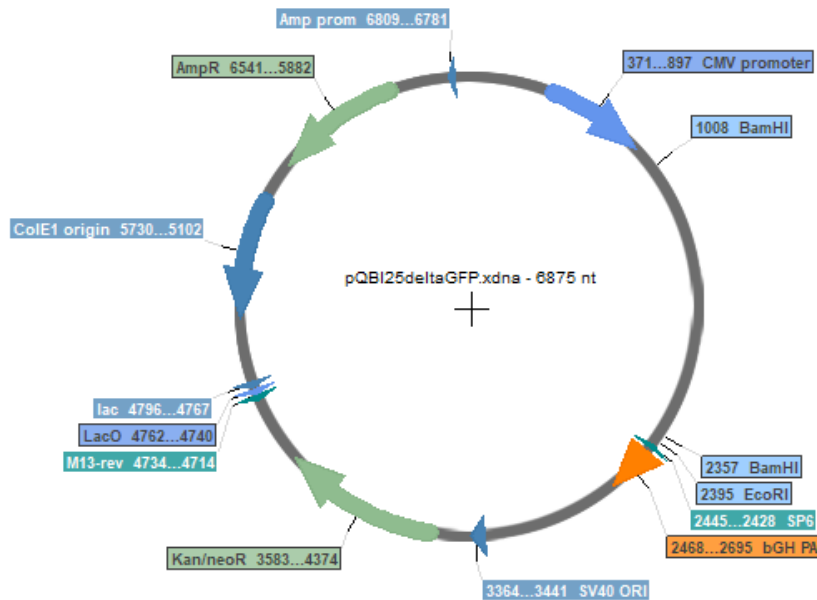


Figura 24. Map de pQBI25deltaGFP. El mapa del vector para las transfecciones estables. Marca los sitios de corte para *Bam* HI y *Eco* RI; además de los genes de resistencia a Ampicilina y Geneticina (Generado en Serial Cloner)

De la misma forma que para los productos de la PCR, las digestiones se comprobarán en un gel de agarosa al 1% para cada construcción y el vector. Las bandas obtenidas se cortarán del gel y purificarán con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de (Promega, WI, USA).

5.1.2.3 Ligación y transformación

Teniendo los fragmentos digeridos y purificados, se utilizará el protocolo del kit LigaFast™ Rapid DNA Ligation System de Promega para ligar el vector pQBI25deltaGFP con sus respectivos insertos, usando una proporción molar de 3:1 del inserto con respecto al plásmido. El volumen de la mezcla de ligación será 10 µL para cada inserto. Se incubarán por 10 min a temperatura ambiente e inmediatamente se transformarán células competentes *E. coli* DH5α de Thermo Fisher. Estas células contienen las mutaciones *recA1* y *endA*; las cuales deshabilitan la recombinación homologa y la degradación de DNA de doble hebra respectivamente.

Se usarán alícuotas de *E. coli* DH5α (50 µL) con 2.5 µL de la mezcla de ligación. Para poder transformar estas bacterias se usará el método de choque térmico. Cada alícuota de *E. coli* DH5α se incubará en hielo por 30 min, después se pasarán a un calentador de bloque a 42°C por 30 segundos y finalmente se dejarán recuperar en hielo por 5 min.

Para permitir que las bacterias se recuperen del estrés generado por el choque térmico, se les adicionarán 450 µL de medio de Luria-Bertani (LB) (volumen total de 500 µL) conteniendo glucosa 20 mM y se incubarán en agitación a 37 °C por 1 hora. Después, las bacterias se precipitarán por centrifugación a 14,000 rpm (8546 × *g*), desechando aproximadamente 400 µL del sobrenadante. Con el sobrenadante restante del precipitado se resuspenderán las bacterias y se sembrarán en placas de LB-agar con Ampicilina 30 µg/mL (concentración estimada). El plásmido expresa resistencia al antibiótico Ampicilina, lo que nos permitirá seleccionar las clonas positivas después de 16 horas. Las clonas resistente se resembrarán en 10 mL de medio LB con Ampicilina

30 µg/mL, dejando incubar a 37 °C en agitación por 24 horas, para que de esta forma se asegure la selección de las clonas transformadas. Finalmente, el DNA plasmídico se purificará usando GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich). La concentración de los plásmidos se determinará por absorbencia a 260 nm y se secuenciarán los plásmidos finalmente para confirmar que no se presenten mutaciones.

5.1.2.4 Transfección estable

Con los vectores generados se realizará la transfección estable de las células SH-SY5Y. El vector consiste en la secuencia codificante para la especie de Tau de interés (Tau completa y sus fragmentos Tau1-314 y Tau315-441), así como un gen de resistencia para Ampicilina y para Geneticina. El gen de resistencia a Ampicilina nos permitirá expandir nuestro vector y el gen de resistencia a Geneticina nos permitirá hacer la transfección selectiva en las células eucarióticas.

Para esta transfección se usará el protocolo Lipofectamine 2000 Plasmid DNA transfection (Thermo Fisher). Se sembrarán las células SH-SY5Y en placas de 24 pozos, (alrededor de 1×10^5 células en 500 µL de medio de crecimiento sin antibiótico), hasta alcanzar una confluencia de 70%-90%. Se diluirá el DNA de cada construcción con Opti-MEM hasta alcanzar una dilución 0.8 µg/50 µL. 2 µL de Lipofectamina 2000 se diluirán con Opti-MEM hasta alcanzar 50 µL. Después de una incubación de 5 min a temperatura ambiente, se combinarán las dos diluciones y se incubarán por 20 min a temperatura

ambiente. La mezcla (100 μ L) se agregará al pozo con células (procedimiento por pozo) y la placa se incubará por 24 horas a 37°C.

Después de este tiempo, se realizará un pase de las células a una dilución 1:10 (60 μ L de la suspensión de células, 540 mL de DMEM F12 y Geneticina a 300 μ g/mL). De esta forma se iniciará la selección de células por resistencia al antibiótico Geneticina. Durante las siguientes 2 semanas se reemplazará el medio cada 4 días. Después de este tiempo se deberán observar islas de células transfectadas que pueden ser rescatadas. Se realizará un segundo pase con estas células siguiendo las condiciones anteriores para confirmar una transfección exitosa. Finalmente, por microscopía de fluorescencia se observarán las células transfectadas para confirmar la expresión estable de las proteínas de interés.

5.1.2.5 Ensayos de citotoxicidad

Para confirmar que las transfecciones no son tóxicas para las células, se realizarán ensayos de viabilidad por el método de MTT. Este ensayo se basa en la reducción metabólica del sustrato Thiazolyl Blue al producto Formazán, el cual presenta una coloración azul con absorbancia a 570 nm. En este ensayo colorimétrico, la absorbancia es directamente proporcional a la viabilidad celular (actividad metabólica). Las células se incubarán con Thiazolyl blue a 0.5 mg/mL, adicionándolo al medio de cultivo en proporción 1:10 durante 3 h a 37°C. El medio se retirará y los cristales de formazán se resuspenderán en 330 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO). La cuantificación colorimétrica se llevará a cabo en un lector de placas de ELISA a una longitud de onda de 570 nm.

También se realizarán otros ensayos complementarios como el método de exclusión de azul de Tripano.

5.1.2.6 Comprobación de la expresión de las diversas especies de Tau por Western Blot y visualización por Microscopía de fluorescencia confocal

Al finalizar el tiempo de preparación de la transfección estable, se obtendrán lisados celulares de las distintas transfecciones y se analizará la expresión de nuestras proteínas de interés por separación electroforética en geles de policacrilamida e identificación por Western Blot (WB). El lisado de las células se llevará a cabo en buffer RIPA (Tritón x-100 al 1%, NaCl 150 mM, Tris 50 mM y EDTA 5 mM, pH 8.0, suplementado con PMSF 1 mM y cocktail COMPLETE 1X, incubándose por 20 min a 4 °C en el Vortex-Genie 2 a velocidad máxima. Al finalizar el proceso de lisis, las muestras se volverán a centrifugar a 14,000 rpm ($8546 \times g$) durante 10 min y se recuperarán los sobrenadantes para cuantificar la concentración de proteínas por el método de miniBradford. Se depositarán 30 µg de proteína de las muestras en geles de poliacrilamida al 10% conteniendo SDS. Se llevará la electroforesis con un voltaje de 100 Voltios durante 2 horas. Terminada la electroforesis, se transferirán las proteínas a membranas de nitrocelulosa con una corriente de 250 mA por 90 minutos a temperatura ambiente. Estas membranas se bloquearán con leche baja en grasa al 5% durante 1 hora a temperatura ambiente. Después se incubarán con los anticuerpos a los tiempos determinados por protocolos de nuestro laboratorio y descritos en la Tabla 2 (López-Aviña, 2020). Se visualizarán las

proteínas en las membranas por quimioluminiscencia mediante el sistema Western Lightning Plus-ECL de PerkinElmer,. Con el WB se comprobará la expresión e identificación exitosa de nuestras proteínas expresadas en una línea celular estable.

Por otra parte, será importante corroborar la localización subcelular de las proteínas, tal y como se ha descrito previamente en nuestro laboratorio: Tau completa y Tau1-314, con distribución citoplásmica; mientras que Tau315-441 en el citoplasma y en el compartimento nuclear. Para este propósito se realizarán ensayos de inmunofluorescencia como describimos a continuación. Las células transfectadas y los grupos control sin transfección, se fijarán en paraformaldehído al 4% en PBS 1× por 15 min. Después de tres lavados con PBS (buffer fosfato salino) por cinco min a temperatura ambiente, las células se permeabilizarán con PBSt, PBS con 0.1% de detergente Tween, durante 15 min. Se incubarán por 20 min en solución de bloqueo (Gelatina 0.5 % y FBS 1.5 % en PBS 1X). Después de otros tres lavados con PBS, se incubarán con sus respectivos anticuerpos primarios (tiempos establecidos en la Tabla 2) a una disolución 1:1000. Después de otra tanda de lavados por 15 min en PBS 1×, las células se incubarán en una cámara húmeda y en obscuridad por 1 h con sus respectivos anticuerpos secundarios, hacia los diferentes primarios, acoplados al fluorocromo deseado, a una dilución de 1:100 en 1× a temperatura ambiente. Estos incluyen el Isotiocianato de fluoresceína (FITC) con un pico de emisión a 525nm (verde), Isotiocianato de Tetrametilrodamina (TRITC) con un pico de emisión a 570 nm (rojo), o Carbocianina 5 (Cy5) con un pico de emisión a 670 nm (rojo lejano modificado a azul con pseudocolor digital). Para los experimentos que requieran un doble marcaje con anticuerpos monoclonales, se realizará el procedimiento en dos etapas: en la primera se

realiza la inmunodetección con el anticuerpo primario y secundario respectivos. Secuencialmente se bloqueará adicionalmente el anticuerpo primario por saturación con un anticuerpo secundario anti-Mouse IgG acoplado a Peroxidasa en dilución 1:100 en PBS 1× por 1 h a temperatura ambiente. La marca de HRP, será invisible bajo fluorescencia. Se finalizará con la siguiente combinación de un segundo anticuerpo primario y su correspondiente segundo anticuerpo secundario, en tiempos cortos de incubación.

Para definir la morfología global de las células, al final de la inmunolocalización, se realizará una contra tinción para Actina filamentosa con la falotoxina fluorescente Faloidina-Rodamina de Thermo Fisher en diluciones de 1:500. Igualmente, para la identificación del compartimento nuclear se usará el marcaje fluorescente con el colorante Hoechst 33342. Finalmente, las laminillas con las células teñidas se lavarán al menos 5 veces con PBS 1× y una vez con agua ultrapura, para ser montadas en portaobjetos con Vectashield y se sellarán los bordes con barniz de uñas. El material así procesado será analizado microscópicamente y diversos parámetros serán determinados cuantitativa y cualitativamente utilizando el software Nikon NIS-Elements AR-3.0- SP7 (Tokio, Japón), acoplado a nuestro sistema de microscopía de fluorescencia (microscopio ECLIPSE-NIKON) que cuenta con Cámara Nikon digital sight-DG-Ri1 (Tokio, Japan). Asimismo, para determinaciones cuantimétricas como el análisis de colocación y superresolución de estructuras, utilizaremos un microscopio confocal espectral TCS-SP8 con láseres de diodos (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).

Una vez corroborada la expresión y distribución subcelular de nuestras proteínas de interés, se procederá al análisis del transcriptoma de las células transfectadas.

Tabla 2. Anticuerpos y colorantes

Anticuerpo primario	Epítotope	hospedero	Procedimiento	Dilución	Tiempo	Referencia
Tau Policlonal	1-189*	Conejo-IgG	WB IC	1:5 000 1:1 000	1 h 1 h	GeneTex, Inc., Irvine, CA, USA
Tau 46.1 Monoclonal	428-441*	Ratón-IgG	WB IC	1:10 000 1:1 000	1 h TN	Dra. V. Lee; (Carmel et al., 1996)
Tau 5 Monoclonal	210-230*	Ratón-IgG	WB IC	1:10 000 1:1 000	1 h TN	Dra. V. Lee; (Carmel et al., 1996)
Tau 12 Monoclonal	6-18*	Ratón-IgG	WB IC	1:10 000 1:1 000	1 h TN	Dra. V. Lee; (Carmel et al., 1996)
Tau 13 Monoclonal	2-18*	Ratón-IgG	WB IC	1:10 000 1:1 000	1 h TN	Dra. V. Lee; (Carmel et al., 1996)
α -Tubulin Monoclonal	α -Tubulina	Ratón-IgG	WB IC	1:1 000 1:1 000	1 h TN	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA
α -Actina Monoclonal	α -Actina	Ratón-IgG	WB	1:500	1 h	(Diaz-Barriga et al., 1989)

Organelo	Marcador Fluorescente	Excitación/emisión (nm)	Procedimiento	Dilución	Tiempo	Referencia
Núcleo	Hoechst-33258	(350-461)	FL	1:5 000	5 min	Invitrogen Molecular Probes, CA, USA
Citoesqueleto de Actina Filamentosa	Faloidina-Rodamina	(540-565)	FL	1:500	1 h	Invitrogen Molecular Probes, CA, USA

IC: Inmunocitoquímica, WB: Western Blot, FL: Fluorescencia, TN: Toda la noche a 4 °C *Residuos basados en la isoforma más larga de Tau humana (2N4R).

(López-Aviña, 2020)

5.1.3 Extracción de RNA y Análisis de transcriptoma

Una vez comprobada la expresión y localización subcelular de Tau completa, Tau1-314 y Tau315-441, se analizará comparativamente el transcriptoma de cada grupo células. Las células transfectadas se mantendrán en incubación a 37°C y se cambiará el medio (selectivo) cada 3-4 días. Cada semana se extraerá RNA total usando el protocolo de TRIzol (invitrogen).

A partir del análisis del transcriptoma de las líneas SH-SY5Y expresando Tau completa o los fragmentos Tau1-314 y Tau 315-441, se identificarán genes con expresión *y/o splicing* alternativo alterado a través de microarreglos de cDNA. A partir del RNA obtenido de cada una de las líneas celulares, - se sintetizará el cDNA correspondiente y se someterá a hibridación utilizando el microarreglo Clariom™ D Assay, human (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) que contiene un total de 6,765,500 sondas que permiten identificar más de 134,700 genes, 542,500 transcritos, así como splicing alternativo. Como control de calidad para la integridad del RNA se necesitará obtener un valor mínimo de RIN de 8.5 (RIN, del inglés *RNA Integrity Number*), lo cual será determinado mediante un sistema de electroforesis capilar (2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

El microarreglo permite el análisis de la expresión de genes y de sus diferentes formas producidas por *splicing* alternativo, así como la expresión de RNAs no codificantes y con inicio de expresión no canónica. Las muestras se analizarán por replicación directa, realizándose 5 repeticiones para cada línea celular [47]. Los datos se analizarán mediante el programa *GeneChip Operating Software (GCOS)* versión 1.4, y la confiabilidad de los resultados se obtendrá posterior al análisis de calidad del microarreglo a través de la paquetería *Expression Console™ Software Version 1.1.1* (Affimatrix, Santa Clara, CA, USA), con el cual se realizará la validación por tres algoritmos de normalización distintos, del proceso de hibridación a través de la eliminación de la señal de fondo y del análisis de sondas específicas utilizadas como controles internos positivos y negativos. La corrección de los valores se realizará a través del método Robust Multiarrays Average (RMA) y se normalizará a través de cuantiles.

De manera paralela, para un proceso de normalización en la expresión se utilizará The Bioconductor Project implementado en programa “R” (<http://www.cran.r-project.org>). Posteriormente, para la identificación de genes diferencialmente afectados se utilizará un modelo lineal basado en estadística Bayesiana utilizando el programa R y Limma package. Para la corrección de múltiples pruebas será utilizado el algoritmo Benjamini-Hochberg. Para las múltiples comparaciones se utilizará “False Discovery Rate (FDR)”. Los valores para genes diferencialmente expresados serán considerados con un cambio relativo (FC) >2.0.

5.1.4 Validación de la técnica de microarreglos

Los resultados de los perfiles de expresión serán validados por PCR en Tiempo Real, utilizando sondas *TaqMan*®. Para tal efecto, se seleccionarán 5 genes aleatoriamente, de acuerdo con Miron et al. (2006). El número de genes validados propuesto es el mínimo con el poder estadístico para validar los resultados. Brevemente, se purificará el RNA total de las líneas celulares mediante el uso de *Rneasy mini Kit (Qiagen)*, el cual será sometido a una transcripción reversa para obtener cDNA mediante el sistema *Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen)*. Posteriormente se realizarán ensayos de expresión mediante el sistema *TaqMan PCR MasterMix (Life Technologies)*. La sonda *TaqMan*® y las secuencias de los oligonucleótidos específicas serán diseñadas por el programa *Primer Express (Perkin-Elmer Life Science)*. Las reacciones de PCR se llevarán a cabo en un sistema de PCR en tiempo real *Step One Sequence Detection (Applied Biosystems)*, conforme a los protocolos del proveedor. Como control interno se analizará

la expresión del gen ribosomal 18S. Los controles negativos se incluirán en cada ensayo. La determinación cuantitativa de los niveles de expresión se obtendrá por medio del método C_T descrito por *Applied Biosystems*.

5.1.5 Análisis de vías ontológicas

Para definir la relevancia de los genes alterados en el modelo celular de acuerdo con la presencia de cada isoforma de Tau, se identificará primeramente la vía metabólica y/o cascadas de señalización en donde participen; enseguida se seleccionará un grupo de al menos cinco genes de mayor interés, de acuerdo para su posterior análisis por RT-PCR tiempo real. La identificación de los procesos biológicos alterados se llevará a cabo por medio de la paquetería *PARTEK Genomics Suite* y/o mediante el programa Gene set enrichment analysis (GSEA), y DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>) para comparar el análisis de ontología de los genes en diferentes plataformas. El análisis de las cascadas de señalización potencialmente afectadas se realizará con las bases de datos *Ingenuity Pathway analysis (IPA)* (Redwood City, CA, USA) para identificar la interacción de redes biológicas en la asociación de genes regulados significativamente.

5.1.6 Evaluación de Genes de interés mediante qRT-PCR

Se seleccionarán cinco genes alterados y se reevaluarán por RT-PCR en tiempo real cuantitativo como se describió en la sección 5.1.4. La selección de genes se hará bajo los siguientes criterios: a) genes que presenten una disminución o aumento de 2 o más veces en su expresión global o en una de sus isoformas de splicing, conforme al método comparativo $2^{-\Delta\Delta CT}$ y b) genes relacionados con funciones celulares básicas (por ejemplo, organización de citoesqueleto, sistema Ubiquitina-proteosoma, apoptosis o estrés oxidativo, entre otros). El número de cinco genes se definió tomando en consideración el tiempo estimado para la consecución de los objetivos del presente estudio.

5.2 CONSTRUCCIONES DE TAU CON VARIABLE NÚMERO DE DOMINIOS REPETIDOS

Para generar construcciones de Tau 315-441 a las que se les adicionarán segmentos que reconstruyan su extremo amino (incluidos los primeros dominios repetidos), su longitud se estableció de acuerdo a sitios relevantes de proteólisis de Tau que se han reportado en la literatura (Figura 25). Un sitio de importancia es K281-L282, donde este corte es inducido por la acetilación de los residuos de cisteína C291 and C322; sin las cisteínas, no se acetila el residuo de lisina K280, que es un marcador importante en la EA y no ocurre el corte en K281-L282 (Cohen et al., 2016). Otro corte con significado patológico es en R242- L243, producido por calpaína 1 (Matsumoto et al., 2015). El último corte que sería interesante a considerar es en R230-T231. Este corte es generado por calpaína 1 y calpaína 2 (Garg et al., 2011). El sitio T231, es un importante blanco de

fosforilación de Tau en la EA y promueve cambios conformacionales locales en la molécula de Tau

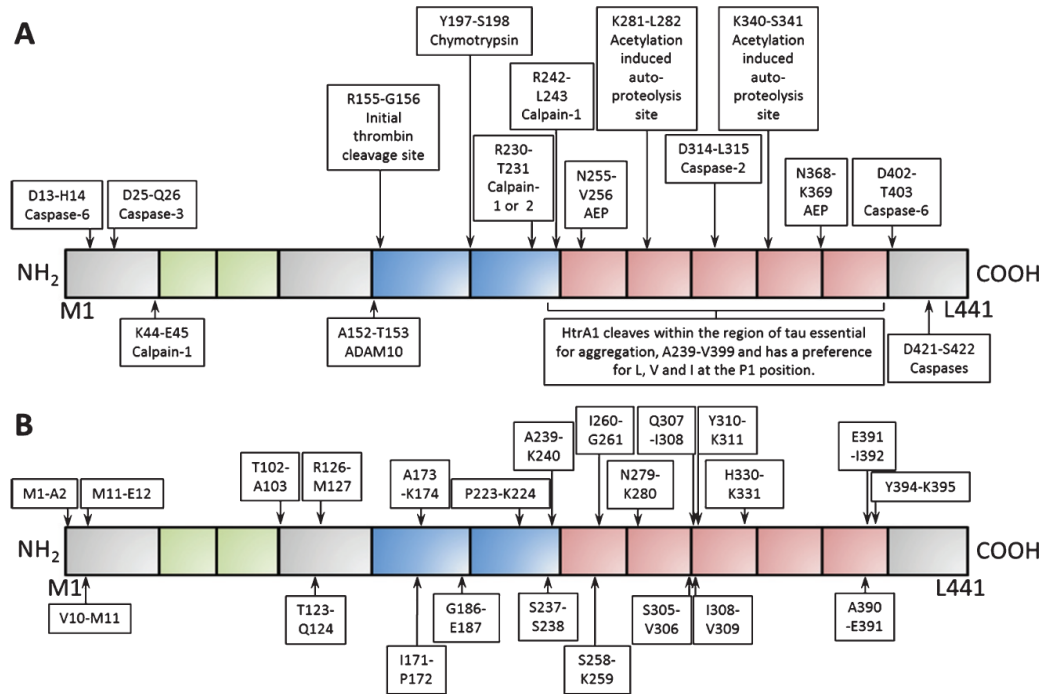


Figura 25. Sitios de proteólisis de Tau. A) Sitios de proteólisis de Tau, cuya proteasa ya ha sido identificada. B) Sitios de proteólisis de Tau, con la proteasa ejecutora aún es desconocida (Quinn et al., 2018).

En función de lo anterior se realizarán las siguientes construcciones, que son el resultado de adicionar dominios relevantes en el extremo amino, a partir de la especie truncada Tau315-441:

A] Tau282-441, la cual inicia en el sitio de corte promovido por la cascada de acetilación del sitio K280. (cohen et al., 2016)

B] Tau243-441, la cual inicia en el sitio de corte R242 por calpaína 1. (Matsumoto et al., 2015)

C] Tau231-441, la cual inicia en el sitio de corte R230 por calpaína 1 o 2. (Garg et al., 2011)

Para la generación de estos fragmentos, se utilizarán los oligonucleótidos descritos en la Tabla 3. Como control de ingreso al núcleo, se utilizará el plásmido que codifica para Tau 315-441, el cual fue preparado previamente en nuestro laboratorio. Todos los oligonucleótidos requerirán de la inserción de metionina para garantizar su expresión. Se usará el software de NCBI “Primer-Blast” para obtener oligonucleótidos que no aparen entre sí y tengan el mismo punto de fusión (Ye et al., 2012). De esta forma se diseñaron los siguientes oligonucleótidos:

TABLA 3. OLIGONUCLEÓTIDOS PARA AMPLIFICAR LOS FRAGMENTOS DEL GEN MAPT PARA GENERAR LAS LÍNEAS CELULARES TRANSITORIAS

	Oligonucleótido sentido 5'	Oligonucleótido antisentido 3'
TAU 282-441	5'-CGC GGA TCC ATG CTG GAT CTG AGC AAC	5'-CGG GAA TTC TCA CAA ACC CTG CTT GGC
TAU 243-441	5'-CGC GGA TCC ATG CTG CAG ACC GCG CCG GTG	5'-CGG GAA TTC TCA CAA ACC CTG CTT GGC
TAU 231-441	5'-CGC GGA TCC ATG ACC CCG CCG AAA AGC CCG	5'-CGG GAA TTC TCA CAA ACC CTG CTT GGC

Con estos fragmentos se utilizará la misma metodología descrita anteriormente, pero se realizará una transfección transitoria sin el tiempo de selección por Geneticina descrito en “5.1.2.4 Transfección estable”

6 REFERENCIAS:

1. Abraha, A., Ghoshal, N., Gamblin, T. C., Cryns, V., Berry, R. W., Kuret, J., & Binder, L. I. (2000). C-terminal inhibition of tau assembly in vitro and in Alzheimer's disease. *Journal of cell science*, 113 Pt 21, 3737–3745
2. Arendt, T., Stieler, J. T., & Holzer, M. (2016). Tau and tauopathies. *Brain research bulletin*, 126(Pt 3), 238–292. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.08.018>
3. Arriagada, P. V., Growdon, J. H., Hedley-Whyte, E. T., & Hyman, B. T. (1992). Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology*, 42(3 Pt 1), 631–639. <https://doi.org/10.1212/wnl.42.3.631>
4. Basurto-Islas, G., Luna-Muñoz, J., Guillozet-Bongaarts, A. L., Binder, L. I., Mena, R., & García-Sierra, F. (2008). Accumulation of aspartic acid⁴²¹- and glutamic acid³⁹¹-cleaved tau in neurofibrillary tangles correlates with progression in Alzheimer disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 67(5), 470–483. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31817275c7>
5. Binder, L. I., Guillozet-Bongaarts, A. L., Garcia-Sierra, F., & Berry, R. W. (2005). Tau, tangles, and Alzheimer's disease. *Biochimica et biophysica acta*, 1739(2-3), 216–223. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2004.08.014>
6. Braak, H., & Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta neuropathologica*, 82(4), 239–259. <https://doi.org/10.1007/BF00308809>
7. Carmel, G., Mager, E. M., Binder, L. I., & Kuret, J. (1996). The structural basis of monoclonal antibody Alz50's selectivity for Alzheimer's disease pathology. *The*

Journal of biological chemistry, 271(51), 32789–32795.
<https://doi.org/10.1074/jbc.271.51.32789>

8. Cohen, T. J., Constance, B. H., Hwang, A. W., James, M., & Yuan, C. X. (2016). Intrinsic Tau Acetylation Is Coupled to Auto-Proteolytic Tau Fragmentation. *PLoS one*, 11(7), e0158470. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158470>
9. Fan, T. J., Han, L. H., Cong, R. S., & Liang, J. (2005). Caspase family proteases and apoptosis. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 37(11), 719–727. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2005.00108.x>
10. Fasulo, L., Ugolini, G., Visintin, M., Bradbury, A., Brancolini, C., Verzillo, V., Novak, M., & Cattaneo, A. (2000). The neuronal microtubule-associated protein tau is a substrate for caspase-3 and an effector of apoptosis. *Journal of neurochemistry*, 75(2), 624–633. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0750624.x>
11. Francisco García-Sierra, Gustavo Basurto-Islas, Jaime Jarero-Basulto, Hugo C. Monroy-Ramírez, Francisco M. Torres Cruz, Hernán Cortés Callejas, Héctor M. Camarillo Rojas, Zdena Kristofikova, Daniela Ripova, José Luna-Muñoz, Raúl Mena, Lester I. Binder and Siddhartha Mondragón-Rodríguez (September 12th 2011). Pathological Stages of Abnormally Processed Tau Protein During Its Aggregation into Fibrillary Structures in Alzheimer's Disease, *Alzheimer's Disease Pathogenesis - Core Concepts, Shifting Paradigms and Therapeutic Targets*, Suzanne De La Monte, IntechOpen, DOI: 10.5772/17077. Available from: <https://www.intechopen.com/books/alzheimer-s-disease-pathogenesis-core->

concepts-shifting-paradigms-and-therapeutic-targets/pathological-stages-of-abnormally-processed-tau-protein-during-its-aggregation-into-fibrillary-struc

12. Gamblin, T. C., Chen, F., Zambrano, A., Abraha, A., Lagalwar, S., Guillozet, A. L., Lu, M., Fu, Y., Garcia-Sierra, F., LaPointe, N., Miller, R., Berry, R. W., Binder, L. I., & Cryns, V. L. (2003). Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(17), 10032–10037. <https://doi.org/10.1073/pnas.1630428100>
13. García-Sierra, F., Ghoshal, N., Quinn, B., Berry, R. W., & Binder, L. I. (2003). Conformational changes and truncation of tau protein during tangle evolution in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, *5*(2), 65–77. <https://doi.org/10.3233/jad-2003-5201>
14. García-Sierra, F., Wischik, C. M., Harrington, C. R., Luna-Muñoz, J., & Mena, R. (2001). Accumulation of C-terminally truncated tau protein associated with vulnerability of the perforant pathway in early stages of neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *Journal of chemical neuroanatomy*, *22*(1-2), 65–77. [https://doi.org/10.1016/s0891-0618\(01\)00096-5](https://doi.org/10.1016/s0891-0618(01)00096-5)
15. Garg, S., Timm, T., Mandelkow, E. M., Mandelkow, E., & Wang, Y. (2011). Cleavage of Tau by calpain in Alzheimer's disease: the quest for the toxic 17 kD fragment. *Neurobiology of aging*, *32*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.09.008>
16. Guo, H., Albrecht, S., Bourdeau, M., Petzke, T., Bergeron, C., & LeBlanc, A. C. (2004). Active caspase-6 and caspase-6-cleaved tau in neuropil threads, neuritic

- plaques, and neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *The American journal of pathology*, 165(2), 523–531. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63317-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63317-2)
17. Hefti, M. M., Kim, S., Bell, A. J., Betters, R. K., Fiock, K. L., Iida, M. A., Smalley, M. E., Farrell, K., Fowkes, M. E., & Crary, J. F. (2019). Tau Phosphorylation and Aggregation in the Developing Human Brain. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 78(10), 930–938. <https://doi.org/10.1093/jnen/nlz073>
18. Ibarra-Bracamontes, V. J., Escobar-Herrera, J., Kristofikova, Z., Rípova, D., Florán-Garduño, B., & Garcia-Sierra, F. (2020). Early but not late conformational changes of tau in association with ubiquitination of neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease brains. *Brain research*, 1744, 146953. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2020.146953>
19. Jarero-Basulto, J. J., Luna-Muñoz, J., Mena, R., Kristofikova, Z., Ripova, D., Perry, G., Binder, L. I., & Garcia-Sierra, F. (2013). Proteolytic cleavage of polymeric tau protein by caspase-3: implications for Alzheimer disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 72(12), 1145–1161. <https://doi.org/10.1097/NEN.0000000000000013>
20. LeBlanc, A., Liu, H., Goodyer, C., Bergeron, C., & Hammond, J. (1999). Caspase-6 role in apoptosis of human neurons, amyloidogenesis, and Alzheimer's disease. *The Journal of biological chemistry*, 274(33), 23426–23436. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.33.23426>
21. Lee, M. J., Lee, J. H., & Rubinsztein, D. C. (2013). Tau degradation: the ubiquitin-proteasome system versus the autophagy-lysosome system. *Progress in neurobiology*, 105, 49–59. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.03.001>

22. Liu, P., Smith, B. R., Huang, E. S., Mahesh, A., Vonsattel, J., Petersen, A. J., Gomez-Pastor, R., & Ashe, K. H. (2019). A soluble truncated tau species related to cognitive dysfunction and caspase-2 is elevated in the brain of Huntington's disease patients. *Acta neuropathologica communications*, 7(1), 111. <https://doi.org/10.1186/s40478-019-0764-9>
23. López Aviña Y. Tesis de Doctorado. Alteración morfológica y del proteoma de células de neuroblastoma que expresan los fragmentos de Tau proteolizada por Caspasa-2
24. Lu, J., Li, T., He, R., Bartlett, P. F., & Götz, J. (2014). Visualizing the microtubule-associated protein tau in the nucleus. *Science China. Life sciences*, 57(4), 422–431. <https://doi.org/10.1007/s11427-014-4635-0>
25. Lu, S., Wang, J., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., Geer, R. C., Gonzales, N. R., Gwadz, M., Hurwitz, D. I., Marchler, G. H., Song, J. S., Thanki, N., Yamashita, R. A., Yang, M., Zhang, D., Zheng, C., Lanczycki, C. J., & Marchler-Bauer, A. (2020). CDD/SPARCLE: the conserved domain database in 2020. *Nucleic acids research*, 48(D1), D265–D268. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz991>
26. Maina, M. B., Bailey, L. J., Wagih, S., Biasseti, L., Pollack, S. J., Quinn, J. P., Thorpe, J. R., Doherty, A. J., & Serpell, L. C. (2018). The involvement of tau in nucleolar transcription and the stress response. *Acta neuropathologica communications*, 6(1), 70. <https://doi.org/10.1186/s40478-018-0565-6>
27. Mandelkow, E., von Bergen, M., Biernat, J., & Mandelkow, E. M. (2007). Structural principles of tau and the paired helical filaments of Alzheimer's disease. *Brain*

pathology (Zurich, Switzerland), 17(1), 83–90. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2007.00053.x>

28. Matsumoto, S. E., Motoi, Y., Ishiguro, K., Tabira, T., Kametani, F., Hasegawa, M., & Hattori, N. (2015). The twenty-four kDa C-terminal tau fragment increases with aging in tauopathy mice: implications of prion-like properties. *Human molecular genetics*, 24(22), 6403–6416. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv351>
29. Mena, R., Edwards, P. C., Harrington, C. R., Mukaetova-Ladinska, E. B., & Wischik, C. M. (1996). Staging the pathological assembly of truncated tau protein into paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica*, 91(6), 633–641. <https://doi.org/10.1007/s004010050477>
30. Miron, M., Woody, O. Z., Marcil, A., Murie, C., Sladek, R., & Nadon, R. (2006). A methodology for global validation of microarray experiments. *BMC bioinformatics*, 7, 333. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-333>
31. Monroy-Ramírez, H. C., Basurto-Islas, G., Mena, R., Cisneros, B., Binder, L. I., Avila, J., & Garcia-Sierra, F. (2013). Alterations in the nuclear architecture produced by the overexpression of tau protein in neuroblastoma cells. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 36(3), 503–520. <https://doi.org/10.3233/JAD-122401>
32. Nandi, D., Tahiliani, P., Kumar, A., & Chandu, D. (2006). The ubiquitin-proteasome system. *Journal of biosciences*, 31(1), 137–155. <https://doi.org/10.1007/BF02705243>
33. Orzáez, M., Gortat, A., Mondragón, L., & Pérez-Payá, E. (2009). Peptides and peptide mimics as modulators of apoptotic pathways. *ChemMedChem*, 4(2), 146–160. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200800246>

34. Quinn, J. P., Corbett, N. J., Kellett, K., & Hooper, N. M. (2018). Tau Proteolysis in the Pathogenesis of Tauopathies: Neurotoxic Fragments and Novel Biomarkers. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, *63*(1), 13–33. <https://doi.org/10.3233/JAD-170959>
35. Raina, A. K., Hochman, A., Zhu, X., Rottkamp, C. A., Nunomura, A., Siedlak, S. L., Boux, H., Castellani, R. J., Perry, G., & Smith, M. A. (2001). Abortive apoptosis in Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica*, *101*(4), 305–310. <https://doi.org/10.1007/s004010100378>
36. Rodríguez-Cruz, F., Torres-Cruz, F. M., Monroy-Ramírez, H. C., Escobar-Herrera, J., Basurto-Islas, G., Avila, J., & García-Sierra, F. (2018). Fragmentation of the Golgi Apparatus in Neuroblastoma Cells Is Associated with Tau-Induced Ring-Shaped Microtubule Bundles. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, *65*(4), 1185–1207. <https://doi.org/10.3233/JAD-180547>
37. Shipley, M. M., Mangold, C. A., & Szpara, M. L. (2016). Differentiation of the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (108), 53193. <https://doi.org/10.3791/53193>
38. Smith, B. R., Nelson, K. M., Kemper, L. J., Leinonen-Wright, K., Petersen, A., Keene, C. D., & Ashe, K. H. (2019). A soluble tau fragment generated by caspase-2 is associated with dementia in Lewy body disease. *Acta neuropathologica communications*, *7*(1), 124. <https://doi.org/10.1186/s40478-019-0765-8>
39. Tang, M., Harrison, J., Deaton, C. A., & Johnson, G. (2019). Tau Clearance Mechanisms. *Advances in experimental medicine and biology*, *1184*, 57–68. https://doi.org/10.1007/978-981-32-9358-8_5

40. Thermo Fisher. GeneChip™ WT Pico Reagent Kit. Published 2018 July 10.
41. Thermo Fisher. Transcriptome Analysis Console (TAC) 4.0.2. Published 2019 January.
42. Torres-Cruz, F. M., Rodríguez-Cruz, F., Escobar-Herrera, J., Barragán-Andrade, N., Basurto-Islas, G., Ripova, D., Ávila, J., & Garcia-Sierra, F. (2016). Expression of Tau Produces Aberrant Plasma Membrane Blebbing in Glial Cells Through RhoA-ROCK-Dependent F-Actin Remodeling. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 52(2), 463–482. <https://doi.org/10.3233/JAD-150396>
43. Troy, C. M., & Shelanski, M. L. (2016). Caspase-2 and tau-a toxic partnership?. *Nature medicine*, 22(11), 1207–1208. <https://doi.org/10.1038/nm.4227>
44. Ulrich, G., Salvadè, A., Boersema, P., Calì, T., Foglieni, C., Sola, M., Picotti, P., Papin, S., & Paganetti, P. (2018). Phosphorylation of nuclear Tau is modulated by distinct cellular pathways. *Scientific reports*, 8(1), 17702. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36374-4>
45. Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics*, 13, 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>
46. Zhang, Y., Chen, X., Zhao, Y., Ponnusamy, M., & Liu, Y. (2017). The role of ubiquitin proteasomal system and autophagy-lysosome pathway in Alzheimer's disease. *Reviews in the neurosciences*, 28(8), 861–868. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2017-0013>

47. Zhang, Y., Goodyer, C., & LeBlanc, A. (2000). Selective and protracted apoptosis in human primary neurons microinjected with active caspase-3, -6, -7, and -8. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(22), 8384–8389. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-22-08384.2000>
48. Zhao, X., Kotilinek, L. A., Smith, B., Hlynialuk, C., Zahs, K., Ramsden, M., Cleary, J., & Ashe, K. H. (2016). Caspase-2 cleavage of tau reversibly impairs memory. *Nature medicine*, 22(11), 1268–1276. <https://doi.org/10.1038/nm.4199>