

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

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Estudio del secuestro del factor de splicing hnRNPA2B1 y su impacto en la
patogénesis de la Ataxia Espinocerebelar tipo 7 (SCA7)”**

Tesis que presenta

Q.B.C. Fernando Alberto Lizárraga Saavedra

Para obtener el Grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

En la Especialidad de

GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Directores de la Tesis:

Dr. José Manuel Hernández Hernández

Dr. Oscar Hernández Hernández

Ciudad de México

Agosto, 2024

Dedicatoria

A cada miembro de mi amada familia, especialmente a mi madre Miriam Saavedra Martínez, a mi padre Ulises Lizárraga Corona, y a mi hermano Jesús Ulises Lizárraga Saavedra, porque no tengo palabras para expresarles mi total y profundo agradecimiento por todo el apoyo, amor y palabras de aliento que me han brindado desde el momento en que llegué a este mundo, este logro también es de ustedes, los amo con todo mi corazón.

A mis abuelos maternos Enrique Saavedra Galván † y María Celia Martínez Yescas y a mis abuelos paternos Martha Corona Méndez † y Ulises Lizárraga Sotelo, quienes siempre me han apoyado en mi crecimiento académico y personal, les estaré agradecido eternamente.

A mi amada compañera de vida Carmen Guadalupe Manzanarez Quin, por ser una inspiración a siempre ser una mejor persona, por tu comprensión, apoyo y amor incondicional y por ser mi refugio en momentos difíciles, sin tus palabras de aliento este trabajo no hubiese sido tan alegre como tú lo hiciste, te amo y siempre tendrás un lugar en mi corazón.

Agradecimientos

Agradezco al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por el apoyo económico otorgado durante la realización de mis estudios de maestría a través de la beca: 2022-000018-02NACF-12982 y por el financiamiento **FORDECYT PRONACES/2472263/2020**.

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV) por darme la oportunidad de aprovechar sus recursos e instalaciones para poder realizar mi posgrado.

Al Centro de Investigación sobre el Envejecimiento (CIE) por permitirme ingresar a sus instalaciones y hacer uso de sus equipos.

Al Instituto Nacional de Rehabilitación (INR) por su apoyo y colaboración con recursos y equipo de laboratorio durante el desarrollo de mi investigación.

Al Dr. José Manuel Hernández Hernández por haber sido un pilar importante en mi desarrollo académico y personal al darme la oportunidad de integrarme en su equipo de trabajo, por su orientación, apoyo y recomendaciones durante el desarrollo de este trabajo, gracias por compartirme sus conocimientos y tomarse el tiempo para escucharme.

Al Dr. Óscar Hernández Hernández por su apoyo como co-director durante el desarrollo de mi tesis, por haberse tomado el tiempo para guiarme y asistir a mis seminarios, así como también por haber aportado recursos de su laboratorio.

A mis asesores de tesis, Dr. Bulmaro Cisneros Vega y Dr. José Efraín Garrido Guerrero, por sus aportaciones y recomendaciones para el desarrollo del presente trabajo y por su retroalimentación en cada una de mis evaluaciones.

A la Dra. María Luisa Benítez Hess, auxiliar de laboratorio de investigación, por su apoyo técnico y disposición para la elaboración de soluciones del laboratorio, así como también sus consejos para el desarrollo de mis experimentos.

A la Dra. Tzindilú Molina Muñoz, por todas las ocasiones en que me apoyó y brindó tiempo para el uso del microscopio confocal, por haber compartido sus reactivos y equipo de laboratorio, así como por sus valiosos consejos académicos y personales, gracias por escucharme.

A mi padre Ulises Lizárraga Corona, por su apoyo emocional y económico durante toda mi vida, por haberme enseñado el valor del esfuerzo y trabajo desde pequeño y por enseñarme una mejor forma de disfrutar la vida, por enfrentar y haber tenido la perseverancia necesaria para terminar con tu enfermedad con un impacto positivo en nuestras vidas, te estaré eternamente agradecido por tu confianza en mis capacidades y el amor que siempre me compartes, te amo.

A mi madre Miriam Saavedra Martínez, por su amor, preocupación y esfuerzo por asegurar que tenga lo mejor en mi vida, por todo su apoyo emocional y económico para poder cumplir mis sueños y metas, por ser una excelente madre y poder contarte mis más grandes secretos con alegría, gracias por ser un pilar muy importante de mi inspiración y mis deseos de salir adelante, te amo.

A mi hermano Jesús Ulises Lizárraga Saavedra, por ser un ejemplo a seguir y por haber compartido sus conocimientos durante toda la vida, especialmente durante la licenciatura, gracias por siempre compartir conmigo tus éxitos, aconsejarme y alegrarte por mis logros, tu influencia ha sido invaluable para este trabajo, te amo.

A mis abuelos Martha Corona Méndez†, Ulises Lizárraga Sotelo, Enrique Saavedra Galván † y María Celia Martínez Yescas por todo su cariño y apoyo compartido durante toda la vida, especialmente por inspirarme a salir de mi zona de confort y comenzar mis viajes académicos fuera de mi ciudad de origen, gracias por su amor.

A mi tía Martha Lyvia Lizarraga Corona, por apoyarme durante mi trayectoria académica y estar presente en el festejo de mis logros.

A mi pareja Carmen Guadalupe Manzanarez Quin, a quien agradezco haber conocido en el momento perfecto de mi vida, te agradezco por todo tu apoyo y desvelo junto a mi desde el comienzo de nuestros proyectos de investigación, por tus palabras de aliento y tu luz que alegran cada uno de mis días, por ser mi amiga, mi pareja y mi compañera de aventuras, te amo.

A mi cuñada Nitza Marina Martínez Almanza, por ser una integrante muy importante en la familia y siempre haberme apoyado en mi trayectoria académica y personal, por alentarme a perseguir mis sueños y por compartir su cariño y amor.

A mis mascotas Frank† y Togo, quienes a pesar de no entender este mensaje en texto, agradezco por haber sido una alegría en mi hogar, por desvelarse junto a mi durante mis estudios, brindándome no solo compañía, si no también un refugio emocional, lealtad y sonrisas.

A mi compañera y amiga de laboratorio Ana Victoria Arredondo Robles, por su apoyo y amistad durante el posgrado, por los días de café, tacos y dibujos que adornan mi espacio de trabajo, gracias por hacer este periodo más alegre.

A mis compañeros y amigos de maestría, especialmente a Raúl Eduardo Loreda Puerta, Angelica Soberano Nieto, Mariel Alexis Quiven Feria, Marco Jácome del Ángel, Daniel Eduardo Nieblas Peña, María Fernanda Serrato Trejo y María Fernanda Herrera Rojas, Sofia Gabriela Tomás Morales, Hiram Miguel Vega Guerrero, Martha Susana Camargo Tavares y Cristian Gustavo Zuppa Gutiérrez y Noemí del Socorro Lázaro Pérez.

A mis compañeros y amigos de laboratorio Amairani Cancino Bello, Daniel Ávila Avilés, Magaly Ramírez Ramírez, Jaime Issai Falcón Solis, Misael Sánchez Morales, Mauricio Hernández Somilleda, Erick Bahena Culhuac y Manuel Gutierrez Rodriguez, por su colaboración y consejos en los seminarios a lo largo de este proyecto, así como también por su valiosa amistad fuera del laboratorio.

A mis vecinos de laboratorio Martin López Rico y Luis Gómez Gómez por las pláticas en el pasillo sobre nuestros avances de investigación y por la amistad que construimos en poco tiempo, gracias por todos los momentos en que compartimos festejos, café y pasteles.

A todos los integrantes de mi equipo de softball Jalisco por permitirme tener un equilibrio entre lo académico y el bienestar personal, gracias por compartir risas, derrotas y victorias en el campo, y por ayudarme a mantener una perspectiva saludable mientras enfrentaba los desafíos de esta etapa académica.

Por último y no menos importante, a mis amigos Rodrigo, María, Marlon, Luis, Miguel, Sadjed, Paola, Raul, Marcos, Victor, Sebastián, Laura y Luis, por brindarme su apoyo y amistad, haciendome sentir como en casa durante mi estancia en la Ciudad de México, gracias por esos momentos de convivencia asando carne, viendo juegos de soccer y football americano y por sus palabras de aliento.

ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA	2
AGRADECIMIENTOS	3
ÍNDICE DE FIGURAS	8
ÍNDICE DE TABLAS	9
ABREVIATURAS	10
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUCCIÓN	13
1.1 ENFERMEDADES POLIGLUTAMÍNICAS	13
1.2 ATAXIA ESPINOCEREBELOS A TIPO 7	14
1.3 EPIDEMIOLOGÍA	15
1.4 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	15
1.5 PATOGÉNESIS DE SCA7	17
2. ANTECEDENTES	19
2.1 AGREGADOS DE ATXN7 EN ATAXIA ESPINOCEREBELOS A DE TIPO 7	19
2.2 PAPEL DE LAS RIBONUCLEOPROTEÍNAS HETEROGÉNEAS NUCLEARES (hnRNPs) EN LAS ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS	21
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. HIPÓTESIS	24
5. OBJETIVOS	25
5.1 OBJETIVO GENERAL	25
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES	25
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	26
7. MATERIALES Y MÉTODOS	27
7.1 CULTIVO CELULAR	27
7.2 EXTRACCIÓN DE RNA	27
7.3 RT-PCR	28
7.4 PCR PUNTO FINAL Y ANÁLISIS DE <i>SPLICING</i>	29
7.5 WESTERN BLOT	31

7.6 HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i> FLUORESCENTE DE RNA (RNA-FISH)	33
7.7 HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i> FLUORESCENTE ACOPLADA A INMUNOFLUORESCENCIA (INMUNO-FISH)	33
7.8 TRANSFECCIÓN TRANSITORIA	34
7.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	36
8. RESULTADOS	37
8.1 LAS CÉLULAS MIO-M1 Q10 Y Q64 EXPRESAN EFICIENTEMENTE ATAXINA-7 MUTANTE.	37
8.2 EL ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE hNRNPA2B1 NO REVELA CAMBIOS SIGNIFICATIVOS.....	38
8.3 PRESENCIA DE AGREGADOS DE MRNA-ATXN7 EN CÉLULAS MIO-M1 Q64.	42
8.4 INTERACCIÓN DE hNRNPA2B1 CON AGREGADOS DE MRNA-ATXN7 EN CÉLULAS MIO-M1 Q64.....	43
8.5 hNRNPA2B1 CO-LOCALIZA CON AGREGADOS DE MRNA-ATXN7 MEDIANTE EXPRESIÓN TRANSITORIA.	44
8.6 EL SECUESTRO DE hNRNPA2B1 EN MRNA-ATXN7 INDUCE CAMBIOS DE <i>SPLICING</i> DE SLC17A7.	46
9. DISCUSIÓN	47
10. CONCLUSIÓN.....	50
11. REFERENCIAS	51

Índice de figuras

FIGURA 1. MECANISMOS DE PATOGÉNESIS DE SCA7.....	17
FIGURA 2. COMPLEJO SAGA.....	18
FIGURA 3. MODELO INDUCIBLE MIO-M1.....	19
FIGURA 4. ANÁLISIS PROTEÓMICO DE LOS AGREGADOS DE ATXN7 EN SCA7.	20
FIGURA 5. ANÁLISIS PROTEÓMICO DE LOS AGREGADOS DE ATXN7 EN SCA7.	21
FIGURA 6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.	26
FIGURA 7. CONDICIONES Y PASOS PARA LA PCR PUNTO FINAL.....	30
FIGURA 8. INTEGRIDAD DE RNA EN GEL DE AGAROSA 1%.....	37
FIGURA 9. EXPRESIÓN DE ATAXINA-7 EN CÉLULAS MIO-M1 Q10 Y Q64.	38
FIGURA 10. CURVA DE CALIBRACIÓN DE BSA.	39
FIGURA 11. TINCIÓN DE GEL DE POLIACRILAMIDA CON AZUL DE COOMASSIE.....	40
FIGURA 12. TINCIÓN DE MEMBRANA PVDF CON PONCEAU S.	40
FIGURA 13. WESTERN BLOT DE HNRNPA2B1.....	41
FIGURA 14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA EXPRESIÓN DE HNRNPA2B1.	41
FIGURA 15. RNA-FISH Q10.....	42
FIGURA 16. RNA-FISH Q64.....	42
FIGURA 17. INMUNO-FISH Q10.....	43
FIGURA 18. INMUNO-FISH Q64.....	43
FIGURA 19. DIGESTIÓN ENZIMÁTICA CON NHEI.	44
FIGURA 20. EXPRESIÓN TRANSITORIA DE ATAXINA-7.	45
FIGURA 21. EVALUACIÓN DEL <i>SPLICING</i> DE SLC17A7.....	46
FIGURA 22. ANÁLISIS POR DENSITOMETRÍA % DE EXCLUSIÓN DE EXÓN.....	46

Índice de tablas

TABLA 1. SOLUCIÓN A CON PARÁMETROS PARA RT-PCR.....	28
TABLA 2. SOLUCIÓN B CON PARÁMETROS PARA RT-PCR.....	28
TABLA 3. SECUENCIAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS PARA PCR PUNTO FINAL.	29
TABLA 4. PARÁMETROS PARA PCR PUNTO FINAL DE ATAXINA-7 MUTANTE.	29
TABLA 5. PARÁMETROS PARA PCR PUNTO FINAL DE SLC17A7.....	30
TABLA 6. PARÁMETROS PARA PCR PUNTO FINAL DE TBP.....	30
TABLA 7. COMPONENTES PARA LA PREPARACIÓN DE GEL SEPARADOR AL 10 %.	31
TABLA 8. COMPONENTES PARA LA PREPARACIÓN DE GEL CONCENTRADOR AL 3.9 %.....	32
TABLA 9. COMPONENTES PARA LA DIGESTIÓN DE PLÁSMIDOS PURIFICADOS.....	35
TABLA 10. SOLUCIONES PARA TRANSFECCIÓN TRANSITORIA.....	35
TABLA 11. DETERMINACIÓN DE VOLUMEN DE PROTEÍNA NECESARIO PARA WESTERN BLOT.	39

Abreviaturas

SCA7 Ataxia Espinocerebelosa Tipo 7

ATXN7 Ataxina-7

PolyQ Poliglutamina

ADCAS Ataxias Cerebelosas Autosómicas Dominantes

SAGA Spt-Ada-Gcn5 acetiltransferasa

HAT Acetiltransferasa de histonas

DUB Desubiquitinasa

TAF Factores asociados a TBP

TBP proteína de unión a TATA

BSA seroalbúmina bovina

hnRPs ribonucleoproteínas heterogêneas nucleares

Resumen

La Ataxia Espinocerebelosa tipo 7 es causada por la expansión de repetidos [CAG] en el gen de ataxina-7. En esta, se forman agregados tóxicos de poliglutamina y ganancia de función de RNA tóxico, formando RNA foci y secuestro de proteínas, entre ellas, factores de *splicing*. Por otro lado, se ha reportado que la disminución de transportadores de glutamato en glía de Bergman altera la captación de glutamato lo cual produce excitotoxicidad y muerte celular. Sin embargo, el efecto de la expansión mutante de ataxina-7 sobre células de glía de retina no está bien documentado. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue analizar el interactoma entre las proteínas asociadas al mRNA y evaluar si el factor de *splicing* HNRNPA2B1 es secuestrado en RNA foci de manera que afecte la expresión de genes blancos que puedan estar involucrados en la patogénesis de SCA7.

Para ello, se utilizó un sistema inducible con doxiciclina de células gliales de retina con 10 y 64 repetidos para conocer que proteínas están asociadas al RNA mutante. Posteriormente, para evaluar la funcionalidad del sistema, se diseñaron oligonucleótidos para analizar la expresión de Ataxina-7 por medio de RT-PCR. Después, se analizó la expresión de la proteína HNRNPA2B1 mediante western blot y seguidamente se analizó su posible retención en agregados de RNA (RNA foci), así como su colocalización con el RNA mensajero mutante de ataxina-7, utilizando la técnica de FISH acoplada a inmunofluorescencia. Por último, se evaluaron los cambios *splicing* sobre genes blanco (SLC17A7) por medio de RT-PCR y densitometría.

Los resultados mostraron que las células MIO-M1 Q10 y Q64 expresan eficientemente ataxina-7 mutante. El interactoma de proteínas asociadas al mRNA de ataxina-7 mutante identificó un clúster de hnRNPs relacionado con el procesamiento de mRNA y enfermedades neurodegenerativas. Por su parte, el ensayo InmunoFISH reveló el secuestro de HNRNPA2B1 con el mRNA mutante en células de 64 repetidos, alterando así el *splicing* alternativo de genes blanco, incluyendo el gen SLC17A7, el cual codifica para VGLUT1, esencial en el transporte de glutamato cerebral. Finalmente, el secuestro de HNRNPA2B1 en agregados de mRNA de ataxina-7 mutante, puede ser un factor clave en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas al afectar el metabolismo del RNA. Además, la alteración del *splicing* alternativo de genes blanco como SLC17A7 podría tener consecuencias en la neurotransmisión y la fisiología neuronal.

Abstract

Spinocerebellar Ataxia type 7 is caused by the expansion of [CAG] repeats in the ataxin-7 gene. In this, toxic polyglutamine aggregates and toxic RNA gain of function are formed, forming RNA foci and protein sequestration, including *splicing* factors. On the other hand, it has been reported that the decrease of glutamate transporters in Bergman glia alters glutamate uptake leading to excitotoxicity and cell death. However, the effect of ataxin-7 mutant expansion on retinal glia cells is not well documented. Therefore, the aim of this study was to analyze the interactome between mRNA-associated proteins and to assess whether the *splicing* factor HNRNPA2B1 is sequestered in RNA foci in a manner that affects the expression of target genes that may be involved in the pathogenesis of SCA7.

For this purpose, a doxycycline-inducible system of retinal glial cells with 10 and 64 repeats was used to learn which proteins are associated with the mutant RNA. Subsequently, to evaluate the functionality of the system, oligonucleotides were designed to analyze the expression of Ataxin-7 by RT-PCR. Next, hnRNPA2B1 protein expression was analyzed by western blot and then its possible retention in RNA aggregates (RNA foci) was analyzed, as well as its colocalization with ataxin-7 mutant messenger RNA, using the FISH technique coupled to immunofluorescence. Finally, *splicing* changes on target genes (SLC17A7) were evaluated by RT-PCR and densitometry.

The results showed that MIO-M1 Q10 and Q64 cells efficiently express ataxin-7 mutant. The ataxin-7 mutant mRNA-associated protein interactome identified a cluster of hnRNPs related to mRNA processing and neurodegenerative diseases. In turn, ImmunoFISH assay revealed sequestration of HNRNPA2B1 with the mutant mRNA in 64-repeat cells, thus altering alternative *splicing* of target genes, including the SLC17A7 gene, which encodes for VGLUT1, essential in brain glutamate transport. Finally, sequestration of HNRNPA2B1 in ataxin-7 mutant mRNA aggregates may be a key factor in the development of neurodegenerative diseases by affecting RNA metabolism. In addition, altered alternative *splicing* of target genes such as SLC17A7 could have consequences on neurotransmission and neuronal physiology.

1. Introducción

1.1 Enfermedades poliglutamínicas

Las enfermedades poliglutamínicas (PolyQ) son un grupo de enfermedades hereditarias que se presentan cuando hay un incremento en el número de repeticiones en el triplete CAG (más de 35-40 repeticiones) (Bunting et al., 2022). Las expansiones nucleotídicas pueden estar presentes tanto en secuencias codificantes como en secuencias no codificantes (Minakawa & Nagai, 2021). Sin embargo, las encontradas en la región codificante de algún gen, son causantes de diferentes enfermedades que se caracterizan por ser enfermedades multisistémicas, especialmente neurológicas y neurodegenerativas (Mederos et al., 2003).

Los principales efectos que causan son: desde la inactivación de un gen hasta alteraciones en el transporte del mRNA y/o en la síntesis proteica, ya que se traduce en la expansión de una región PolyQ en el producto proteico resultante (McLoughlin et al., 2020). Así como también, la pérdida progresiva de células neuronales en las regiones dentro de los cerebros o las médulas espinales que son específicas de cada enfermedad. Sin embargo, los pacientes que padecen enfermedades PolyQ presentan características diferenciales, en cuanto a su cuadro clínico y pronóstico (Mederos et al., 2003).

Esto se debe a que sufren diversos trastornos motores, cognitivos y psiquiátricos que dependen de las regiones del sistema nervioso afectadas en cada enfermedad (Mederos et al., 2003). Dentro de este grupo de enfermedades tenemos al menos 10 diferentes que incluyen: la Enfermedad de Huntington (HD), la Atrofia Muscular Espinobulbar (SBMA), la Atrofia Dentado-Rubro-Pálido Luysiana (DRPLA), y las Ataxias Espinocerebelosas (SCA) tipo 1, 2, 3, 6, 7, 12, y 17, principalmente (Minakawa & Nagai, 2021).

1.2 Ataxia Espinocerebelosa tipo 7

La ataxia espinocerebelosa tipo 7 (SCA7, por sus siglas en inglés) es una enfermedad neurodegenerativa que pertenece a la gran familia de las ataxias cerebelosas autosómicas dominantes (ADCAs). Las ADCA son un grupo de trastornos poco frecuentes con una prevalencia de 0,3 a 2 por 100.000 habitantes y se caracterizan patológicamente por una atrofia prominente del cerebelo, el tronco encefálico y la médula espinal. Además, junto con degeneración a nivel variable de otras regiones cerebrales (Zoghbi & Orr, 2000).

Se clasifican en tipos I, II y III. El tipo I se caracteriza por ataxia cerebelosa asociada a características neurológicas variables y el tipo III por ataxia cerebelosa pura. Por su parte, el tipo II que es donde se incluye a SCA 7, se distingue clínicamente por la presencia adicional de una maculopatía pigmentaria (Hammans, 1996; Niewiadomska-Cimicka & Trottier, 2019). SCA 7 es una de las ataxias menos frecuente, que se descubrió por primera vez en 1937. El gen responsable de esta patología se mapeó en el cromosoma 3p12-21.1, consta de 13 exones que abarcan 140 kb de ADN genómico y codifica el gen ATXN7 que alberga un tramo polimórfico PolyQ en el amino-terminal, que al plegarse vuelven tóxica a la proteína ataxina-7 (Borbolla-Jiménez et al., 2023).

Los alelos de tipo salvaje de ATXN7 tienen 4-35 repeticiones CAG siendo entre un 70-80% que llevan 10 CAG, lo que se considera normal. Los alelos con 28-35 CAG son normales, pero son dados a expandirse por transmisión paterna y son responsables de la rara mutación presente en SCA7 (Niewiadomska-Cimicka & Trottier, 2019). Por otro lado, los alelos con 34 a 36 repeticiones, se asocian con síntomas tardíos y leves de la enfermedad; mientras que en pacientes con SCA7, los alelos mutantes comunmente tienen 36 a 55 repeticiones CAG y son responsables de la forma clásica de inicio en la edad adulta, que progresa durante décadas hasta la muerte (Karam & Trottier, 2018).

Las repeticiones mayores a 70 CAG, son típicamente responsables de las formas de inicio juvenil con un curso acelerado de la enfermedad; mientras que las repeticiones extremadamente grandes (> 100 CAG), pudiendo incluso alcanzar más de 460, causan formas infantiles graves que conducen a la muerte en pocos años o meses (La Spada, 2020). Por lo tanto, su longitud está inversamente correlacionada con la edad de aparición y la duración de la enfermedad. SCA 7 representa entre el

1 y el 11,7 % de todos los casos de ataxias cerebelosas autosómicas dominantes diagnosticadas genéticamente en todo el mundo. Sin embargo, la frecuencia de SCA7 es mayor donde se han observado efectos fundadores locales como es el caso de Escandinavia, Sudáfrica, Zambia y México (Karam & Trottier, 2018).

1.3 Epidemiología

La prevalencia de SCA7 es inferior a 1:300.000, siendo predominante en dos grupos raciales de población: los europeos del norte y los africanos (Filla et al., 2000). De hecho, la SCA7 al igual que la enfermedad de Huntington tipo 2, son las únicas enfermedades de expansión de nucleótidos, con un gran número de individuos afectados de ascendencia racial africana. En el caso de México, como resultado de un efecto fundador que se remonta a la época colonial, existen una gran concentración de personas con SCA7 en el estado de Veracruz, con más de 150 individuos afectados registrados (La Spada, 2020).

La zona centro del estado, específicamente los municipios de Tlaltetela, Limones, Cosautlán, Tuzamapan y Teocelo, albergan una prevalencia de 423 por cada 100,000 habitantes, convirtiéndola en la prevalencia más alta del mundo reportada para esta enfermedad en 2020 (Rodríguez-Labrada et al., 2020). Los portadores de SCA7 en México comparten un haplotipo común llamado A-254-82-98, que contiene los marcadores genéticos 3145G/A, D3S1287, y D3S3635, lo que es un fuerte indicador de un efecto fundador (Magaña et al., 2014). Además, se identificó que dicho haplotipo compartido tiene mayor afinidad con poblaciones europeas. Por lo que se mantiene la hipótesis de la presencia de un efecto fundador asociado a la llegada de una persona con SCA7 de origen europeo.

1.4 Características clínicas

La aparición de los síntomas y su severidad están relacionados con el número de repeticiones CAG en el alelo afectado, por lo que los síntomas pueden variar dependiendo del caso. Las grandes expansiones de repetidos están asociadas con una aparición temprana de la enfermedad y causan pérdida visual antes que ataxia cerebelosa. Por otro lado, la ataxia es la primera manifestación

cuando se presentan expansiones más cortas y estas se asocian con una aparición de la enfermedad en la adolescencia o la edad adulta (Karam & Trottier, 2018).

Los signos neurológicos clásicos en pacientes adultos con SCA7 son, ataxia de la marcha, que progresa a ataxia de las extremidades y degeneración de la retina. Los síntomas más comunes incluyen, disartria (dificultad en el habla), disfagia (dificultad para tragar), dismetría (diferencias en la longitud de las extremidades) y disdiadocinesia (dificultad para realizar movimientos rápidos y alternados). Así como también, lentitud de movimientos oculares, oftalmoplejía, pérdida de la sensibilidad y deterioro de los conos de la retina que conlleva a una pérdida gradual y completa de la visión. Siendo SCA7 la única ataxia espinocerebelosa que causa ceguera en las personas que padecen la enfermedad (Zapata, 2013).

También se han descrito pacientes con SCA7 con dificultades para atribuir emociones y con deterioro cognitivo que afecta a la memoria verbal y a la fluidez (Moriarty et al., 2016). También se ha propuesto, que el componente extracerebeloso de la SCA7 explica los cambios repentinos en el tono muscular laríngeo, produciendo inestabilidad en la voz. Sin embargo, como ocurre con muchos trastornos neurodegenerativos, la precisión de la evaluación clínica tiene limitaciones debido a la variación en la edad de aparición y la velocidad de progresión de la enfermedad (La Spada, 2020).

Los signos y síntomas de la enfermedad pueden presentarse en la infancia, la niñez, la adolescencia, la juventud, la mediana edad o la vejez. La edad de inicio se correlaciona inversamente con la tasa de progresión y el alcance de la sintomatología; ya que el inicio alrededor de los 50 años o después, da lugar a una ataxia cerebelosa predominante, sin progresión a una discapacidad visual significativa. Por lo contrario, si el inicio se da antes de la mediana edad, suele presentar progresión a pérdida de visión y una discapacidad grave con resultado de muerte (Zapata, 2013).

1.5 Patogénesis de SCA7

La patología está causada por una expansión inestable de la repetición CAG que codifica un tramo PolyQ en Ataxina-7 (ATXN7). La expansión PolyQ en ATXN7 se traduce en un tracto de poliglutamina anormalmente largo en la proteína mutante. Confiéndole propiedades tóxicas que conducen a una degeneración neuronal selectiva en el cerebelo, el tronco cerebral y la retina (Niewiadomska-Cimicka & Trotter, 2019).

En la actualidad, se han propuesto una serie de mecanismos patogénicos comunes (Fig. 1) para explicar la toxicidad de la proteína PolyQ. Dentro de estos se incluyen, la escisión proteolítica (que conduce a la producción de fragmentos tóxicos), el deterioro de la vía ubiquitina-proteasoma, la agregación de la proteína mutante (que implica el secuestro de la proteína PolyQ de tipo salvaje y otros componentes celulares importantes), la desregulación de la transcripción y la disfunción mitocondrial (Watson et al., 2016).

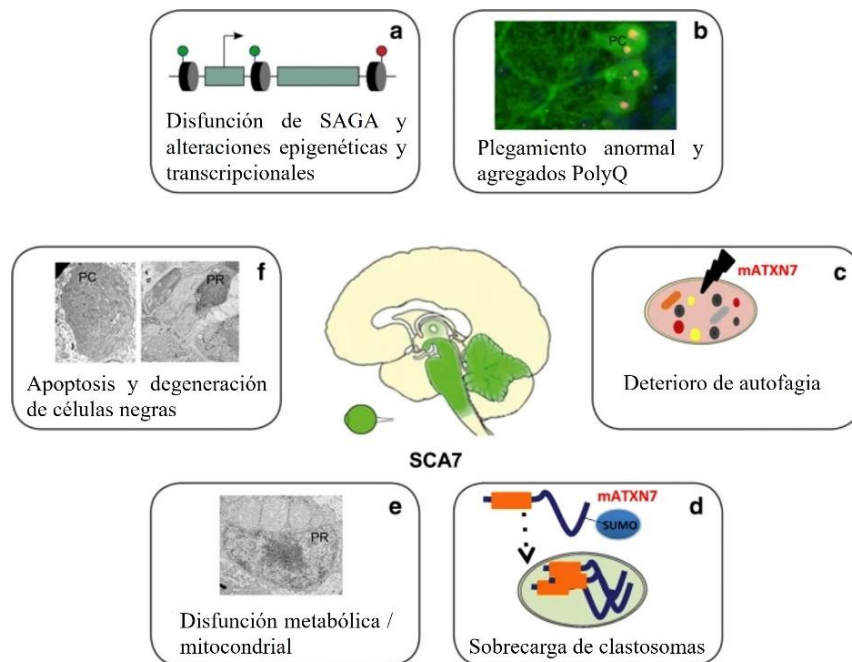


Figura 1. Mecanismos de patogénesis de SCA7. Se ilustran algunos de los mecanismos de patogénesis más estudiados en SCA7. Modificado de Niewiadomska-Cimicka et al., 2019.

La proteína ATXN7 de tipo salvaje se expresa de forma ubicua, y se ha demostrado que desempeña un papel importante en la regulación transcripcional como componente de un complejo coactivador transcripcional conocido como complejo SAGA (Fig. 2), el cual está compuesto por cuatro módulos principales: el módulo SPT, que constituye la estructura del núcleo; el módulo TAF, que interactúa con la maquinaria de transcripción; el módulo HAT, que incluye la histona acetiltransferasa KAT2A/KAT2B; y el módulo DUB, que contiene las enzimas de desubiquitinación USP22, ATXN7, ATXN7L3 y ENY2. Sin embargo, la mutación en ATXN7 (mATXN7) altera las funciones epigenéticas de SAGA, ya sea al integrarse en el complejo o al secuestrar componentes de SAGA en inclusiones nucleares, lo que resulta en una desregulación de la transcripción (Niewiadomska-Cimicka & Trotter, 2019).

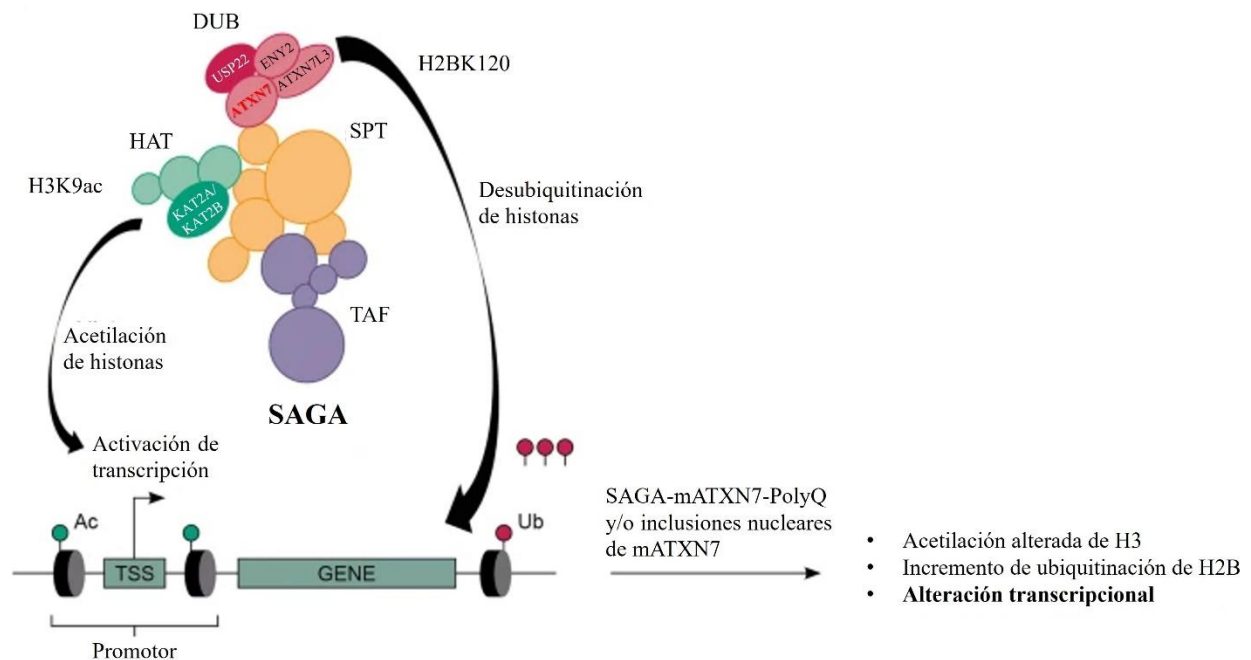


Figura 2. Complejo SAGA. Se ilustra los módulos del complejo coactivador transcripcional, ATXN7 se ubica marcado en color rojo en el módulo DUB.

2. Antecedentes

2.1 Agregados de ATXN7 en Ataxia Espinocerebelosa de tipo 7

Con el fin de buscar el impacto de los agregados CAG en ATXN7, Suárez y colaboradores en 2023, generaron un modelo inducible para SCA7 basado en células glía de Müller, debido al papel esencial de la glía en la salud de la retina. Este modelo utiliza el sistema Tet-On 3G, en donde, mediante la adición de doxiciclina, un transactivador se une de forma específica al promotor pTRE3G, que a su vez activa la transcripción de ATXN7. Para emular los efectos de la patología en el modelo, se utilizaron construcciones en donde ATXN7 presentó 10 (MIO-M1-Q10) y 64 repetidos (MIO-M1-Q64). Con este enfoque, se identificaron foci nucleares y citoplasmáticos, así como alteraciones en el empalme alternativo (Fig. 3).

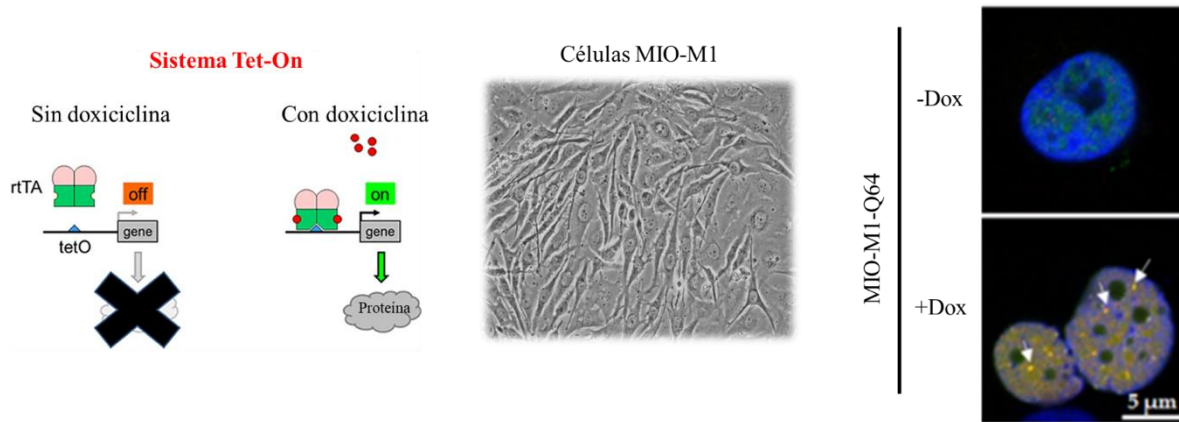


Figura 3. Modelo inducible MIO-M1. Estrategia metodológica del modelo de estudio para SCA7 utilizando células de Glía de Müller (MIO-M1), con 10 y 64 repetidos. A la derecha, se observa la presencia de agregados, consistentes con la patología de SCA7. Modificado de Suárez et al, 2023.

Por otro lado, Ávila-Avilés en 2022 (datos no publicados), basándose en previas publicaciones, recuperó los complejos asociados al mRNA de Ataxina-7 mediante un proceso de entrecruzamiento e hibridación con biotín-oligos dirigidos hacia el mRNA mutante. Los complejos fueron analizados mediante espectrofotometría de masas. Del análisis proteómico obtenido, y los análisis de ontología génica correspondientes, resaltaron dos agrupaciones (Fig. 4): una de ellas contenía factores relacionados con procesos de óxido reducción y respuesta a estrés oxidativo; el segundo, contenía factores cuya participación resulta importante para el proceso de *splicing* de mRNA. En

este segundo clúster, se identificó como factor de importancia a la ribonucleoproteína heterogénea nuclear A2/B1 (hnRNPA2B1) (Fig. 5).

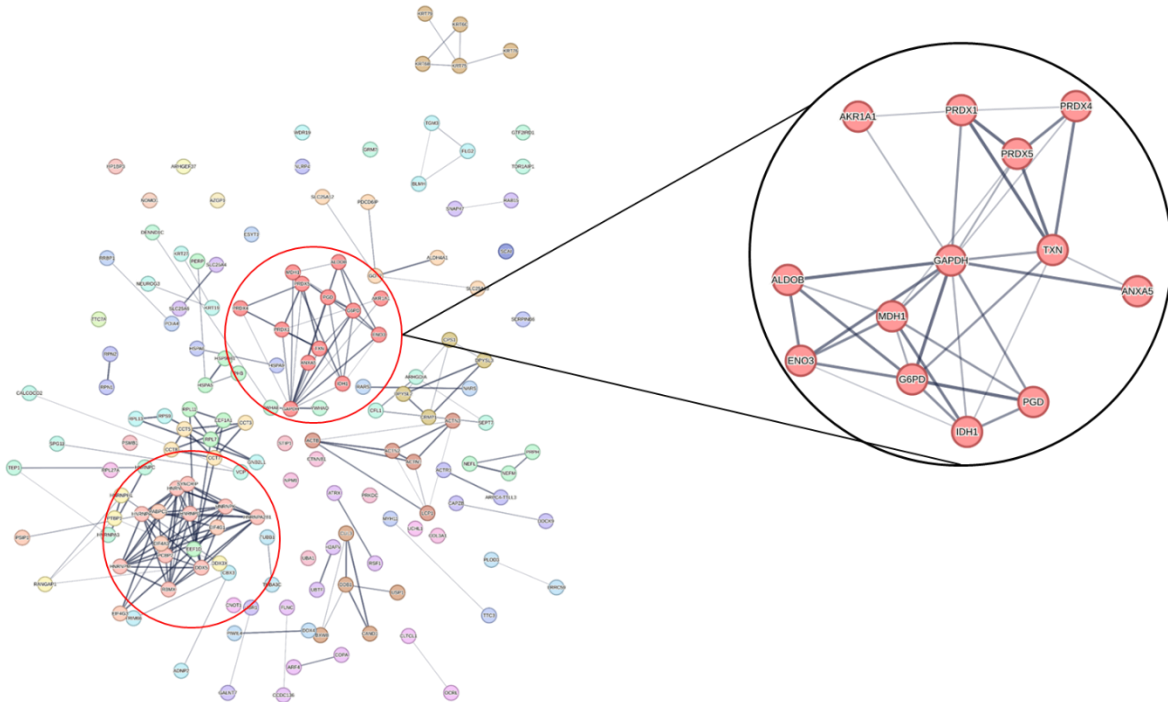


Figura 4. Análisis proteómico de los agregados de ATXN7 en SCA7. Se muestran los dos principales clústers encontrados en el análisis. En acercamiento, se muestra el clúster 1, relacionado con estrés oxidativo. Modificado de Ávila-Avilés (datos no publicados).

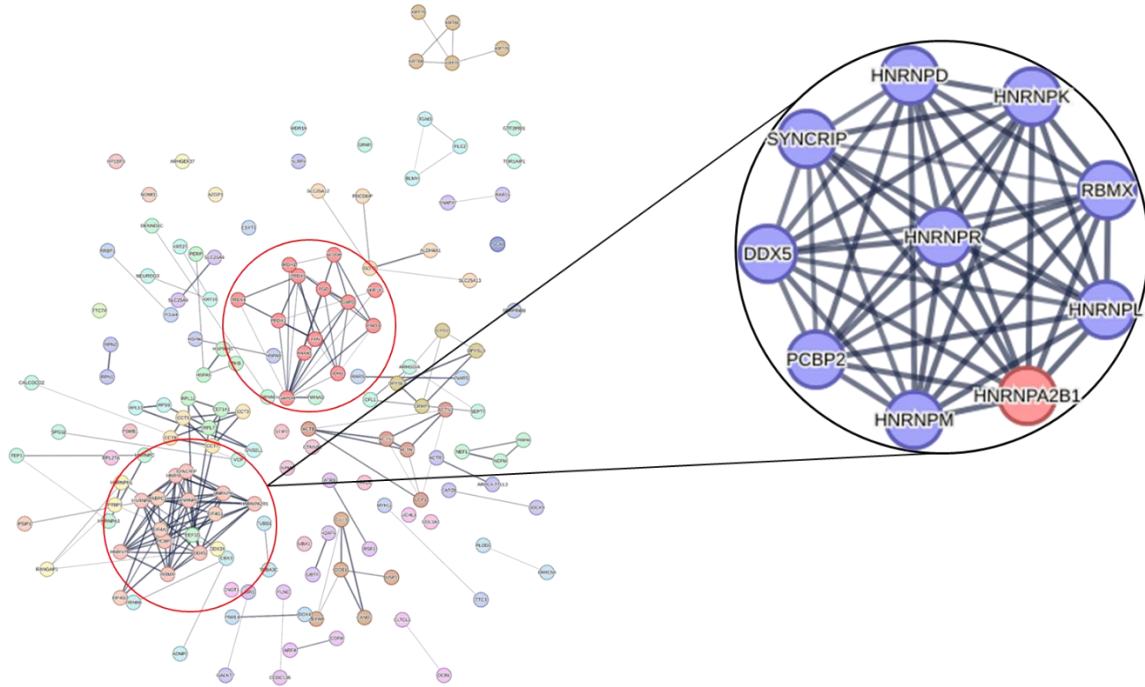


Figura 5. Análisis proteómico de los agregados de ATXN7 en SCA7. Se muestran los dos principales clústers encontrados en el análisis. En acercamiento, se muestra el clúster 2, relacionado con los procesos de empalme alternativo. En rojo, se señala a hnRNPA2B1. Modificado de Ávila-Avilés (datos no publicados).

2.2 Papel de las ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (hnRNPs) en las enfermedades neurodegenerativas

Las ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (hnRNPs) son proteínas con la capacidad de unirse a los transcritos primarios de los genes blanco. Son importantes para el procesamiento, maduración y transporte de los RNAs nucleares (Brandão-Teles et al., 2024). Asimismo, son mediadores del reconocimiento de sitios de *splicing* en las primeras etapas de la definición de exones (Busch & Hertel, 2012). Por otro lado, la evidencia reciente ha demostrado que diversos hnRNPs pueden tener un papel importante en la patogenia de algunas condiciones neurodegenerativas y psiquiátricas (Brandão-Teles et al., 2024).

En 2019, Mori y colaboradores, mostraron que, en inclusiones intranucleares presentes en neuronas afectadas con la enfermedad de Huntington, se reclutan diversas proteínas relacionadas con el *splicing* de RNA, en especial, hnRNPs. Además, evidenciaron que este secuestro conlleva a alteraciones severas en el procesamiento de mRNA's, lo que podría contribuir a la degeneración neuronal en la enfermedad. Por otra parte, se ha identificado que la disfunción de hnRNPA1 resulta en alteraciones en la unión de blancos, provocando un proceso aberrante de empalme alternativo que contribuye a la neurodegeneración en la Esclerosis Múltiple (Salapa et al., 2024).

Así mismo, Martínez y colaboradores en 2016 demostraron que la pérdida de este factor (HnRNPA2B1), resulta en empalme alternativo, provocando la pérdida de un exón dentro del gen que codifica para la D-aminoácido oxidasa (DAO), implicado en el metabolismo de la D-serina. Este cambio, puede ser relevante para la neurodegeneración observada en condiciones como la Esclerosis Lateral Amiotrófica.

Por otro lado, debido a los mecanismos en los que participan las hnRNP's, su rol es crucial en enfermedades neurodegenerativas, ya que se ha reportado que el factor de *splicing* hnRNPA2B1 participa en el procesamiento y estabilidad de los mRNA diana (Brandão-Teles et al., 2024). Debido a esto, en el sistema de 64 repetidos podría llevarse a cabo un secuestro en agregados de mRNA que pueden influir sobre la actividad de esta proteína, tal como lo reportan Martínez y colaboradores en 2016. Además, estos autores mostraron que tras la delección de dicho factor se alteran 137 eventos de *splicing*, de los cuales, la alteración del exón 10 del gen SLC17A7 fue de nuestro interés. Esto se debe a que codifica para la proteína VGLUT1, cuyas funciones celulares como transportador vesicular de glutamato, podría ser un mecanismo por el cual SCA7 se vea afectada en un modelo de células gliales, provocando excitotoxicidad celular.

3. Justificación

A pesar de que la ataxia espinocerebelosa tipo 7 (SCA7) es un trastorno neurodegenerativo con poca prevalencia a nivel mundial, en México hay una alta prevalencia debido al efecto fundador, aunado a lo anterior actualmente no existe algún tratamiento para esta patología. Por lo anterior, estudiar los mecanismos patológicos sobre la ganancia de función de RNA resulta provocativo dado que ya se han reportado que dichos mecanismos pueden afectar de manera significativa enfermedades neurodegenerativas, cuestión que no ha sido estudiada a profundidad con SCA7.

Por otro lado, estudiar el posible secuestro de un factor que participe en el *splicing* y que pueda tener influencia en SCA7 resulta crucial, esto debido a que con esta información se pueden comprender a profundidad este tipo de mecanismos y de esta manera llegar a la posibilidad de nuevas opciones terapéuticas.

Por último, comprender el efecto de esta delección sobre un gen en específico el cual es fundamental para la función neuronal es un paso fundamental que puede servir como guía para el estudio de más genes implicados en esta patología para mitigar los síntomas de pacientes con SCA7.

4. Hipótesis

El secuestro del factor de *splicing* HNRNPA2B1 en agregados de RNA en el modelo de ataxia espinocerebelosa tipo 7 (MIO-M1 de 64 repetidos) afecta el procesamiento de genes blanco involucrados en funciones neuronales.

5. Objetivos

5.1 *Objetivo general*

Confirmar la presencia del factor de *splicing* HNRNPA2B1 en agregados de RNA en células MIO-M1 y estudiar su papel en el *splicing* de genes blanco en SCA7.

5.2 *Objetivos particulares*

1. Confirmar la expresión de Ataxina-7 en células MIO-M1 mediante RT-PCR.
2. Confirmar la expresión del factor de *splicing* HNRNPA2B1 en células MIO-M1 mediante western blot.
3. Confirmar la localización del factor de *splicing* HNRNPA2B1 en agregados de RNA mediante la técnica de Inmunofluorescencia acoplada a RNA Hibridación *in situ* Fluorescente (ImmunofISH).
4. Analizar los cambios en el *splicing* del gen candidato SLC17A7 regulado por el factor de *splicing* HNRNPA2B1 mediante RT-PCR.

6. Estrategia experimental

Se empleó una estrategia experimental la cual se ilustra a continuación (Fig. 6). Inicialmente se utilizó un modelo celular de glía de Müller (MIO-M1) inducible con doxiciclina, de las cuales, a un grupo de células se les insertó un plásmido con una etiqueta Myc para 10 repetidos, y otro grupo una etiqueta Myc para 64. Seguidamente se diseñaron oligonucleótidos para analizar la expresión de Ataxina-7 por medio de RT-PCR para evaluar la funcionalidad del sistema. Después se analizó la expresión de la proteína hnRNPA2B1 mediante western blot y seguidamente se analizó su posible retención en agregados de RNA (RNA foci) y su colocalización con el RNA mensajero mutante de ataxina-7 utilizando la técnica FISH acoplada a inmunofluorescencia. Por último, se evaluaron los cambios de *splicing* sobre genes blanco (SLC17A7) por medio de RT-PCR y densitometría.

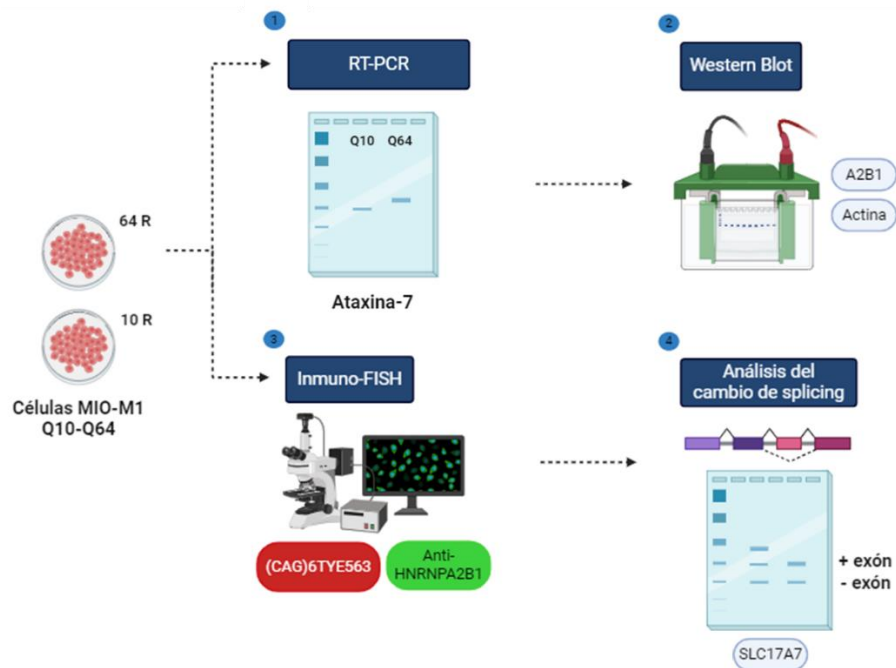


Figura 6. Estrategia experimental. En el primer paso se evaluó la expresión de Ataxina-7 mutante; en el segundo paso se analizó la expresión de la proteína hnRNPA2B1; en el tercer paso se evaluó la interacción entre la proteína hnRNPA2B1 y el mRNA-Atxn7; finalmente en el cuarto paso se analizaron los cambios de *splicing* por RT-PCR y densitometría.

7. Materiales y métodos

7.1 Cultivo celular

Las células gliales de retina (MIO-M1) estables que simulan un fenotipo normal y uno patológico con 10Q y 64Q repetidos [CAG] respectivamente y que expresan ataxina-7 de manera inducible con doxiciclina, fueron sembradas en placas de cultivo con 3 mL de medio DMEM (UltraCruz®) suplementado con 10% de SFB (Biowest®) o SFB Tet-System (Gibco®), 100 U/mL de penicilina/100 µg/mL de estreptomicina/250 ng/mL de anfotericina B (MP Biomedicals), 250 µg/mL de G418 (Gibco®) y 0,16 µg/mL de puromicina (Sigma-Aldrich) en condiciones estándar a 37 °C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂ y con cambios a medio fresco cada tres días. Las células se mantuvieron a un 80% de confluencia y se realizaron pases celulares. Para esto, se retiró el medio de cultivo mediante aspiración, posteriormente se hizo un lavado de las células con PBS estéril 1X y fueron incubadas a 37°C durante 5 minutos con tripsina-EDTA 2X (SantaCruz Biotechnology®) para su desprendimiento, seguidamente las células se recuperaron y se centrifugaron a 450 x g durante 5 minutos, finalmente se descartó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en el medio de cultivo antes señalado. Para llevar a cabo los experimentos con la expresión de ataxina-7, se cultivaron células adicionando 1 µg/mL de doxiciclina durante 6 días.

7.2 Extracción de RNA

Para la extracción de RNA total se utilizó el kit Total RNA Minipreps (EZ-10 Spin Column, BioBasic) el cual contiene una columna de centrifugación que permite la separación eficiente de RNA de otros componentes celulares como proteínas y otras impurezas. Para esto, se sembraron 0.6×10^6 células en placas de cultivo celular (60 x 15 mm, UltraCruz®) y se adicionó 1 µg/mL de doxiciclina durante 6 días, posteriormente se siguieron las instrucciones del fabricante: se retiró el medio y se realizó un lavado con PBS 1X, seguidamente se adicionó 350 µL de buffer RLT, se recolectó el lisado celular y se agitó en vórtex durante 30 segundos, posteriormente se adicionó 350 µL de Etanol al 70% y se transfirió el contenido a una columna del kit para centrifugación a 6000 x g durante 1 minuto, se desechó el sobrenadante y se adicionó 500 µL de buffer RW para ser centrifugado a 6000 x g durante 1 minuto, el sobrenadante se descartó y seguidamente se adicionó 500 µL de buffer RPE y se centrifugó a 6000 x g durante 1 minuto, de nuevo se descartó el

sobrenadante y se repitió este último paso, posteriormente se transfirió la columna a un tubo limpio de 1.5 mL y finalmente se agregó 30 μ L de agua libre de RNAasas, se incubó durante 2 minutos a 5 °C y se centrifugó a 8000 \times g durante 1 minuto para la recolección de RNA total. Para determinar su concentración e integridad, se cuantificó mediante espectrofotómetro NanoDrop 2000 (NanoDrop Technologies) y mediante un gel de agarosa al 1% respectivamente.

7.3 RT-PCR

Para la obtención de cDNA se preparó la mezcla de reacción A y B de acuerdo con la tabla 1 y 2. La mezcla A fue calentada a 65 °C durante 5 minutos en un termociclador de la serie GET-S, seguidamente se mantuvo una temperatura de 4 °C durante 3 minutos en donde se adicionó la mezcla B, posteriormente se incrementó la temperatura a 37 °C durante 2 minutos para adicionar la enzima M-MLV RT (Invitrogen) a cada tubo, esta temperatura se mantuvo durante 50 minutos adicionales y seguidamente se inactivó la reacción a 70 °C durante 10 minutos, finalmente se almacenaron alícuotas a -20 °C hasta su uso.

Tabla 1. Solución A con parámetros para RT-PCR.

<i>Componente</i>	<i>Cantidad</i>
<i>Oligo dT</i>	1.5 μ L
<i>Mix dNTP's</i>	1 μ L
<i>RNA</i>	500 ng
<i>Agua libre de nucleasas</i>	Aforar a 12 μ L

Tabla 2. Solución B con parámetros para RT-PCR

<i>Componente</i>	<i>Cantidad</i>
<i>Buffer first strand 5x</i>	4 μ L
<i>DTT</i>	2 μ L
<i>Agua libre de nucleasas</i>	1 μ L

7.4 PCR punto final y análisis de splicing

Una vez obtenido el cDNA, se diseñaron oligonucleótidos para evaluar la expresión de los genes de interés (Ataxina-7, SLC17A7 y TBP) mostrados en la tabla 3 mediante PCR punto final. Para ello, se mezclaron los componentes de la tabla 4, 5 y 6 respectivamente y se utilizó el programa de la figura 7 en el termociclador antes mencionado. Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa y se realizó un análisis por densitometría para determinar los cambios de *splicing* representados como porcentaje de exclusión / inclusión de exón de SLC17A7, utilizando TBP como control de carga.

Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos para PCR punto final.

<i>Oligonucleótidos</i>	<i>Secuencia</i>
<i>Myc-Atxn7-F 10 μM</i>	ATGGAGCAGAAGCTGATCCAG
<i>Atxn7-R 10 μM</i>	CTTGGAAGCTTGATGAGGATGCG
<i>SLC17A7-10-AS-F 10 μM</i>	GCCAGATCGCGGACTTCCT
<i>SLC17A7-10-AS-R 10 μM</i>	ACCATGCCCGACAGTGTG
<i>TBP-F 10 μM</i>	GCTGTTAACTTCGCTTCCG
<i>TBP-R 10 μM</i>	TCCTTGGGTTATCTTCACACG

Tabla 4. Parámetros para PCR punto final de Ataxina-7 mutante.

<i>Componente</i>	<i>Cantidad</i>
<i>Máster Mix 2x</i>	5 μL
<i>Fwd 10 μM</i>	0.5 μL
<i>Rev 10 μM</i>	0.5 μL
<i>DMSO 8%</i>	0.8 μL
<i>Agua libre de nucleasas</i>	1.2 μL
<i>cDNA</i>	2 μL

Tabla 5. Parámetros para PCR punto final de SLC17A7.

<i>Componente</i>	<i>Cantidad</i>
<i>Máster Mix 2x</i>	5 μ L
<i>Fwd 10 μM</i>	0.5 μ L
<i>Rev 10 μM</i>	0.5 μ L
<i>Agua libre de nucleasas</i>	2 μ L
<i>cDNA</i>	2 μ L

Tabla 6. Parámetros para PCR punto final de TBP.

<i>Componente</i>	<i>Cantidad</i>
<i>Máster Mix 2x</i>	5 μ L
<i>Fwd 10 μM</i>	0.5 μ L
<i>Rev 10 μM</i>	0.5 μ L
<i>Agua libre de nucleasas</i>	2 μ L
<i>cDNA</i>	2 μ L

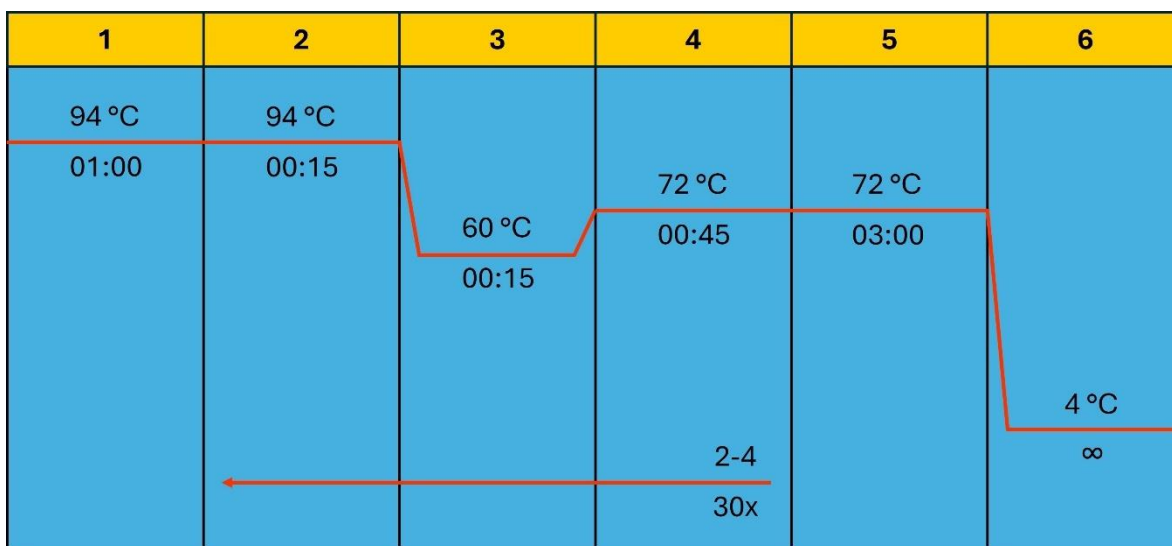


Figura 7. Condiciones y pasos para la PCR punto final. Desnaturalización inicial¹, desnaturalización², alineamiento³, extensión⁴, extensión final⁵, enfriamiento⁶.

7.5 Western Blot

A partir de una placa de cultivo (60 x 15 mm, UltraCruz®) con las mismas condiciones antes descritas se llevó a cabo la extracción de proteínas, para esto las células fueron lavadas con PBS 1X y posteriormente se adicionó 500 µL de buffer de lisis RIPA, seguidamente se homogeneizó y se transfirió a un tubo de 1.5 mL dejando reposar en hielo durante 5 minutos. Después se agitó en vórtex durante 30 segundos y dichos extractos proteicos fueron clarificados mediante centrifugación a 14,000 x g durante 15 minutos a 4 °C para finalmente ser almacenados en alícuotas a -80 °C hasta su uso.

Para determinar la concentración de los extractos proteicos se utilizó el kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoScientific™) cuyo fundamento se basa en la reacción de BCA y la reducción de Cu⁺² a Cu⁺¹ por proteínas en un medio alcalino. Para esto, se preparó una curva de calibración de 8 puntos con BSA (0-2 mg/mL) y se siguieron las instrucciones del fabricante: en una microplaca se adicionó 10 µL de cada muestra y/o solución estándar, posteriormente se mezcló en un tubo cónico de 15 mL el reactivo A + B en una relación 50:1 para tener la solución de trabajo, de la cual se tomaron 200 µL para cada pozo con la muestra y se agitó durante 30 segundos, seguidamente se incubó a 37 °C durante 30 minutos y se midió la absorbancia a 562 nm en un lector de microplacas.

Para la separación de proteínas mediante electroforesis desnaturante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) se prepararon las soluciones de la tabla 7 y 8, una vez polimerizados, se mezclaron 25 µg de las muestras de proteínas con buffer Laemmli y se desnaturizó a 95 °C durante 5 minutos, posteriormente se cargaron en los pocillos del gel concentrador y se realizó la electroforesis del gel en una solución amortiguadora Tris/Glicina/SDS a 100 voltios durante 90 minutos.

Tabla 7. Componentes para la preparación de gel separador al 10 %.

<i>Componente</i>	<i>Volumen</i>
30 % Acrilamida/0.8 % bisacrilamida	2.66 mL
4X Tris-Cl/SDS pH 8.8	2 mL
H ₂ O	3.33 mL
10 % APS	70 µL
TEMED	10 µL

Tabla 8. Componentes para la preparación de gel concentrador al 3.9 %.

<i>Componente</i>	<i>Volumen</i>
<i>30 % Acrilamida/0.8 % bisacrilamida</i>	0.39 mL
<i>4X Tris-Cl/SDS pH 6.8</i>	0.75 mL
<i>H2O</i>	1.83 mL
<i>10 % APS</i>	70 µL
<i>TEMED</i>	10 µL

Para verificar que la separación de proteínas en el gel de poliacrilamida fue la adecuada se llevó a cabo una tinción con Azul de Coomassie, para esto se lavó el gel durante 3 minutos con agua destilada, posteriormente se sumergió en una solución de azul de Coomassie durante 30 minutos en agitación constante y se realizó el lavado utilizando una solución con metanol-agua destilada en una relación 1:1 y ácido acético al 10% con cambios constantes hasta observar las bandas de proteínas.

Con las proteínas separadas en geles sin tinción, se equilibraron los materiales para hacer la transferencia a la membrana. Para esto se colocó el gel y los filtros en buffer de transferencia durante 30 minutos y mientras tanto, se activó la membrana de PVDF (Bio-Rad) con metanol durante 30 segundos, seguidamente se equilibró en agua destilada durante 5 minutos y finalmente se colocó en buffer de transferencia durante 10 minutos. En una cámara para transferencia semi-seca (Bio-rad), se colocó el sándwich del gel y se aplicó una corriente constante de 250 miliamperios durante 1 hora. Para comprobar la transferencia se sumergió la membrana en colorante Ponceau S durante 20 minutos y se lavó con buffer TBS-T hasta lograr desteñir y observar las bandas de proteínas, posteriormente se realizó un bloqueo con leche desnatada al 6% en TBS-T durante 1 hora y se incubó el anticuerpo primario anti-hnRNPA2B1 (ab259894) durante toda la noche a 4 °C, después de este periodo se realizaron tres lavados con TBS-T y se incubó con el anticuerpo secundario (ab6721) durante 1 hora a temperatura ambiente para nuevamente realizar tres lavados con TBS-T y finalmente el revelado empleando una solución quimioluminiscente con el kit ECL de alta sensibilidad (abcam) en un scanner C-DiGit® (LICORbio™). Para normalizar los niveles relativos de la proteína se utilizó un buffer para desnudamiento a 65 °C durante 25 minutos para remover los anticuerpos de la membrana e incubar nuevamente con el anticuerpo

primario anti-actina (sc-376421) como control de carga y el anticuerpo secundario correspondiente (ab6728). Para analizar la concentración relativa de proteína se hizo un análisis por densitometría mediante el software ImageJ.

7.6 Hibridación in situ fluorescente de RNA (RNA-FISH)

Se sembraron células sobre cubreobjetos en una placa para cultivo de 12 pozos en las condiciones anteriormente descritas, tras 6 días de inducción con doxiciclina (1 µg/mL) se retiró el medio de cultivo y se realizó el lavado celular con PBS 1X, posteriormente las células se fijaron con formaldehído al 4% durante 10 minutos y se permeabilizó con tritón al 0.1% durante 5 minutos, después se incubó con una solución de prehibridación durante 30 minutos a temperatura ambiente y seguidamente se incubó con una solución de hibridación a 37 °C durante 2 horas. Una vez transcurrido este periodo, se realizó un lavado con la solución de prehibridación a 45 °C durante 30 minutos y un lavado en SSC 1X durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se realizaron tres lavados con PBS 1X y cada cubreobjeto se incubó con 6 µL de DAPI (Invitrogen) durante 5 minutos para tinción del núcleo, seguido de un lavado con PBS 1X y la adición de 5 µL de medio de montaje sobre portaobjetos los cuales fueron sellados con barniz transparente para ser almacenadas en oscuridad a 4 °C hasta su visualización con el objetivo 63x en un microscopio confocal de barrido láser STELLARIS 5 (Leica microsystems).

7.7 Hibridación in situ fluorescente acoplada a inmunofluorescencia (Inmuno-FISH)

Siguiendo el protocolo RNA-FISH anteriormente descrito, una vez que se incubó con la solución de hibridación y se realizaron los lavados correspondientes, se bloqueó con BSA al 3% durante 1 hora y seguidamente se incubó con el anticuerpo primario anti-hnRNPA2B1 (ab259894) en cámara húmeda durante toda la noche a 4 °C en oscuridad. Al siguiente día se realizaron tres lavados con PBS 1X y se incubó con el anticuerpo secundario Alexa Fluor™ 488 (A-21206) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de tres lavados con PBS 1X, se adicionó 6 µL de DAPI (Invitrogen) durante 5 minutos, se realizó un lavado con PBS 1X y se agregó 5 µL de medio de montaje sobre un portaobjeto sellado con barniz transparente para ser visualizados con el objetivo 63x en un microscopio confocal de barrido láser STELLARIS 5 (Leica microsystems).

7.8 Transfección transitoria

En principio se realizó una transformación bacteriana mediante choque térmico para la introducción de un plásmido que contiene un fragmento Myc y el transgén de *Atxn7* para 10 (pTRE3G-Myc-10Q) o 64 (pTRE3G-Myc-64Q) repetidos y un vector de clonación pCMV-Tet3G que codifica la proteína transactivadora Tet-On® 3G la cual permite la expresión inducible de *Atxn7*. Para esto, se descongelaron 100 μ L de células competentes *Escherichia coli* TOP10, se añadieron 200 ng de cada plásmido y se incubaron en hielo durante 30 minutos, seguidamente se aplicó choque térmico donde se incubó a 42 °C durante 30 segundos en termoblock y posteriormente en hielo durante 2 minutos. Se agregó 1 mL de medio LB precalentado sin antibióticos y se incubó a 37 °C, 200 RPM durante 90 minutos. Finalmente, se transfirió la suspensión bacteriana a 100 mL de medio LB precalentado con ampicilina como método de selección y se incubó a 37 °C, 200 RPM durante 12-16 horas.

Para la purificación del plásmido se utilizó el kit Midi (Qiagen) la cual se basa en la purificación por lisis alcalina mediante una columna para la eliminación de impurezas, permitiendo la concentración de ADN plasmídico. Para esto, se recolectó el cultivo bacteriano mediante centrifugación a 4,500 \times g durante 20 min a 4°C, posteriormente el precipitado se resuspendió en 4 mL de tampón P1, seguidamente se agregó 4 mL de tampón P2 y se mezcló hasta que la solución tornara a un color azul, después de 5 minutos de incubación a 15-25 °C, se adicionó 4 mL de tampón P3 preenfriado y se mezcló hasta que la solución se volviera incolora, una vez transcurridos 15 minutos de incubación en hielo, se centrifugó a $\geq 20.000 \times$ g durante 45 min a 4°C. Seguidamente se equilibró la punta QIAGEN del kit aplicando 4 mL de tampón QBT y una vez que la columna se vació, se añadió el sobrenadante del paso de centrifugación, posteriormente se realizaron lavados aplicando 2 \times 10 mL de tampón QC y se eluyó el ADN en un tubo nuevo aplicando 5 mL de tampón QF. Después se añadió 3.5 mL de isopropanol para la precipitación del ADN y se centrifugó a $\geq 15.000 \times$ g durante 30 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se realizaron lavados del pellet de ADN con 2 mL de etanol al 70% a temperatura ambiente, seguidamente se centrifugó a $\geq 15.000 \times$ g durante 10 min, se desechó el sobrenadante y se dejó secar el pellet durante 10 minutos. Finalmente, el ADN se resuspendió en agua ultrapura y se cuantificó mediante espectrofotómetro NanoDrop 2000 (NanoDrop Technologies).

Para comprobar la integridad del plásmido, se realizó una digestión enzimática de acuerdo con la tabla 9. La reacción se incubó a 37 °C durante 1 hora y los fragmentos resultantes se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Tabla 9. Componentes para la digestión de plásmidos purificados.

<i>Componente</i>	<i>pTRE3G-Myc-10Q (Sin digestión)</i>	<i>pTRE3G-Myc-10Q (Con digestión)</i>	<i>pTRE3G-Myc-64Q (Con digestión)</i>
<i>Plásmido (2 ug)</i>	2.50 µL	2.50 µL	2.92 µL
<i>Buffer 10x</i>	2 µL	2 µL	2 µL
<i>NheI (5 U)</i>	0.25 µL	0.25 µL	0.25 µL
<i>Agua ultrapura</i>	15.25 µL	15.25 µL	14.83 µL

Para la transfección se sembraron 0.1×10^6 células MIO-M1 Wild Type sobre cubreobjetos en placas de 12 pozos con 1 mL de medio DMEM (UltraCruz®) suplementado con 10% de SFB (Biowest®) o SFB Tet-System (Gibco®), 100 U/mL de penicilina/100 µg/mL de estreptomicina/250 ng/mL de anfotericina B (MP Biomedicals) en condiciones estándar a 37 °C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂ hasta obtener 80% de confluencia. Posteriormente, se preparó la solución para la transfección de acuerdo con la tabla 10, seguidamente se mezcló el tubo 1 + tubo 2 y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente para después vaciar su contenido en las placas de cultivo antes descritas. Después, se adicionó 1 µg/mL de doxiciclina y tras 48 horas de incubación, se evaluó la expresión de Ataxina-7 mutante y se siguió la metodología Hibridación *in situ* fluorescente acoplada a inmunofluorescencia (Inmuno-FISH) antes descrita.

Tabla 10. Soluciones para transfección transitoria.

<i>Tubo</i>	<i>Componente</i>
<i>1</i>	150 µL Optimem + 2.5 µL lipofectamina 2000
<i>2</i>	150 µL optimem + 5 ug pCMV-Tet3G + 5 ug (pTRE3G-myc-ATXN710Q) o (pTRE3G-myc-ATXN764Q)

7.9 Análisis estadístico

Para determinar la significancia estadística, se utilizó el software GraphPad Prism 8.0.1 mediante una prueba t de Student al 95% de confianza cuando se compararon dos grupos o un análisis de varianza de una sola vía al 95% de confianza cuando se compararon más de 2 grupos.

8. Resultados

8.1 Las células MIO-MI Q10 y Q64 expresan eficientemente Ataxina-7 mutante.

El RNA extraído de las células inducidas con doxiciclina durante 6 días demostró tener la concentración y calidad suficiente de acuerdo con la presencia de las bandas de RNA ribosomal 28S y 18S observado en un gel de agarosa al 1% (Fig. 8) donde se agregó 250 ng de RNA total, de manera que resulta útil para proceder con la obtención de cDNA.

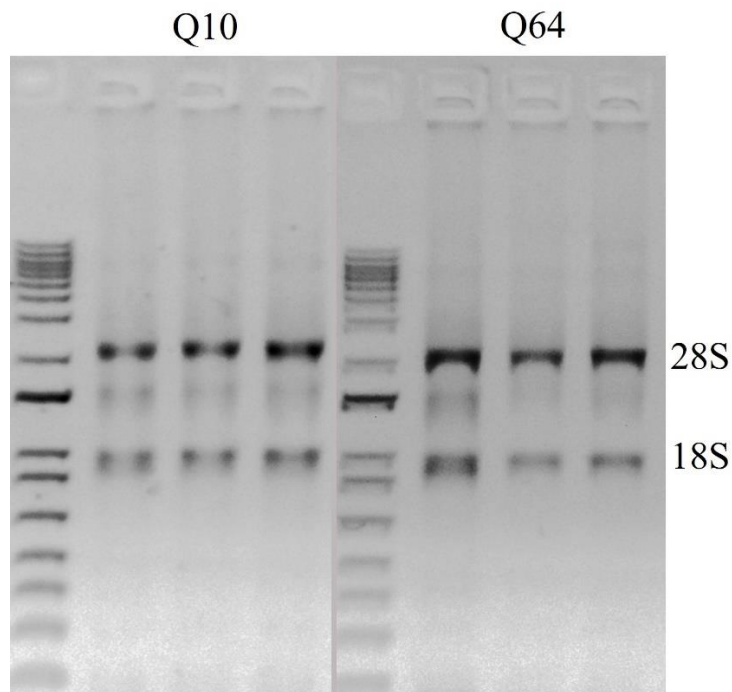


Figura 8. Integridad de RNA en gel de agarosa 1%. En el panel de la izquierda se ilustra el triplicado del sistema Q10 inducido durante 6 días; en el panel de la derecha se muestra el triplicado del sistema Q64 inducido durante 6 días.

Con los oligonucleótidos diseñados para analizar la expresión del transgén de Atxn7 Q10 o Q64 se realizó una RT-PCR de la cual se obtuvo un amplicón esperado con una diferencia de peso molecular de 700 pares de bases para Atxn7-Q10 y 860 pares de bases para Atxn7-Q64 (Fig. 9), en donde no hay diferencias de concentración de la reacción al compararse con el control de carga TBP.

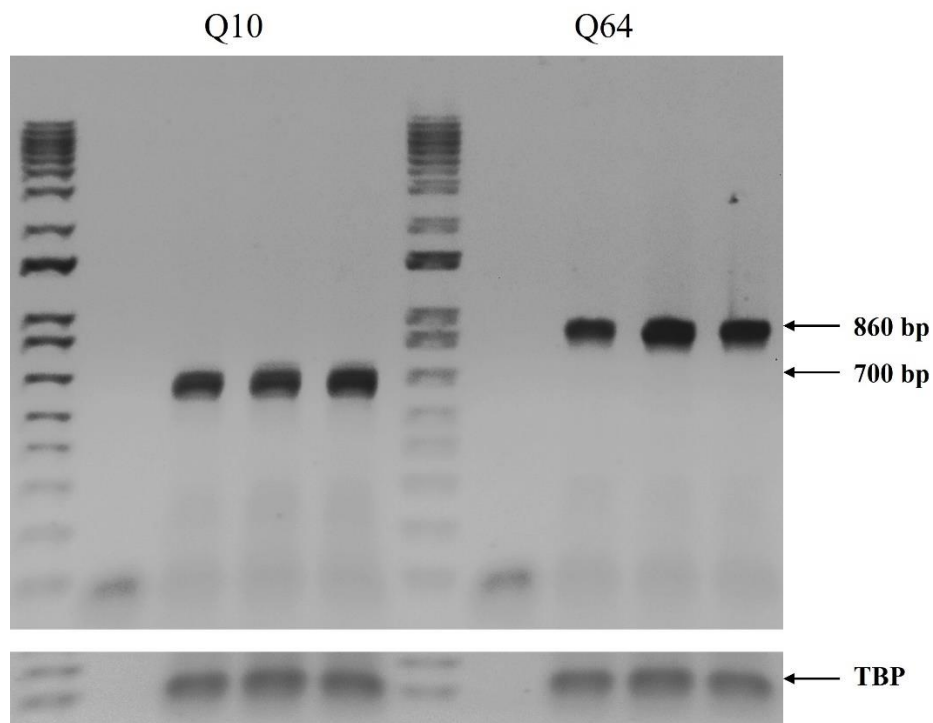


Figura 9. Expresión de Ataxina-7 en células MIO-M1 Q10 y Q64. A la izquierda se muestra el triplicado de muestras Q10 inducido durante 6 días; a la derecha se muestra el triplicado de muestras Q64 inducido durante 6 días.

8.2 El análisis de la expresión de hnRNPA2B1 no revela cambios significativos.

Utilizando los valores de la curva de calibración con BSA se aplicó una línea de tendencia y se obtuvo un coeficiente de determinación $R^2 = 0.9913$ (Fig. 10) de manera que es fiable para predecir la concentración de la proteína en muestras desconocidas, con este gráfico se obtuvo la ecuación $y = 0.138x + 0.1242$ donde y representa la absorbancia de una muestra, mientras que x representa la concentración de la proteína, de manera que resolviendo x se obtuvo la concentración relativa para cada muestra como se muestra en la tabla 11.

Curva de Calibración BSA

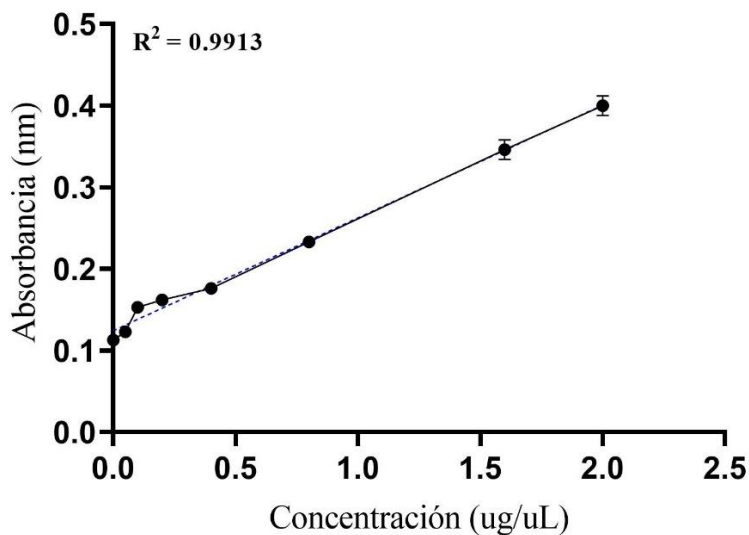


Figura 10. Curva de calibración de BSA. Se realizaron 8 diluciones con buffer de lisis RIPA (0-2 mg/mL).

Tabla 11. Determinación de volumen de proteína necesario para western blot.

<i>Muestra</i>	<i>Volumen para 25 ug (μL)</i>
<i>10Q (1) sin doxiciclina</i>	17.31
<i>10Q (2) sin doxiciclina</i>	21.13
<i>64Q (1) sin doxiciclina</i>	19.25
<i>64Q (2) sin doxiciclina</i>	17.67
<i>10Q (1) con doxiciclina</i>	20.15
<i>10Q (2) con doxiciclina</i>	27.12
<i>64Q (1) con doxiciclina</i>	21.67
<i>64Q (2) con doxiciclina</i>	21.13

Con los extractos proteicos resultantes, se realizaron los cálculos necesarios para realizar una electroforesis desnaturante (SDS-PAGE) y se observó la separación adecuada de proteínas mediante tinción con Azul de Coomassie (Fig. 11) en donde se observa que hay suficiente concentración y separación adecuada de proteínas para la transferencia a una membrana.

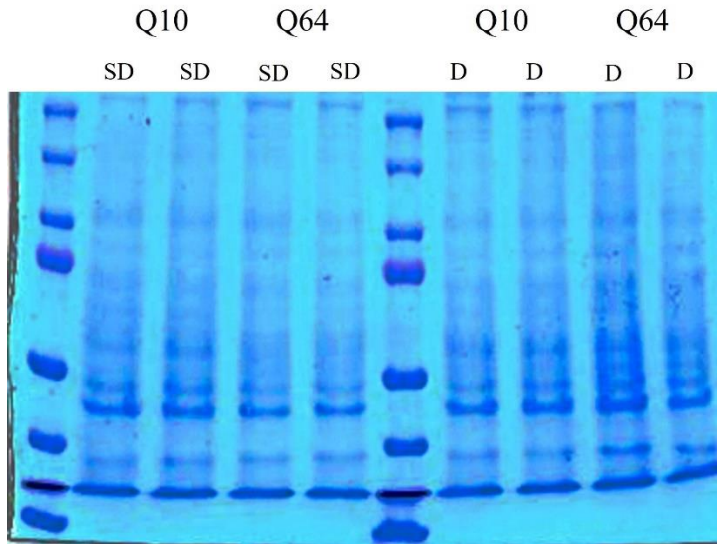


Figura 11. Tinción de gel de poliacrilamida con Azul de Coomassie. A la izquierda se muestran duplicados de Q10 y Q64 sin inducción; a la derecha se ilustran duplicados de Q10 y Q64 con inducción.

Para demostrar la transferencia de proteínas desde el gel de poliacrilamida a la membrana de PVDF y asegurar que las condiciones hayan sido adecuadas, se realizó la tinción con Ponceau S (Fig. 12) de manera que la distribución y concentración de proteínas es adecuada para continuar con la incubación de los anticuerpos.

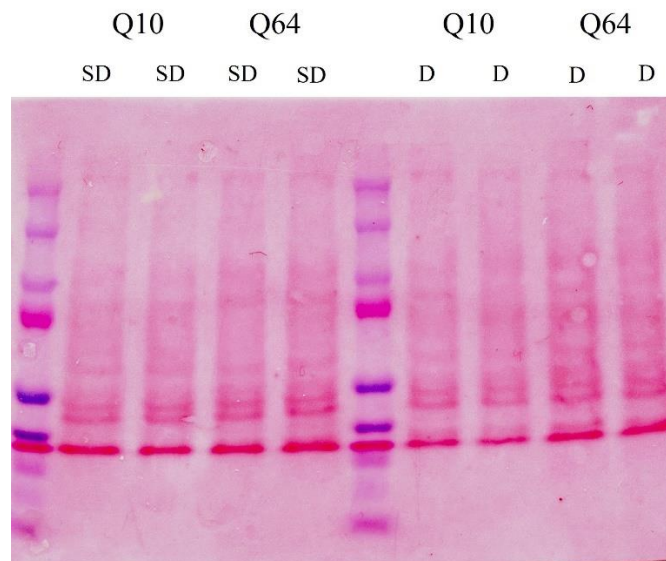


Figura 12. Tinción de membrana PVDF con Ponceau S. A la izquierda se muestran duplicados de Q10 y Q64 sin inducción; a la derecha se ilustran duplicados de Q10 y Q64 con inducción.

Con la finalidad de analizar los resultados de la incubación con el anticuerpo anti-hnRNPA2B1 se normalizó la concentración de la banda que se observa a aproximadamente a 37 kDa con un control de carga de actina que se observa a aproximadamente 43 kDa (Fig. 13) con lo cual se realizó el análisis por densitometría de manera que no se observan diferencias significativas en la expresión a nivel proteína de las muestras con y sin inducción para hnRNPA2B1 (Fig. 14).

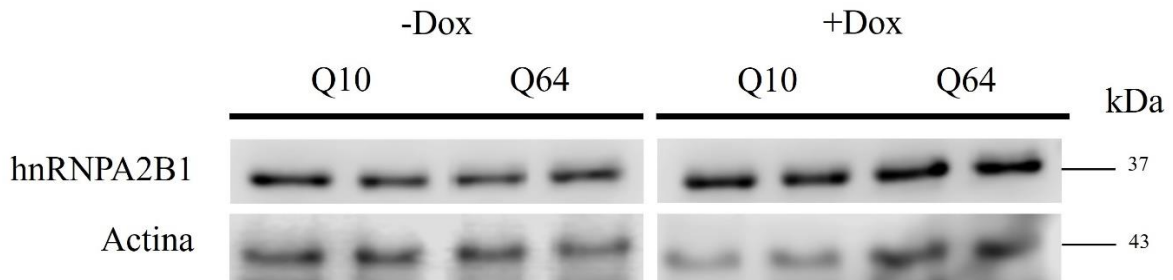


Figura 13. Western Blot de hnRNPA2B1. A la izquierda se muestra el duplicado de muestras sin inducción; a la derecha se ilustra el duplicado de muestras con inducción.

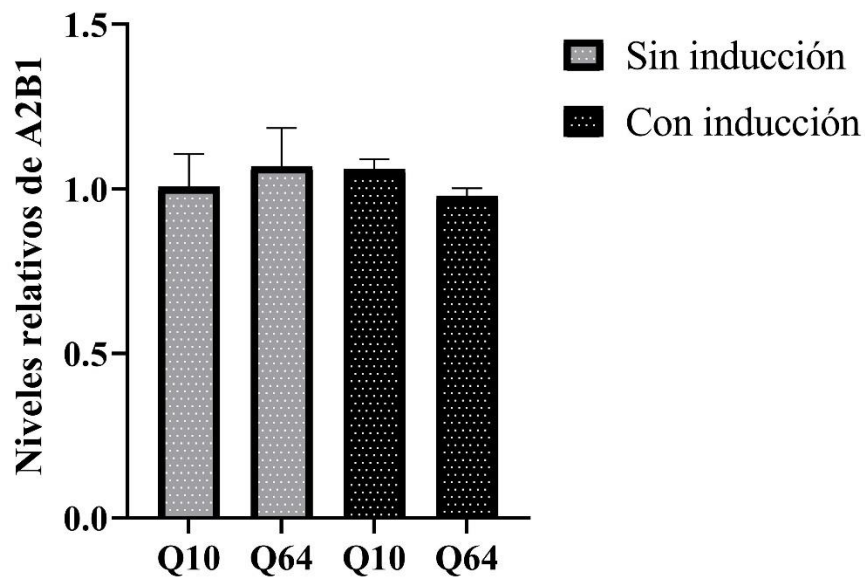


Figura 14. Análisis estadístico de la expresión de hnRNPA2B1. A la izquierda en gris, se muestra el sistema Q10 y Q64 sin inducción; a la derecha en negro, se muestra el sistema Q64 con inducción durante 6 días.

8.3 Presencia de agregados de mRNA-Atxn7 en células MIO-M1 Q64.

Con la intención de analizar la formación de agregados de mRNA y Ataxina-7 mutante con 64 repetidos, se realizó el ensayo RNA-FISH con células MIO-M1 con 10 repetidos (Q10) y 64 repetidos (Q64), en la (Fig. 15) se puede observar que no hay agregados de mRNA en las muestras Q10 con y sin inducción con doxiciclina para la expresión de Ataxina-7 mutante, en comparación con la (Fig. 16) en donde se pueden observar agregados de mRNA en las muestras Q64 una vez que el sistema es inducido.

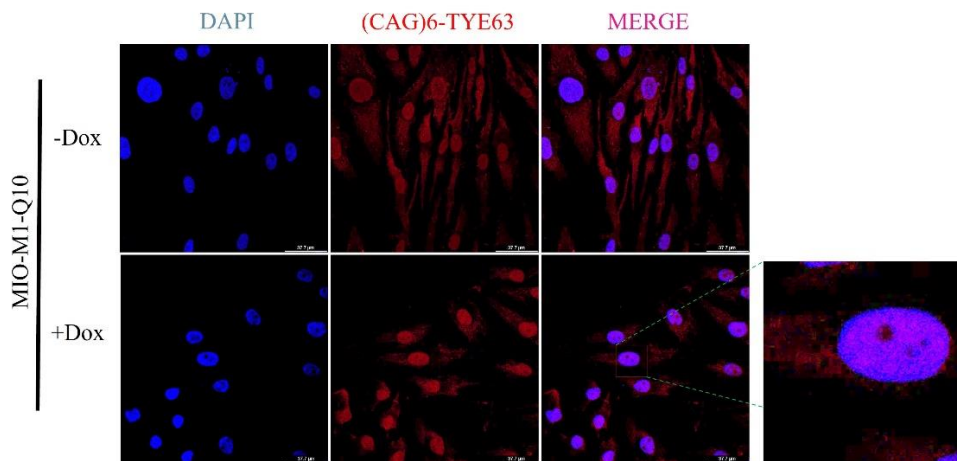


Figura 15. RNA-FISH Q10. Se ilustra el sistema Q10 con y sin inducción; en azul se muestra la tinción del núcleo con DAPI; en rojo se muestra la sonda fluorescente dirigida a los repetidos CAG; a la derecha se observa el merge de ambos filtros.

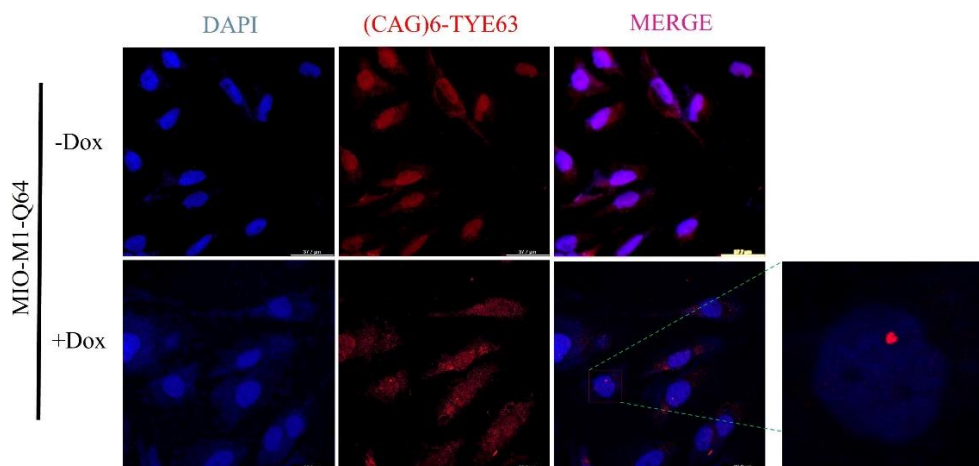


Figura 16. RNA-FISH Q64. Se ilustra el sistema Q64 con y sin inducción; en azul se muestra la tinción del núcleo con DAPI; en rojo se muestra la sonda fluorescente dirigida a los repetidos CAG; a la derecha se observa el merge de ambos filtros.

8.4 Interacción de hnRNPA2B1 con agregados de mRNA-Atxn7 en células MIO-M1 Q64.

Para confirmar la interacción de hnRNPA2B1 con los agregados de mRNA-Atxn7, tras el ensayo de RNA-FISH se trabajó con la inmunofluorescencia incubando con el anticuerpo anti-hnRNPA2B1, donde al utilizar el sistema Q10 no se observa interacción entre la proteína y el mRNA de Ataxina-7 mutante (Fig. 17), en cambio, al observar el sistema Q64 se observa la co-localización de la proteína con el mRNA de Ataxina-7 (Fig. 18), hallazgo que fue confirmado en el laboratorio (imagen no ilustrada) mediante la inmunoprecipitación de RNA acoplado a RT-qPCR en donde se observó un mayor enriquecimiento en el sistema Q64 comparado con Q10.

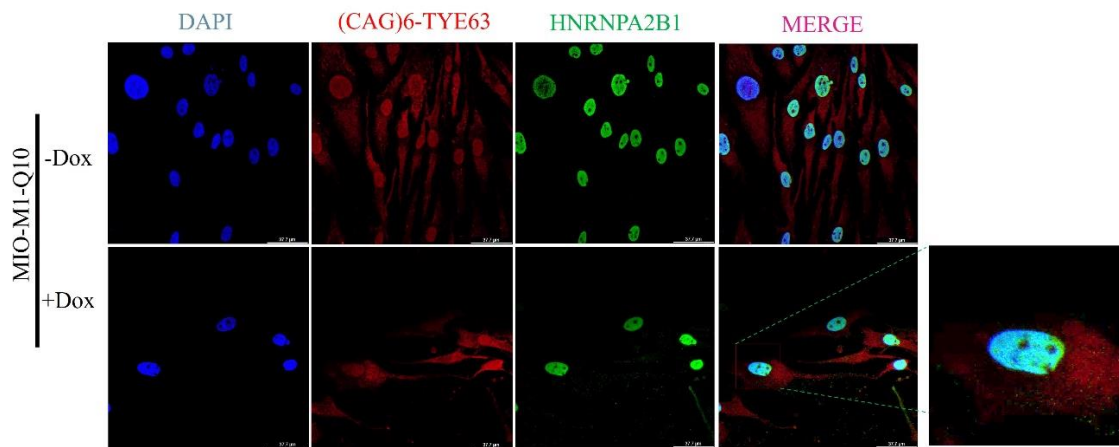


Figura 17. Inmuno-FISH Q10. Se ilustra el sistema Q10 con y sin inducción; en azul se muestra la tinción del núcleo con DAPI; en rojo se muestra la sonda fluorescente dirigida a los repetidos CAG; en verde se muestra la proteína hnRNPA2B1; a la derecha se observa el merge de los tres filtros.

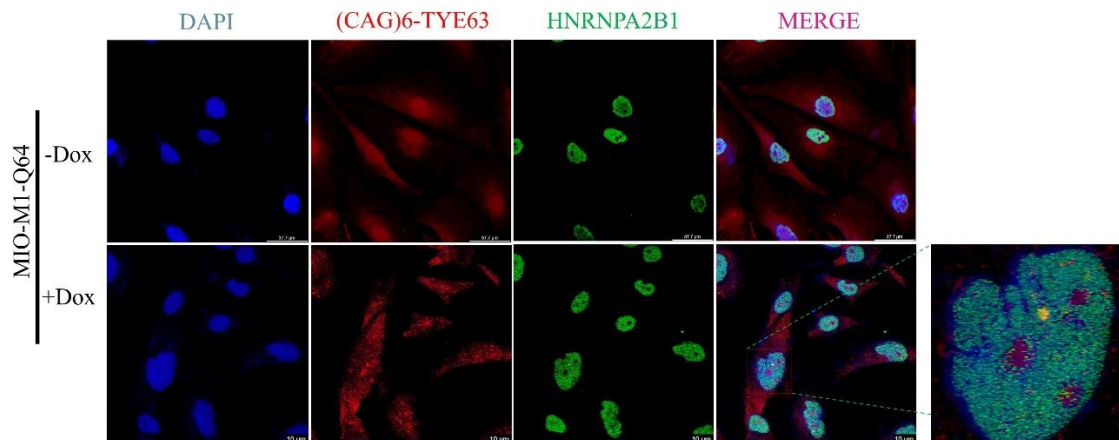


Figura 18. Inmuno-FISH Q64. Se ilustra el sistema Q64 con y sin inducción; en azul se muestra la tinción del núcleo con DAPI; en rojo se muestra la sonda fluorescente dirigida a los repetidos CAG; en verde se muestra la proteína hnRNPA2B1; a la derecha se observa el merge de los tres filtros.

8.5 *hnRNPA2B1* co-localiza con agregados de mRNA-*Atxn7* mediante expresión transitoria.

Con el fin de comprobar la co-localización de *hnRNPA2B1* con el mRNA de Ataxina-7 mutante en un modelo celular sin clonas estables, se realizó una transfección transitoria en células MIO-M1 Wild Type y se les insertó un plásmido con el transgén para 10 (pTRE3G-Myc-10Q) o 64 repetidos (pTRE3G-Myc-64Q). En principio se realizó la transformación bacteriana en células competentes contemplando un negativo sin plásmido. Después de haber realizado la purificación de cada plásmido, se analizó la integridad del plásmido por digestión enzimática y se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% (Fig. 19) en donde se observan los fragmentos resultantes de aproximadamente 2679 pares de bases para Q10 y 2808 pares de bases para Q64, de manera que el plásmido contiene el transgén esperado y es adecuado para la transfección.

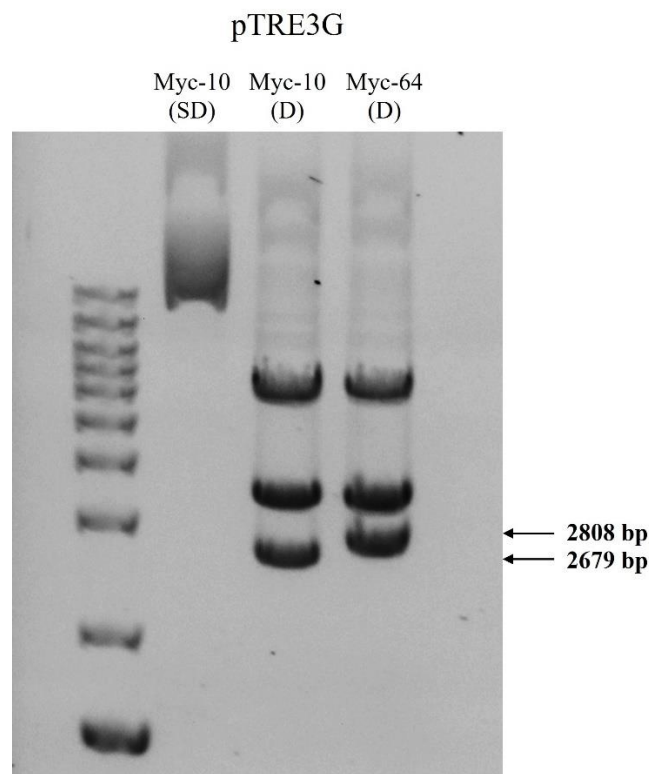


Figura 19. Digestión enzimática con *NheI*. Gel de agarosa al 1%. En el pozo de la izquierda se ilustra al plásmido pTRE3G-Myc-10 sin enzima *NheI*; en el pozo del medio se muestra al mismo plásmido con la presencia de la enzima de restricción; en el pozo de la derecha se muestra al plásmido pTRE3G-Myc-64.

Con las células transfectadas con los plásmidos antes mencionados se realizó una RT-PCR para evaluar la expresión de Ataxina-7 mutante y utilizando TBP como control de carga, los cuales se analizaron por un gel de agarosa al 1% en ambos sistemas (Fig. 20) en donde se observan los amplicones esperados de 700 pares de bases para pTRE3G-Myc-10Q y 860 pares de bases para pTRE3G-Myc-64Q de manera que la transfección fue exitosa y es apta para el siguiente ensayo.

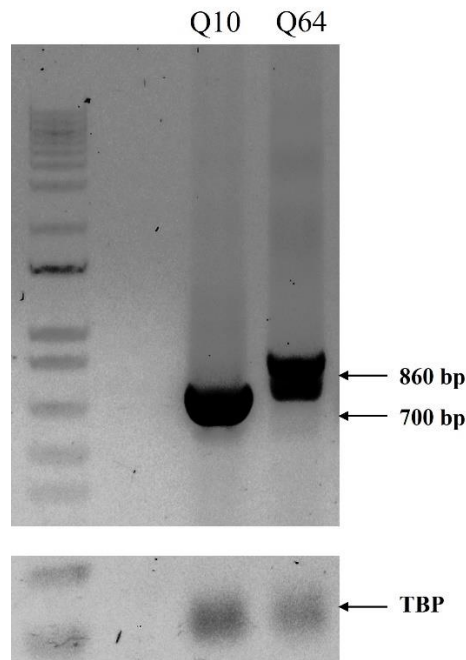


Figura 20. Expresión transitoria de Ataxina-7. Gel de agarosa al 1%. En el pozo de la izquierda se muestra la expresión de pTRE3G-Myc-10Q; en el pozo de la derecha se muestra la expresión de pTRE3G-Myc-64Q.

Los hallazgos de co-localización fueron demostrados utilizando el sistema de 64 repetidos tras la expresión transitoria después de 48 horas, para lo cual se realizó el mismo procedimiento descrito para inmunofluorescencia acoplada a RNA-FISH.

8.6 El secuestro de *hnRNPA2B1* en *mRNA-Atxn7* induce cambios de *splicing* de *SLC17A7*.

Finalmente con el interés de evaluar los efectos del secuestro de *hnRNPA2B1* sobre el *splicing* alternativo del exón 10 de *SLC17A7*, se realizó una RT-PCR con células inducidas durante 6 días utilizando el sistema Q10 y Q64, con lo cual se evaluó la exclusión / inclusión mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (Fig. 21) y análisis por densitometría (Fig. 22) en donde se ilustra que hay un cambio en la exclusión del exón significativo en el sistema Q64 comparado con el sistema Q10, de manera que hay una alteración sobre el *splicing* debido al secuestro de la proteína *hnRNPA2B1* en agregados de RNA.

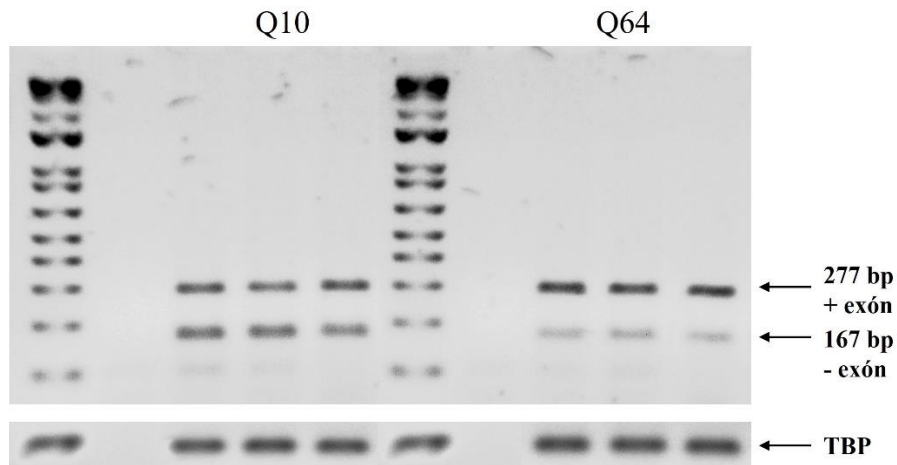


Figura 21. Evaluación del *splicing* de *SLC17A7*. Gel de agarosa al 2%.; a la izquierda se muestra el triplicado de muestras Q10 con inducción durante 6 días; a la derecha se muestra el triplicado de muestras Q64 con inducción durante 6 días.

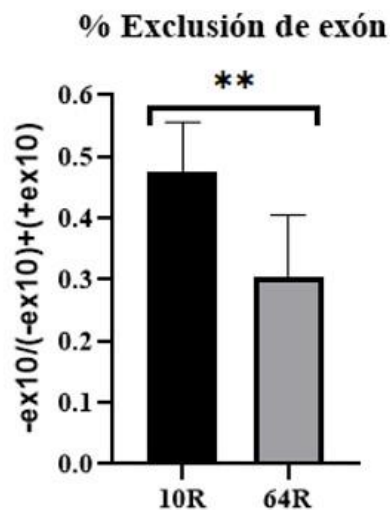


Figura 22. Análisis por densitometría % de exclusión de exón. A la izquierda se muestra el sistema Q10; a la derecha se ilustra el sistema Q64.

9. Discusión

Las expansiones de repetidos CAG se asocian a una variedad de grupos de trastornos neurológicos conocidas como enfermedades poliglutamínicas (PolyQ). Debido a que esta expansión puede conferir toxicidad mediante la ganancia de función de RNA, en los últimos años se ha observado un incremento en el estudio del papel de RNA en patologías asociadas con la expansión de estos tripletes (Wojciechowska, M., & Krzyzosiak, W. J., 2011).

Además, se ha reportado que transcritos CAG en la enfermedad de Huntington hay agregados de RNA que secuestran proteínas como MBNL1, provocando su alteración y pérdida de función biológica (De Mezer, M., et al., 2011). Otro detalle interesante es que Yang y colaboradores en 2015 reportaron el efecto que los agregados de ataxina-7 tienen sobre el complejo SAGA: un coactivador transcripcional en el cual Ataxina-7 participa modulando la interacción entre varios módulos, de manera que dicho secuestro alteró la interacción con el módulo de desubiquitinación USP22, de manera que esto puede afectar la función del complejo SAGA y provocar una desregulación transcripcional que conlleva a la muerte celular y neurodegeneración en la SCA7.

Ahora bien, las hnRNPs son complejos de unión a RNA que participan durante la transcripción génica y la posterior modificación postranscripcional del mRNA, además, participan en una amplia gama de funciones como reparación del ADN y la señalización celular (Purice, M. D., & Taylor, J. P., 2018). En la última década, las funciones de estas proteínas se han visto involucradas en algunas enfermedades neurodegenerativas, tales como la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), la Demencia Frontotemporal (DFT), enfermedad de Alzheimer, etc. Por lo que ha cobrado interés en la investigación de los mecanismos en los que participa. Aunado a lo anterior, en estudios recientes se ha reportado la toxicidad de la ganancia de función del RNA a través del secuestro de esta familia de proteínas, lo que sugiere un mecanismo patológico (Purice, M. D., & Taylor, J. P., 2018).

Estos hallazgos fueron confirmados con nuestro modelo celular utilizando células de glía de Müller. Los resultados revelaron la formación de agregados de RNA y el secuestro del factor de *splicing* hnRNPA2B1, de manera que este modelo resulta útil para el estudio de enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la expansión de repetidos CAG. Por otro lado, en un estudio reportado por Martínez y colaboradores en 2016 en el que realizaron una deleción de la proteína de estudio hnRNPA2B1, se identificaron un total de 276 cambios de *splicing*, de los cuales, un

porcentaje alto se involucraba con el skipping de exón en lugar de llegar a ser incluido, en este sentido, se reportó la dependencia en ciertos genes blanco cuya expresión se vio afectada por este suceso en el cambio de *splicing*, de manera que nuestro modelo de estudio podría estar simulando este efecto. Además, estos hallazgos sugieren que la acumulación de agregados de RNA y la disfunción de proteínas relacionadas con el procesamiento de este, como hnRNPA2B1, podrían desempeñar un papel crucial en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas asociadas a la expansión de repetidos CAG. Por lo anterior, con la información de los genes afectados tras la delección del factor de *splicing*, y correlacionando con los datos proteómicos realizados en el grupo de trabajo del laboratorio, se seleccionó el gen SLC17A7.

SLC17A7 es un gen que codifica para la proteína VGLUT1: un transportador vesicular de glutamato el cual se encarga de empaquetar el glutamato en vesículas sinápticas, y debido a que ya se han reportado procesos de excitotoxicidad en células de Purkinje y glía de Bergman debido a una alteración en el reciclamiento de glutamato en SCA7 (Pietrancosta, N., et al., 2020), fue de nuestro interés evaluar el posible secuestro del factor de *splicing* hnRNPA2B1 y estudiar el efecto sobre la expresión de este gen.

Después de haber hecho una evaluación con los cambios de exclusión / inclusión del exón 10 de SLC17A7 utilizando nuestro sistema para 10 y 64 repetidos, observamos un porcentaje de exclusión con diferencias significativas al comparar el sistema Q64 contra Q10, lo anterior se asocia con los resultados reportados por Martínez y colaboradores en 2016, de manera que al haber un secuestro de la proteína hnRNPA2B1 en 64 repetidos, esta altera el *splicing* sobre este gen en particular, no obstante, con los datos proteómicos realizados en el laboratorio (no publicados) se sugiere que esta es solo una de muchas proteínas que tienen interacción con el mRNA mutante de ataxina-7, por lo que otros procesos biológicos también puedan verse afectados, así como el impacto sobre otros genes que puedan estar relacionados con los mecanismos patogénicos de SCA7.

En cuanto a los efectos que estos cambios de expresión en VGLUT1 pueda tener sobre SCA7, se ha reportado que este transportador se encuentra alterado en enfermedades asociadas con procesos de excitotoxicidad. Utilizando un modelo de *Drosophila*, Daniels y colaboradores en 2011, mostraron que la sobreexpresión de VGLUT es suficiente para generar defectos de

comportamiento, letalidad prematura y neurodegeneración por excitotoxicidad, además de que hay pérdida de la función motora dependiente de la edad y a un acortamiento de la esperanza de vida.

Por otro lado, Kashani y colaboradores en 2007, reportaron que VGLUT1 se encontró dramáticamente disminuido en la corteza prefrontal y temporal de pacientes con enfermedad de Parkinson, por lo que hay una relación estrecha entre las alteraciones de la transmisión glutamatérgica en varias enfermedades neurodegenerativas.

Lo anterior puede ser relacionado recordando que la glía de Müller es un contexto celular distinto a las células de Purkinje y glía de Bergman, sin embargo, esto brinda nuevas perspectivas de enfoque de estudio ya que dichos procesos de excitotoxicidad también pueden estar involucrados en la enfermedad de SCA7, de esta manera se puede llegar a diseñar dianas terapéuticas más adecuadas.

10. Conclusión

Nuestros hallazgos destacan la complejidad de los mecanismos moleculares involucrados en SCA7 de acuerdo con los siguientes puntos:

1. Las células MIO-M1 expresaron Ataxina-7 inducible con doxiciclina, sin observarse diferencias significativas en su nivel de expresión en comparación con los controles. Esto sugiere que su nivel de expresión no se ve afectado por las condiciones experimentales evaluadas.
2. Se detectaron agregados de RNA en el sistema de células con 64 repetidos, los cuales también secuestran a la proteína hnRNPA2B1, importante en los procesos de *splicing*.
3. El secuestro del factor de *splicing* provocado por los agregados de RNA resultó en una alteración del *splicing* del gen SLC17A7, mismo que codifica para el transportador vesicular de glutamato (VGLUT1). Puesto que VGLUT1 es esencial para el transporte de glutamato, estos resultados sugieren que las alteraciones en su *splicing* podrían impactar negativamente en la función sináptica y la neurotransmisión glutamatérgica.

En conjunto, estos hallazgos proporcionan una visión detallada de cómo los agregados de RNA y el secuestro de factores de *splicing* pueden alterar el *splicing* de genes cruciales y afectar funciones celulares vitales. Futuros estudios deberán enfocarse en explorar las implicaciones patológicas de estos mecanismos y desarrollar estrategias terapéuticas para contrarrestar sus efectos.

11.Referencias

1. Borbolla-Jiménez, F. V., García-Aguirre, I. A., Del Prado-Audelo, M. L., Hernández-Hernández, O., Cisneros, B., Leyva-Gómez, G., y Magaña, J. J. (2023). Development of a Polymeric Pharmacological Nanocarrier System as a Potential Therapy for Spinocerebellar Ataxia Type 7. *Cells*, 12(23), 2735.
2. Brandão-Teles, C., Antunes, A. S., de Moraes Vrechi, T. A., y Martins-de-Souza, D. (2024). The Roles of hnRNP Family in the Brain and Brain-Related Disorders. *Molecular neurobiology*, 61(6), 3578-3595.
3. Bunting, E. L., Hamilton, J., y Tabrizi, S. J. (2022). Polyglutamine Diseases. *Current Opinion in Neurobiology*, 72, 39-47.
4. Busch, A., y Hertel, K. J. (2012). Evolution of SR protein and hnRNP *splicing* regulatory factors. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 3(1), 1-12; Erkelenz, S., Mueller, W. F., Evans, M. S., Busch, A., Schöneweis, K., Hertel, K. J., & Schaal, H. (2013). Position-dependent *splicing* activation and repression by SR and hnRNP proteins rely on common mechanisms. *Rna*, 19(1), 96-102.
5. Daniels, R. W., Miller, B. R., y DiAntonio, A. (2011). Increased vesicular glutamate transporter expression causes excitotoxic neurodegeneration. *Neurobiology of disease*, 41(2), 415-420.
6. De Mezer, M., Wojciechowska, M., Napierala, M., Sobczak, K., y Krzyzosiak, W. J. (2011). Mutant CAG repeats of Huntingtin transcript fold into hairpins, form nuclear foci and are targets for RNA interference. *Nucleic acids research*, 39(9), 3852-3863.
7. Filla, A., Mariotti, C., Caruso, G., Coppola, G., Coccozza, S., Castaldo, I., y Di Donato, S. (2000). Relative frequencies of CAG expansions in spinocerebellar ataxia and dentatorubropallidoluysian atrophy in 116 Italian families. *European neurology*, 44(1), 31-36.

8. Guyenet, S. J., Mookerjee, S. S., Lin, A., Custer, S. K., Chen, S. F., Sopher, B. L., y Ellerby, L. M. (2015). Proteolytic cleavage of ataxin-7 promotes SCA7 retinal degeneration and neurological dysfunction. *Human molecular genetics*, 24(14), 3908-3917.
9. Hammans, S. R. (1996). The inherited ataxias and the new genetics. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 61(4), 327.
10. Karam, A., y Trottier, Y. (2018). Molecular mechanisms and therapeutic strategies in spinocerebellar ataxia type 7. *Polyglutamine Disorders*, 197-218.
11. Kashani, A., Betancur, C., Giros, B., Hirsch, E., & El Mestikawy, S. (2007). Altered expression of vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in Parkinson disease. *Neurobiology of aging*, 28(4), 568-578.
12. La Spada AR. Spinocerebellar Ataxia Type 7. 1998 Aug 27 [Updated 2020 Jul 23]. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2024.
13. Magaña, J. J., Tapia-Guerrero, Y. S., Velázquez-Pérez, L., Cerecedo-Zapata, C. M., Maldonado-Rodríguez, M., Jano-Ito, J. S., y Cisneros, B. (2014). Analysis of CAG repeats in five SCA loci in Mexican population: epidemiological evidence of a SCA7 founder effect. *Clinical genetics*, 85(2), 159-165.
14. Martinez, F. J., Pratt, G. A., Van Nostrand, E. L., Batra, R., Huelga, S. C., Kapeli, K., y Yeo, G. W. (2016). Protein-RNA networks regulated by normal and ALS-associated mutant HNRNPA2B1 in the nervous system. *Neuron*, 92(4), 780-795].
15. McLoughlin, H. S., Moore, L. R., y Paulson, H. L. (2020). Pathogenesis of SCA3 and implications for other polyglutamine diseases. *Neurobiology of disease*, 134, 104635.

16. Mederos, L. E. A., Falcón, N. S., Almira, Y. R., y Zaldívar, Y. (2003). Neuropatología molecular de enfermedades poliglutamínicas. *Correo Científico Médico de Holguín*, 7(3), 3.
17. Minakawa, E. N., y Nagai, Y. (2021). Protein aggregation inhibitors as disease-modifying therapies for polyglutamine diseases. *Frontiers in neuroscience*, 15, 621996.
18. Mori, S., Honda, H., Ishii, T., Yoshimura, M., Sasagasako, N., Suzuki, S. O., y Iwaki, T. (2019). Expanded polyglutamine impairs normal nuclear distribution of fused in sarcoma and poly (rC)-binding protein 1 in Huntington's disease. *Neuropathology*, 39(5), 358-367.
19. Moriarty, A., Cook, A., Hunt, H., Adams, M. E., Cipolotti, L., y Giunti, P. (2016). A longitudinal investigation into cognition and disease progression in spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, 6, and 7. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 11, 1-9.
20. Niewiadomska-Cimicka, A., y Trottier, Y. (2019). Molecular targets and therapeutic strategies in spinocerebellar ataxia type 7. *Neurotherapeutics*, 16(4), 1074-1096.
21. Pietrancosta, N., Djibo, M., Daumas, S., El Mestikawy, S., y Erickson, J. D. (2020). Molecular, structural, functional, and pharmacological sites for vesicular glutamate transporter regulation. *Molecular neurobiology*, 57(7), 3118-3142.
22. Purice, M. D., y Taylor, J. P. (2018). Linking hnRNP function to ALS and FTD pathology. *Frontiers in neuroscience*, 12, 326.
23. Rodríguez-Labrada, R., Martins, A. C., Magaña, J. J., Vazquez-Mojena, Y., Medrano-Montero, J., Fernandez-Ruíz, J., y PanAmerican Hereditary Ataxia Network. (2020). Founder effects of spinocerebellar ataxias in the American continents and the Caribbean. *The Cerebellum*, 19, 446-458.

24. Suárez-Sánchez, R., Ávila-Avilés, R. D., Hernández-Hernández, J. M., Sánchez-Celis, D., Azotla-Vilchis, C. N., Gómez-Macías, E. R., y Hernández-Hernández, O. (2022). RNA Foci Formation in a Retinal Glial Model for Spinocerebellar Ataxia Type 7. *Life*, 13(1), 23.
25. Watson, L. M., Wood, M. J. A., Smith, D. C., Scholefield, J., Ballo, R., Kidson, S., y Greenberg, L. J. (2016). Spinocerebellar ataxia type 7 in South Africa: Epidemiology, pathogenesis and therapy: The new millennium. *South African Medical Journal*, 106(sup-1), 107-109.
26. Wojciechowska, M., y Krzyzosiak, W. J. (2011). Cellular toxicity of expanded RNA repeats: focus on RNA foci. *Human molecular genetics*, 20(19), 3811-3821.
27. Yang, H., Liu, S., He, W. T., Zhao, J., Jiang, L. L., y Hu, H. Y. (2015). Aggregation of polyglutamine-expanded ataxin 7 protein specifically sequesters ubiquitin-specific protease 22 and deteriorates its deubiquitinating function in the Spt-Ada-Gcn5-acetyltransferase (SAGA) complex. *Journal of Biological Chemistry*, 290(36), 21996-22004.
28. Zapata, C. M. C. (2013). Descripción clínica y correlación fenotipo-genotipo de la ataxia espinocerebelosa tipo 7 en la población mexicana (Doctoral dissertation, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO).
29. Zoghbi, H. Y., y Orr, H. T. (2000). Glutamine repeats and neurodegeneration. *Annual review of neuroscience*, 23(1), 217-247.