

UCH-FC  
Biotecnología

Z947  
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE, FACULTAD DE CIENCIAS, ESCUELA DE PREGRADO

**“USO DE VECTORES VIRALES ADENO-ASOCIADOS PARA  
ESTUDIAR EL EFECTO DE LA GANANCIA DE FUNCIÓN DEL  
FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN XBP1 EN UN NUEVO MODELO  
MURINO PARA LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

**AMPARO ZULETA RODRÍGUEZ**

Director de Seminario de Título: Dr. Claudio Hetz F.  
Co-director de Seminario de Título: Dr. René Vidal G.  
Profesor Patrocinante: Dr. Miguel Allende C.

Agosto de 2011  
Santiago – Chile



## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, que el Seminario de Título presentado por la candidata:

### AMPARO ZULETA RODRÍGUEZ

#### “USO DE VECTORES VIRALES ADENO-ASOCIADOS PARA ESTUDIAR EL EFECTO DE LA GANANCIA DE FUNCIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN XBPI EN UN NUEVO MODELO MURINO PARA LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON”

Ha sido aprobado por la Comisión evaluadora y revisora, como requisito parcial, para optar al título profesional de Ingeniera en Biotecnología Molecular.

*Dr. Claudio Hetz*

**Director del Seminario de Título**

*Dr. René Vidal*

**Co-Director del Seminario de Título**

*Dr. Miguel Allende*

**Patrocinante**

**Comisión Revisora y Evaluadora**

*Dr. Álvaro Glavic*

**Presidente**

*Dra. Verónica Palma*

**Evaluadora**

Santiago de Chile, Agosto de 2011

Sección de firmas manuscritas con un sello circular que dice "BIBLIOTECA CENTRAL FACULTAD DE CIENCIAS UNIVERSIDAD DE CHILE". Las firmas corresponden a Claudio Hetz, René Vidal, Miguel Allende, Álvaro Glavic y Verónica Palma.



A mi Ma' y a mi Pa'  
que me dieron las alitas  
con las que hoy quiero aprender a volar...



*There's no merit without crisis.*

Albert Einstein  
1879 - 1955

## BIOGRAFÍA

Porteña de nacimiento y Viñamarina por adopción, nacida en el convulsionado otoño del año 1987 al interior de una familia de clase media y laica. Es la primera de tres hijos para una pareja de padres profesionales.

Creció en un ambiente intelectualmente crítico, dialógico y gregario formado por adultos jóvenes que potencian su desarrollo y su autonomía personal.

Recibió desde siempre la influencia progresista de la enseñanza e instrucción de la cultura francófona dentro del marco de los valores de “Liberté, Égalité, Fraternité”. En este contexto, tempranamente exhibió sus amplias sensibilidades y



habilidades por las artes de las ciencias y de manera muy particular por las ciencias biológicas, marcando específicamente su interés por la Genética.

Rigurosa en la observación, perseverante en el método de los cuestionamientos posteriores, propositiva y constante en el proceso del aprender y del enseñar, obtuvo frecuentes resultados meritorios que la destacaron como una de las primeras entre sus iguales, con distinciones y reconocimientos en el área de la lengua materna y adquirida y en las disciplinas de las ciencias biológicas.

Les Gaulois, Grupo Scouts perteneciente a la Alianza Francesa de Valparaíso, la ve recorrer todos los caminos y roles del quehacer grupal y la reconoce especialmente por la “Certeza” como principal virtud dentro de su Humanidad.

Los sabores, las texturas, los colores y los aromas de Puebla de los Ángeles en México, detonan su avidez por degustar más gentes y territorios a conocer y recorrer.

Los frecuentes y muy buenos resultados académicos como trayectoria, le permiten acceder para ser educada en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, dónde se forma como alumna regular y al mismo tiempo contribuye a formar a otras generaciones de estudiantes, en su rol de ayudante alumna en diversas Cátedras que incrementan su acervo cultural biológico, dentro de los plazos estipulados por la Institución para acceder al título de Ingeniera en Biotecnología Molecular, promoción 2006.

*Me faltan las palabras para poder expresar con elocuencia mi más sincero y profundo agradecimiento...*

... a mis Papás, porque sin su inmensísimo e incondicional apoyo esto no hubiese sido posible,

... al Mono y al Jenaro, por haber amenizado los fines de semana de estos 6 añitos fuera de casa,

... a mis Abuelos, por haberme agasajado y mimado en cada instancia que les fue posible,

... a mis Amigos del alma, mi Paulita y mi Mati, por haber estado siempre, pero siempre conmigo,

... a mi Pajarito, por haberme rescatado de los ataques imaginarios de las células rojas y por haberme mantenido viva durante este importante proceso,

... al PAKM, por estos últimos añitos de onces, conversaciones y muchas, muchas risas,

... a la Paolita y al Willian, que fueron mis segundos padres al decidir abandonar el nido paterno,

... al Claudio, por haber confiado este ambicioso pequeño proyecto a esta Cabra Chica,

... al René, por la enorme paciencia que tuvo durante la conducción de este trabajito,

... a las Gusanas y los Gusanos, por todo ese optimismo durante las extenuantes y a veces frustrantes jornadas laboratorísticas,

... a mis Compañeros, por haber hecho de la sala de clases un lugar menos aburrido,

... a mis Profesores, porque seguramente gracias a ellos, también, he podido llegar hasta aquí.

... En fin, a todos aquellos que han dejado una marquita durante estos 24 añitos. Gracias a todos ustedes hoy puede decir orgullosamente:

*¡Misión Cumplida!*

# I. ÍNDICE

## I.1. Índice de contenidos.

I.	ÍNDICE .....	vi
I.1.	Índice de contenidos .....	vi
I.2.	Índice de figuras .....	viii
I.3.	Índice de tablas .....	viii
I.4.	Lista de abreviaturas .....	ix
II.	RESUMEN .....	1
III.	ABSTRACT .....	2
IV.	INTRODUCCIÓN .....	4
IV.1.	Características generales de la enfermedad de Huntington .....	4
IV.2.	Modelos animales utilizados en el estudio de la enfermedad de Huntington .....	5
IV.3.	Eventos patológicos moleculares de la enfermedad de Huntington .....	8
IV.4.	Potenciales estrategias terapéuticas para la enfermedad de Huntington .....	10
IV.5.	Adaptación al estrés celular: la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) .....	13
IV.6.	La enfermedad de Huntington y la UPR .....	18
V.	OBJETIVOS .....	22
V.1.	Objetivos generales .....	22
V.2.	Objetivos específicos .....	22
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	23
VI.1.	Materiales .....	23
VI.1.1.	Materiales y reactivos .....	23
VI.1.2.	Material biológico .....	24
VI.2.	Métodos .....	24
VI.2.1.	Trasformación de bacterias quimiocompetentes .....	24
VI.2.2.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	25
a.	PCR con la enzima ADN polimerasa Pfu Ultra <sup>TM</sup> II Fusion HS .....	25
b.	PCR convencional .....	25
c.	PCR en tiempo real (qPCR) .....	26
VI.2.3.	Purificación de ADN plasmidial .....	27
a.	Extracción de ADN plasmidial por fenol: cloroformo .....	27

b.	Extracción de ADN plasmidial por <i>kit</i> .....	27
VI.2.4.	Digestión de ADN plasmidial.....	27
VI.2.5.	Purificación de ADN a partir de gel de agarosa.....	28
VI.2.6.	Ligación de fragmentos de PCR en vector pCR®BluntTOPO®.....	28
VI.2.7.	Ligación de fragmentos de ADN en vectores de expresión.....	28
VI.2.8.	Secuenciación.....	29
VI.2.9.	Cultivo celular.....	30
VI.2.10.	Transfección de líneas celulares.....	30
a.	Transfección de líneas celulares por fosfato de calcio.....	30
b.	Transfección de líneas celulares por Effectene.....	31
VI.2.11.	Western Blot.....	31
VI.2.12.	Ensayo de Luciferasa.....	32
VI.2.13.	Síntesis de ADNc.....	33
VI.2.14.	Producción y purificación de virus AAV recombinantes.....	34
VI.2.15.	Titulación de los virus AAV.....	35
VI.2.16.	Estereotáxis en la región del estriado en ratón.....	38
VI.2.17.	Fijación y disección de tejido para análisis histológico.....	39
VI.2.18.	Inmunofluorescencia.....	39
a.	Inmunofluorescencia en líneas celulares.....	39
b.	Inmunofluorescencia en cortes histológicos.....	40
VI.2.19.	Microscopía y análisis estadístico.....	40
<b>VII.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
VII.1.	Clonamiento de las secuencias Htt588-mRFP en el vector de expresión pAAV.....	42
VII.2.	Expresión de las proteínas de fusión Htt588-mRFP en líneas celulares.....	47
VII.3.	Titulación de los virus AAV-Htt588-mRFP.....	49
VII.4.	Expresión de la proteína de fusión Htt588Q95-mRFP <i>in vivo</i> .....	51
VII.5.	Funcionalidad del virus AAV-XBP1s-GFP.....	58
VII.6.	Efecto de XBP1s sobre la agregación de Htt mutante <i>in vivo</i> .....	60
<b>VIII.</b>	<b>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....</b>	<b>63</b>
VIII.1.	Generación de los vectores virales AAV-Htt588mRFP.....	63
VIII.2.	Un nuevo modelo viral adeno-asociado para el estudio de la enfermedad de Huntington.....	65
VIII.3.	Ganancia de función de XBP1 como alternativa terapéutica para modular la agregación de Huntingtina mutante.....	70
<b>IX.</b>	<b>PROYECCIONES.....</b>	<b>73</b>
<b>X.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>75</b>

## I.2. Índice de figuras.

<b>Figura 1.</b> Respuesta a Proteínas mal Plegadas (UPR). .....	17
<b>Figura 2.</b> Diagrama de producción de virus adeno-asociados. ....	37
<b>Figura 3.</b> Digestiones secuenciales de los plasmidios pCR®BluntTOPO®-Htt588-mRFP y pAAV-Htt588-mRFP. ....	44
<b>Figura 4.</b> Mapa del vector pAAV-Htt588Q95-mRFP. ....	45
<b>Figura 5.</b> Secuenciación del plasmidio pCR®BluntTOPO®-Htt588Q95-mRFP con los partidores M13Fw y M13Rv y partidores internos para Htt. ....	46
<b>Figura 6.</b> Secuencia aminoacídica de la proteína de fusión Htt588Q95-mRFP. ....	47
<b>Figura 7.</b> Expresión de los constructos pAAV-Htt588Q95-mRFP y pAAV-Htt588Q17-mRFP en líneas celulares. ....	48
<b>Figura 8.</b> Determinación del título viral de los virus AAV-Htt588Q95-mRFP y AAV-Htt588Q17-mRFP. ....	50
<b>Figura 9.</b> Estrategia experimental utilizada para la generación de un nuevo modelo animal de la EH y para el estudio del efecto de la sobreexpresión de XBP1s sobre la agregación de Htt mutante. ....	52
<b>Figura 10.</b> Inmunofluorescencia en cortes histológicos de cerebros transducidos con los virus AAV-Htt588-mRFP. ....	54
<b>Figura 11.</b> Tipo de inclusiones en células RFP positivas <i>in vivo</i> . ....	55
<b>Figura 12.</b> Poblaciones de células RFP positivas <i>in vivo</i> . ....	57
<b>Figura 13.</b> Cinética de agregación de Htt588Q95-mRFP <i>in vivo</i> . ....	58
<b>Figura 14.</b> Funcionalidad del virus AAV-XBP1s-eGFP. ....	59
<b>Figura 15.</b> Cotransducción de AAV-Htt588Q95-mRFP y AAV-XBP1s-GFP <i>in vivo</i> . ....	61
<b>Figura 16.</b> Efecto de XBP1s sobre la agregación de Htt mutante. ....	62

## I.3. Índice de tablas.

<b>Tabla 1.</b> Resumen de las características de los modelos animales más comunes para la enfermedad de Huntington. ....	7
<b>Tabla 2.</b> Curva estándar de ADN utilizada en la titulación de los virus AAV. ....	49
<b>Tabla 3.</b> Cálculo del título viral de los virus AAV-Htt588-mRFP. ....	50

#### I.4. Lista de abreviaturas.

<b>Abreviatura:</b>	<b>Significado:</b>
AAV	Adeno Associated Virus
AAV2/2	Virus Adeno-Asociado de serotipo 2
ADN	Ácido Desoxiribonucleico
ADNc	Ácido Desoxiribonucleico complementario
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
ASK1	Apoptosis signal-regulating Kinase 1
ATF4/ATF6	Activating Transcription Factor 4/6
BCA	Bicinchoninic Acid
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor
BiP	Binding immunoglobulin Protein
BSA	Bovine Serum Albumin
CHOP	C/EBP Homologous Protein
CMV	Citomegalovirus
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
dNTPs	Deoxyribonucleotides Triphosphate
DPr	Desórdenes relacionados con Prión
EA	Enfermedad de Alzheimer
ECL	Enhanced Chemiluminescence
eGFP	enhanced Green Fluorescent Protein
EH	Enfermedad de Huntington
ELA	Esclerosis Lateral Amiotrófica
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EP	Enfermedad de Parkinson
ERAD	Endoplasmic Reticulum (ER)-Associated protein Degradation
GABA	Gamma-Aminobutyric acid
GDNF	Glial cell-Derived Neurotrophic Factor
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
HAP1	Huntingtin-Associated Protein 1
HDAC	Histone deacetylases
HEK 293	Human Embryonic Kidney 293
Herp	Homocysteine-induced Endoplasmic Reticulum Protein
HIP1	Huntingtin Interacting Protein 1
HRP	Horseradish Peroxidase
Htt	Huntingtina
IRE1 $\alpha$	Inositol Requiring Kinase 1 $\alpha$
JNK	cJun-N terminal kinase
Luc	Luciferasa
mRFP	monomeric Red Fluorescent Protein
N2A	Neuro-2A
NeuN	Neuronal Nuclei
NGF	Nerve Growth Factor
NMDA	N-Methyl-D-aspartate
pAAV	Plasmidio de expresión del Virus Adeno-Asociado

PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDI	Protein Disulfide Isomerase
PERK	double-stranded RNA-activated-Protein kinase-like Endoplasmic Reticulum Kinase
poliQ	poli Glutamina
PrPsc	Proteína prión scrapie
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction
RE	Retículo Endoplasmático
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SFB	Suero Fetal Bovino
shRNA	short hairpin Ribonucleic Acid
SOD1	Superóxido Dismutasa
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TRAF2	TNRF-Associated Factor 2
UE	Unidades Enzimáticas
UPR	Unfolded Protein Response
XBP1	X-box Binding Protein 1
XBP1s	X-box Binding Protein 1 spliced

## II. RESUMEN

La enfermedad de Huntington es una enfermedad neurodegenerativa hereditaria causada por la expansión del codón GAC en el primer exón del gen que codifica para la proteína Huntingtina. Esta mutación se traduce en una expansión de una región rica en glutamina en el extremo amino-terminal de la proteína y le confiere una ganancia de función dañina para el organismo, en especial al sistema nervioso. La proteína mutante forma agregados tóxicos, llevando a una pérdida neuronal selectiva en el estriado lo que desencadena los síntomas asociados a la patología. Hasta el momento no ha sido posible desarrollar una cura o terapia contra esta patología. Estudios recientes sugieren la posible participación de respuestas a estrés de retículo en la enfermedad de Huntington. En este trabajo se reporta la generación de un nuevo modelo para estudiar la enfermedad de Huntington *in vivo*. Este modelo animal fue generado mediante la transferencia génica a través de vectores virales adeno-asociados, codificantes para un fragmento amino-terminal de 588 aminoácidos de Huntingtina humana con una región patológica de 95 glutaminas, fusionado a la proteína fluorescente roja monomérica. Para esto, la secuencia codificante para la proteína de fusión Htt588Q95-mRFP fue clonada en un vector de expresión viral adeno-asociado con el cual luego se produjeron las partículas virales recombinantes. Las partículas virales fueron inyectadas intraestriatalmente en ratones macho adultos mediante estereotáxis y se evaluó la agregación de la proteína Huntingtina mutante al cabo de 2, 4 y 8 semanas. Luego de 2 semanas post-inyección fue posible observar células con inclusiones citoplasmáticas, alcanzando un 70% de agregación máxima al cabo de 4 semanas post-inyección. Con el objetivo de analizar el

impacto del estrés de retículo en la patología, se coinyectaron los virus adeno-asociados codificantes para la proteína de fusión Huntingtina mutante y para el factor de transcripción *X-box Binding Protein 1* (XBP1) activo en la región de estriado. La sobreexpresión del factor de transcripción XBP1 llevó a una disminución en un 15,1% en la agregación de Huntingtina mutante evaluada 4 semanas post-inyección. Estos resultados indican que la sobreexpresión del factor de transcripción activo, XBP1s, representa una potencial alternativa terapéutica en el tratamiento de las características patológicas de la enfermedad de Huntington en un nuevo modelo *in vivo*.

### III. ABSTRACT

Huntington's disease is a hereditary neurodegenerative disease caused by CAG codon expansion in the first exon of the Huntingtin gene. This mutation results in an expansion of a glutamine rich region at the amino-terminus of Huntingtin and confers to the protein a gain of function harmful to the body, especially to the nervous system. The mutant protein form toxic aggregates, leading to a selective neuronal loss in the striatum which triggers the symptoms associates with the pathology. So far it has not been possible to develop a cure or therapy against this disease. Recent studies suggest the possible involvement of endoplasmic stress responses in Huntington's disease. This work reports the generation of a new model to study Huntington's disease *in vivo*. This animal model was generated by gene transfer via adeno-associated viral vectors, coding for an amino-terminal fragment of 588 amino acids of human Huntingtin with a pathological region with 95 glutamines, fused to the monomeric red fluorescent protein. For this, the coding

sequence for Htt588Q95-mRFP fusion protein was cloned into an adeno-associated viral expression vector which was used to generate the recombinant viral particles. The viral particles were injected by stereotaxis in the adult mice striatum and the mutant Huntingtin aggregation was evaluated at 2, 4 and 8 weeks after injection. Two weeks post-injection it was possible to observe cells with cytoplasmic inclusions, reaching a maximum aggregation of 70% after 4 weeks. In order to analyze the impact of the endoplasmic reticulum stress in the pathology, adeno-associated virus coding for the mutant Huntingtin fusion protein and for the active transcription factor *X-box Binding Protein 1* (XBP1) were co-injected in the adult mice striatum. Mutant Huntingtin aggregation was decreased by 15,1% by the overexpression of the transcription factor XBP1s, 4 weeks post-injection. These results indicate that overexpression of the active transcription factor, XBP1s, represents a potential therapeutic alternative in the treatment of pathological features of Huntington's disease in a new model *in vivo*.

## **IV. INTRODUCCIÓN**

### **IV.1. Características generales de la enfermedad de Huntington.**

La enfermedad de Huntington (EH), es una enfermedad neurodegenerativa hereditaria (autosómica dominante), causada por la expansión del triplete CAG en exón 1 del gen *IT15*, ubicado en el cromosoma 4 y codificante para la proteína Huntingtina (Htt). Esta expansión CAG se traduce en la extensión de un fragmento rico en glutamina (poliQ) en la región amino-terminal de la proteína, confiriéndole a ésta características estructurales y funcionales diferentes a las de la proteína silvestre. La proteína silvestre contiene en promedio 18 glutaminas en tándem y expansiones superiores a 35 glutaminas producen que la proteína sea insoluble, dando paso a la formación de oligómeros y agregados proteicos (Kremer et al., 1994). La prevalencia de la mutación que origina la EH se calcula entre 4 a 10 personas por cada 100.000 habitantes en la población de Europa Occidental (Zuccato et al., 2010).

La EH se caracteriza por el desarrollo de síntomas psiquiátricos, cognitivos y motores (van Dellen et al., 2005). Entre los problemas psiquiátricos se puede mencionar que los pacientes manifiestan cambios de personalidad y depresión. Entre los síntomas cognitivos los pacientes presentan una disminución de la capacidad visual, de la flexibilidad cognitiva, una pérdida de memoria y también demencia. Los síntomas motores se caracterizan por la presencia de movimientos involuntarios del tronco, cabeza y extremidades, corea, atrofia muscular que compromete la capacidad de hablar (disartria), tragar (disfagia), caminar (dystonia y bradicinesia) y una serie de tics motores. Existe una relación directa entre el largo del fragmento poliQ y la edad promedio de la

aparición y agresividad de los síntomas de la enfermedad (Macdonald et al., 1993). Los primeros síntomas de la EH se manifiestan, generalmente, alrededor de los 40 o 50 años de edad y la muerte se produce entre los 10 a 20 años más tarde. Expansiones mayores a 60 repeticiones de glutamina se asocian al desarrollo precoz de la sintomatología, denominado Huntington juvenil (Imarisio et al., 2008; Zuccato et al., 2010). A nivel celular, la patología se caracteriza por la formación de inclusiones nucleares y citoplasmáticas en células de distintas áreas cerebrales (DiFiglia et al., 1997). Las células principalmente afectadas en la enfermedad son las neuronas medio espinales de la región del estriado y en menor medida las neuronas piramidales de la corteza. Estas poblaciones neuronales degeneran selectivamente, interrumpiendo el circuito cortico-estriatal, lo que contribuye a los déficits motores y cognitivos propios de la EH. Otras regiones cerebrales como el globus pallidus, amígdala, cerebelo e hipocampo también se ven afectadas y presentan alteraciones morfológicas. La alteración del hipocampo podría contribuir a los problemas cognitivos de la EH. Tejidos *post-mortem* derivados de pacientes revelan una respuesta de microglía activada en las zonas afectadas (estriado y corteza) proporcional al grado de pérdida neuronal producida (van Dellen et al., 2005).

#### **IV.2. Modelos animales utilizados en el estudio de la enfermedad de Huntington.**

Una serie de modelos animales de la EH se han desarrollado con el fin de caracterizar a nivel celular y molecular los procesos alterados en la enfermedad y de evaluar potenciales alternativas terapéuticas. Estos modelos son capaces de recapitular algunas características de la patología y se diferencian unos de otros en el tamaño de la proteína

Htt expresada, en el número de glutaminas en la expansión poliQ, en el patrón de expresión y en los niveles de expresión de la proteína mutante. Esto incide directamente en el fenotipo patológico del modelo, variando la agresividad de la patología en cuanto a las áreas cerebrales afectadas, la intensidad de las características alteradas y en el tiempo de aparición de las mismas (Heng et al., 2008). Los modelos animales para la EH pueden dividirse en modelos genéticos y modelos virales. Los modelos genéticos pueden subdividirse en modelos transgénicos y modelos *knock-in*. Los primeros expresan la proteína Htt mutante humana, o un fragmento de ella, incluyendo la mutación en la región poliQ bajo un promotor distinto al promotor endógeno y el gen de Htt exógena se inserta al azar en el genoma del animal. Los modelos *knock-in* poseen una inserción de repeticiones del codón CAG en uno de los alelos endógenos del gen de Htt de ratón o bien poseen un reemplazo del exón 1 del gen de Htt endógeno por el exón 1 del gen humano portador de la expansión CAG (Zuccato et al., 2010). Los modelos genéticos que mejor recapitulan la sintomatología de la enfermedad son el modelo transgénico YAC128 y el modelo *knock-in* HdhQ111, con fenotipos motores detectables entre los 3 a 4 meses y 2 años de edad, respectivamente (Heng et al., 2008). En los modelos virales la expresión de Htt es modulada por la transducción con vectores virales en zonas específicas del cerebro, liberados mediante inyección estereotáxica. Los vectores virales más comunes para el modelamiento de la EH son lentivirus y virus adeno-asociados (AAV) recombinantes que codifican para la proteína Htt mutante. En general, ambos modelos virales presentan robustos fenotipos celulares y tisulares al cabo de 2 semanas post-inyección (de Almeida et al., 2002; DiFiglia et al., 2007; Franich et al., 2008) y son capaces de generar un fenotipo motor en periodos de tiempo más acotados que los modelos genéticos (DiFiglia et al., 2007; Palfi et al., 2007). Las características de los modelos animales más utilizados en el estudio de la EH se resumen en la Tabla 1.

**Tabla 1. Resumen de las características de los modelos animales más comunes para la enfermedad de Huntington.**

Modelo	Transcrito	poliQ	Inicio Enfermedad	Muerte	Características Celulares y Tissulares	Fenotipo motor y cognitivo	Pérdida neuronal	Referencia
<b>R6/2</b>	Exon 1 (humano)	148-153	5-6 semanas	12-15 semanas	Inclusiones nucleares y citoplasmáticas (día 1); Respuesta astrocitaria (GFAP); Reducción tamaño del estriado y cerebro (12 semanas); Aumento tamaño del ventrículo.	Deficiencia de aprendizaje y memoria (3.5 semanas); Anomalia rotarod (5 semanas); <i>Clasping</i> ; Hipercinesis e hipocinesis.	Estriado (26%, 12 semanas)	Heng <i>et al.</i> , 2008
	<i>Full length</i> (humano)	128	3 meses	No letal	Inclusiones nucleares (18 meses); Reducción tamaño estriado y corteza (9 meses).	Anomalia rotarod (6 meses); Deficiencias motoras progresivas; <i>Clasping</i> ; Hipercinesis e hipocinesis; Ataxia.	Estriado (15%, 12 meses) corteza	
	Exon 1 (quimérico)	94 140	4-6 meses	No letal	Pequeñas inclusiones nucleares (6 meses) y citoplasmáticas en estriado y otras regiones; Reducción tamaño estriado (15%, 18 meses).	Disminuye locomoción (4-6 meses); Hiperactividad e hipocinesis.	No reportado	
	Exon 1 (quimérico)	111 92	4 meses	No letal	Inclusiones nucleares (12 meses) y citoplasmáticas en estriado, globus pallidus y sustancia negra (17 meses); Respuesta astrocitaria (GFAP).	Alteraciones motoras (24 meses).	Estriado	
	Exon 1 (ratón)	150	4 meses	No letal	Inclusiones nucleares (10 meses) y citoplasmáticas en globus pallidus y sustancia negra; Respuesta astrocitaria (GFAP); Degeneración axonal; Reducción tamaño estriado (25 meses, homocigoto).	Pérdida de peso, disminuye actividad, anomalías rotarod, temblores y ataxia (25 meses).	estriado (50%, 25 meses)	
<b>Lentiviral</b>	171	44; 66; 82	2-4 semanas: rata 9 semanas: mono	No evaluado	Inclusiones nucleares y citoplasmáticas; Pérdida de marcadores neuronales NeuN y DARPP32 directamente proporcional a la expansión poliQ; Respuesta astrocitaria (GFAP); Muerte celular (Fluorolade y núcleos hipertrómicos).	Discinesia e hipercinesis (9 semanas en mono en condiciones inducidas y 30 semanas en condiciones espontáneas); tics motores.	Estriado	DeAlmeida <i>et al.</i> , 2002
	853	82	3 meses	No evaluado	Inclusiones nucleares y citoplasmáticas; pérdida de DARPP32 inversamente proporcional al largo de la proteína; Respuesta astrocitaria (GFAP); Muerte celular (Fluorolade).	No evaluado.	Estriado	
	1520	> 6 meses	> 6 meses	No evaluado			Estriado	
<b>AAV</b>	171	70	2 semanas	No evaluado	Inclusiones nucleares; Pérdida marcadores neuronales NeuN y DARPP32; Respuesta astrocitaria (GFAP); Contracción del estriado; Muerte celular (Fluorolade); Contracción del estriado; Aumento tamaño del ventrículo.	No evaluado.	Estriado, globus pallidus sustancia nigra (5 semanas)	DiFiglia <i>et al.</i> , 2007 Kegel <i>et al.</i> , 2010
	400	100	2 semanas	No evaluado	Inclusiones nucleares y citoplasmáticas; Células transduccionas más pequeñas; Procesamiento de Htt.	<i>Clasping</i> .	Estriado	Franch <i>et al.</i> , 2008

### **IV.3. Eventos patológicos moleculares de la enfermedad de Huntington.**

Htt es una proteína soluble de 3144 aminoácidos (348KDa) que se expresa constitutivamente tanto en el sistema nervioso como fuera de él y cuya estructura y función fisiológica no han sido completamente definidas. Htt posee una amplia distribución subcelular y se encuentra asociada a diversos organelos como por ejemplo el núcleo, el retículo endoplasmático (RE), el complejo de Golgi, microtúbulos y estructuras vesiculares en neuritas y sinapsis (Cattaneo et al., 2005).

Diversos estudios han relacionado la presencia de la proteína Htt mutante con la alteración del funcionamiento normal de una serie de procesos celulares, no necesariamente interconectados y que podrían estar involucrados en el desarrollo de las características patológicas de la EH. Estos estudios han sido realizados en líneas celulares, modelos animales y tejidos *post-mortem* derivados de pacientes. Entre los principales procesos celulares que se ven afectados en la EH podemos mencionar una alteración del patrón de expresión génica, una alteración en el tráfico vesicular y en el transporte axonal (Sugars y Rubinsztein, 2003; van Dellen et al., 2005; Zuccato et al., 2010). También se han descrito alteraciones en el proceso de autofagia, una pérdida y disfunción mitocondrial y una alteración en la homeostasis de calcio, entre otros (Sugars y Rubinsztein, 2003; van Dellen et al., 2005; Zuccato et al., 2010). La alteración en el patrón de expresión génica se debe a la interacción directa de Htt mutante con factores de transcripción y proteínas coactivadoras o represoras de la transcripción (Sugars y Rubinsztein, 2003; van Dellen et al., 2005; Zuccato et al., 2010). En la EH se han descritos cambios, principalmente, en la transcripción de receptores de neurotransmisores como por ejemplo el receptor de glutamato, de NMDA (del inglés *N-Methyl-D-*

*aspartate*), de GABA (del inglés *gamma-Aminobutyric acid*), de adenosina, de dopamina y de receptores canabinoides además de alteraciones en la transcripción del factor neurotrófico BDNF (del inglés *Brain Derived Neurotrophic Factor*) (Imarisio et al., 2008; van Dellen et al., 2005; Zuccato et al., 2010). El BDNF es esencial en la sobrevivencia de las neuronas estriatales y en la funcionalidad de las sinapsis cortico-estriatales (Imarisio et al., 2008), por lo que la alteración de la transcripción de este factor neurotrófico podría producir directamente la sensibilidad selectiva de las neuronas en el estriado (van Dellen et al., 2005). Otros de los procesos afectados en la EH son el tráfico vesicular y el transporte axonal (Imarisio et al., 2008; Zuccato et al., 2010). Diferentes estudios han demostrado la interacción de Htt con elementos del citoesqueleto a través de las proteínas HAP1 (*Huntingtin-associated protein 1*) e HIP1 (*Huntingtin Interacting Protein 1*), que actúan como adaptadores moleculares que unen diferentes proteínas a los motores moleculares involucrados tanto en el transporte axonal anterógrado como retrógrado (Imarisio et al., 2008; Zuccato et al., 2010). Los defectos en estos procesos podrían deberse a la unión diferencial de la proteína Htt mutante a HAP1 y HIP1, respecto a la proteína silvestre (Velier et al., 1998), como también a la disrupción del citoesqueleto producida por la formación de agregados citoplasmáticos en las neuritas (Li et al., 2001). Las alteraciones en el proceso de autofagia en la EH pueden atribuirse a posibles fallas en el reconocimiento de los sustratos de degradación (Martinez-Vicente et al., 2010) y también al secuestro de un regulador esencial para la autofagia Beclin-1 dentro de los agregados proteicos de Htt mutante (Shibata et al., 2006). La pérdida y disfunción mitocondrial compromete el metabolismo energético celular y produce daño oxidativo, contribuyendo a la disfunción neuronal y muerte

celular (Quintanilla y Johnson, 2009). Por último, la alteración en la homeostasis de calcio se debe posiblemente a mecanismos sinérgicos como la potenciación de la activación de receptores de NMDA, la promoción de la movilización de calcio y la interferencia con la recaptación mitocondrial de calcio (Rockabrand et al., 2007).

En resumen, la expresión de Htt mutante altera el metabolismo y la homeostasis celular en diversas etapas que contribuyen a la pérdida de la función neuronal y muerte celular en zonas específicas del cerebro. Sin embargo hasta el día de hoy no existe claridad sobre cuáles son los eventos moleculares principales que desencadenan las características patológicas de la EH y no existen tratamientos efectivos contra la enfermedad.

#### **IV.4. Potenciales estrategias terapéuticas para la enfermedad de Huntington.**

Con el fin de prevenir o revertir los efectos patológicos de la proteína Htt mutante en modelos de la EH, se han estudiado múltiples estrategias de intervención, principalmente, farmacológicas y genéticas para alterar las distintas vías y procesos celulares afectados en la enfermedad. Si bien la mayoría de estos estudios se encuentran a nivel pre-clínico, algunos de ellos han alcanzado el nivel de estudios clínicos de fase II (Zuccato et al., 2010). Estos estudios tienen por principal objetivo el bloqueo de los eventos patológicos descritos en la EH o la eliminación la proteína Htt mutante ya sea por un silenciamiento génico o por un aumento la degradación de ésta. Otras alternativas estudiadas consisten en estrategias que favorecen el plegamiento de Htt mutante y que disminuyen la formación de agregados proteicos (Southwell y Patterson, 2011; Zuccato et al., 2010).

Entre las principales estrategias terapéuticas diseñadas contra los mecanismos patológicos producidos por Htt mutante en diversos modelos de la EH, se puede mencionar: el uso de drogas contra la exitotoxicidad, el aumento en los niveles de factores neurotróficos como BDNF y en menor medida GDNF (del inglés *Glial cell-Derived Neurotrophic Factor*), NGF (del inglés *Nerve Growth Factor*) y Neuritina, la inhibición de la proteólisis de Htt, la modificación de la transcripción génica y el restablecimiento de la función mitocondrial (Imarisio et al., 2008; Southwell y Patterson, 2011; Zuccato et al., 2010). Todas estas estrategias sólo tienen efecto positivo sobre algunas características patológicas específicas, y al intervenir procesos celulares con un amplio rango de acción de sus blancos, estas aproximaciones podrían generar un sinnúmero de efectos secundarios indeseados (Imarisio et al., 2008; Southwell y Patterson, 2011; Zuccato et al., 2010).

Desde el año 2005 se han desarrollado al menos 10 estrategias de silenciamiento génico con ARN interferentes (ARNi) y horquillas pequeñas de ARN (shRNA, del inglés *short hairpin RNA*) para el gen de Htt en distintos modelos animales de la EH. El silenciamiento de la expresión de Htt en modelos animales murinos disminuye la cantidad de agregados nucleares y citoplasmáticos, atenúa la pérdida de marcadores neuronales como NeuN y DARPP32, previene la muerte neuronal y además mejora las deficiencias motoras (Imarisio et al., 2008; Southwell y Patterson, 2011; Zuccato et al., 2010). Los ARNi y shRNA utilizados en estos estudios no son capaces de distinguir entre el alelo de Htt mutante y el silvestre, y al ser específicos para el gen de Htt humano no es posible evaluar el potencial efecto de la pérdida de la proteína Htt endógena. Por lo mismo, estos estudios no son comparables a la situación en pacientes humanos dónde se

silenciaría la expresión tanto de la proteína Htt mutante como silvestre. La proteína Htt es fundamental durante en desarrollo del sistema nervioso y ratones *knock-out* para Htt mueren al antes del día 8,5 de gestación (van Dellen et al., 2005; Zuccato et al., 2010).

La sensibilidad a la pérdida de la proteína silvestre pudiera diferir entre los humanos y los ratones. Debido a lo anterior y a los largos tratamientos requeridos en pacientes humanos, sería necesario diseñar oligonucleótidos específicos para el alelo de Htt mutante en la implementación de una terapia de silenciamiento génico contra la EH.

La eliminación de la proteína mutante también ha sido estudiada como una alternativa de terapia en modelos de la EH. Los agregados proteicos de Htt no son accesibles a la maquinaria del proteasoma para su degradación, por lo que la principal vía de degradación de Htt mutante es la macroautofagia, referida desde ahora como autofagia (Kouroku et al., 2007; Williams et al., 2006). Un aumento de los niveles de autofagia disminuye los niveles de agregación de Htt mutante en distintos modelos de la EH (Imarisio et al., 2008; Zuccato et al., 2010). Tratamientos farmacológicos permiten aumentar la autofagia de forma global. Otra alternativa es incrementar la autofagia de forma específica aumentando el tipo de autofagia mediada por chaperonas. Bauer y sus colaboradores demostraron que la transducción con AAV codificantes para un péptido de reconocimiento a la región poliQ expandida (QBP1) fusionado a un dominio de unión de la chaperona HSC70 (del inglés *Heat Shock Cognate protein 70*), permite dirigir selectivamente la proteína Htt mutante a la vía de autofagia mediada por chaperonas (Bauer et al., 2010). Otros estudios han sido dirigidos a disminuir la formación de agregados proteicos. Por ejemplo, la sobreexpresión de chaperonas y la utilización de chaperonas químicas favorece el plegamiento proteico evitando la formación de

agregados de Htt mutante y la inhibición de la actividad transglutaminasa, que forma enlaces covalentes entre péptidos, podría también tener un efecto en la formación de los mismos (Imarisio et al., 2008; Southwell y Patterson, 2011; Zuccato et al., 2010).

En resumen, distintas estrategias terapéuticas que alteran los procesos de síntesis, plegamiento y degradación de proteínas han sido evaluadas en diversos modelos de la EH, a fin de evitar o reducir la expresión de Htt mutante y revertir los efectos patológicos de la enfermedad. Es necesario continuar investigando los mecanismos de acción de estas estrategias con el objetivo de desarrollar una alternativa terapéutica que revierta de forma global las características patológicas de la EH e impida la evolución de la enfermedad.

#### **IV.5. Adaptación al estrés celular: la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR).**

Durante la síntesis proteica en la vía secretora, las proteínas pasan a través de un estricto control de calidad que verifica su correcto plegamiento, para luego ser exportadas a su destinación final como el propio RE, complejo de Golgi, lisosomas, sistema endosomal, membrana plasmática o espacio extracelular. Este proceso de verificación del plegamiento ocurre en el RE y posibles alteraciones en la homeostasis del RE podrían llevar a la acumulación de proteínas mal plegadas y a la formación de agregados proteicos (Matus et al., 2011). En el RE existen mecanismos que previenen la acumulación de proteínas mal plegadas. Este mecanismo censa el estado de plegamiento de las proteínas en el lumen reticular e inicia una cascada de señalización hacia el núcleo que activa la transcripción de genes involucrados en el plegamiento de proteínas (chaperonas) y en su degradación, con el fin de prevenir o aliviar el estrés reticular. Este

mecanismo adaptativo se denomina Respuesta a Proteínas mal plegadas o UPR (del inglés *Unfolded Protein Response*) y controla una serie de genes involucrados en distintos procesos incluyendo la entrada de proteínas al RE, plegamiento, glicosilación, degradación asociada al RE (ERAD del inglés *Endoplasmic Reticulum (ER)-Associated protein Degradation*), control de calidad de proteínas, metabolismo redox, autofagia, biogénesis de lípidos y tráfico vesicular (Hetz y Glimcher, 2009) (Figura 1B). Por otro lado el estrés crónico o prolongado en el RE desencadena la apoptosis celular (Woehlbier y Hetz, 2011).

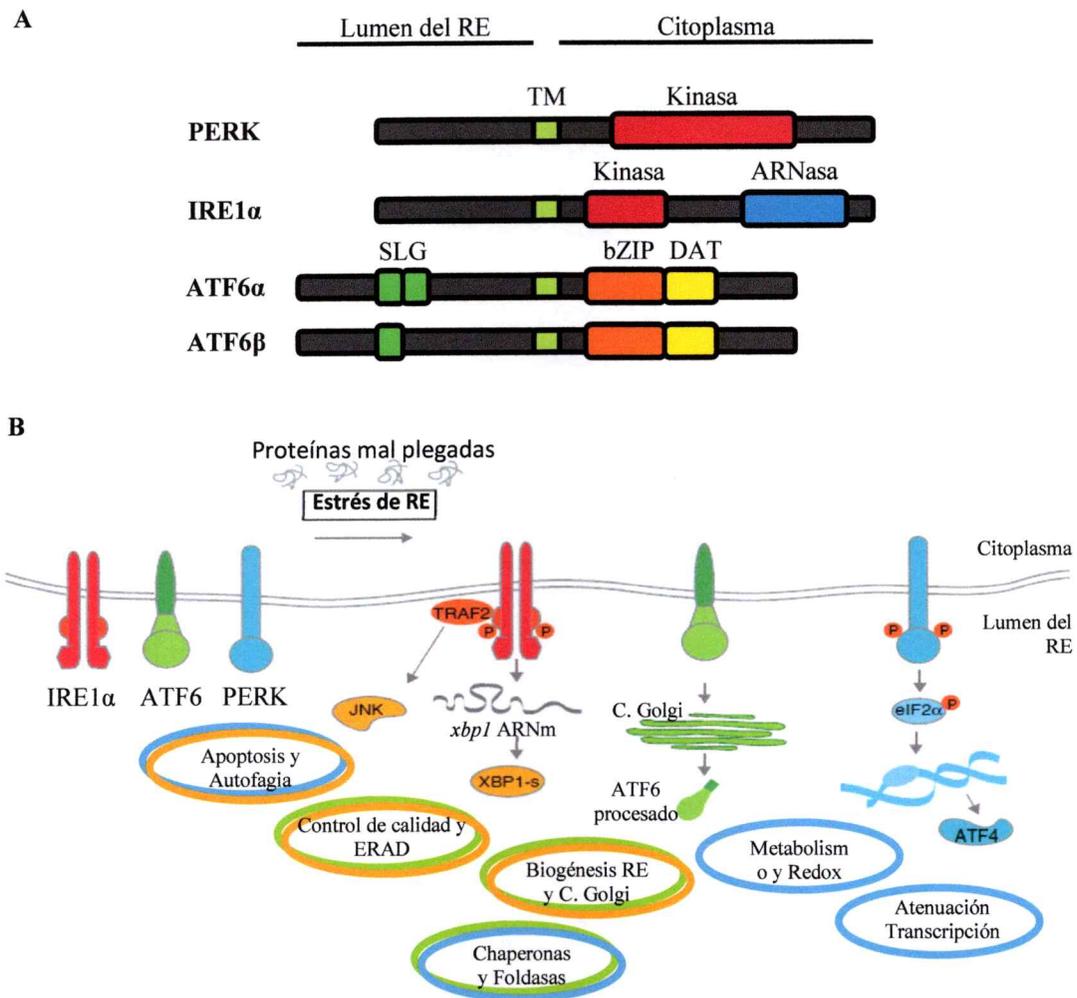
La UPR se inicia por la activación de tres sensores de estrés ubicados en la membrana del RE que desencadenan tres vías de señalización diferentes (Hetz y Glimcher, 2009). Estos sensores son PERK (del inglés *double-stranded RNA-activated-Protein kinase-like Endoplasmic Reticulum Kinase*), ATF6  $\alpha$  y  $\beta$  (*Activating Transcription Factor 6*) e IRE1 $\alpha$  (*Inositol Requiring Kinase 1*) (Figura 1A). PERK es una proteína de transmembrana con un dominio citosólico con actividad kinasa (Ron y Walter, 2007). PERK activado fosforila al factor eucariótico de iniciación de la traducción 2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ), inhibiendo la traducción génica y reduciendo la carga proteica. eIF2 $\alpha$  fosforilado aumenta, específicamente, la traducción del factor de transcripción ATF4 (*Activating Transcription Factor 4*), el cual regula genes relacionados con el metabolismo aminoacídico y la homeostasis redox (Hetz y Glimcher, 2009). Por otro lado, ATF6 $\alpha$  y ATF6 $\beta$  son proteínas de transmembrana con un dominio que proyecta hacia el lumen del RE cuya función es censar el estrés reticular y un dominio citosólico que codifica para un factor de transcripción bZIP (*basic leucine Zipper*) (Ron y Walter, 2007). Durante el estrés de RE, ATF6 es procesado en el complejo de Golgi liberando el dominio

citoplásmico que transloca al núcleo donde activa directamente la transcripción de chaperonas reticulares y genes involucrados en la ERAD (Hetz y Glimcher, 2009). La ERAD es el principal mecanismo de control de calidad que permite eliminar proteínas mal plegadas dentro del lumen reticular o en la membrana. Las proteínas dañadas son transportadas al citoplasma donde son ubiquitinadas y luego degradadas por el proteasoma (Hampton, 2002).

Por último, IRE1 $\alpha$  es una proteína de transmembrana con un dominio sensor de estrés de RE que proyecta hacia el lumen y un dominio citoplásmico con actividad kinasa y endoribonucleasa. Bajo condiciones de estrés reticular IRE1 $\alpha$  dimeriza, lo que favorece su autofosforilación y consiguiente activación del dominio endoribonucleasa (Hetz y Glimcher, 2009). IRE1 $\alpha$  activo inicia el procesamiento no convencional del ARN mensajero (ARNm) del factor de transcripción XBP1 (*X-Box-binding Protein 1*), removiendo una región de 26 nucleótidos. Este procesamiento modifica el marco de lectura del nuevo ARNm y da origen a la traducción de una proteína activa denominada XBP1s. El factor de transcripción XBP1s viaja al núcleo y activa la transcripción de genes relacionados con el plegamiento de proteínas, con el control de calidad, con la entrada de proteínas al RE, con la ERAD, la biosíntesis de lípidos y la biogénesis del RE y complejo de Golgi (Hetz y Glimcher, 2009). El dominio citoplásmico de IRE1 $\alpha$  puede unirse al adaptador proteico TRAF2 (*TNRF-Associated Factor 2*) activando vías apoptóticas reguladas por ASK1 (*Apoptosis signal-regulating Kinase 1*) y JNK (*cJun-N terminal kinase*) en caso de estrés reticular irreversible (Hetz y Glimcher, 2009).

En resumen, la UPR es un complejo mecanismo de señalización que modula la adaptación al estrés reticular a fin de restablecer la homeostasis o bien desencadena la

muerte celular por apoptosis cuando los niveles de estrés son irreversibles. Durante los últimos diez años, diversos estudios indican que la activación de respuestas a estrés de retículo se asocian a diferentes enfermedades neurodegenerativas asociadas con la acumulación proteica (Matus et al., 2011)



**Figura 1. Respuesta a Proteínas mal Plegadas (UPR).**

(A) Sensores de la UPR. PERK (*double-stranded RNA-activated-Protein kinase-like Endoplasmic Reticulum Kinase*), IRE1 $\alpha$  (*Inositol Requiring Kinase 1*) y ATF6  $\alpha$  y  $\beta$  (*Activating Transcription Factor 6*). Las abreviaciones son: TM, dominio de transmembrana; SLG, secuencia de localización para el complejo de Golgi; bZIP, *basic leucine zipper* y DAT, dominio de activación transcripcional. (B) Vía de señalización de la UPR. La acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del RE activa la respuesta UPR a través de los sensores IRE1 $\alpha$ , ATF6 y PERK que desencadenan cascadas de señalización a fin de recuperar la homeostasis celular o activan la vía de muerte celular por apoptosis. Imágenes modificadas de (A) Hetz y Glimcher, 2008 y (B) Matus *et al.* 2011.

#### IV.6. La enfermedad de Huntington y la UPR.

Estudios recientes han vinculado la EH con el estrés de retículo en distintos modelos de la enfermedad. Las primeras evidencias surgieron a partir de modelos celulares en los cuales la expresión de una proteína con una expansión poliQ patológica activa los sensores de estrés de retículo IRE1 $\alpha$  y PERK, así como también induce la activación de algunos de sus blancos río abajo como CHOP (del inglés *C/EBP Homologous Protein*) y BiP (*Binding immunoglobulin Protein*) (Kouroku et al., 2002; Nishitoh et al., 2002). Por otro lado, la proteína poliQ patológica gatilla el estrés reticular en células en cultivo, lo que activa la expresión de ASK1 y JNK, y el procesamiento de caspasa 12, llevando a la muerte celular por apoptosis (Kouroku et al., 2002; Nishitoh et al., 2002). Dos estudios demostraron que la expresión de Htt mutante en levaduras y líneas celulares produce una rápida inhibición de la ERAD (Duennwald y Lindquist, 2008; Reijonen et al., 2008). El primer trabajo indica que el defecto en la ERAD se debe al secuestro de proteínas esenciales en este proceso dentro de los agregados citosólicos de Htt mutante, como por ejemplo Np14, Ufd1 y p97 inhibiendo su acción (Duennwald y Lindquist, 2008). Las fallas en la ERAD conducen a la acumulación de sustratos, desencadenando estrés reticular. A partir de estos estudios *in vitro*, los autores proponen que las células estriatales en cultivo son especialmente sensibles al estrés de retículo, lo que podría explicar la especificidad celular de la EH.

Sólo tres estudios reportan la ocurrencia de estrés de retículo en modelos animales *in vivo*. Carnemolla demostró por primera vez una sobrerregulación de los marcadores tempranos de estrés BiP y Herp en el estriado de ratones *knock-in* modelos de la EH, así como también la sobrerregulación de otro gen relacionado con estrés de retículo Rrs1

(Carnemolla et al., 2009). Otro estudio demuestra que la inyección de estresores de retículo en ratones transgénicos modelos de EH aumenta la agregación de Htt mutante en el estriado (Noh et al., 2009). Los autores proponen que el estrés reticular producido por la expresión de Htt mutante, induce la sobrerregulación de la proteína SCAMP5, un inhibidor de la endocitosis, aumentando los niveles de agregación de Htt mutante y desencadenando neurotoxicidad (Noh et al., 2009). Finalmente Cho y sus colaboradores demostraron la sobreexpresión de la proteína ASK1 en la corteza y en el estriado de ratones transgénicos modelos de EH, lo que es consistente con los resultados *in vitro* obtenidos por los grupos de Kouroku y Nishito (Cho et al., 2009). La ocurrencia de estrés de retículo fue confirmada en tejidos derivados de pacientes *post-mortem* donde se observó un aumento de los niveles de ARNm de los marcadores Bip y Herp y del marcador tardío CHOP (Carnemolla et al., 2009; Cho et al., 2009). La mayoría de los datos presentados en estos estudios son correlativos y no existen reportes que demuestren el rol del estrés de retículo y la UPR en la progresión de la EH *in vivo*. Debido a lo anterior, la manipulación farmacológica o genética de la vía de señalización de la UPR es requerida a fin de dilucidar su posible rol en la EH y futura relevancia en la generación de estrategias terapéuticas.

Como se mencionó anteriormente, diversos estudios han reportado la activación de la UPR en otras enfermedades neurodegenerativas relacionadas con mal plegamiento de proteínas tales como la enfermedad de Alzheimer (EA), la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), la enfermedad de Parkinson (EP) y desordenes relacionados con Prion (DPr) (Matus et al., 2011). Distintos marcadores de estrés de retículo han sido

detectados en tejido *post-mortem* derivado de pacientes afectados por estas enfermedades (Matus et al., 2011).

Existen reportes que demuestran una participación del factor de transcripción XBP1 en diversos modelos de enfermedades neurodegenerativas. La sobreexpresión del factor de transcripción activo XBP1s, presenta una actividad neuroprotectora en dos modelos de la EA. Por ejemplo, la sobreexpresión de XBP1s protege contra la citotoxicidad producida por oligómeros A $\beta$  en líneas celulares, previniendo la muerte celular y rescata la neurotoxicidad en el ojo de moscas transgénicas que expresan el péptido  $\beta$ -amiloide (Casas-Tinto et al., 2011). También se ha evidenciado el efecto protector de XBP1s en modelos de la EP. La sobreexpresión de XBP1s protege contra la muerte celular y degeneración neuronal en modelos farmacológicos celulares y animales de la EP (Sado et al., 2009). Por otro lado, un estudio realizado por nuestro laboratorio revela que la deficiencia de XBP1 en un modelo celular de ELA reduce la toxicidad de la proteína Superóxido Dismutasa 1 (SOD1) mutante por una disminución de los agregados proteicos. Ratones *knock-out* para XBP1 y transgénicos para la proteína mutante SOD1, presentan una mayor tasa de supervivencia y la eliminación prácticamente total de agregados de SOD1 mutante en la médula espinal. Estos efectos son atribuidos al aumento del proceso de autofagia tanto *in vitro* como *in vivo* (Hetz et al., 2009). En contraste, la supresión de XBP1 en ratones *knock-out* infectados con la proteína Prión scrapie no afecta la agregación proteica, ni la pérdida neuronal ni la supervivencia de los animales (Hetz et al., 2008).

En resumen, el efecto de la manipulación de XBP1 ha sido evaluado en distintos modelos de enfermedades neurodegenerativas asociadas al mal plegamiento de

proteínas, obteniéndose resultados dispares. La sobreexpresión de XBP1s protege contra la muerte celular y neurotoxicidad en modelos de la EA y EP, mientras que la eliminación del factor de transcripción tiene efectos neuroprotectores en modelos de la enfermedad de ELA y no tiene efecto significativo sobre las características patológicas en modelos de DPR. Hasta la fecha, el posible rol de XBP1 no ha sido evaluado en modelos de la EH y la manipulación de la expresión de XBP1 podría tener efectos terapéuticos sobre las características patológicas de esta enfermedad. Basado en todos los antecedentes planteados anteriormente, proponemos la siguiente hipótesis: La sobreexpresión del factor de transcripción activo XBP1s disminuye la agregación de Huntingtina mutante en células del estriado *in vivo*.

## V. OBJETIVOS

### V.1. Objetivos generales.

- Generar un nuevo modelo animal para la EH utilizando vectores virales AAV codificantes para la proteína Htt humana mutante y silvestre fusión RFP.
- Evaluar el efecto de la ganancia de función del factor de transcripción activo XBP1s, sobre la agregación de Htt humana mutante *in vivo*.

### V.2. Objetivos específicos.

- Clonar las secuencias Htt588Q95-mRFP y Htt588Q17-mRFP en el vector de expresión de los vectores virales AAV.
- Producir partículas virales AAV2/2-CMV-Htt588Q95-mRFP y AAV2/2-CMV-Htt588Q17-mRFP infectivas.
- Inyectar los vectores virales AAV en la región del estriado en ratones adultos.
- Evaluar la agregación de Htt humana mutante en una curva temporal *in vivo*.
- Coinyectar los vectores virales AAV-Htt588Q95-mRFP y AAV-XBP1s-GFP en la región del estriado en ratones adultos.
- Evaluar el efecto de la sobreexpresión de XBP1s sobre la agregación de Htt humana mutante *in vivo*.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### VI.1. Materiales.

#### VI.1.1. Materiales y reactivos.

Las sales, ácidos, bases, detergentes, bromuro de etidio y solventes fueron obtenidos de Merck y Sigma. La agarosa y acrilamida de Merck. El cóctel de inhibidores de proteasas fue adquirido en Roche.

Las enzimas PfuUltra<sup>TM</sup> II, Taq polimerasa, Go Taq, Transcriptasa reversa, ADNasas y ARNasas, endonucleasas y ligasa T4 fueron obtenidas de Stratagene, Invitrogen, Promega, BioRad, Sigma y New England BioLabs<sup>®</sup>, respectivamente.

El medio de cultivo celular y los antibióticos fueron obtenidos de Invitrogen y el suero fetal bovino, de Life Technologies.

Los plasmidios peGFPC1-Htt588Q138-mRFP y peGFPC1-Htt588Q15-mRFP fueron enviados gentilmente por el Dr. Ray Truant (Atwal et al., 2007), los plasmidios pAAV-RC, pAAV-Helper y pAAV2-CMV fueron obtenidos a partir del *kit* AAV-Helper free System de Stratagene y el *kit* de clonación pCR<sup>®</sup>BluntTOPO<sup>®</sup>, de Invitrogen.

Los *kits* de purificación de ADN plasmidial y de purificación de ADN a partir de gel de agarosa fueron adquiridos de de QIAGEN y el kit de ensayo de Luciferasa de Promega.

Los anticuerpos primarios EM48,  $\alpha$ -GFAP y  $\alpha$ -NeuN fueron obtenidos de Millipore, Sigma y Chemicon International, respectivamente y el anticuerpo  $\alpha$ -XBP1 fue donado por el laboratorio de Laurie Glimcher. Los anticuerpos secundarios  $\alpha$ -mouse-HRP,  $\alpha$ -

rabbit-HRP y Alexa Fluor<sup>®</sup> fueron obtenidos de Invitrogen y la tinción nuclear Hoeschst de Intergen<sup>®</sup>.

### **VI.1.2. Material biológico.**

Las líneas celulares HEK 293 y N2A fueron obtenidas de la compañía ATCC. El virus AAV2/2-CMV-XBP1s-EF1a-eGFP (AAV-XBP1s-eGFP) fue producido por la empresa Genzyme. Los ratones macho C57BL/6j de entre 10 y 12 semanas de edad fueron adquiridos en el Bioterio de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

## **VI.2. Métodos.**

### **VI.2.1. Transformación de bacterias quimiocompetentes.**

Bacterias DH5 $\alpha$  quimiocompetentes fueron descongeladas en hielo y mezcladas manualmente con el ADN plasmidial requerido. Las bacterias fueron incubadas durante 30 minutos en hielo, luego por 45 segundos a 42°C y finalmente por 1 minuto en hielo. Un volumen de 800  $\mu$ l de medio SOC tibio fue agregado y la reacción fue incubada una hora, con agitación constante a 200 rpm y 37°C. Las bacterias fueron centrifugadas a 2.000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante en exceso fue eliminado, dejando 100  $\mu$ l para resuspender el precipitado. Las bacterias resuspendidas fueron sembradas en placas con medio LB agar suplementadas con el antibiótico correspondiente (Ampicilina 200  $\mu$ g/ml o Kanamicina 50  $\mu$ g/ml). Las placas fueron incubadas durante 16 horas a 37°C.

## **VI.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**

### **a. PCR con la enzima ADN polimerasa Pfu Ultra™ II Fusion HS.**

Una masa de 75 ng de los plasmidios peGFPC1-Htt588-mRFP fue incubada con tampón de reacción PfuUltra™ II 10x, dNTPs 0,25 mM de cada uno, partidores 0,2 µM cada uno y 1 µl de enzima ADN polimerasa PfuUltra™ II (Stratagene), en un volumen final de 50 µl. Los partidores utilizados en la reacción fueron: partidador sentido 5'TTGAATTCATGGCGACCCTGGAAAAGC3' y partidador antisentido 5'TTAGATCTTTATCTAGAGGCGCCGGTG3', con sitios de restricción para las endonucleasas EcoRI y BglII respectivamente.

El programa de PCR utilizado fue el siguiente: Un periodo de denaturación de 2 minutos a 95°C, 30 ciclos de amplificación con periodos de denaturación, hibridación y elongación de 20 segundos a 95°C, 20 segundos a 57°C y 30 segundos a 72°C, respectivamente y un periodo de elongación final de 3 minutos a 72°C. Los productos de PCR fueron resueltos en geles de agarosa 1% con bromuro de etidio 1 µg/ml a 100 V.

### **b. PCR convencional.**

Un volumen de 1 µl de ADN conteniendo entre 5 y 100 ng fue incubado junto con 12,5 µl de Go Taq Master Mix (Promega), partidores 1 µM cada uno, en un volumen final de 25 µl. Los partidores utilizados para la reacción fueron diseñados para amplificar una región central de 124 pb Htt Humana por PCR en tiempo real y sus secuencias son: sentido (Htt-RT-SN) 5'ACAATGTTGTGACCGGAGC3' y antisentido (Htt-RT-AS) 5'GACTCCTCCTTAGCAGCGG3'.

El programa de PCR utilizado fue el siguiente: Un periodo de denaturación de 3 minutos a 94°C, 30 ciclos de amplificación con periodos de denaturación, hibridación y elongación de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C y 1 minuto a 72°C, respectivamente y un periodo de elongación final de 3 minutos a 72°C. Los productos de PCR fueron resueltos en geles de agarosa 1% con bromuro de etidio 1 µg/ml a 100 V.

**c. PCR en tiempo real (qPCR).**

Un volumen de 4 µl de una dilución 1:40 de ADNc o 1 µl en el caso de ADN plasmidial, fue incubado con tampón SYBR Mix 10x, dNTPs 0,16 mM cada uno, SYBRgreen 100x, partidores 0,1 µM cada uno y 0,25 µl de enzima GO Taq<sup>®</sup> Flexi (Promega) en un volumen final de 25 µl. Los partidores utilizados fueron Htt-RT-SN y Htt-RT-AS, descritos previamente, y partidores diseñados para amplificar una región de 87pb del factor de transcripción XBP1 cuyas secuencias son: sentido (mXBP-551-S-RT) 5'TTGTCACCTCCCCAGAACATC3' y antisentido (mXBP-638-A-RT) 5'TCCAGAATGCCCAAAGGAT3'. El programa de PCR utilizado fue el siguiente: un ciclo de denaturación de 10 minutos a 95°C, 35 ciclos de 15 segundos a 95°C, 15 segundos a 57°C y 15 segundos a 72°C y un ciclo final de 10 segundos a 95°C, 5 segundos a 25°C, 1 segundo a 70°C y 1 segundo a 95°C en un sistema ABI PRISM 7700 de Applied Biosystems.

### **VI.2.3. Purificación de ADN plasmidial.**

#### **a. Extracción de ADN plasmidial por fenol: cloroformo.**

El ADN plasmidial fue purificado por extracción doble, tomando 50  $\mu$ l de solución de CsCl conteniendo las partículas virales AAV o 5  $\mu$ l de la solución viral concentrada. La solución conteniendo las partículas virales fue aforada a 100  $\mu$ l con agua libre de nucleasas y la mitad del volumen de Fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (Invitrogen) fue agregada. La solución fue agitada en *vortex* y centrifugada a máxima velocidad por 5 minutos a 4°C. La fracción acuosa de aproximadamente 90  $\mu$ l fue recuperada. El procedimiento fue repetido agregando la mitad del volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico.

#### **b. Extracción de ADN plasmidial por *kit*.**

El ADN plasmidial fue extraído utilizando las columnas de purificación de ADN plasmidial de los *kits* QIAGEN Plasmid Mini, Midi y Maxi Kits, siguiendo las instrucciones del proveedor.

### **VI.2.4. Digestión de ADN plasmidial.**

EL ADN plasmidial (entre 200 ng y 1  $\mu$ g) fue digerido utilizando 6UE de las endonucleasas EcoRI, BglII, NotI y XhoI (New England BioLabs®) en un volumen final de 20 a 100  $\mu$ l, durante 16 horas a 37°C. Digestiones secuenciales de ADN plasmidial fueron realizadas, utilizando como primera endonucleasa aquella con sólo un sitio de corte en el plasmidio. La reacción fue incubada 4 horas a 37°C al cabo de las cuales la

segunda endonucleasa fue agregada. La reacción completa fue incubada durante 16 horas a 37°C. Los fragmentos de restricción fueron resueltos en geles de agarosa al 0,8% con bromuro de etidio 0,1 µg/ml a 100 V.

#### **VI.2.5. Purificación de ADN a partir de gel de agarosa.**

Las bandas de ADN en el gel de agarosa fueron visualizadas utilizando luz UV al 70%. El ADN fue purificado del gel utilizando el *kit* QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN®).

#### **VI.2.6. Ligación de fragmentos de PCR en vector pCR®BluntTOPO®.**

Los fragmentos hHtt588-mRFP (Htt588-mRFP) amplificados por PCR fueron clonados en el vector pCR®BluntTOPO® (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del proveedor. Un volumen de 4 µl de la reacción de PCR producidos por la enzima PfuUltra™ II fue mezclado con 1 µl de solución salina y 1 µl del vector pCR®BluntTOPO®. La solución fue agitada manualmente e incubada por 5 minutos a temperatura ambiente. Las bacterias quimiocompetentes fueron transformadas con 2 µl de la reacción de clonación y fueron sembradas en placas con medio LB agar suplementadas con Kanamicina 50 µg/ml. Las bacterias fueron incubadas 16 horas a 37°C.

#### **VI.2.7. Ligación de fragmentos de ADN en vectores de expresión.**

Los fragmentos de ADN correspondientes al *backbone* del plasmidio de expresión pAAV2-CMV (pAAV) y a los insertos Htt588Q95-mRFP o Htt588Q17-mRFP fueron ligados utilizando dos proporciones diferentes de *backbone* e inserto. Volúmenes de 2 µl

o 6  $\mu$ l del *backbone* purificado fueron mezclados con 15  $\mu$ l u 11  $\mu$ l de inserto purificado y 1  $\mu$ l de ADN Ligasa T4 (New England BioLabs®). La reacción fue llevada a cabo en un volumen final de 20  $\mu$ l durante 16 horas a 16°C. Al cabo de 16 horas, 0,2  $\mu$ l de ADN Ligasa T4 fueron agregados a cada reacción y éstas fueron incubadas por 1 hora a temperatura ambiente.

Tres alícuotas de 30  $\mu$ l de bacterias quimiocompetentes fueron transformadas, para cada reacción de ligación descrita anteriormente. Cada transformación fue realizada con 5  $\mu$ l de la reacción de ligación, siguiendo el protocolo ya descrito. Las bacterias fueron centrifugadas a 2.000 rpm por 5 minutos, los precipitados correspondientes a la misma transformación fueron juntados, resuspendidos en 100  $\mu$ l de medio SOC y sembrados en placas con medio LB agar suplementadas con Ampicilina 200  $\mu$ g/ml. Las bacterias fueron incubadas por 16 horas a 37°C. Dos colonias por condición fueron seleccionadas para verificar la correcta ligación mediante análisis de restricción.

#### **VI.2.8. Secuenciación.**

Los plasmidios pCR®BluntTOPO®-Htt588-mRFP y peGFPC1-Htt588-mRFP fueron secuenciados en Centro de Cáncer Dana-Farber (Harvard) utilizando los partidores internos a Htt: sentido (Htt\_int\_Fw) 5'CTGGACAAGCTGCTCTG3' y antisentido (Htt\_int\_Rv) 5'GCACTCAAGAAGGACAC3' y los partidores externos a la secuencia Htt588-mRFP M13Rv y M13Fw, en el caso de los plasmidios pCR®BluntTOPO® y sentido (Htt\_mRFP\_ext\_Fw) 5'ACCTCTACAAATGTGGTATGGC3' y antisentido (Htt\_mRFP\_ext\_Rv) 5'GCAGAGCTGGTTTAGTG3', en el caso de los plasmidios originales.

### **VI.2.9. Cultivo celular.**

Las células fueron mantenidas a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> en Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM). Suplementadas con 5-10% de suero fetal bovino (SFB), glutamina 1 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml. Las células fueron subcultivadas al alcanzar confluencia.

### **VI.2.10. Transfección de líneas celulares.**

#### **a. Transfección de líneas celulares por fosfato de calcio.**

Las células fueron sembradas en placas de 100mm. El medio de cultivo fue reemplazado por 8ml de medio DMEM fresco con 10% SFB al alcanzar 60-70% de confluencia y luego de 2 horas las células fueron transfectadas. Una masa de 10 µg de ADN fue mezclada con 1ml de CaCl<sub>2</sub> 25 mM. Un volumen de 1 mL de tampón salino HEPES 2x pH 7,1 (HEPES 50mM, NaCl 280mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,5 mM) fue agregado gota a gota a la mezcla ADN/Ca<sup>2+</sup>, agitando en *vortex* constantemente. La solución fue incubada a temperatura ambiente por 5 minutos. Un volumen de 2 ml de la solución CaCl<sub>2</sub>/ADN fue agregada gota a gota a la placa de cultivo cubriendo la totalidad de la superficie y agitando constantemente.

El medio de cultivo fue reemplazado por medio DMEM fresco suplementado con 10% SFB luego de 24 horas post transfección. Para transfecciones en placas de menor tamaño, el volumen de los reactivos fue calculado proporcionalmente al volumen de medio de cultivo a utilizar.

**b. Transfección de líneas celulares por Effectene.**

Las células fueron sembradas en pocillos de 60 mm sobre cubreobjetos de 10 mm de diámetro a una concentración de 100.000 células/ml. Luego de 24 horas, 0,6 µg de ADN fueron mezclados con 3,2 µl de Enhancer y el volumen de reacción fue aforado a 100 µl con tampón EC. La mezcla fue agitada en *vortex* durante 15 segundos e incubada a temperatura ambiente durante 10 minutos. Un volumen de 10 µl de Effectene fue agregado a la mezcla y ésta fue agitada 10 segundos e incubada a temperatura ambiente durante 15 minutos. La solución fue mezclada con 600 µl de medio DMEM 10% SFB y 690 µl de la mezcla fueron agregados gota a gota a la placa de cultivo, cubriendo la totalidad de la superficie.

**VI.2.11. Western Blot.**

Las células fueron colectadas utilizando un *cell scraper* y centrifugadas a 2.000 rpm por 5 minutos a 4°C. El precipitado celular fue resuspendido en tampón RIPA o Tritón 1x, ambos suplementados con inhibidor de proteasas (Roche). Las células fueron homogeneizadas por sonicación 3 veces durante 5 segundos y se determinó la concentración de proteínas utilizando el *kit* Pierce® BCA Protein Assay.

Una masa de 30-50 µg de proteínas totales fue mezclada con tampón de carga 5x (Tris-HCl pH 8,0 50mM, SDS 2%, DTT 100mM, azul de bromofenol 0,01%, glicerol 10%), las muestras fueron incubadas a 95°C durante 5 minutos y cargadas en un geles de poliacrilamida 8% preparados según las siguientes concentraciones descritas por el método de Laemmli (1970): Gel separador: Tris-HCl 0.38M pH 8,3, acrilamida-bis-acrilamida 8%, SDS 0,1%, persulfato de amonio 0,1% y TEMED 0,06%. Gel

espaciador: Tris-HCl 0,06 M pH 6,8, acrilamida-bis-acrilamida 5%, SDS 0,1%, persulfato de amonio 0,1% y TEMED 0,06%. La electroforesis fue realizada en tampón de corrida (Tris 25 mM, glicina 250 mM y SDS 0,1%) a un voltaje constante de 80V hasta que el frente iónico penetrara en el gel separador y luego a 100V, hasta la caída del mismo.

Las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF en tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina 250 mM, SDS 0,1% y metanol 20%) a 100V durante 2 horas en frío. La membrana fue incubada en solución de bloqueo (leche 0% grasa al 5% en PBS-Tween) durante una hora a temperatura ambiente y luego, con el anticuerpo primario EM48 (Millipore) 1:500 por 16 horas a 4°C o con el anticuerpo anti-XBP1 (L. Glimcher) 1:500 durante 2 horas a temperatura ambiente, diluidos en solución de bloqueo.

La membrana fue lavada 3 veces con PBS-Tween durante 10 minutos e incubada con el anticuerpo secundario  $\alpha$ -mouse-HRP o  $\alpha$ -rabbit-HRP (Invitrogen) 1:3.000, según correspondiera, por una hora a temperatura ambiente. La membrana fue lavada 3 veces con PBS-Tween durante 5 minutos.

Las membranas fueron reveladas sobre películas fotográficas de radiografía Super HR-U (Fujifilm) utilizando el *kit* Pierce® ECL Western Blotting Substrate.

#### **VI.2.12. Ensayo de Luciferasa.**

El ensayo de Luciferasa fue realizado utilizando el *kit* Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega) según las instrucciones del proveedor. Las células N2A fueron sembradas en placas de 12 pocillos a una concentración de 100.000 células/mL. Al cabo

de 24 horas, las células fueron transfectadas con los plasmidios Renila (0,02 µg), UPRE-Luc (0,2 µg) y pAAV2-CMV-XBP1s-Ef1a-GFP (pAAV-XBP1s-GFF), pAAV2-CMV-eGFP (pAAV-eGFP), pCADN3-XBP1s o pCADN3 (0,2 µg) utilizando el método de Effectene. El medio de cultivo fue retirado 48 horas post-transfección y las células fueron lavadas con PBS 1x. Un volumen de 250 µl de tampón pasivo de lisis fue agregado a las células y la solución fue incubada durante 15 minutos a temperatura ambiente con agitación. Un volumen de 20 µl de células lisadas fue agregado a 100 µl de sustrato LARII, la mezcla fue agitada en *vortex*. La luminiscencia de UPRE-Luc fue medida. Un volumen de 100 µl de Stop&Glo fue agregado a la mezcla y ésta fue agitada en *vortex*. La luminiscencia de Renila fue medida. El ensayo fue realizado en un Luminómetro FB 12 de Berthold Detection Systems, con periodos de medición de 10 segundos y un periodo previo de espera de 2 segundos. Los valores relativos de luminiscencia fueron calculados utilizando la razón:

$$Lum = \frac{Lum_{UPRE-Luc}}{Lum_{Renila}}$$

### VI.2.13. Síntesis de ADNc.

El ARN total fue extraído utilizando TRIzol<sup>®</sup> (Invitrogen), según el protocolo del fabricante. El ADNc fue sintetizado utilizando el *kit* iScript cDNA synthesis (BioRad). Una masa 1 µg de ARN fue incubado con tampón RT Buffer 10x, dNTPs 1mM cada uno, partidores oligo dT 10x cada uno y 1 µl de enzima Transcriptasa reversa en un volumen final de 20 µl, durante 5 minutos a 25°C, 45 minutos a 44°C y finalmente 5 minutos a 85°C.

#### **VI.2.14. Producción y purificación de virus AAV recombinantes.**

La producción de virus fue realizada siguiendo el protocolo AAV-Helper-Free System (Stratagene). Las células HEK 293 fueron sembradas en 20 placas de 100mm con medio DMEM suplementado con 5% SFB. El medio de cultivo fue reemplazado por 8ml de medio DMEN con 5% SFB fresco al alcanzar un 60-70% de confluencia. Las células fueron transfectadas al cabo de 2 horas, con 10 µg de cada uno de los plasmidios pAAV-RC, pAAV-Helper y uno de los plasmidios de expresión pAAV2-CMV-Htt588Q95-mRFP (pAAV-Htt588Q95-mRFP) o pAAV2-CMV-Htt588Q17-mRFP (pAAV-Htt588Q17-mRFP), por el método de Fosfato de Calcio. El medio de cultivo fue reemplazado 24 y 48 horas post-transfección por medio DMEN 5% SFB fresco. Las células fueron cosechadas 72 horas post transfección, por resuspensión en el mismo medio de cultivo. Las células fueron colectadas en tubos de 50 ml y centrifugadas a 5.000 rpm por 5 minutos. El precipitado celular correspondiente a las 20 placas transfectadas con el mismo plasmidio de expresión, fue lavado 2 veces con 5 ml de PBS 1x autoclavado. Las células fueron resuspendidas en 5 ml de PBS 1x autoclavado y congeladas rápidamente en etanol sobreenfriado a -80°C para su almacenaje (Figura 2A).

La purificación de las partículas virales AAV fue realizada por gradiente en columnas de CsCl según el protocolo descrito por Grieger (Grieger et al., 2006). Las células fueron lisadas con 5 ciclos de descongelamiento/congelamiento a 37°C/-80°C y agitadas en *vortex* entre cada ciclo. El lisado celular fue tratado con 50 UE de ADNasa (Sigma) y de ARNasa (Sigma) e incubado por una hora a 37°C. La reacción fue centrifugada a 3.000 g por 15 minutos y el sobrenadante fue filtrado en filtros GyroDisc CA-PC de 0,45 µm

(Orange Scientific). El filtrado celular fue aforado a 22 mL con PBS 1x y mezclado con 13 g de CsCl. Los tubos de centrifugación de Polialómero (Beckman) fueron equilibrados con 11ml aproximadamente de cada solución de virus más CsCl. La solución de CsCl fue centrifugada a 60.000-75.000 rpm durante 15 horas a 4°C.

Cada tubo de centrifugación fue perforado en la zona inferior con una aguja, aproximadamente a 1cm de distancia del fondo, permitiendo la elusión del CsCl. Fracciones de entre 1 y 1,5 ml de CsCl fueron colectadas. Las 2 o 3 primeras fracciones fueron cargadas en bolsas de diálisis Slide-A-Lyzer<sup>®</sup> Dialysis Cassette (Thermo Scientific) y dializadas contra PBS 1x durante 16 horas a 4°C con agitación.

El ADN de cada una de las fracciones dializadas fue extraído mediante extracción doble con Fenol: cloroformo y diluciones seriadas de ADN entre 1:10 y 1:1.000 fueron preparadas en agua libre de nucleasas. Un ensayo de PCR convencional fue realizado con 1µl de cada dilución. Las fracciones positivas fueron juntadas y concentradas a un volumen final de 150µl en tubos Amicon<sup>®</sup> Ultra-4 (Millipore) a 3500 g por 10 minutos (Figura 2B).

#### **VI.2.15. Titulación de los virus AAV.**

La titulación de los virus fue realizada en base al protocolo descrito previamente por Rohr (Rohr et al., 2002), para lo cual se realizó una purificación de ADN a partir del concentrado viral por extracción doble con Fenol: cloroformo. Diluciones seriadas de 1:10 y 1:100 fueron preparadas a partir del ADN purificado.

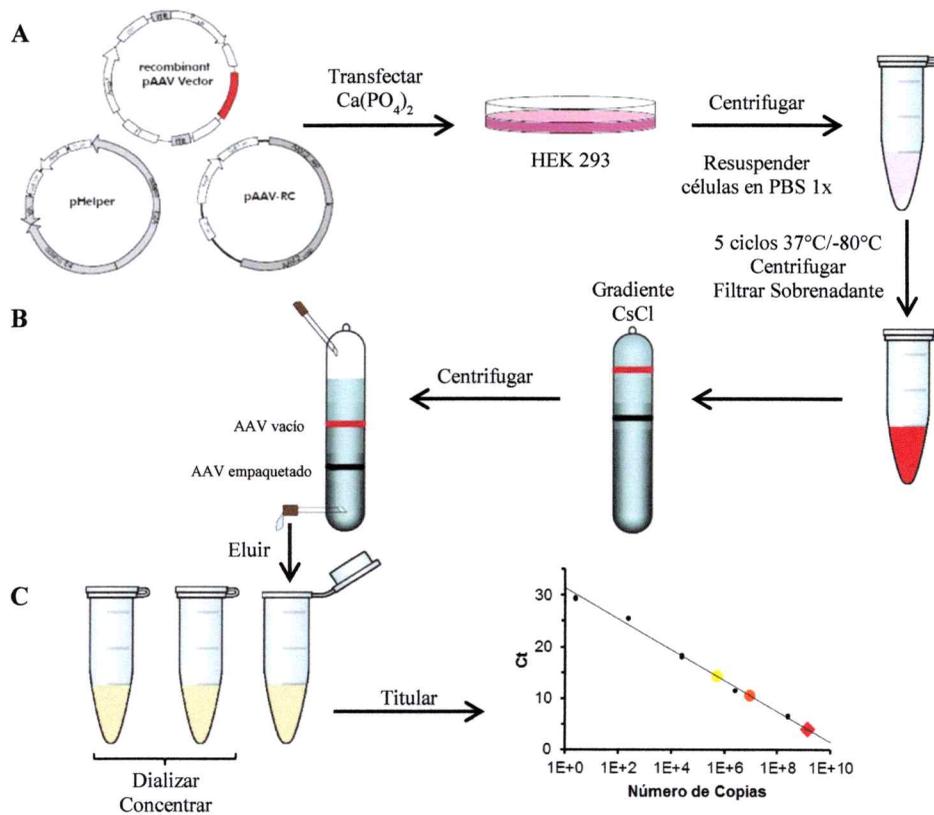
Una curva de calibración fue realizada con una masa entre  $10^{-4}$  y  $10^4$  pg de ADN del plasmidio pAAV-Htt588-mRFP correspondiente a cada virus. El número de copias de

ADN equivalente para cada uno de estos valores, fue calculado utilizando la siguiente ecuación:

$$\#CopiasADN = \left[ \frac{(MasaADN) * (6,022 * 10^{23})}{(\# pb) * (660) * (10^{12})} \right] * 2$$

En esta ecuación se considera la masa de ADN expresada en pg, un peso molecular promedio de 660g/mol por cada par de bases y que un plasmidio es una doble hebra circular de ADN.

El ciclo de amplificación (Ct) del ensayo de PCR en tiempo real (qPCR) fue graficado en función del número de copias de ADN presentes en la reacción (Tabla 2). El número de copias de ADN presentes en cada reacción de PCR fue calculado Para determinar el título de cada uno de los virus. Para esto, el valor promedio del Ct (entre duplicados) fue interpolado en la curva estándar realizada con los plasmidios pAAV-Htt588-mRFP correspondientes. Los valores obtenidos fueron corregidos por el factor de dilución de cada preparación y promediados para obtener el número de copias de ADN viral en la solución de ADN purificado. Finalmente, éste último valor fue corregido por el factor de dilución 20, producto de la purificación de ADN a partir del concentrado viral.



**Figura 2. Diagrama de producción de virus adeno-asociados.**

Esquema del proceso de producción de partículas virales AAV para su utilización *in vivo*. (A) Obtención de las partículas virales. Las células HEK 293 fueron transfectadas con los plasmidios pRC, pHelper, y pAAV. Las células fueron cosechadas 72 horas post-transfección y lisadas por 5 ciclos de descongelamiento/congelamiento. (B) Purificación de las partículas virales. El lisado celular fue cargado en columnas de CsCl y centrifugado a 60.000-75.000 rpm durante 15 horas a  $4^\circ\text{C}$ . La columna de CsCl fue eluída en fracciones de 1 a 1,5 ml. Las tres primeras fracciones fueron dializadas y concentradas. (C) Determinación del título viral. El concentrado viral fue titulado mediante qPCR. Imágenes obtenidas y modificadas de Stratagene, 2008 y Grieger et al., 2006.

### **VI.2.16. Estereotáxis en la región del estriado en ratón.**

Los animales fueron anestesiados por inyección intraperitoneal con una dosis de Ketamina [100 ng/kg] y Xilacina [20 ng/kg]. La reacción al dolor fue medida presionando la cola y las extremidades. Una vez anestesiados, los animales fueron posicionados en el aparato estereotáxico fijando el hocico y las orejas para inmovilizar la cabeza. La zona de corte fue limpiada con agua oxigenada y la piel fue abierta con un bisturí, dejando el cráneo expuesto. El cráneo también fue limpiado con agua oxigenada y perforado según las coordenadas correspondientes al estriado; +0,5 mm antero-posterior,  $\pm 2$  mm lateral, respecto a Bregma (Machida et al., 2006). Los animales fueron inyectados con los virus AAV2/2-CMV-Htt588Q95-mRFP (AAV-Htt588Q95-mRFP), AAV2/2-CMV-mXBP1s-E1fa-GFP (AAV-XBP1s-GFP) y AAV2/2-CMV-eGFP (AAV-eGFP). La jeringa con la dosis de virus a utilizar; 2  $\mu$ l o 4  $\mu$ l, fue posicionada sobre la perforación y descendida hasta -3 mm dorso-ventral (Machida et al., 2006) a una velocidad de 1 mm/min. El título de los virus utilizados fue de  $1,13 \cdot 10^{12}$  DRPs/ml y  $7,52 \cdot 10^7$  genomas virales/ml para los virus AAV-XBP1s-GFP y AAV-eGFP, respectivamente. El virus fue inyectado a una tasa de 1  $\mu$ l/min, luego de 5 minutos la aguja fue retirada 1mm a una velocidad de 0,5 mm/min y se esperó un minuto. Finalmente la aguja fue retirada lentamente. La piel de la cabeza fue sellada con sutura quirúrgica y los animales fueron dispuestos sobre una frazada calefaccionada para una recuperación más rápida de la anestesia. Un total de 3 animales por grupo experimental fue utilizado. Todos los procedimientos con animales vivos fueron realizados de acuerdo a las normas bioéticas establecidas en el protocolo CBA#0306 FMUCH.

### **VI.2.17. Fijación y disección de tejido para análisis histológico.**

Los animales fueron sacrificados 2, 4 u 8 semanas post-inyección estereotáxica. Éstos fueron anestesiados por inyección intraperitoneal con una dosis de Ketamina [100 ng/kg] y Xilacina [20 ng/kg] y perfundidos con 20 ml de suero fisiológico (NaCl 0,9%) y posteriormente con 20 ml de paraformaldehído 4%, pH 7,4 frío. Los cerebros fueron extraídos, fijados en paraformaldehído por 16 horas a 4°C y luego deshidratados en sacarosa 30% y azida de sodio 0,002%. Los cerebros fueron mantenidos a 4°C.

El tejido comprendiendo la región del estriado entre las coordenadas +2mm y -0,2mm respecto a Bregma, fue montado sobre soportes metálicos con OCT (Optimal Cutting Temperature) y cortado en secciones de 30 µm en un Crióstato Leica CM 1510 S. Las criosecciones fueron colectadas cada 6 cortes y almacenadas en PBS1x y azida de sodio 0,002% a 4°C. Toda la región del estriado entre las coordenadas +2 mm y -0,2 mm respecto a Bregma fue analizada de forma pseudo-seriada, seleccionando un corte histológico por sección, es decir un corte histológico cada 30 o 180 µm.

### **VI.2.18. Inmunofluorescencia.**

#### **a. Inmunofluorescencia en líneas celulares.**

El cubreobjetos con las células adheridas fue extraído 24, 48 o 60 horas post-transfección, lavado con PBS 1x, incubado en paraformaldehído 4% durante 10 minutos y luego lavado con PBS 1x. El cubreobjetos fue incubado con Hoechst 1:1000 diluido en PBS 1x durante 10 minutos y luego lavado 3 veces con PBS. El exceso de líquido fue eliminado y el cubreobjetos fue montado en un portaobjetos sobre 3 µl de medio de

montaje Vectashield<sup>®</sup>. El cubreobjetos fue sellado con esmalte y almacenado a 4°C protegido de la luz.

**b. Inmunofluorescencia en cortes histológicos.**

Un corte histológico cada 6 cortes fue seleccionado para el análisis, abarcando toda la región del estriado en estudio. Las criosecciones fueron montadas sobre vidrios VWR Micro Slides Superfrost<sup>®</sup> Plus (VWR International) e incubados con solución de bloqueo (BSA 0,5%, Tritón 0,2% y Azida de Sodio 0,02% en PBS 1x) durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego, los cortes histológicos fueron incubados con los anticuerpos primarios anti-GFAP (Sigma) o anti-NeuN (Chemicon International) 1:500 diluidos en solución de bloqueo durante 16 horas a 4°C. Los cortes fueron lavados 3 veces con PBS 1x por 10 minutos y luego incubados con el anticuerpo secundario Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 (Invitrogen) 1:500 diluido en solución de bloqueo sin azida. Las criosecciones fueron lavadas 3 veces con PBS 1x durante 10 minutos e incubadas con Hoechst 1:1.000 por 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, los cortes montados fueron lavados 2 veces con PBS 1x durante 10 minutos. Un cubreobjetos fue montado sobre los cortes adheridos al vidrio, utilizando medio de montaje Vectashield<sup>®</sup>. Los cubreobjetos fueron sellados con esmalte y almacenados a 4°C protegidos de la luz.

**VI.2.19. Microscopía y análisis estadístico.**

Las muestras fueron analizadas en un Microscopio Olympus BX61W1 con el lente LUMPLFL20xW y LUMPL60xW (Olympus). Un análisis manual de las células transducidas fue realizado para determinar el porcentaje de agregación de Htt mutante.

Todas las células RFP positivas de cada corte histológico fueron contadas, distinguiendo cualitativamente entre aquellas que presentaban inclusiones pequeñas o inclusiones grandes y células sin inclusiones (ver ejemplos en Figura 11). Los porcentajes de agregación fueron calculados en base al total de células RFP positivas.

En el caso de las coinyecciones con los virus AAV-Htt588Q95-mRFP y AAV-XBP1s-GFPo AAV-eGFP, el mismo análisis fue realizado sólo considerando las células cotransducidas (RFP y GFP positivas) en el lado ipsilateral. En el contralateral, sólo las células RFP positivas fueron contabilizadas.

Los porcentajes de agregación de los 3 animales por condición fueron promediados y la desviación estándar de la muestra fue calculada. Los datos fueron analizados estadísticamente utilizando la prueba T de Student de 2 colas en el programa Microsoft® Excel® 2010, con un nivel de significancia mínimo  $p < 0,05$ .

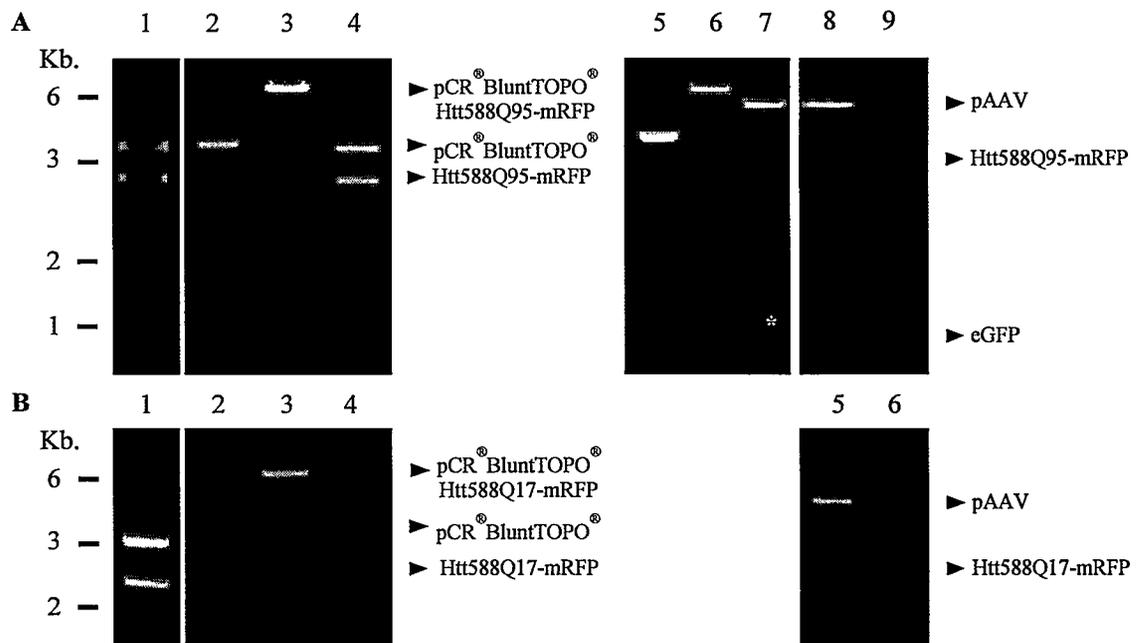
## VII. RESULTADOS.

### VII.1. Clonamiento de las secuencias Htt588-mRFP en el vector de expresión pAAV.

A fin de generar en nuestro laboratorio vectores virales AAV para expresar Htt humana mutante en el cerebro de ratones adultos, fue necesario clonar las secuencias codificantes de las proteínas de fusión Htt588Q95-mRFP y Htt588Q17-mRFP a partir de los vectores peGFPC1-Htt588Q138-mRFP y peGFPC1-Htt588Q15-mRFP respectivamente, en el vector de expresión pAAV2-CMV (pAAV). Las proteínas Htt mutante y silvestre fusionadas a mRFP facilitan el análisis de las muestras histológicas por microscopía de fluorescencia. En la Figura 3 se describe cada uno de los pasos del clonamiento. Las secuencias fueron amplificadas por PCR con la enzima ADN polimerasa PfuUltra™ II y resueltas en gel de agarosa. Las bandas correspondientes a las secuencias Htt588Q95-mRFP (2700pb) y Htt588Q17-mRFP (2500pb), fueron purificadas a partir del gel de agarosa (dato no mostrado). Los fragmentos fueron clonados en el vector intermediario pCR®BluntTOPO® y amplificados en *E. coli*. Este vector fue purificado y luego digerido con la endonucleasa EcoRI liberando el inserto correspondiente a las secuencias clonadas. Los fragmentos obtenidos poseen los tamaños esperados para Htt588Q95-mRFP (2700pb) (Figura 3A, carril 1) y Htt588Q17-mRFP (2500pb) (Figura 3B, carril 1). Los vectores pAAV-eGFP y pCR®BluntTOPO®-Htt588-mRFP fueron digeridos, secuencialmente, con las enzimas de restricción BglII y EcoRI. Los vectores digeridos fueron resueltos en geles de agarosa y se purificaron las bandas de 2700, 2500, 4600 y 800pb correspondientes a Htt588Q95-mRFP, Htt588Q17-mRFP, al *backbone* del vector

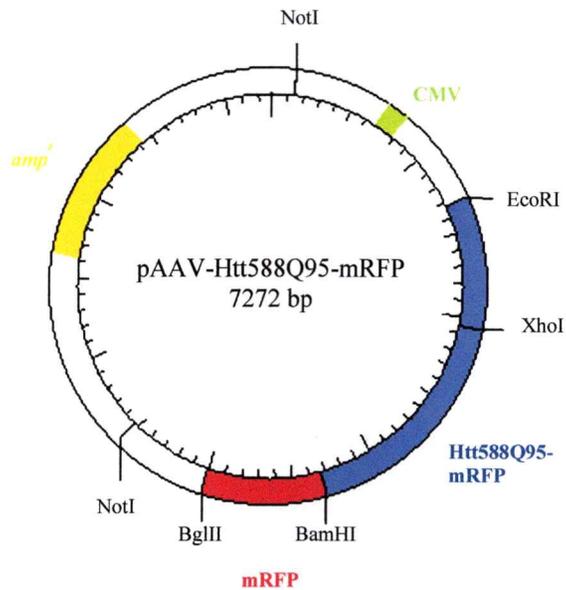
de expresión pAAV y eGFP, respectivamente (Figura 3A y B). Los fragmentos Htt588Q95-mRFP y Htt588Q17-mRFP con extremos adhesivos, fueron ligados al vector de expresión pAAV. Los vectores pAAV-Htt588-mRFP fueron amplificados en *E. coli* y purificados. Finalmente, estos plasmidios fueron redigeridos con las endonucleasas BglIII y EcoRI y NotI y XhoI, con el objetivo de comprobar la correcta inserción de las secuencias Htt588-mRFP (Figura 3A, carriles 8 y 9 y Figura 3B, carriles 5 y 6). La enzima de restricción NotI posee dos sitios de corte en el plasmidio pAAV2-CMV-Htt588-mRFP (pAAV-Htt588-mRFP), lo que da origen a 3 fragmentos de restricción en una digestión conjunta con XhoI. En la Figura 3A se muestra el procedimiento realizado para uno de los cuatro clones obtenidos para el plasmidio pCR<sup>®</sup>BluntTOPO<sup>®</sup>-Htt588Q95-mRFP. En la Figura 4 se indican todos los sitios de restricción utilizados durante el clonamiento.

Los plasmidios pCR<sup>®</sup>BluntTOPO<sup>®</sup>-Htt588-mRFP fueron secuenciados, revelando la presencia de sólo 95 codones CAG o CAA, ambos codificantes para Glutamina, en el plasmidio pCR<sup>®</sup>BluntTOPO<sup>®</sup>-Htt588Q95-mRFP en lugar de 138 (Figura 5y Figura 6) y de 17 codones CAG o CAA en el plasmidio pCR<sup>®</sup>BluntTOPO<sup>®</sup>-Htt588Q17-mRFP en lugar de 15 (dato no mostrado), como había sido descrito para los plasmidios originales. Por lo mismo, los plasmidios originales peGFPC1-Htt588-mRFP también fueron secuenciados, corroborando el resultado anterior (dato no mostrado).



**Figura 3. Digestiones secuenciales de los plasmidios pCR<sup>®</sup>BluntTOPO<sup>®</sup>-Htt588-mRFP y pAAV-Htt588-mRFP.**

Electroforesis de los fragmentos de digestión de los plasmidios pCR<sup>®</sup>BluntTOPO<sup>®</sup> y pAAV con las endonucleasas EcoRI, BglII, NotI y XhoI en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. (A) Clonamiento del fragmento Htt588Q95-mRFP en el plasmidio pCR<sup>®</sup>BluntTOPO<sup>®</sup> (carriles 1-4) y subclonamiento en el plasmidio de expresión pAAV (carriles 5-9). Plasmidio pCR<sup>®</sup>BluntTOPO<sup>®</sup>-Htt588Q95-mRFP digerido con EcoRI (carril 1), sin digerir (carril 2), BglII (carril 3) y BglII/EcoRI (carril 4). Plasmidio pAAV-eGFP sin digerir (carril 5), digerido con BglII (carril 6) y BglII/EcoRI (carril 7). Plasmidio pAAV-Htt588Q95-mRFP digerido con BglII/EcoRI (carril 8) y NotI/XhoI (carril 9). (B) Clonamiento del fragmento Htt588Q17-mRFP en el plasmidio pCR<sup>®</sup>BluntTOPO<sup>®</sup> (carriles 1-4) y subclonamiento en el plasmidio de expresión pAAV (carriles 5 y 6). Plasmidio pCR<sup>®</sup>BluntTOPO<sup>®</sup>-Htt588Q17-mRFP digerido EcoRI (carril 1), sin digerir (carril 2), BglII (carril 3) y BglII/EcoRI (carril 4). Plasmidio pAAV-Htt588Q17-mRFP digerido con BglII/EcoRI (carril 5) y NotI/XhoI (carril 6).



**Figura 4. Mapa del vector pAAV-Htt588Q95-mRFP.**

Posiciones de los sitios de restricción del plasmidio pAAV-Htt588Q95-mRFP utilizados durante el clonamiento. El mapa es equivalente para el vector pAAV-Htt588Q17-mRFP considerando una región CAG de 17 codones. ■ Promotor de Citomegalovirus Humano (CMV), ■ Gen de resistencia a ampicilina, ■ Secuencia codificante de los primeros 588 aminoácidos de la proteína mutante HttQ95, ■ Secuencia codificante para la proteína fluorescente roja RFP.



MVGIRLDYSESKLGFANHVHTSYLPPTAPGQRAGLCAGPSLWQRIGIRTSIEFMATLEKLMKAFASLKSFOOOOOOOOOOOOOOO  
 OOO  
 PPP  
 PFFLLCSDDAE SDVRMVADE CLNKVFKALMDSNL PRLQLELYKE IKKNGAPRSLRAALWRFALHLVVRPQKCRPYLVNLLPCLTRT  
 SKRPEE SVQETLAAAVPKIMASFGNFANDNE IKVLLKAFIANLKSSTPTIRRTAAGSAVSI CQHSRRTQYFY SWLLNVLLGLLVPV  
 EDEHSTLLILGVLLTLRYLVPLLQQQVKDTSILKGSFGVTRKEMEVSPSAEQLVQVYELTLHHTQHGDHNVVTGALELLQQLFRTPP  
 PELLQTLTAVGGIGQLTAAKEESGGRSRSGSIVELIAGGGSSCSFVLSRKQKGVLLGEEEALEDDSESRSDVSSAL TASVKDEI  
 SGELAASSGVSTPGSAGHDIIITEQPRSQHTLQADSVDLASCDLTSSATDGDDEEDILSHSSSQVSAVPSDPAMDLDNGTQASSPISD  
 SSQTTTEGPD SAVTPSDSSEIVLDGTAGPGSMASSEDVIKEFMRFKVRMEGSVNGHEFEIEGEGERPYEGTQTAKLKVTKGGPLP  
 FAWDILSPQFQYGSKAYVKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPDGPVMQKTM  
 GWEASTERMPEDGALKGEIKMRLKLDGGHYDAEVKTTYMAKKPVQLPGAYKTDIKLDITSHNEDYTIIVEQYERAEGRHSTGASR

**Figura 6. Secuencia aminoacídica de la proteína de fusión Htt588Q95-mRFP.**

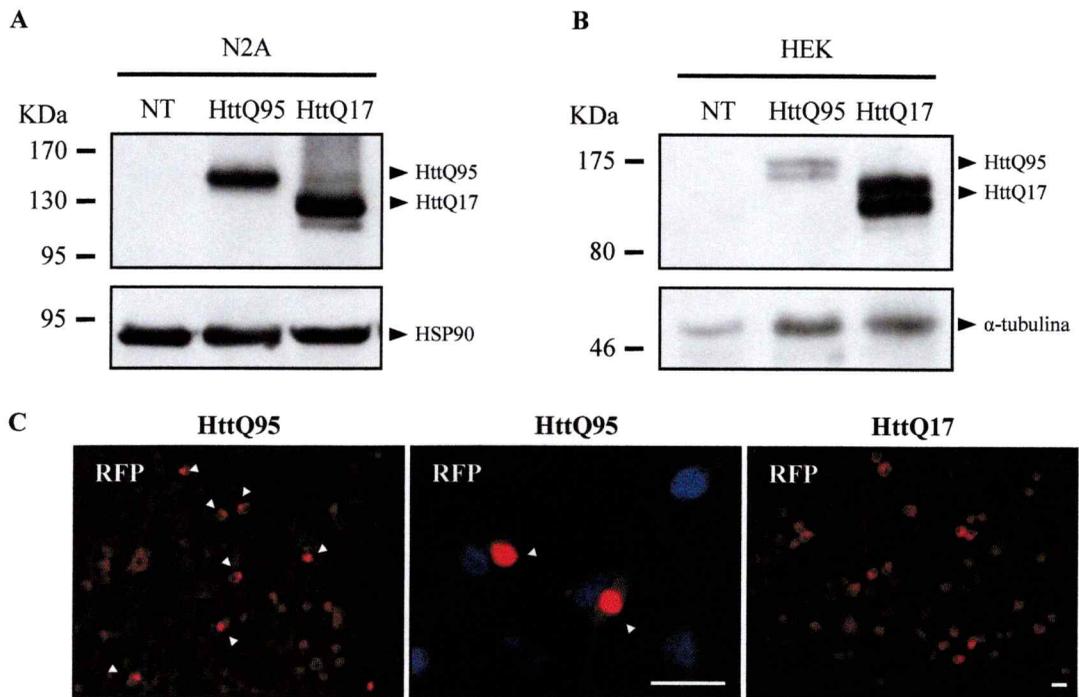
Secuencia correspondiente a la proteína de fusión Htt588Q95-mRFP. ■ Htt588Q95 ■ expansión de la región poli-Glutamina, ■ mRFP.

**VII.2. Expresión de las proteínas de fusión Htt588-mRFP en líneas celulares.**

Con el objeto de corroborar la expresión de Htt mediada por los plasmidios generados, las células N2A y HEK 293 fueron transfectadas con los plasmidios pAAV-Htt588-mRFP. La expresión de Htt tanto en células N2A como en HEK 293 transfectadas con los plasmidios pAAV-Htt588-mRFP, fue verificada 48 post-transfección mediante ensayo de Western Blot, utilizando el anticuerpo EM48 específico para Htt. Las proteínas de fusión, Htt588Q95-mRFP y Htt588Q17-mRFP poseen un tamaño esperado de ~100 KDa y ~90 KDa, respectivamente, determinado con el programa Compute PI/Mw tool de ExPASy Proteomics Server. Las bandas correspondientes a Htt obtenidas por ensayo de Western Blot poseían un tamaño mayor a 130 KDa para la proteína Htt588Q95-mRFP y mayor a 100 KDa para Htt588Q17-mRFP (Figura 7A y B).

Luego de transfectar las células con el plasmidio pAAV-Htt58895-mRFP por 48 horas fue posible observar la presencia de inclusiones de gran tamaño en el citoplasma celular. Estas inclusiones fueron principalmente únicas y de gran tamaño. Las células transfectadas con el plasmidio pAAV-Htt588Q17-mRFP no presentaron inclusiones,

observándose una distribución homogénea de RFP en el citoplasma celular (Figura 7C). El mismo patrón fue observado en células HEK 293, 24 y 48 horas post-transfección (dato no mostrado).



**Figura 7. Expresión de los constructos pAAV-Htt588Q95-mRFP y pAAV-Htt588Q17-mRFP en líneas celulares.**

Las células N2A y HEK 293 fueron transfectadas con los plásmidos pAAV-Htt588Q95-mRFP (HttQ95) y pAAV-Htt588Q17-mRFP (HttQ17). La expresión de las proteínas de fusión en la células N2A fue detectada al cabo de 48 horas mediante Western Blot (A) e Inmunofluorescencia (C), y mediante Western Blot en células HEK 293 (B). Los triángulos indican inclusiones en el citoplasma celular. La barra de escala corresponde a 20 $\mu$ m.

### VII.3. Titulación de los virus AAV-Htt588-mRFP.

Luego del proceso de producción y purificación de los virus AAV-Htt588-mRFP, fue necesario determinar su título según el protocolo descrito previamente en la sección materiales y métodos. Para ello, una curva de calibración del ciclo de amplificación por qPCR (Ct) fue construida en función del número de copias de ADN de los plasmidios pAAV-Htt588-mRFP presentes en la reacción. Los valores obtenidos para la curva estándar se especifican en la Tabla 2.

Tabla 2. Curva estándar de ADN utilizada en la titulación de los virus AAV.

Masa ADN (pg)	pAAV-Htt588Q95-mRFP		pAAV-Htt588Q17-mRFP	
	Copias ADN	Ct <sub>Prom</sub>	Copias ADN	Ct <sub>Prom</sub>
1*10 <sup>-4</sup>	2,51*10 <sup>0</sup>	29,38	2,59*10 <sup>0</sup>	30,76
1*10 <sup>-2</sup>	2,51*10 <sup>2</sup>	25,46	2,59*10 <sup>2</sup>	24,93
1*10 <sup>0</sup>	2,51*10 <sup>4</sup>	18,12	2,59*10 <sup>4</sup>	17,92
1*10 <sup>2</sup>	2,51*10 <sup>6</sup>	11,45	2,59*10 <sup>6</sup>	12,10
1*10 <sup>4</sup>	2,51*10 <sup>8</sup>	6,45	2,59*10 <sup>8</sup>	6,65

Número de copias de ADN calculado a partir de la masa de plasmidio utilizada en la construcción de la curva estándar con el plasmidio pAAV correspondiente a cada preparación viral.

Las siguientes ecuaciones fueron obtenidas para las curvas estándar aplicando la función de regresión lineal a los datos obtenidos por qPCR:

$$\text{AAV-Htt588Q95-mRFP: } Ct = -1,3 \ln(\# \text{CopiasADN}) + 31,336$$

$$\text{AAV-Htt588Q17-mRFP: } Ct = -1,326 \ln(\# \text{CopiasADN}) + 31,945$$

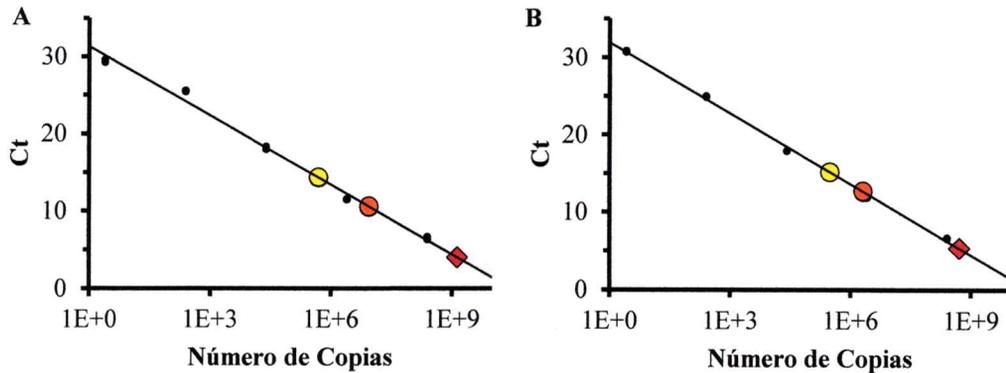
Los valores de R<sup>2</sup> para las curvas de calibración fueron de 0,992 y 0,998, respectivamente. Finalmente, el título viral fue calculado corrigiendo el valor promedio

del número de copias de ADN (entre las preparaciones 1:10 y 1:100), por el factor de dilución 20, producto de la purificación de ADN a partir del concentrado viral. El cálculo del título viral queda explícito en la Tabla 3.

**Tabla 3. Cálculo del título viral de los virus AAV-Htt588-mRFP.**

Virus AAV	Preparación	Ct Promedio	Copias ADN	(Copias ADN)*f <sub>d</sub>	Título (genomas/μl)
Htt588Q95	1:10	10,55	8,79*10 <sup>6</sup>	8,79*10 <sup>7</sup>	1,37*10 <sup>9</sup>
mRFP	1:100	14,30	4,93*10 <sup>5</sup>	4,93*10 <sup>7</sup>	
Htt588Q17	1:10	12,67	2,06*10 <sup>6</sup>	2,06*10 <sup>7</sup>	5,16*10 <sup>8</sup>
mRFP	1:100	15,18	3,11*10 <sup>5</sup>	3,11*10 <sup>7</sup>	

Cálculo del título viral de los virus AAV-Htt588-mRFP por interpolación en la curva estándar realizada con el plasmidio pAAV-Htt588-mRFP correspondiente a cada virus.



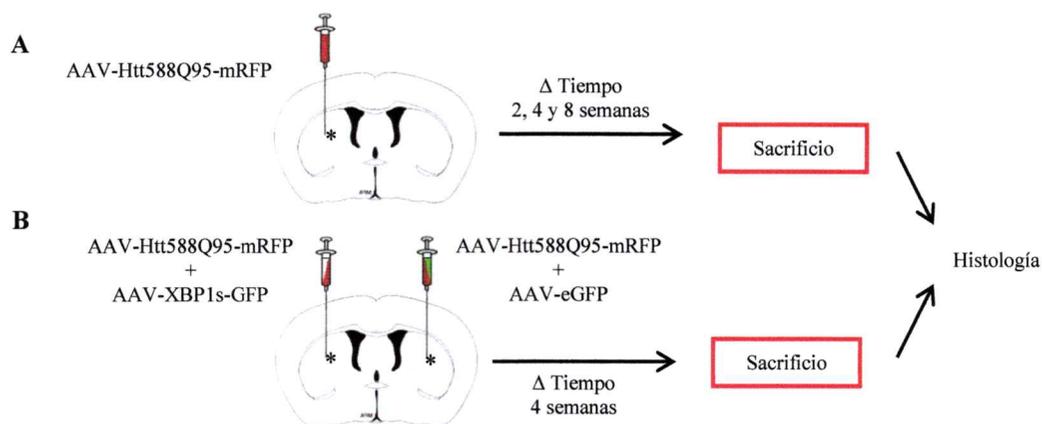
**Figura 8. Determinación del título viral de los virus AAV-Htt588Q95-mRFP y AAV-Htt588Q17-mRFP.**

Valor del ciclo de amplificación por qPCR (Ct) en función del número de copias de ADN presentes en la reacción. (●) Curva estándar, (●) valor de Ct obtenido para la preparación de virus 1:100, (●) valor de Ct obtenido para la preparación de virus 1:10, (◆) título viral calculado. (A) Titulación del virus AAV-Htt588Q95-mRFP. (B) Titulación del virus AAV-Htt588Q17-mRFP.

En producciones posteriores de partículas virales en nuestro laboratorio, se verificó que el tiempo de tratamiento con ADNasa sugerido en el protocolo de purificación (Grieger et al., 2006) no es suficiente para degradar por completo los plasmidios pAAV utilizados en la generación de las partículas virales. Por lo mismo se obtienen fracciones eluidas a partir de la columna de CsCl positivas en la reacción de PCR con partidores para Htt y que no contienen partículas virales infectivas. Estas fracciones, conteniendo tanto genomas virales empaquetados como no empaquetados, fueron concentradas y luego el concentrado viral fue titulado por qPCR utilizando partidores específicos para Htt. Al existir plasmidio pAAV-Htt588-mRFP en solución, el título viral calculado está sobreestimado.

#### **VII.4. Expresión de la proteína de fusión Htt588Q95-mRFP *in vivo*.**

La expresión *in vivo* de la proteína de fusión Htt mutante fue estudiada en una curva temporal de 8 semanas, utilizando dosis virales de 2  $\mu$ l ( $2,74 \cdot 10^9$  genomas virales) y 4  $\mu$ l ( $5,48 \cdot 10^9$  genomas virales) del vector viral AAV-Htt588Q95-mRFP inyectadas por estereotáxis en el estriado de ratones adultos. Los animales fueron sacrificados 2, 4 y 8 semanas post-operación, perfundidos y el tejido cerebral fue preparado para histología. Los cortes de tejido representativos de toda la región del estriado fueron analizados por inmunofluorescencia utilizando el marcador neuronal NeuN y con el marcador glial GFAP (Figura 9A). El vector viral AAV-Htt588Q17-mRFP también fue inyectado en la zona del estriado en ratones adultos utilizando una dosis de 2  $\mu$ l ( $1,032 \cdot 10^9$  genomas virales), sin embargo no se observaron células RFP positivas al cabo de 2 ni 4 semanas post-inyección (dato no mostrado).



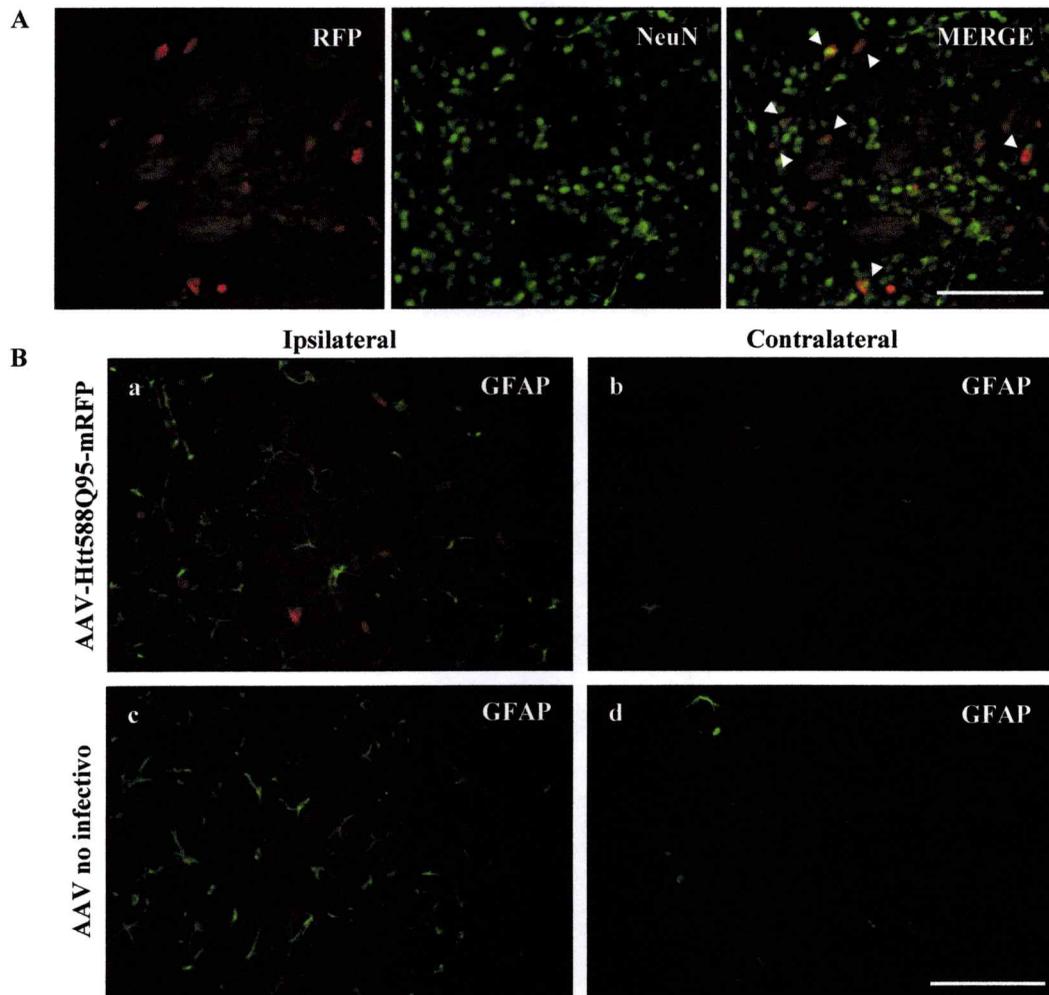
**Figura 9. Estrategia experimental utilizada para la generación de un nuevo modelo animal de la EH y para el estudio del efecto de la sobreexpresión de XBP1s sobre la agregación de Htt mutante.**

Ratones C57Bl/6j machos de entre 10 y 12 semanas de edad, tres por grupo experimental, fueron inyectados intraestriatalmente con vectores virales AAV en las coordenadas AP: +0,5 mm, L:  $\pm 2$  mm y DV: -3mm respecto a Bregma (\*). (A) Estrategia experimental para generar el nuevo modelo animal de la EH. Los animales fueron inyectados en el hemisferio ipsilateral con el virus AAV-Htt588Q95-mRFP. Los animales fueron sacrificados 2, 4 u 8 semanas post-inyección y el tejido de la zona del estriado entre las coordenadas AP: +2 mm y -0,2 mm fue analizado por inmunofluorescencia. Las células RFP positivas fueron cuantificadas distinguiendo células con inclusiones pequeñas, células con inclusiones grandes y células sin inclusiones. (B) Estrategia experimental para evaluar el efecto de la sobreexpresión de XBP1s sobre la agregación de Htt mutante. los animales fueron coinyectados en el hemisferio ipsilateral con los virus AAV-Htt588Q95-mRFP y AAV-XBP1s-GFP y en el hemisferio contralateral con los virus AAV-Htt588Q95-mRFP y AAV-eGFP. Los animales fueron sacrificados 4 semanas post-inyección y se cuantificaron las células RFP positivas con inclusiones en la región del estriado entre las coordenadas AP: +2 mm y -0,2 mm respecto a Bregma en ambos hemisferios.

La Figura 10A muestra la colocalización de células RFP positivas con el marcador NeuN. En el hemisferio inyectado tanto con el virus AAV-Htt588Q95-mRFP como con una preparación de virus AAV-Htt588Q17-mRFP no infectiva, se observa una fuerte

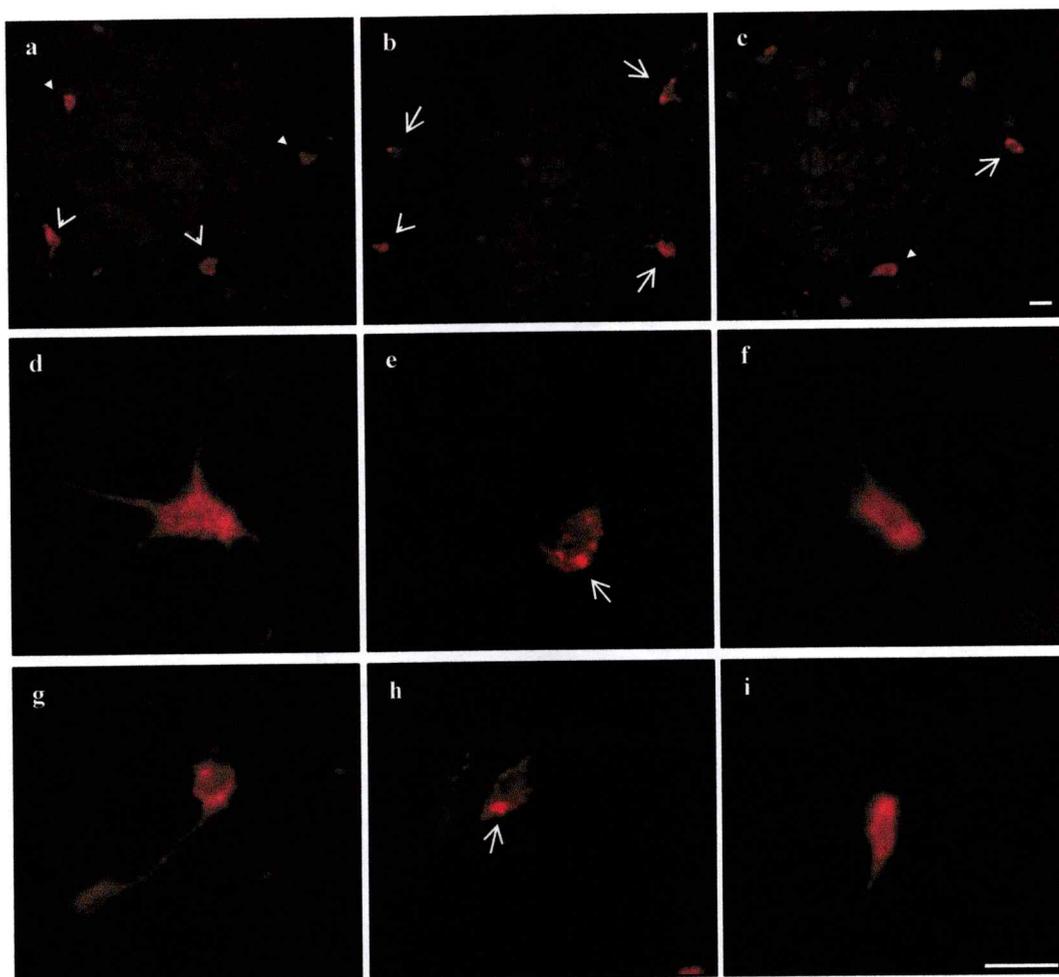
marca de GFAP en toda la región del estriado analizada (Figura 10B paneles a y c) en comparación al hemisferio contralateral no inyectado (Figura 10B paneles b y d).

En los 3 tiempos evaluados, se evidencia la presencia de células RFP positivas en la región del estriado inyectada con el virus AAV-Htt588Q95-mRFP, de las cuales un porcentaje presenta inclusiones citoplasmáticas (Figura 11). Las inclusiones pueden ser clasificadas en 2 tipos dependiendo del diámetro de éstas: inclusiones pequeñas (Figura 11a) e inclusiones grandes (Figura 11b). Existe una tercera población de células que no presenta inclusiones, mostrando un patrón de expresión de Htt difuso (Figura 11c).



**Figura 10. Inmunofluorescencia en cortes histológicos de cerebros transducidos con los virus AAV-Htt588-mRFP.**

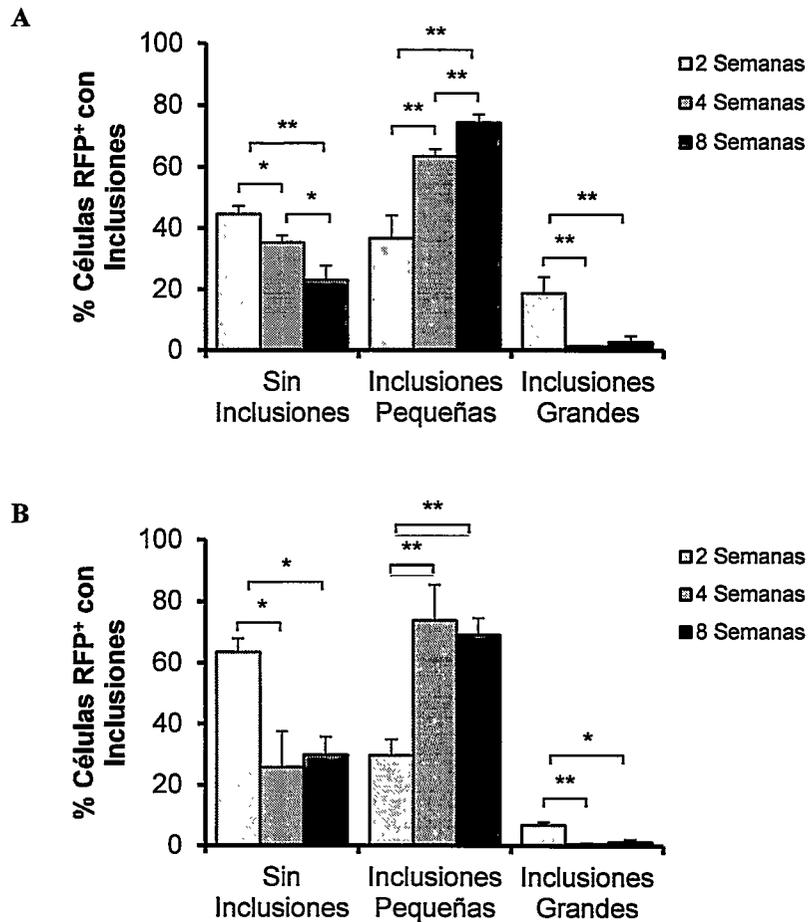
Imagen representativa del tejido cerebral correspondiente a la zona del estriado de un animal inyectado estereotáxicamente con 2  $\mu$ l del virus AAV-Htt588Q95-mRFP ( $2,47 \times 10^9$  genomas virales) o una preparación viral no infectiva. Las muestras histológicas fueron evaluadas 2 semanas post-inyección mediante inmunofluorescencia. (A) Inmunofluorescencia con el marcador neuronal NeuN. Los triángulos indican células RFP y NeuN positivas. (B) Inmunofluorescencia con el marcador glial GFAP. (a) Hemisferio ipsilateral inyectado con el vector viral AAV-Htt588Q95-mRFP, (b) hemisferio contralateral no inyectado, (c) hemisferio ipsilateral inyectado con una preparación viral AAV-Htt588Q17-mRFP no infectiva y (d) hemisferio contralateral no inyectado. La barra de escala corresponde a 100 $\mu$ m.



**Figura 11. Tipo de inclusiones en células RFP positivas *in vivo*.**

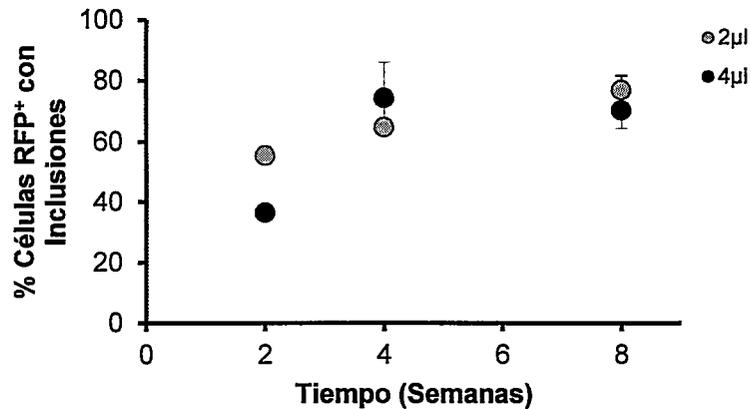
Imagen representativa del tejido cerebral correspondiente a la zona del estriado de un animal inyectado estereotáxicamente con 2  $\mu$ l del virus AAV-Htt588Q95-mRFP ( $2,47 \cdot 10^9$  genomas virales). Los animales fueron sacrificados 2 semanas post-inyección y el tejido cerebral fue preparado para histología y analizado por microscopía de fluorescencia. Las células RFP positivas se dividen en 3 poblaciones principales: células con inclusiones pequeñas (paneles (d) y (g) e indicadas por puntas de flecha en (a, b y c)), células con inclusiones grandes (paneles (e) y (h) e indicadas con flechas en (a, b y c)) y células sin inclusiones (paneles (f) e (i) e indicadas por triángulos en (a, b y c)). Barra de escala correspondiente a 100 $\mu$ m.

El primer tiempo evaluado corresponde a dos semanas post-inyección. Sobre un total de alrededor de 100 células NeuN y RFP positivas en toda la región del estriado analizada, un porcentaje de  $55,5 \pm 2,7\%$  de células con inclusiones fue determinado para la dosis de 2  $\mu\text{l}$  de virus y de  $36,5 \pm 4,4\%$  para la dosis mayor de 4  $\mu\text{l}$ . Para la dosis de 2  $\mu\text{l}$ , porcentajes de  $36,7 \pm 7,5\%$  y  $18,8 \pm 5,2\%$  de células con inclusiones pequeñas y grandes fueron obtenidos, respectivamente. Con 4  $\mu\text{l}$ , los valores fueron  $29,6 \pm 5,4\%$  y  $6,9 \pm 0,9\%$ , respectivamente. El mismo análisis fue realizado para el tiempo de 4 semanas, contándose un total de entre 300 y 400 células NeuN y RFP positivas. Utilizando la dosis de 2  $\mu\text{l}$  un porcentaje de  $64,7 \pm 2,3\%$  de células con inclusiones fue obtenido. Éste se divide en  $63,4 \pm 2,4\%$  de células con inclusiones pequeñas y  $1,3 \pm 0,2\%$  de células con inclusiones grandes. Para 4  $\mu\text{l}$  el porcentaje de agregación fue de  $74,2 \pm 11,8\%$ , desglosándose en  $73,7 \pm 11,5\%$  de células NeuN y RFP positivas con inclusiones pequeñas y  $0,5 \pm 0,4\%$  con inclusiones grandes. Finalmente, en el tiempo correspondiente a 8 semanas un total de entre 400 y 700 células NeuN y RFP positivas fue contado. Porcentajes de  $77,0 \pm 4,6\%$  y  $70,2 \pm 6,0\%$  de células con inclusiones fueron obtenidos, respectivamente, para las dosis de 2 y 4  $\mu\text{l}$ . Estos porcentajes se dividen en  $74,3 \pm 2,7\%$  y  $2,7 \pm 1,9\%$ , y  $68,9 \pm 5,5\%$  y  $1,3 \pm 0,8\%$  de células con inclusiones pequeñas y grandes, respectivamente, para cada una de las dosis descritas. En la Figura 12 se grafican las distintas poblaciones celulares descritas previamente para ambas dosis virales utilizadas y en la Figura 13 se grafica la cinética de agregación *in vivo* de la proteína mutante Htt588Q95-mRFP en el transcurso de tiempo evaluado.



**Figura 12. Poblaciones de células RFP positivas *in vivo*.**

Porcentaje de células con inclusiones pequeñas, grandes o sin inclusiones sobre el total de células RFP positivas contadas en la región del estriado transducida con el vector viral AAV-Htt588Q95-mRFP entre las coordenadas +2 mm y -0,2 mm respecto a Bregma de 3 animales por grupo experimental. Los animales fueron inyectados utilizando dos dosis virales de (A) 2  $\mu$ l de virus o  $2,47 \cdot 10^9$  genomas virales y (B) 4  $\mu$ l o  $5,48 \cdot 10^9$  genomas virales por inyección y fueron sacrificados 2, 4 y 8 semanas post-inyección y fijados. El tejido cerebral fue preparado para histología y analizado por microscopía de fluorescencia. El gráfico representa el promedio y desviación estándar de 3 experimentos independientes. Los datos fueron analizados estadísticamente con la prueba T de Student (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ). Los grupos experimentales sin barra de significancia indican diferencias estadísticas no significativas.



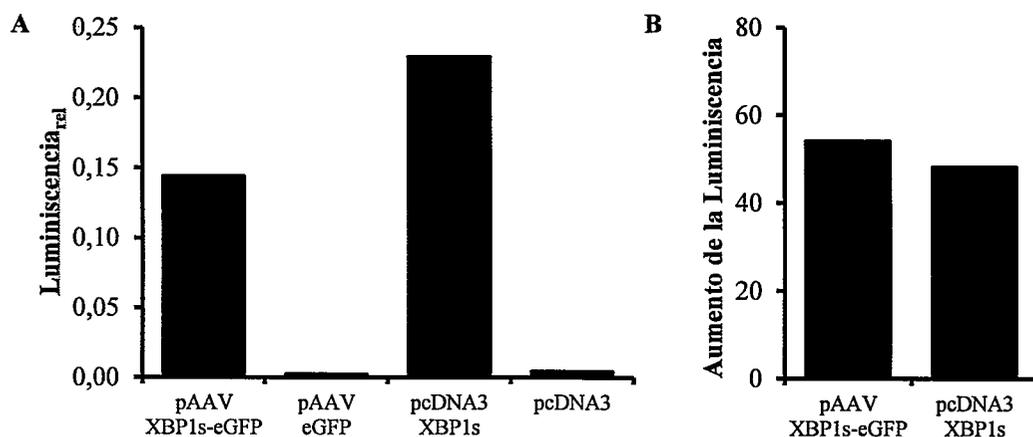
**Figura 13. Cinética de agregación de Htt588Q95-mRFP *in vivo*.**

Porcentaje total de células con inclusiones (inclusiones pequeñas más inclusiones grandes) sobre el total de células RFP positivas contadas en la región del estriado transducida con el vector viral AAV-Htt588Q95-mRFP entre las coordenadas +2 mm y -0,2 mm respecto a Bregma. Los animales fueron inyectados utilizando dosis virales de 2 µl de virus o  $2,47 \times 10^9$  genomas virales y 4 µl de virus o  $5,48 \times 10^9$  genomas virales por inyección. Los animales fueron sacrificados 2, 4 y 8 semanas post-inyección y fijados. El tejido cerebral fue preparado para histología y analizado por microscopía de fluorescencia. El gráfico representa el promedio y desviación estándar de 3 experimentos independientes.

#### **VII.5. Funcionalidad del virus AAV-XBP1s-GFP.**

La funcionalidad del vector de expresión pAAV-XBP1s-GFP fue confirmada mediante un ensayo de Luciferasa con un vector reportero. Las células N2A fueron transfectadas con los vectores pAAV-XBP1s-eGFP, pAAV-eGFP, pcDNA3-XBP1s o pcDNA3 vacío, en conjunto con los plasmidios Renila y con el vector reportero UPRE-Luciferasa (UPRE-Luc) en una proporción 10:1:10. Éste último, posee un *cassette* de expresión de Luciferasa, bajo el promotor mínimo *c-fos* y 5 copias en tándem del sitio de unión de ATF6 (Wang et al., 2000). Los sitios de unión de ATF6 y XBP1 comparten homología

de secuencia (Lee et al., 2002). La luminiscencia del reportero UPRE-Luc y de Renila fue medida. El valor de luminiscencia relativa fue calculado haciendo el cuociente entre el valor de luminiscencia obtenido para el vector XBP1s y su respectivo control. La luminiscencia aumentó 54 veces con el plasmidio pAAV-XBP1s-eGFP, en comparación con el control pcDNA3-XBP1s que aumenta 48 veces (Figura 14) respecto de sus respectivos controles pAAV-eGFP y pcDNA3 vacío. Por lo tanto, el vector pAAV es funcional *in vitro*.



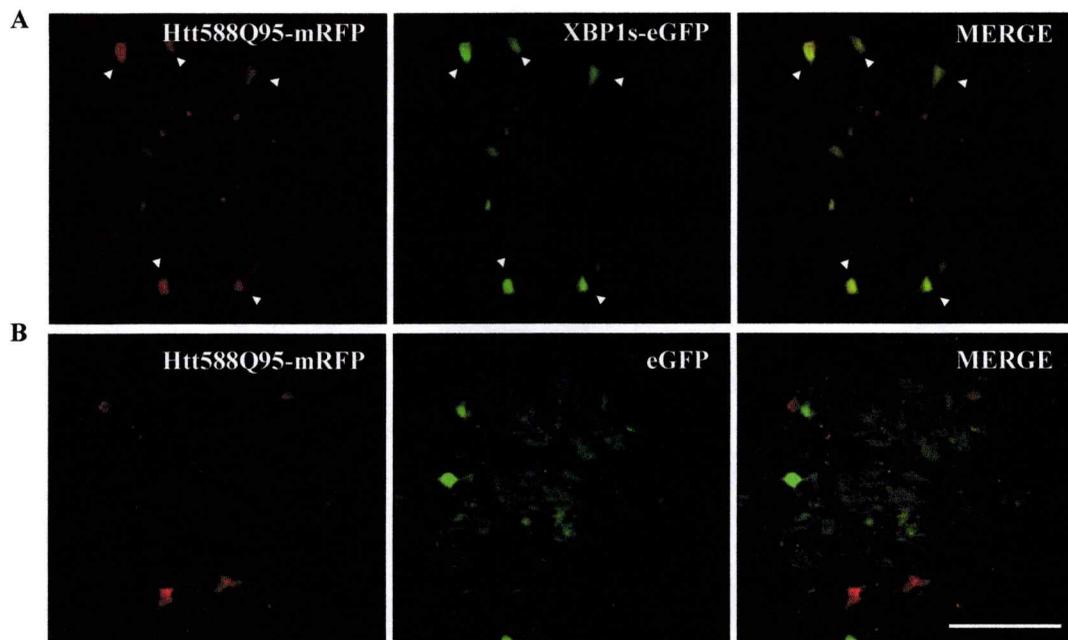
**Figura 14. Funcionalidad del virus AAV-XBP1s-eGFP.**

Las células N2A fueron cotransfectadas con los plasmidios pAAV-XBP1s-eGFP, pAAV-eGFP, pcDNA3-XBP1s o pcDNA3 vacío, UPRE-Luc y Renila en una proporción 10:10:1 y fueron lisadas 48 horas post-transfección. La luminiscencia fue medida utilizando el kit *Dual-Luciferase® Reporter Assay System*. (A) Promedio del valor de luminiscencia relativa respecto a Renila de dos experimentos independientes. (B) Aumento de la luminiscencia de los vectores XBP1s respecto a sus respectivos controles.

#### **VII.6. Efecto de XBP1s sobre la agregación de Htt mutante *in vivo*.**

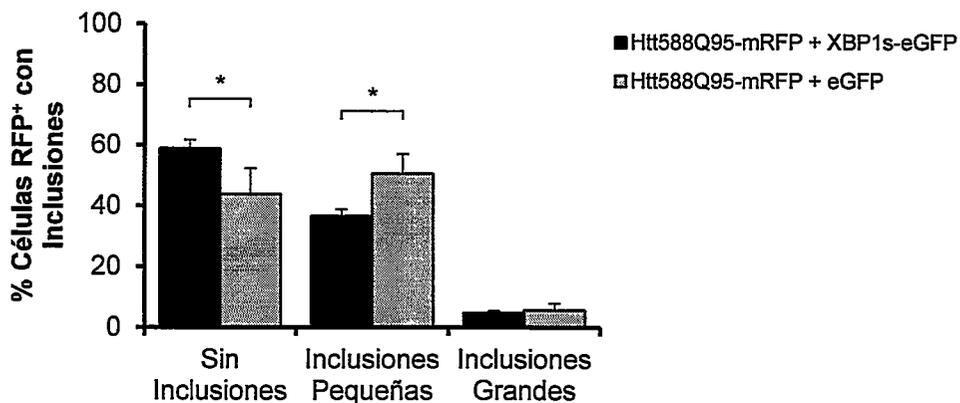
Para evaluar el efecto de la sobreexpresión del factor de transcripción XBP1 activo sobre la agregación de Htt mutante *in vivo*, ratones adultos fueron coinyectados en el hemisferio ipsilateral con los virus AAV-Htt588Q95-mRFP y AAV-XBP1s-GFP y en el hemisferio contralateral con los virus AAV-Htt588Q95-mRFP y AAV-eGFP cada uno en una dosis de 2  $\mu$ l. Los vectores virales AAV-eGFP fueron preparados con anterioridad en nuestro laboratorio de acuerdo el procedimiento descrito previamente. El efecto fue evaluado 4 semanas post-operación (Figura 9B). Al cabo de este tiempo fue posible observar un alto índice de cotransducción en células estriatales de los virus AAV-Htt588Q95-mRFP y AAV-XBP1s-eGFP, observándose que prácticamente el total de células RFP positivas también eran GFP positivas (Figura 15A). El índice de cotransducción de los virus AAV-Htt588Q95-mRFP y AAV-XBP1s-GFP es mucho menor, observándose escasas células positivas para ambas proteínas fluorescentes (Figura 15B).

En el hemisferio ipsilateral, las células RFP y GFP positivas fueron contadas revelando un total de  $41,2 \pm 3,0\%$  de células con inclusiones. Entre las células con inclusiones,  $36,5 \pm 2,3\%$  poseía inclusiones pequeñas mientras que el  $4,6 \pm 0,7\%$  restante presentaba inclusiones grandes. Sólo las células RFP positivas fueron contabilizadas en el lado contralateral, dado el bajo grado de cotransducción. De éstas, el  $50,7 \pm 6,4\%$  presentaba inclusiones pequeñas y el  $5,5 \pm 2,4\%$  inclusiones grandes, sumando un total de  $56,2 \pm 8,6\%$  de células RFP positivas con inclusiones. La prueba estadística T de Student reveló que la reducción en un  $15,1\%$  del porcentaje de agregación, por efecto del factor de transcripción XBP1 activo, es estadísticamente significativa (Figura 16).



**Figura 15. Cotransducción de AAV-Htt588Q95-mRFP y AAV-XBP1s-GFP *in vivo*.**

Imagen representativa del tejido cerebral correspondiente a la zona del estriado de un animal coinyectado por estereotáxis con 2  $\mu$ l del virus AAV-Htt588Q95-mRFP ( $2,47 \cdot 10^9$  genomas virales) y (A) 2  $\mu$ l del virus AAV-XBP1s-GFP ( $2,26 \cdot 10^9$  DRPs) en el hemisferio ipsilateral o (B) 2  $\mu$ l del virus AAV-eGFP ( $1,50 \cdot 10^8$  genomas virales) en el hemisferio contralateral. Las muestras histológicas fueron evaluadas 4 semanas post-inyección por microscopía de fluorescencia. Los triángulos indican células RFP y GFP positivas. Barra de escala correspondiente a 100  $\mu$ m.



**Figura 16. Efecto de XBP1s sobre la agregación de Htt mutante.**

Porcentaje de células con inclusiones sobre el total de células RFP positivas contadas en la región del estriado entre las coordenadas +2 mm y -0,2 mm respecto a Bregma. Los animales fueron coinyectados con 2  $\mu$ l del virus AAV-Htt588Q95-mRFP ( $2,47 \cdot 10^9$  genomas virales) y 2  $\mu$ l del virus AAV-XBP1s-GFP ( $2,26 \cdot 10^9$  DRPs) en el hemisferio ipsilateral o con 2  $\mu$ l del virus AAV-eGFP ( $1,50 \cdot 10^8$  genomas virales) en el hemisferio contralateral. En el hemisferio ipsilateral el 100% de las células corresponde a células cotransducidas RFP y GFP positivas, mientras que en el hemisferio contralateral el 100% de las células corresponde sólo a las células RFP positivas. El gráfico muestra el promedio y desviación estándar de 3 experimentos independientes. Los datos fueron analizados estadísticamente con la prueba T de Student (\* $p < 0,05$ ). Las poblaciones celulares sin barra de significancia indican diferencias estadísticas no significativas.

## VIII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En este trabajo hemos descrito un nuevo modelo viral adeno-asociado para el estudio de la EH basado en la expresión de un fragmento amino-terminal de 588 aminoácidos de la proteína Htt humana portadora de una expansión de 95 glutaminas en tándem, fusionado a RFP. A su vez, se evaluó el efecto de la ganancia de función del factor de transcripción XBP1 como alternativa terapéutica para disminuir la acumulación de inclusiones de Htt humana mutante en este nuevo modelo viral de la patología.

### VIII.1. Generación de los vectores virales AAV-Htt588mRFP.

Los vectores virales producidos en este estudio fueron desarrollados a partir de los plasmidios peGFPC1-Htt588-mRFP diseñados por Atwal y sus colaboradores para estudiar la función del dominio amino-terminal de 18 aminoácidos de Htt en la ubicación subcelular, la agregación y toxicidad de Htt mutante (Atwal et al., 2007). En dicho trabajo, los autores indican que la proteína mutante utilizada presenta una región poliQ de 138 glutaminas, mientras que esta misma región en la proteína consta de 15 glutaminas. La secuenciación de los plasmidios pCR<sup>®</sup>BluntTOPO<sup>®</sup>-Htt588-mRFP y de los plasmidios originales peGFPC1-Htt588-mRFP reveló la presencia de 95 codones codificantes para glutamina (CAG y CAA) en el gen de Htt mutante y de 17 para el gen de Htt silvestre. A pesar de diferir de los datos publicados previamente, las características de agregación de las proteínas Htt mutante y silvestre se mantienen, ya que la primera presenta una expansión poliQ mayor a 35 glutaminas, considerado patológico, y la segunda contiene un número de glutaminas dentro del rango normal o no

patológico (Kremer et al., 1994). En este mismo estudio de secuenciación se evidenció una mutación puntual en la posición 12 de un ácido glutámico por una alanina. Esta mutación E12A fue descrita previamente por Atwal y sus colaboradores resultando en una mayor afinidad de la proteína Htt por membranas vesiculares, al igual que la mutación puntual E5A (Atwal et al., 2007).

Htt es una proteína de gran tamaño (348KDa) y a la fecha no ha sido posible elucidar completamente su estructura tridimensional. Htt no posee homología de secuencia con otras proteínas, ni dominios estructurales con funciones definidas, lo que ha complejizado aún más su estudio. Sin embargo, se ha logrado identificar una serie de potenciales sitios de interacción con otras proteínas denominados *HEAT repeats* (del inglés *Huntingtin*, *Elongation factor 3*, *protein phosphatase 2A*, and *TOR 1*) y numerosos sitios de modificaciones post-traduccionales como: sitios de ubiquitinación, fosforilación, palmitoilación, acetilación, sumoilación y numerosos sitios de corte por distintas proteasas como caspasas y calpaínas entre otras (van Dellen et al., 2005; Zuccato et al., 2010). La expresión de las proteínas de fusión Htt588Q95-mRFP y Htt588Q17-mRFP fue verificada mediante un ensayo de Western Blot en líneas celulares. A través de este ensayo se detectó que ambas proteínas Htt588-mRFP presentaban un peso molecular mayor al determinado utilizando el programa Compute PI/Mw tool. Según dicho programa la proteína Htt588Q95-mRFP posee un tamaño de alrededor de 100 KDa y la proteína Htt588Q17-mRFP de alrededor de 90 KDa, sin embargo el ensayo de Western Blot reveló tamaños moleculares de 130 KDa y 100 KDa para las proteínas de fusión, respectivamente. Esto último podría deberse a diversas

modificaciones post-traduccionales sufridas por ambas proteínas, como las descritas previamente.

### **VIII.2. Un nuevo modelo viral adeno-asociado para el estudio de la enfermedad de Huntington.**

Diversos modelos animales han sido desarrollados para estudiar las características patológicas de la EH y posibles alternativas terapéuticas que prevengan, reviertan o atenúen dichas características. A la fecha, dos modelos generados por la transferencia génica mediada por vectores virales AAV han sido evaluados. Los vectores virales utilizados en estos estudios expresan fragmentos amino-terminales de Htt de 171 y 400 aminoácidos con expansiones poliQ de 70 y 100 glutaminas, respectivamente (DiFiglia et al., 2007; Franich et al., 2008). En el presente trabajo se propone un nuevo modelo para la EH utilizando vectores virales AAV que expresan un fragmento amino-terminal de Htt de 588 aminoácidos fusionado a la proteína fluorescente roja, RFP. Esto último permite una fácil visualización y cuantificación de inclusiones proteicas de Htt mutante *in vivo*.

Los sitios de modificación post-traduccionales de Htt se encuentran ubicados, en su gran mayoría, entre los primeros 586 aminoácidos amino-terminales de la proteína. Al mismo tiempo esta región amino-terminal contiene uno de los tres grupos de *HEAT repeats* de la proteína Htt comprendido entre los aminoácidos 114 y 413 (Imarisio et al., 2008; Zuccato et al., 2010). Por esta razón, el constructo Htt588-mRFP también permitiría evaluar el efecto de la interacción de Htt con otras proteínas y de las posibles modificaciones post-traduccionales con incidencia en los mecanismos patológicos de la

enfermedad. Además, nuestro modelo podría facilitar el estudio del efecto la proteína Htt mutante tanto en tejido como en líneas celulares mediante microscopía de fluorescencia. Un ejemplo importante de las modificaciones post-traduccionales de Htt es el procesamiento proteolítico que sufre esta proteína y que genera fragmentos amino-terminales portadores de la expansión poliQ a los que ha sido atribuida, en parte, la neurotoxicidad de la proteína mutante (Graham et al., 2006; Lunkes et al., 2002; Ratovitski et al., 2009). En teoría, la expresión de la proteína Htt588Q95-mRFP podría generar fenotipos patológicos que se aproximen de mejor forma a la enfermedad en humanos, dado que ha sido demostrado que fragmentos cortos de Htt con grandes expansiones poliQ generan fenotipos muy agresivos y artefactuales (Heng et al., 2008). Según los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, se observaron células RFP positivas al cabo de tan sólo 2 semanas post-inyección de los vectores virales AAV-Htt588Q95-mRFP y el porcentaje máximo de agregación se alcanzó alrededor de las 4 semanas de expresión. El porcentaje máximo de agregación fue equivalente aproximadamente al 70% de las células RFP positivas. A pesar de mantenerse constante el porcentaje de agregación entre las 4 y 8 semanas de expresión, el número de células RFP positivas aumentó en periodos más largos de tiempo.

Entre las células Htt-mRFP positivas se distinguieron 3 poblaciones celulares con distribuciones de la fluorescencia particulares: células con inclusiones pequeñas, células con inclusiones grandes y células sin inclusiones o con la fluorescencia homogéneamente distribuida. Con la metodología utilizada, sería posible ampliar la distinción entre poblaciones celulares basándonos en las categorías previamente descritas por Kouroku y sus colaboradores. Estas corresponderían a células con proteína

mutante dispersa en el citoplasma, equivalente a la categoría de células RFP positivas sin inclusiones, células con inclusiones dispersas en el citoplasma y procesos, células con inclusiones perinucleares, células con inclusiones nucleares (Kouroku et al., 2002). Sin embargo, la cuantificación de células con inclusiones dispersas en el citoplasma y perinucleares podría ser sobreestimada ya que los 18 primeros aminoácidos de la región amino-terminal de Htt conforman un dominio  $\alpha$ -hélice de asociación a membranas que dirige a Htt de forma reversible hacia membranas vesiculares y del RE (Atwal et al., 2007). Por lo anterior, las vesículas o porciones de membrana reticular asociadas a Htt mutante podrían ser contabilizadas como inclusiones proteicas. Para evitar la sobreestimación de la agregación sería necesario establecer las características específicas de las inclusiones en cuanto a tamaño y distribución subcelular y realizar el estudio con programas computacionales de análisis de imágenes.

Es importante mencionar que en el presente estudio no se observó la presencia de inclusiones nucleares. La formación de inclusiones nucleares es una característica que aparece tardíamente en los modelos *knock-in* de la EH. Htt mutante se acumula progresivamente en el núcleo de las células estriatales, formando inclusiones nucleares alrededor de 10 a 12 meses dependiendo del largo de la expansión poliQ (Wheeler et al., 2000). Sin embargo, en modelos virales de la EH que utilizan lentivirus o AAV es posible visualizar inclusiones nucleares al cabo de 1 y 2 semanas post-inyección, respectivamente (de Almeida et al., 2002; DiFiglia et al., 2007). Se ha descrito que el procesamiento proteolítico de Htt mutante genera la acumulación de inclusiones nucleares formadas por fragmentos amino-terminales de la proteína (Graham et al., 2006; Lunke et al., 2002; Ratovitski et al., 2009). El corte proteolítico de Htt en

posiciones más cercanas al extremo amino-terminal que el aminoácido 588, produciría la pérdida de la proteína fluorescente roja, por lo que las inclusiones de Htt no podrían ser observadas sin la realización de inmunofluorescencia con anticuerpos específicos para Htt. Este aspecto no fue abordado en el presente trabajo.

La inyección estereotáxica del vector viral AAV-Htt588Q95-mRFP produce una fuerte respuesta glial en toda la región del estriado analizada. Esta respuesta no es atribuible a la expresión de Htt mutante, ya que la misma respuesta se observa en tejido cerebral de animales inyectados con una preparación de virus AAV-Htt588Q17-mRFP no infectiva. Para evaluar si la expresión de la proteína Htt588Q95-mRFP produce una respuesta glial como se ha descrito para otros modelos de la EH (de Almeida et al., 2002; DiFiglia et al., 2007; Franich et al., 2008; Heng et al., 2008), sería necesario utilizar preparaciones virales de mayor pureza a la utilizada en este trabajo.

Los virus AAV poseen una serie de ventajas como vectores de transferencia génica en el desarrollo de potenciales terapias para diversas enfermedades (Myzyczka, 2010; Taymans et al., 2007). Este tipo de virus no han sido asociados a enfermedades humanas, no son replicativos, transducen un amplio rango de tipos celulares y a la vez cada serotipo tiene tropismos específicos para determinados tipos celulares, infectan células proliferativas y no proliferativas, permiten una expresión de transgenes a largo plazo, no producen respuesta inmune y los virus recombinantes no son integrativos (Cearley y Wolfe, 2006; Taymans et al., 2007).

Hasta la fecha se han aislado más de 100 variantes de vectores virales AAV a partir de tejidos de primates y humanos, de las cuales cerca de 10 serotipos diferentes han sido caracterizados para su utilización en terapia génica (Myzyczka, 2010). Los distintos

serotipos de AAV difieren entre sí en las proteínas de la cápside que expresan y, por lo tanto, en el tipo de receptor celular al que éstas se unen. Esto resulta en un tropismo diferencial de los vectores virales por distintos tipos celulares y por lo tanto en variaciones en la eficiencia de transducción (Davidson et al., 2000). El vector viral AAV de serotipo 2 es el más estudiado y utilizado para la expresión exógena de transgenes, sin embargo su eficiencia de transducción en células del sistema nervioso central es considerablemente más baja en comparación a otros serotipos (Davidson et al., 2000; Taymans et al., 2007).

En el presente trabajo se demostró que la utilización de vectores virales AAV de serotipo 2, permite una eficiencia de transducción suficiente para establecer un nuevo modelo de la EH. Para mejorar la eficiencia de transducción, en estudios que así lo requieran, existen 2 alternativas. La primera consiste en empaquetar el genoma viral de serotipo 2 en cápsides virales con un tropismo selectivo para células estriatales como el serotipo 5, derivado de humano y los serotipos 7 y 8 derivados de primates no humanos (Cearley y Wolfe, 2006; Taymans et al., 2007). De esta forma se obtendrían vectores virales híbridos de pseudotipos 2/5, 2/7 y 2/8, respectivamente (Taymans et al., 2007). La segunda alternativa es utilizar concentrados virales de mayor título. El título de las preparaciones virales utilizadas en este estudio fue sobreestimado debido a la degradación incompleta del vector de expresión pAAV no empaquetado. La utilización de altas dosis virales no es recomendable debido a la generación de respuesta inmune (Daya et al., 2008).

### **VIII.3. Ganancia de función de XBP1 como alternativa terapéutica para modular la agregación de Huntingtina mutante.**

Dadas las características genéticas de la EH, sería posible diseñar terapias presintomáticas. El hecho de ser una enfermedad autosómica dominante, con herencia mendeliana y causada por una única mutación permite una gran predictibilidad del desarrollo de los síntomas asociados. Por esto existe una ventaja comparativa respecto al tratamiento de otras enfermedades neurodegenerativas, pues al momento de manifestarse los síntomas ya se ha producido gran daño y pérdida neuronal. Sin embargo, aún no existe una cura para la EH y los tratamientos disponibles tienen por principal objetivo disminuir los síntomas motores, cognitivos y psiquiátricos una vez ya iniciados (Imarisio et al., 2008). Las drogas utilizadas en estos tratamientos sólo alivian parcialmente los síntomas, sin afectar el desarrollo de la patología y en su mayoría tienen asociados diversos efectos secundarios (Imarisio et al., 2008; Southwell y Patterson, 2011; Zuccato et al., 2010).

Una de las principales características histopatológicas de la EH, es la colocación de los agregados proteicos de Htt mutante con ubiquitina (Imarisio et al., 2008; Zuccato et al., 2010). Htt es ubiquitinada por la enzima ubiquitin-ligasa E2-25K y dirigida a degradación vía proteasoma (Kalchman et al., 1996). Sin embargo, el proteasoma eucariótico no es capaz de degradar de forma eficiente grandes agregados proteicos (Imarisio et al., 2008; van Dellen et al., 2005; Zuccato et al., 2010). Se ha propuesto que el proteasoma no puede cortar entre residuos sucesivos de glutamina en un fragmento proteico poliQ y que los agregados con expansiones poliQ patológicas podrían inhibir directamente la actividad del proteasoma debido al bloqueo del canal catalítico de la

subunidad 20S, impidiendo la entrada de otros sustratos para su degradación (Imarisio et al., 2008).

En este trabajo se estudió el efecto de la ganancia de función del factor transcripcional activo XBP1s, como posible estrategia terapéutica contra la EH. XBP1s es un factor de transcripción río abajo del sensor de estrés de retículo IRE1 $\alpha$ , que modula la activación de genes involucrados en diferentes procesos celulares como el plegamiento de proteínas, el control de calidad de proteínas, la entrada de proteínas al RE, la ERAD, la biosíntesis de lípidos y la biogénesis del RE y complejo de Golgi (Hetz y Glimcher, 2009). Diferentes grupos han estudiado el efecto de la manipulación de la expresión del factor de transcripción XBP1 sobre algunas de las características patológicas de determinadas enfermedades neurodegenerativas (Matus et al., 2011). Estos estudios demuestran el rol transversal de la UPR en el proceso de neurodegeneración.

En este trabajo, se observó que la sobreexpresión del factor transcripcional activo XBP1s, reduce en un 15,1% la agregación de Htt mutante en neuronas estriatales cotransducidas *in vivo* al cabo de 4 semanas de expresión. La reducción en la agregación se debe principalmente a la disminución de la cantidad de células RFP positivas con inclusiones pequeñas. Este es un resultado relevante ya que se ha sugerido que los agregados e inclusiones pequeñas, oligómeros solubles y formas de Htt mutante con plegamientos aberrantes, son altamente tóxicos para las células (Zuccato et al., 2010). Los resultados obtenidos nos permiten especular que XBP1s podría actuar impidiendo la formación de nuevas inclusiones de Htt mutante. El factor de transcripción XBP1s activa una serie de genes río abajo involucrados en la ERAD, como EDEM, HERP y p58<sup>IPK</sup> (Gupta et al., 2010; Lee et al., 2003). La sobrerregulación de estos genes involucrados en

la ERAD, y por lo tanto en la degradación proteosomal, podría favorecer la degradación de Htt mutante en estado monomérico u oligomérico, evitando así la acumulación de proteína mutante y previniendo la formación de grandes inclusiones proteicas. Por otro lado, XBP1s promueve la expresión de una serie de chaperonas como ERdj4, ERdj5, HEDJ, Grp58 y PDIP5 (Gupta et al., 2010). Las proteínas ERdj4, p58<sup>IPK</sup> y HEDJ se localizan en el RE y presentan una actividad similar a Hsp40 aumentando la actividad de chaperonas de la familia Hsp70 (Lee et al., 2003). Esto último concuerda con diversos estudios que demuestran que la sobreexpresión de chaperonas como Hsp40, Hsp70, Hsp104, y tratamientos con chaperonas químicas como Trehalosa, reducen la agregación de Htt mutante y la muerte celular en modelos de EH (Imarisio et al., 2008; Matus et al., 2008). De acuerdo a lo anterior, la sobreexpresión de XBP1s podría tener un efecto dual sobre el plegamiento de Htt mutante además de su degradación vía proteasoma. Los blancos transcripcionales de XBP1 difieren entre distintos tipos celulares (Acosta-Alvear et al., 2007; Lee et al., 2003) y los blancos neuronales aún no se encuentran bien definidos. Sin embargo, los niveles de expresión de blancos clásicos de XBP1 como EDEM y ERdj4 no se alteran en cultivos primarios de ratones deficientes de XBP1 tratados con el estresor de retículo Tunicamicina (Tm) a diferencia de la expresión de HERP, PDI y Grp58 que sí disminuye (Hetz et al., 2008). Por lo anterior, el efecto observado en la reducción de la agregación de Htt mutante sería independiente de EDEM y ERdj4. Sin embargo, los estudios realizados en este trabajo no permiten confirmar el mecanismo de acción de XBP1 sobre la agregación de Htt mutante.

## **IX. PROYECCIONES**

El presente estudio representa una primera aproximación para desarrollar un nuevo modelo animal para la EH. En esta línea de investigación, es necesario realizar una caracterización más profunda del modelo con la evaluación de la pérdida de marcadores neuronales como NeuN o DARPP32 y respuesta glial con el marcador GFAP ante la expresión de Htt mutante. También es necesaria la evaluación del posible procesamiento proteolítico de Htt mutante y la consecuente generación de fragmentos tóxicos amino-terminales así como también la evaluación de muerte celular en las regiones cerebrales afectadas, la determinación de un posible fenotipo motor y la progresión de todas estas características en el tiempo (de Almeida et al., 2002; DiFiglia et al., 2007; Franich et al., 2008; Heng et al., 2008).

Respecto al efecto de XBP1s sobre la agregación de Htt mutante, es necesario realizar estudios que permitan identificar el mecanismo específico por el cual la sobreexpresión del factor de transcripción activo XBP1s, permite reducir las inclusiones proteicas de Htt mutante. De igual forma, es importante evaluar en el futuro, el efecto de la ganancia de función de XBP1 sobre otros eventos patológicos moleculares característicos de la EH, como por ejemplo, la desregulación de la homeostasis de calcio (Rockabrand et al., 2007). En esta línea, Casas y sus colaboradores describieron un efecto neuroprotector de XBP1s en dos modelos de la EA atribuyendo este efecto a la regulación transcripcional negativa del canal de calcio RyR3 por parte de XBP1. La disminución en la expresión de RyR3 reduciría la liberación de calcio desde el RE y por tanto la muerte celular (Casas-

Tinto et al., 2011). Este mecanismo también podría estar involucrado en neuroprotección de XBP1 en la EH.

En resumen, este trabajo de tesis presenta un nuevo modelo animal para la EH, generado por la transferencia génica mediada por vectores virales AAV, de la región amino-terminal de Htt humana fusionada la RFP. Este nuevo modelo presenta un fenotipo celular de agregación proteica en cortos periodos de tiempo, lo que permite el estudio de posibles alternativas terapéuticas para la enfermedad. En esta línea, la sobreexpresión del factor de transcripción XBP1 permite atenuar la agregación de Htt mutante *in vivo*, una de las principales características celulares de la EH. Futuros estudios son requeridos en la caracterización de este nuevo modelo animal de la EH y en la determinación del mecanismo molecular por el que XBP1 disminuye la formación y/o acumulación de inclusiones proteicas de Htt mutante.

## X. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta-Alvear, D., Zhou, Y., Blais, A., Tsikitis, M., Lents, N.H., Arias, C., Lennon, C.J., Kluger, Y., and Dynlacht, B.D. (2007). XBP1 controls diverse cell type- and condition-specific transcriptional regulatory networks. *Mol Cell* 27, 53-66.
- Atwal, R.S., Xia, J., Pinchev, D., Taylor, J., Epanand, R.M., and Truant, R. (2007). Huntingtin has a membrane association signal that can modulate huntingtin aggregation, nuclear entry and toxicity. *Hum Mol Genet* 16, 2600-2615.
- Bauer, P.O., Goswami, A., Wong, H.K., Okuno, M., Kurosawa, M., Yamada, M., Miyazaki, H., Matsumoto, G., Kino, Y., Nagai, Y., *et al.* (2010). Harnessing chaperone-mediated autophagy for the selective degradation of mutant huntingtin protein. *Nat Biotechnol* 28, 256-263.
- Carnemolla, A., Fossale, E., Agostoni, E., Michelazzi, S., Calligaris, R., De Maso, L., Del Sal, G., MacDonald, M.E., and Persichetti, F. (2009). Rrs1 is involved in endoplasmic reticulum stress response in Huntington disease. *J Biol Chem* 284, 18167-18173.
- Casas-Tinto, S., Zhang, Y., Sanchez-Garcia, J., Gomez-Velazquez, M., Rincon-Limas, D.E., and Fernandez-Funez, P. (2011). The ER stress factor XBP1s prevents amyloid- $\beta$  neurotoxicity. *Hum Mol Genet* 20, 2144-2160.
- Cattaneo, E., Zuccato, C., and Tartari, M. (2005). Normal huntingtin function: an alternative approach to Huntington's disease. *Nat Rev Neurosci* 6, 919-930.
- Cearley, C.N., and Wolfe, J.H. (2006). Transduction characteristics of adeno-associated virus vectors expressing cap serotypes 7, 8, 9, and Rh10 in the mouse brain. *Mol Ther* 13, 528-537.
- Cho, K.J., Lee, B.I., Cheon, S.Y., Kim, H.W., Kim, H.J., and Kim, G.W. (2009). Inhibition of apoptosis signal-regulating kinase 1 reduces endoplasmic reticulum stress and nuclear huntingtin fragments in a mouse model of Huntington disease. *Neuroscience* 163, 1128-1134.
- Davidson, B.L., Stein, C.S., Heth, J.A., Martins, I., Kotin, R.M., Derksen, T.A., Zabner, J., Ghodsi, A., and Chiorini, J.A. (2000). Recombinant adeno-associated virus type 2, 4, and 5 vectors: transduction of variant cell types and regions in the mammalian central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3428-3432.
- Daya, S., and Berns, K. (2008) Gene therapy using adeno-associated virusvectors. *Clin Microbiol Rev* 21, 583-593.
- de Almeida, L.P., Ross, C.A., Zala, D., Aebischer, P., and Deglon, N. (2002). Lentiviral-mediated delivery of mutant huntingtin in the striatum of rats induces a selective neuropathology modulated by polyglutamine repeat size, huntingtin expression levels, and protein length. *J Neurosci* 22, 3473-3483.
- DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K.O., Davies, S.W., Bates, G.P., Vonsattel, J.P., and Aronin, N. (1997). Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* 277, 1990-1993.
- DiFiglia, M., Sena-Esteves, M., Chase, K., Sapp, E., Pfister, E., Sass, M., Yoder, J., Reeves, P., Pandey, R.K., Rajeev, K.G., *et al.* (2007). Therapeutic silencing of mutant huntingtin with siRNA attenuates striatal and cortical neuropathology and behavioral deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 17204-17209.
- Duennwald, M.L., and Lindquist, S. (2008). Impaired ERAD and ER stress are early and specific events in polyglutamine toxicity. *Genes Dev* 22, 3308-3319.
- Franich, N.R., Fitzsimons, H.L., Fong, D.M., Klugmann, M., During, M.J., and Young, D. (2008). AAV vector-mediated RNAi of mutant huntingtin expression is neuroprotective in a novel genetic rat model of Huntington's disease. *Mol Ther* 16, 947-956.

- Graham, R.K., Deng, Y., Slow, E.J., Haigh, B., Bissada, N., Lu, G., Pearson, J., Shehadeh, J., Bertram, L., Murphy, Z., *et al.* (2006). Cleavage at the caspase-6 site is required for neuronal dysfunction and degeneration due to mutant huntingtin. *Cell* *125*, 1179-1191.
- Grieger, J.C., Choi, V.W., and Samulski, R.J. (2006). Production and characterization of adeno-associated viral vectors. *Nat Protoc* *1*, 1412-1428.
- Gupta, S., Deepti, A., Deegan, S., Lisbona, F., Hetz, C., and Samali, A. (2010). HSP72 protects cells from ER stress-induced apoptosis via enhancement of IRE1alpha-XBP1 signaling through a physical interaction. *PLoS Biol* *8*, e1000410.
- Hampton, R.Y. (2002). ER-associated degradation in protein quality control and cellular regulation. *Curr Opin Cell Biol* *14*, 476-482.
- Heng, M.Y., Detloff, P.J., and Albin, R.L. (2008). Rodent genetic models of Huntington disease. *Neurobiol Dis* *32*, 1-9.
- Hetz, C., and Glimcher, L.H. (2009). Fine-tuning of the unfolded protein response: Assembling the IRE1alpha interactome. *Mol Cell* *35*, 551-561.
- Hetz, C., Lee, A.H., Gonzalez-Romero, D., Thielen, P., Castilla, J., Soto, C., and Glimcher, L.H. (2008). Unfolded protein response transcription factor XBP-1 does not influence prion replication or pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 757-762.
- Hetz, C., Thielen, P., Matus, S., Nassif, M., Court, F., Kiffin, R., Martinez, G., Cuervo, A.M., Brown, R.H., and Glimcher, L.H. (2009). XBP-1 deficiency in the nervous system protects against amyotrophic lateral sclerosis by increasing autophagy. *Genes Dev* *23*, 2294-2306.
- Imarisio, S., Carmichael, J., Korolchuk, V., Chen, C.W., Saiki, S., Rose, C., Krishna, G., Davies, J.E., Tofsi, E., Underwood, B.R., *et al.* (2008). Huntington's disease: from pathology and genetics to potential therapies. *Biochem J* *412*, 191-209.
- Kalchman, M.A., Graham, R.K., Xia, G., Koide, H.B., Hodgson, J.G., Graham, K.C., Goldberg, Y.P., Gietz, R.D., Pickart, C.M., and Hayden, M.R. (1996). Huntingtin is ubiquitinated and interacts with a specific ubiquitin-conjugating enzyme. *J Biol Chem* *271*, 19385-19394.
- Kouroku, Y., Fujita, E., Jimbo, A., Kikuchi, T., Yamagata, T., Momoi, M.Y., Kominami, E., Kuida, K., Sakamaki, K., Yonehara, S., *et al.* (2002). Polyglutamine aggregates stimulate ER stress signals and caspase-12 activation. *Hum Mol Genet* *11*, 1505-1515.
- Kouroku, Y., Fujita, E., Tanida, I., Ueno, T., Isoai, A., Kumagai, H., Ogawa, S., Kaufman, R.J., Kominami, E., and Momoi, T. (2007). ER stress (PERK/eIF2alpha phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. *Cell Death Differ* *14*, 230-239.
- Kremer, B., Goldberg, P., Andrew, S.E., Theilmann, J., Telenius, H., Zeisler, J., Squitieri, F., Lin, B., Bassett, A., Almqvist, E., *et al.* (1994). A worldwide study of the Huntington's disease mutation. The sensitivity and specificity of measuring CAG repeats. *N Engl J Med* *330*, 1401-1406.
- Lee, A.H., Iwakoshi, N.N., and Glimcher, L.H. (2003). XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol* *23*, 7448-7459.
- Lee, K., Tirasophon, W., Shen, X., Michalak, M., Prywes, R., Okada, T., Yoshida, H., Mori, K., and Kaufman, R.J. (2002). IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. *Genes Dev* *16*, 452-466.
- Li, H., Li, S.H., Yu, Z.X., Shelbourne, P., and Li, X.J. (2001). Huntingtin aggregate-associated axonal degeneration is an early pathological event in Huntington's disease mice. *J Neurosci* *21*, 8473-8481.

- Lunkes, A., Lindenberg, K.S., Ben-Haiem, L., Weber, C., Devys, D., Landwehrmeyer, G.B., Mandel, J.L., and Trotter, Y. (2002). Proteases acting on mutant huntingtin generate cleaved products that differentially build up cytoplasmic and nuclear inclusions. *Mol Cell* *10*, 259-269.
- Machida, Y., Okada, T., Kurosawa, M., Oyama, F., Ozawa, K., and Nukina, N. (2006). rAAV-mediated shRNA ameliorated neuropathology in Huntington disease model mouse. *Biochem Biophys Res Commun* *343*, 190-197.
- Martinez-Vicente, M., Tallozy, Z., Wong, E., Tang, G., Koga, H., Kaushik, S., de Vries, R., Arias, E., Harris, S., Sulzer, D., *et al.* (2010). Cargo recognition failure is responsible for inefficient autophagy in Huntington's disease. *Nat Neurosci* *13*, 567-576.
- Matus, S., Glimcher, L.H., and Hetz, C. (2011). Protein folding stress in neurodegenerative diseases: a glimpse into the ER. *Curr Opin Cell Biol* *23*, 239-252.
- Matus, S., Lisbona, F., Torres, M., Leon, C., Thielen, P., and Hetz, C. (2008). The stress rheostat: an interplay between the unfolded protein response (UPR) and autophagy in neurodegeneration. *Curr Mol Med* *8*, 157-172.
- Myzyczka, N. (2010). Adeno-Associated Virus (AAV) vectors. In *A Guide to Human Genes Therapy*, R.Z. Herzog, S., ed. (Singapur, World Scientific), pp. 87-102.
- Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Tobiume, K., Saegusa, K., Takeda, K., Inoue, K., Hori, S., Kakizuka, A., and Ichijo, H. (2002). ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev* *16*, 1345-1355.
- Noh, J.Y., Lee, H., Song, S., Kim, N.S., Im, W., Kim, M., Seo, H., Chung, C.W., Chang, J.W., Ferrante, R.J., *et al.* (2009). SCAMP5 links endoplasmic reticulum stress to the accumulation of expanded polyglutamine protein aggregates via endocytosis inhibition. *J Biol Chem* *284*, 11318-11325.
- Palfi, S., Brouillet, E., Jarraya, B., Bloch, J., Jan, C., Shin, M., Conde, F., Li, X.J., Aebischer, P., Hantraye, P., *et al.* (2007). Expression of mutated huntingtin fragment in the putamen is sufficient to produce abnormal movement in non-human primates. *Mol Ther* *15*, 1444-1451.
- Quintanilla, R.A., and Johnson, G.V. (2009). Role of mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Huntington's disease. *Brain Res Bull* *80*, 242-247.
- Ratovitski, T., Gucek, M., Jiang, H., Chighladze, E., Waldron, E., D'Ambola, J., Hou, Z., Liang, Y., Poirier, M.A., Hirschhorn, R.R., *et al.* (2009). Mutant huntingtin N-terminal fragments of specific size mediate aggregation and toxicity in neuronal cells. *J Biol Chem* *284*, 10855-10867.
- Reijonen, S., Putkonen, N., Norremolle, A., Lindholm, D., and Korhonen, L. (2008). Inhibition of endoplasmic reticulum stress counteracts neuronal cell death and protein aggregation caused by N-terminal mutant huntingtin proteins. *Exp Cell Res* *314*, 950-960.
- Rockabrand, E., Slepko, N., Pantalone, A., Nukala, V.N., Kazantsev, A., Marsh, J.L., Sullivan, P.G., Steffan, J.S., Sensi, S.L., and Thompson, L.M. (2007). The first 17 amino acids of Huntingtin modulate its sub-cellular localization, aggregation and effects on calcium homeostasis. *Hum Mol Genet* *16*, 61-77.
- Rohr, U.P., Wulf, M.A., Stahn, S., Steidl, U., Haas, R., and Kronenwett, R. (2002). Fast and reliable titration of recombinant adeno-associated virus type-2 using quantitative real-time PCR. *J Virol Methods* *106*, 81-88.
- Ron, D., and Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* *8*, 519-529.
- Sado, M., Yamasaki, Y., Iwanaga, T., Onaka, Y., Ibuki, T., Nishihara, S., Mizuguchi, H., Momota, H., Kishibuchi, R., Hashimoto, T., *et al.* (2009). Protective effect against Parkinson's disease-related insults through the activation of XBP1. *Brain Res* *1257*, 16-24.

- Shibata, M., Lu, T., Furuya, T., Degterev, A., Mizushima, N., Yoshimori, T., MacDonald, M., Yankner, B., and Yuan, J. (2006). Regulation of intracellular accumulation of mutant Huntingtin by Beclin 1. *J Biol Chem* 281, 14474-14485.
- Southwell, A.L., and Patterson, P.H. (2011). Gene therapy in mouse models of huntington disease. *Neuroscientist* 17, 153-162.
- Sugars, K.L., and Rubinsztein, D.C. (2003). Transcriptional abnormalities in Huntington disease. *Trends Genet* 19, 233-238.
- Taymans, J.M., Vandenberghe, L.H., Haute, C.V., Thiry, I., Deroose, C.M., Mortelmans, L., Wilson, J.M., Debyser, Z., and Baekelandt, V. (2007). Comparative analysis of adeno-associated viral vector serotypes 1, 2, 5, 7, and 8 in mouse brain. *Hum Gene Ther* 18, 195-206.
- van Dellen, A., Grote, H.E., and Hannan, A.J. (2005). Gene-environment interactions, neuronal dysfunction and pathological plasticity in Huntington's disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 32, 1007-1019.
- Velier, J., Kim, M., Schwarz, C., Kim, T.W., Sapp, E., Chase, K., Aronin, N., and DiFiglia, M. (1998). Wild-type and mutant huntingtins function in vesicle trafficking in the secretory and endocytic pathways. *Exp Neurol* 152, 34-40.
- Wang, Y., Shen, J., Arenzana, N., Tirasophon, W., Kaufman, R.J., and Prywes, R. (2000). Activation of ATF6 and an ATF6 DNA binding site by the endoplasmic reticulum stress response. *J Biol Chem* 275, 27013-27020.
- Wheeler, V.C., White, J.K., Gutekunst, C.A., Vrbanac, V., Weaver, M., Li, X.J., Li, S.H., Yi, H., Vonsattel, J.P., Gusella, J.F., *et al.* (2000). Long glutamine tracts cause nuclear localization of a novel form of huntingtin in medium spiny striatal neurons in HdhQ92 and HdhQ111 knock-in mice. *Hum Mol Genet* 9, 503-513.
- Williams, A., Jahreiss, L., Sarkar, S., Saiki, S., Menzies, F.M., Ravikumar, B., and Rubinsztein, D.C. (2006). Aggregate-prone proteins are cleared from the cytosol by autophagy: therapeutic implications. *Curr Top Dev Biol* 76, 89-101.
- Woehlbier, U., and Hetz, C. (2011). Modulating stress responses by the UPORosome: A matter of life and death. *Trends Biochem Sci* 36, 329-337.
- Zuccato, C., Valenza, M., and Cattaneo, E. (2010). Molecular mechanisms and potential therapeutical targets in Huntington's disease. *Physiol Rev* 90, 905-981.