

**Identificación de CHIP y Ataxina-2 como  
modificadores de la toxicidad inducida por la  
Ataxina-1 utilizando un Modelo de Ataxia  
Espinocerebelosa Tipo 1 en *Drosophila  
melanogaster***

Autor:

Ismael Al-Ramahi González

Directores:

Juan Botas Rodríguez

Inmaculada Canal Beltrán

## A. Índice

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>5</b>
<b>1.1 SCA1 .....</b>	<b>6</b>
1.1.1 MANIFESTACIONES CLÍNICAS Y PATOLÓGICAS .....	6
1.1.2 ORIGEN GENÉTICO .....	8
1.1.3 MODELO DE GANANCIA DE FUNCIÓN TÓXICA .....	9
1.1.4 ATAXINA-1, EL CONTEXTO PROTEICO EN SCA1.....	11
1.1.5 INCLUSIONES NUCLEARES.....	14
<b>1.2 MECANISMOS CELULARES IMPLICADOS EN LA PATOGÉNESIS DE SCA1. ....</b>	<b>17</b>
1.2.1 MAQUINARIA DE CONTROL DE CALIDAD PROTEICA.....	17
1.2.1.1 Las Chaperonas.....	17
1.2.1.2 Ubiquitinación y degradación: el sistema Ubiquitina/Proteasoma .....	18
1.2.1.3 Implicación de la maquinaria de control de calidad proteica en SCA1.....	19
1.2.2 ALTERACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA .....	21
1.2.2.1 <i>Gfi1/senseless</i> .....	24
<b>1.3 RELACIÓN ENTRE LAS ATAXIAS ESPINOCEREBELOSAS .....</b>	<b>25</b>
1.3.2 SCA2 .....	27
<b>1.4 DROSOPHILA MELANOGASTER COMO MODELO ANIMAL DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS .....</b>	<b>29</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>34</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
GENERACIÓN DE CONSTRUCCIONES PARA EXPRESIÓN EN <i>DROSOPHILA</i> .....	35
UAS-CHIP .....	35
UAS-dAtx2 <sup>NLS</sup> y UAS-dAtx2 <sup>NES</sup> .....	35
INYECCIÓN DE EMBRIONES Y GENERACIÓN DE MOSCAS TRANSGÉNICAS .....	35
OTRAS LÍNEAS DE <i>DROSOPHILA</i> UTILIZADAS .....	37
ENSAYOS DE UBIQUITINACIÓN <i>IN VITRO</i> .....	37
COIMMUNOPRECIPITACIÓN CHIP-ATAXINA-1 .....	37
PURIFICACIÓN POR COAFINIDAD.....	38
ENSAYOS DE UBIQUITINACIÓN EN VIVO DE ATAXINA-1 .....	38
IMMUNOFLUORESCENCIA EN CULTIVO CELULAR.....	39
MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO DE OJOS DE <i>DROSOPHILA</i> .....	39
ENSAYOS DE WESTERN BLOT CON TEJIDO DE <i>DROSOPHILA</i> .....	39
IMMUNOFLUORESCENCIA EN TEJIDOS DE <i>DROSOPHILA</i> .....	40
CUANTIFICACIÓN DE FLUORESCENCIA EN DISCOS DE OJO LARVARIOS .....	40
SECCIONES DE PARAFINA DE OJOS DE <i>DROSOPHILA</i> .....	40
IMMUNOHISTOQUÍMICA EN TEJIDO DE CEREBRO HUMANO.....	41
RT-PCR SEMIQUANTITATIVA EN TEJIDOS DE <i>DROSOPHILA</i> .....	41
ENSAYO DE CAPACIDAD LOCOMOTRIZ .....	42
CUANTIFICACIÓN DE MACROQUETAS .....	42

**4. RESULTADOS ..... 43**

**4.1 CHIP SUPRIME LA TOXICIDAD DE ATAXINA-1 E INDUCE SU UBIQUITINACIÓN Y DEGRADACIÓN..... 44**

INTRODUCCIÓN ..... 44  
CHIP INTERACCIONA CON LA ATAXINA-1 EXPANDIDA Y NO EXPANDIDA ..... 46  
CHIP SE ENCUENTRA EN LAS INS DE ATAXINA-1 TANTO EN CULTIVO CELULAR COMO EN NEURONAS DE CEREBROS CON SCA1 ..... 46  
CHIP UBIQUITINA TANTO A LA ATAXINA-1 EXPANDIDA COMO A LA NO EXPANDIDA IN VITRO, Y HSP70 POTENCIA ESTA UBIQUITINACIÓN ..... 47  
CHIP INDUCE LA UBIQUITINACIÓN DE ATAXINA-1 [82Q] EN CULTIVO CELULAR, DE FORMA DEPENDIENTE DEL DOMINIO TPR..... 50  
CHIP SUPRIME LA TOXICIDAD DE LA ATAXINA-1EXPANDIDA EN UN MODELO DE SCA1 EN DROSOPHILA ..... 53  
LA EXPRESIÓN DE CHIP REDUCE LOS NIVELES DE ATAXINA-1 [82Q] EN VIVO ..... 56  
CHIP SUPRIME LA TOXICIDAD DE ATAXINA-1 NO EXPANDIDA E INDUCE UNA REDUCCIÓN EN SUS NIVELES ..... 59  
EL CONTEXTO PROTEICO INFLUYE EN LA PROTECCIÓN DE CHIP CONTRA LA TOXICIDAD DE POLIGLUTAMINAS EXPANDIDAS..... 62

**4.2 LA ATAXINA-2 CONTRIBUYE A LA TOXICIDAD INDUCIDA POR ATAXINA-1 EXPANDIDA ..... 66**

INTRODUCCIÓN ..... 66  
AUMENTAR LOS NIVELES DE DATX2 POTENCIA LA TOXICIDAD DE ATAXINA-1 [82Q] Y SU DISMINUCIÓN LA SUPRIME ..... 67  
LA REDUCCIÓN DE LOS NIVELES DE DATX2 SUPRIME LA TOXICIDAD DE ATAXINA-1 [82Q] EN EL SISTEMA NERVIOSO DE DROSOPHILA..... 70  
LOS NIVELES DE DATX2 MODULAN LA PÉRDIDA DE MECANORECEPTORES INDUCIDA POR ATAXINA-1 [82Q] ..... 72  
LAS PROTEÍNAS ATAXINA-1 Y ATAXINA-2 HUMANAS INTERACCIONAN EN ENSAYOS DE CO-AP..... 76  
ACUMULACIÓN NUCLEAR DE ATAXINA-2 EN NEURONAS QUE EXPRESAN ATAXINA-1 EXPANDIDA. .... 78  
SOLO LA ATAXINA-1 EXPANDIDA INDUCE LA ACUMULACIÓN NUCLEAR DE ATAXINA-2. .... 81  
LA ACUMULACIÓN DE ATAXINA-2 EN EL NÚCLEO ES ALTAMENTE TÓXICA. .... 83  
LA ATAXINA-2 NUCLEAR CAUSA UNA BAJADA EN LOS NIVELES DE SENSELESS Y PÉRDIDA DE MECHANORECEPTORES. .... 86

**5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES ..... 90**

INTERACCIÓN CHIP-ATAXINA-1 EXPANDIDA ..... 90

<b>INTERACCIÓN CHIP-ATAXINA-1 NO EXPANDIDA .....</b>	<b>92</b>
<b>DATX2 MODULA LA TOXICIDAD DE ATAXINA-1 [82Q] Y AMBAS PROTEÍNAS SON CAPACES DE INTERACCIONAR FÍSICAMENTE.....</b>	<b>93</b>
<b>ACUMULACIÓN NUCLEAR DE DATX2 .....</b>	<b>94</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIAS.....</b>	<b>97</b>

# 1. Introducción

El 1991 se identificó la mutación causante de la atrofia muscular espinobulbar (SBMA). Esta consistía en la expansión en una secuencia de trinucleótidos CAG repetidos en la región codificante del gen *Receptor de Adrógeno (AR)* (La Spada, et al., 1991). Este hecho marcó el descubrimiento de la primera enfermedad causada por expansión de poliglutaminas. A día de hoy, otras ocho enfermedades neurodegenerativas han sido identificadas cuyo detonante es un mecanismo similar. Estas enfermedades son el mal de Huntington (HD), la atrofia Dentatorubropalidoluisiana (DRPLA), y las ataxias espinocerebelosas dominantes (SCAs) tipo 1, 2, 3, 6, 7 y 17, causadas por expansión de poliglutaminas en las proteínas Huntingtina, Atrofina, Ataxina-1, Ataxina-2, Ataxina-3, CACNA1<sub>A</sub> (P/Q-type voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel alpha1A subunit), Ataxina-7 y TBP (TATA-box Binding Protein) respectivamente (**Tabla 1**) (Nakamura, et al., 2001, Zoghbi and Orr, 2000). A este grupo de enfermedades se le conoce con el nombre común de enfermedades causadas por expansión de poliglutaminas y en este trabajo nos referimos a ellas con las iniciales PQDs (de “poly-Q diseases”).

Las PQDs tienen varias características comunes:

- Todas son desencadenadas por la elongación de una repetición inestable de trinucleótidos (CAG)<sub>n</sub> en la región codificada del gen responsable de cada enfermedad; lo cual da lugar a la expansión de un fragmento de poliglutaminas presente en la proteína codificada.

- Estas enfermedades presentan herencia autosómica dominante, excepto en el caso de SBMA dado que el gen *AR* se encuentra en el cromosoma X (aunque el efecto sigue siendo dominante a nivel celular).

- En todas ellas se da el fenómeno de anticipación, por el cual la manifestación clínica de la enfermedad se adelanta de generación en generación (debido al incremento del número de poliglutaminas expandidas), llegando a haber casos juveniles/infantiles.

- En general los síntomas de las distintas PQDs se hacen evidentes a partir de la tercera o cuarta década de vida del paciente, y la progresión de la enfermedad suele extenderse unos diez a veinte años.

- La característica común más llamativa a nivel neuropatológico es la presencia de agregados intraneuronales formados por la proteína expandida causante de la

enfermedad; estos agregados son nucleares en el caso de SCA1, SCA7 y SCA17, citoplásmicos en el caso de SCA6, y tanto nucleares como citoplásmicos en el caso de HD, DRPLA, SBMA, SCA2 y SCA3 (Koeppen, 2005, Zoghbi and Orr, 2000).

Además de estas similitudes, las PQDs también presentan diferencias importantes:

- El umbral de repeticiones necesario para desencadenar toxicidad es distinto en diferentes casos, variando entre 20 (CAG)/Glutaminas en el caso de SCA6 a un número mayor a 61 (CAG)/Glutaminas necesario para desencadenar SCA3 (Zhuchenko, et al., 1997).

- Por otro lado, pese a que las proteínas causantes de las diferentes enfermedades se expresan en todo el sistema nervioso central (además de otros tejidos), y con patrones solapados entre proteínas causantes de diferentes PQDs, en cada mal se observa un grupo específico de neuronas más vulnerables. Cuanto mayor es la expansión de poliglutaminas presente en diferentes proteínas causantes de PQDs mayor es la coincidencia sintomática y neuropatológica entre las diferentes enfermedades (Zoghbi and Orr, 2000).

En nuestro laboratorio y en colaboración con otros grupos, nos proponemos utilizar modelos celulares y animales de ataxia espinocerebelosa de tipo 1 (SCA1), causada por la expansión de poliglutaminas en la proteína Ataxina-1 para identificar tanto mecanismos comunes implicados en la patogénesis de las distintas PQDs, como los mecanismos específicos de SCA1.

## **1.1 SCA1**

### **1.1.1 Manifestaciones clínicas y patológicas**

La ataxia espinocerebelosa tipo-1 o SCA1 es una enfermedad neurodegenerativa que comienza a manifestarse alrededor de los treinta años. Las principales características clínicas de SCA1 son ataxia cerebelar progresiva, dificultades en el habla (disartria), y posteriormente disfunción del bulbo raquídeo. Los síntomas tempranos pueden incluir ataxia en el desplazamiento y en las extremidades, dificultades leves en el habla, movimientos sacádicos irregulares (relacionados con los músculos del ojo) y disfagia (problemas al tragar).

Enfermedad	Gen	Proteína	Número de CAG/Glutaminas		Inclusiones neuronales	Neuronas afectadas
			Normal	Patogénico		
HD	<i>HD</i>	Huntingtina	11-34	40-121	N/CP	Striatum, globus pallidus
SBMA	<i>AR</i>	Receptor de Andrógenos	9-36	38-62	N/CP	Puente troncoencefálico, bulbo raquídeo, medula espinal
DRPLA	<i>DRPLA</i>	Atrofina	7-34	49-88	N/CP	Corteza cerebral y cerebelar, globus pallidus
SCA1	<i>SCA1</i>	Ataxina-1	6-39	40-82	N	Cerebelo, puente, oliva y núcleo dentado
SCA2	<i>SCA2</i>	Ataxina-2	15-24	32-200	N/CP	Cerebelo, puente troncoencefálico, oliva, sustancia negra, lóbulo frontotemporal
SCA3	<i>SCA3</i>	Ataxina-3	13-36	61-84	N/CP	Ganglios basales, tronco encefálico, medulla espinal, y núcleo dentado
SCA6	<i>CACNA1A</i>	CACNA1 <sub>A</sub>	4-20	20-29	CP	Cerebelo y tronco encefálico
SCA7	<i>SCA7</i>	Ataxina-7	4-35	37-306	N	Cerebelo, oliva, algunos pares de nervios craneales, nervio óptico, corteza visual.
SCA17	<i>SCA17</i>	TBP	25-42	47-63	N	Corteza cerebral y cerebelar.

Tabla 1

A medida que la enfermedad avanza, los problemas oculomotores se hacen más evidentes. La ataxia y disartria se van haciendo progresivamente más severas y se observan hiperreflexia, y otros síntomas de disfunción cerebelar como hipotonía y disimetría. En las fases avanzadas de la enfermedad se observa atrofia muscular, falta de reflejos en los tendones, distonía y corea (temblores involuntarios). También en las fases finales se puede producir pérdida cognitiva y frecuentemente se da una fuerte disfunción bulbar, que conlleva disfagia severa y pérdida de control sobre los músculos de la cara. Los pacientes fallecen normalmente debido a parada cardiorrespiratoria o neumonía (Koeppen, 2005, Robitaille, et al., 1995, Zoghbi and Orr, 2000).

Si la expansión de glutaminas en Ataxina-1 es muy larga (>80), se producen casos juveniles de SCA1, en éstos la enfermedad se manifiesta en la niñez, y progresa mucho más rápidamente (Zoghbi, et al., 1988).

Neuro-patológicamente, la SCA1 se caracteriza por una fuerte atrofia cerebelar y pérdida de células de Purkinje, neuronas del núcleo dentado, núcleos olivares y los núcleos de los pares de nervios craneales III, IV, IX, X and XII. Se da desmielinización de los tractos espinocerebelosos así como gliosis en las capas molecular y en la capa granulosa del cerebelo. En el caso de SCA1 además también se observa una fuerte degeneración en las neuronas del puente troncoencefálico o protuberancia (también conocido como *basis pontis* o *pons*), lo cual comparte con SCA2 y SCA7 otras dos SCAs causadas por expansión de poliglutaminas (Koeppen, 2005, Robitaille, et al., 1995, Zoghbi and Orr, 2000).

### **1.1.2 Origen genético**

La mutación desencadenante de SCA1 es la elongación de una secuencia de trinucleótidos (CAG) repetidos en el gen *SCA1* (también conocido como *ATXN1*) que da lugar a un fragmento anormalmente largo de glutaminas repetidas en la porción N-terminal de la proteína Ataxina-1 (Orr, et al., 1993).

La secuencia de (CAG) cuya expansión causa SCA1, es altamente polimórfica. En individuos sanos, esta secuencia presenta variaciones que van desde 6 a 39 (CAG), si las repeticiones son puras, pudiendo llegar hasta los 44 (CAG) si las repeticiones presentan interrupciones en la secuencia con tripletes (CAT) que codifican para el aminoácido Histidina. Por encima del umbral de toxicidad (39 en repeticiones puras y 44



en interrumpidas) se desencadena SCA1. Los casos más severos en SCA1 se dan por encima de 80 (CAG)/Gluaminas, en los cuales la enfermedad se manifiesta en niños, es mucho más severa y presenta una progresión muy rápida (Zoghbi and Orr, 2000, Zoghbi, et al., 1988).

Se desconocen los mecanismos responsables de la expansión de (CAG) por encima del umbral de toxicidad. Es decir lo que lleva a que un individuo sano de lugar en su progeñie a un individuo con SCA1. Una vez que la persona desarrolla SCA1, ésta se transfiere a su descendencia con un patrón de herencia autosómica dominante. Además en cada generación la expansión de (CAG) tiende a ser mayor, lo cual causa que la enfermedad se presente antes y los síntomas sean más severos. Este fenómeno se conoce con el nombre de “anticipación”. Se sabe que las repeticiones (CAG) en general son inestables en la línea germinal, y que la anticipación tiende a ser mayor cuando el portador de la enfermedad es el padre (bias paterno).

Otra característica genética de SCA1 y otras enfermedades causadas por expansión de nucleótidos repetidos, es la inestabilidad somática. Esto es, el número de (CAG) presente en el gen *SCA1* varía entre distintos tejidos o incluso diferentes áreas cerebrales en un mismo paciente. Se desconocen los mecanismos que subyacen tanto a la anticipación como a la inestabilidad somática, aunque parece que tanto problemas en la replicación del DNA así como la maquinaria de reparación genómica podrían jugar un papel clave (Hashida, et al., 2001, Pearson, et al., 2005).

### **1.1.3 Modelo de ganancia de función tóxica**

La patología en SCA1 se observa en forma de atrofia o degeneración severa de las regiones del núcleo olivar, puente troncoencefálico y cerebelo. Además como se mencionó arriba se observan agregados (más conocidos como “inclusiones”) nucleares, formados por la proteína Ataxina-1 expandida, en neuronas del puente troncoencefálico, *medula oblongata* (bulbo raquídeo) y mesencéfalo. Estas inclusiones nucleares (INs) nunca se observan en individuos sanos. La presencia de una sola copia expandida del gen *SCA1* en heterocigosis causa la enfermedad. Este efecto dominante, junto con el hecho de que varias delecciones que cubren el locus de *SCA1* no causan ataxia (Davies, et al., 1999), son indicativos de que la haploinsuficiencia de Ataxina-1 no es la causante de SCA1.

Las secuencias de la Ataxina-1 humana y su homólogo en ratón son idénticas en un 89%, lo cual indica un nivel de conservación muy alto. Para analizar los factores implicados en la etiología de SCA1, se generaron ratones mutantes (*knockout* o *KO*) para el gen *SCA1*. Los ratones deficientes para Ataxina-1, no presentan ni ataxia ni atrofia cerebelar y su media de vida es comparable a la de controles, confirmando que la falta de función de Ataxina-1 no es causante de SCA1. Estos ratones si presentan algunas anomalías de comportamiento, como dificultades en el aprendizaje motriz (relacionado con el cerebelo) y cierta disfunción del hipocampo (a nivel electrofisiológico). Aunque estas observaciones indican que la falta de función de Ataxina-1 no es la desencadenante principal de SCA1, no descartan que la función de la Ataxina-1 normal esté afectada en la enfermedad (Matilla, et al., 1998).

Para explicar la toxicidad observada en SCA1 y otras PQDs se propuso el modelo de ganancia de función proteica tóxica. Este modelo postula que la expansión de poliglutamina causa una ganancia de función aberrante en la proteína mutante, lo cual desencadena la enfermedad. El apoyo más robusto a la teoría de que la ganancia de función de Ataxina-1 subyace a la patogénesis en SCA1 viene de modelos de ratón tanto transgénicos (donde Ataxina-1 [82Q] humana se expresa usando el promotor de células de Purkinje *Pcp2*), como *knock-in* (donde el la Ataxina-1 [154Q] humana se expresa desde el *locus* del gen *SCA1* de ratón). Los ratones transgénicos, desarrollan una fuerte ataxia, y otros síntomas puramente derivados de atrofia cerebelar, aunque su expectativa de vida no disminuye respecto a controles (Burright, et al., 1995). En el caso de los ratones *knock-in*, se detecta una vulnerabilidad neuronal selectiva similar a la observada en pacientes. Además de los síntomas asociados a disfunción de las células de Purkinje, los ratones *knock-in* presentan otros que también ocurren en pacientes, como son pérdida de masa muscular y peso, deficiencia cognitiva y muerte prematura (Watase, et al., 2002). Ambos modelos de ratón presentan las características INs formadas por Ataxina-1 expandida, si bien en el caso del ratón *knock-in* su patrón de distribución neuronal se asemeja más al de pacientes de SCA1.

Otro apoyo a la teoría de ganancia de función toxica de la Ataxina-1 expandida vino del análisis de moscas transgénicas que expresan Ataxina-1 [82Q]. Estas moscas desarrollan fenotipos degenerativos cuando la proteína es expresada en el ojo o en

neuronas. Además la Ataxina-1 [82Q] acumula en INs similares a las observadas en neuronas de pacientes con SCA1 (Fernandez-Funez, et al., 2000).

Los estudios llevados a cabo en modelos de ratón disponibles para diferentes PQDs arrojan conclusiones similares a las obtenidas para SCA1. En general la haploinsuficiencia de la proteína en cuestión es asintomática (en algunos casos ni siquiera la completa falta de función causa síntomas relevantes), o presentan síntomas no relacionados directamente con los observados en pacientes, mientras que la expresión de la proteína expandida (bien en transgénicos o bien en *knock-in*) reproduce las observaciones en pacientes (Gatchel and Zoghbi, 2005, Taroni and DiDonato, 2004). El modelo de ganancia de función tóxico es el aceptado hoy en día para explicar la patogénesis en las PQDs.

#### **1.1.4 Ataxina-1, el contexto proteico en SCA1**

La Ataxina-1 es una proteína de función desconocida, con una masa molecular de 87kDa. y una cadena polipeptídica de entre 792-868 aminoácidos, dependiendo del número de Glutaminas. Su distribución es ubicuita, aunque sus niveles en el sistema nervioso central son entre dos y cuatro veces mayores que en el resto de tejidos (Koshy, et al., 1996, Servadio, et al., 1995). La Ataxina-1 presenta una distribución citoplásmica en tejidos no neuronales, mientras que es nuclear en las neuronas de las regiones cerebrales del puente troncoencefálico, córtex y ganglios basales y tanto nuclear como citoplásmica en las células de Purkinje y mesencéfalo y medula oblongata. (Koshy, et al., 1996, Servadio, et al., 1995, Skinner, et al., 1997).

En la estructura de Ataxina-1 existen varios dominios y motivos relevantes:

Región C-terminal:

- Secuencia de importe nuclear (Klement, et al., 1998).
- Motivo de unión a proteínas 14-3-3 (Chen, et al., 2003).
- Dominio de autoasociación (SAD, self-association domain) (Burright, et al., 1997).
- Dominio AXH (domain in Ataxin-1 and HMG-box protein 1) (Chen, et al., 2004, Yee, et al., 2004).

En su región N-terminal además de la secuencia de poliglutaminas, se encuentra un dominio NBA (N-terminal region of Boat and Ataxin-1) (Mizutani, et al., 2005).

Basándose en las propiedades de fragmentos de poliglutamina expandida en un principio se postuló que la ganancia de función tóxica observada en proteínas con glutaminas expandidas se debía exclusivamente a interacciones aberrantes mediadas por la secuencia de poliglutaminas (Kaytor and Warren, 1999, Luthi-Carter, et al., 2002). Esta teoría se basó en que: 1) Fragmentos de poliglutaminas expandidas con capaces de formar estructuras  $\beta$ -lámina estabilizadas por puentes de hidrógeno, formando agregados insolubles resistentes a proteinasa, visibles tanto en el soma como en el axón de neuronas (Perutz, 1996). 2) La severidad de los síntomas de las PQDs aumenta en relación directa al número de poliglutaminas expandidas (Zoghbi and Orr, 2000). 3) La expresión de poliglutamina expandida sola, o su introducción en proteínas normalmente inocuas (como GFP o la enzima hipoxantina-fosforibosiltransferasa) les confiere capacidad de agregación y neurotoxicidad (Kazemi-Esfarjani and Benzer, 2000, Ordway, et al., 1997).

En el caso de SCA1, se ha llevado a cabo una investigación profunda del papel que juegan los distintos dominios de Ataxina-1 (fuera de la región de poliglutaminas) en la toxicidad inducida por la Ataxina-1 expandida.

Ratones transgénicos que sobreexpresan en las células de Purkinje Ataxina-1 expandida, con una mutación puntual en la secuencia de importe nuclear (Ataxina-1 [82Q]<sup>K772T</sup>), no muestran ningún síntoma neurodegenerativo ni agregación a pesar de la presencia de poliglutamina expandida (Klement, et al., 1998). Estas observaciones además de mostrar que secuencias diferentes a la poliglutamina expandida son importantes para la toxicidad, indican que el importe nuclear de Ataxina-1 es imprescindible para la patogénesis de SCA1.

También se han generado ratones transgénicos que expresan en las células de Purkinje una forma de Ataxina-1 expandida en la cual se ha delecionado el dominio SAD (Ataxina-1 [77Q]<sup>ASAD</sup>). Los efectos tóxicos de la Ataxina-1 [77Q]<sup>ASAD</sup> son muy similares a los causados por la Ataxina-1 [82Q] en ratones transgénicos. Sin embargo, las neuronas que expresan Ataxina-1<sup>ASAD</sup> no presentan agregados (Burrigh, et al., 1997), por lo tanto en el contexto de Ataxina-1 la poliglutamina expandida por si misma tampoco es suficiente para causar agregación.

El dominio AXH es el único dominio globular de Ataxina-1 y el más conservado de *Drosophila* a humano (Tsuda, et al., 2005). El dominio media la interacción de

Ataxina-1 con varios factores de transcripción entre los que destacan SMRT (silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors) y Gfi-1 (growth factor independent-1) (Tsai, et al., 2004, Tsuda, et al., 2005). En el primer caso, se observa que la Ataxina-1 expandida causa una falta de función en SMRT. Usando un modelo de SCA1 en *Drosophila*, los autores muestran que la reducción de los niveles de SMRTER (homólogo de SMRT en *Drosophila*) potencia la degeneración inducida por Ataxina-1 [82Q], mientras que un incremento en los niveles de SMRTER la suprime (Tsai, et al., 2004). Ataxina-1 [82Q] también induce falta de función del factor Gfi-1. En este caso se ve que la interacción Ataxina-1 [82Q]/Gfi-1 es mediada por el dominio AXH de Ataxina-1. Además se observa que la expresión del dominio AXH Por si mismo es suficiente para causar depleción de Senseless/Gfi-1 en *Drosophila* si bien esta depleción es mucho más severa en presencia de las poliglutaminas expandidas. Por último se ve que la sobreexpresión de Ataxina-1 [82Q] en la cual se ha delecionado el dominio AXH (Ataxina-1<sup>ΔAXH</sup>) no causa depleción de Senseless/Gfi-1 (Tsuda, et al., 2005).

Además del papel que juegan los distintos dominios en la toxicidad inducida por la Ataxina-1 expandida, se ha observado que modificaciones como la fosforilación también alteran la toxicidad de la proteína. En este sentido se ha visto que la fosforilación de la Serina 776 de Ataxina-1 [82Q] modula su toxicidad. En ratones transgénicos se vio que la sustitución de la S776 por A, en Ataxina-1 [82Q] suprime completamente la neurodegeneración (Emamian, et al., 2003). Posteriormente se identificó a Akt-1 como la kinasa responsable de la fosforilación, y se vio que la S776 cae en el motivo de unión a proteínas 14-3-3. Usando un modelo de SCA1 en *Drosophila* generado en nuestro laboratorio, se vio que un incremento en los niveles de Akt-1 potencia la degeneración inducida por Ataxina-1 [82Q], y que la sobreexpresión de 14-3-3 induce una gran estabilización de la Ataxina-1 [82Q] e incrementa de forma severa su toxicidad (Chen, et al., 2003).

A estas observaciones hay que añadir la diferente vulnerabilidad neuronal existente entre las distintas PQDs; el diferente umbral de toxicidad en distintas proteínas causantes de PQDs - mientras que 20 Glutaminas son suficientes para causar SCA7, un número mayor a 60 es necesario para desencadenar SCA3- y el hecho de que tanto en ratones transgénicos como en *Drosophila* la expresión de Ataxina-1 no expandida

(Ataxina-1 [30Q]), a niveles muy altos, causa fenotipos neurodegenerativos similares a los causados por la Ataxina-1 expandida (Ataxina-1[82Q]) a niveles de expresión relativamente más bajos (Fernandez-Funez, et al., 2000). Teniendo todo lo anterior en cuenta, resulta claro que las interacciones mediadas por la poliglutamina expandida por si mismas no explican la patogénesis de SCA1, y que el papel de las partes de la proteína que no son poliglutamina también es crucial para entender la etiología de esta enfermedad.

Observaciones similares a las que acabamos de discutir para Ataxina-1 se han hecho también en otras PQDs (Duenas, et al., 2006, Gatchel and Zoghbi, 2005, Riley and Orr, 2006). En el caso de la Huntingtina (causante del mal de Huntington), se sabe que existe una secuencia diana para la caspasa-6 -fuera del fragmento de poliglutaminas- la cual debe ser procesada para que se den la toxicidad y agregación nuclear características de esta enfermedad (Graham, et al., 2006). Además la Huntingtina también se fosforila y sumoila, y ambas modificaciones alteran su toxicidad (Humbert, et al., 2002, Luo, et al., 2005, Pardo, et al., 2006, Schilling, et al., 2006, Steffan, et al., 2004). En SBMA, causada por expansión de poliglutaminas en el Receptor de Andrógeno (RA), experimentos llevados a cabo en modelos de ratón y de *Drosophila* demostraron que la unión del RA con su ligando, y su entrada al núcleo son imprescindibles para la producción de neurodegeneración e INs (Katsuno, et al., 2002, Takeyama, et al., 2002).

Resumiendo, la hipótesis más aceptada hoy en día para explicar como se desencadena la toxicidad en SCA1 (y en las PQDs en general) es que la expansión del fragmento de poliglutaminas induce conformaciones aberrantes que afectan tanto a la estructura terciaria de la Ataxina-1 (u otra proteína causante de PQD) como a las interacciones que la Ataxina-1 normalmente mantiene con otras proteínas. Por lo tanto el contexto proteico en el que se produzca la expansión de poliglutaminas, así como la función que desempeña la proteína en cuestión son cruciales en el desarrollo de la enfermedad. Esta hipótesis no excluye interacciones que puedan estar mediadas solamente por la poliglutamina expandida.

### **1.1.5 Inclusiones Nucleares**

Como ya hemos mencionado, una de las características comunes más llamativas de las PQDs es la presencia de agregados o inclusiones neuronales formados por la proteína

responsable de la enfermedad, y que pueden ser nucleares, citoplásmicos, o ambos dependiendo del mal que se analice. Esta presencia de agregados neuronales no es exclusiva de las PQDs y se da también en otras enfermedades neurodegenerativas como el mal de Alzheimer (donde existen agregados de la proteína de asociación a microtúbulos Tau, y del péptido A $\beta$ -42), el mal de Parkinson (Synucleína y Synfilina) o la esclerosis amiotrófica lateral (Superóxido dismutasa).

En el caso particular de los agregados que se observan en las PQDs existe un gran debate sobre el papel que éstos juegan en el desarrollo de la enfermedad. Basándose en la observación de que varios factores de transcripción y elementos de la maquinaria de control de calidad proteica (como chaperonas y subunidades del proteosoma) se encuentran con frecuencia en los agregados neuronales de las distintas PQDs, en un principio se pensó que los agregados eran el detonante de la toxicidad. Según esta teoría los agregados formados por la proteína expandida atrapan a factores necesarios para el correcto funcionamiento neuronal, estos factores no estarían disponibles para llevar a cabo su función y esto causaría la eventual degeneración neuronal (Michalik and Van Broeckhoven, 2003, Ross and Poirier, 2004).

El análisis de tejidos neuronales *postmortem*, obtenidos de pacientes con SCA1, indica que las áreas más severamente afectadas por la enfermedad (células de Purkinje y de la médula espinal) rara vez presentan INs de Ataxina-1, que si son características de otras regiones donde la degeneración es menor o no degeneran (Duenas, et al., 2006, Koeppen, 2005, Taroni and DiDonato, 2004, Zoghbi and Orr, 2000). Algo similar se observa en el modelo *knock-in* de SCA1 en ratón, donde se ve que un porcentaje muy bajo de células de Purkinje (0.5%) presenta INs, mientras que en otras áreas del cerebro menos afectadas, como la corteza, el número de neuronas con INs es significativamente mayor (80%) (Watase, et al., 2002). La expresión en ratones transgénicos de la Ataxina-1[77Q]<sup>ASAD</sup> expandida (ver arriba) causa degeneración muy similar a la de Ataxina-1 “normal” expandida pero sin embargo la Ataxina-1[77Q]<sup>ASAD</sup> expandida no forma INs (Burrigh, et al., 1997). En ratones transgénicos que expresan Ataxina-1 expandida, si se bajan los niveles de la E3 ubiquitina-ligasa Ube-3a, se observa una exacerbación de la degeneración que sin embargo va acompañada de una disminución en el número de agregados nucleares (Cummings, et al., 1999).

A estas observaciones con SCA1 se unen otras echas en diferentes modelos de PQDs. Es una característica común de las SCAs causadas por expansión de poliglutaminas<sup>1</sup> la práctica ausencia de INs en las células de Purkinje (las más afectadas en estas enfermedades) y su presencia en neuronas de regiones cerebrales que no degeneran o degeneran más tarde (Holmberg, et al., 1998, Huynh, et al., 2000, Koeppe, 2005, Taroni and DiDonato, 2004). En un modelo de ratón de SCA7 se ha observado que las neuronas con más susceptibilidad a degenerar son aquellas en las que no hay agregados, mientras que las que presentan agregados no degeneran (Bowman, et al., 2005). Algo similar se ha observado en cultivos primarios de neuronas de ratón transfectadas con Huntingtina expandida. En estos cultivos se observó que las neuronas que desarrollan INs sobreviven más tiempo que neuronas vecinas que no las desarrollan (Arrasate and Finkbeiner, 2005). En otro modelo de Huntington en ratón, que expresa la porción N-terminal de la Huntingtina con 120 Glutaminas, se observó que aunque las neuronas presentan INs, estos ratones no muestran síntomas neuropatológicos (Slow, et al., 2005).

Todas las observaciones anteriores indican que las neuronas con INs tienden a degenerar menos que aquellas en las que la proteína es soluble o microagregada. Esto ha generado la hipótesis de que realmente es bien la fracción soluble de Ataxina-1 expandida (y otras proteínas causantes de PQDs dependiendo de la enfermedad) o bien microagregados no detectables con microscopía convencional, los desencadenantes de toxicidad en SCA1 y otras PQDs.

A pesar de esto, no se debe abandonar o infravalorar la información que las INs proporcionan. En la SCA1 sabemos que varias de las proteínas que se encuentran en las INs coagregando con Ataxina-1 expandida, resultan ser moduladores de la toxicidad de la misma. En algunos casos como el del factor de transcripción SMRT, parece que la interacción con Ataxina-1 disminuye su función (de SMRT)(Tsai, et al., 2004). En otros casos como el de las proteínas 14-3-3 parece que la interacción con Ataxina-1 incrementa la toxicidad de ésta (Chen, et al., 2003). Por lo tanto las INs parecen ser un mecanismo de

---

<sup>1</sup> Las SCAs son un grupo de al menos 25 ataxias de herencia dominante, de las que 6 son PQDs y las demás están causadas por diferentes mecanismos, pero en todas las SCAs se produce atrofia cerebelar.



protección de las neuronas, cuyo análisis nos revela interacciones que la fracción soluble (o microagregada) de la proteína expandida pueda tener.

## **1.2 Mecanismos celulares implicados en la patogénesis de SCA1.**

### **1.2.1 Maquinaria de control de calidad Proteica**

#### **1.2.1.1 Las Chaperonas**

La mayoría de proteínas sintetizadas por la célula no adoptan su conformación terciaria funcional o “nativa” espontáneamente, sino que esto se consigue gracias a la cooperación de varios factores entre los cuales se encuentran las proteínas chaperonas. Entre las chaperonas mejor caracterizadas se encuentran las familias Hsp70 (heat-shock protein 70kD) y Hsp40. Estas dos Hsps cooperan para ayudar a las proteínas recién sintetizadas a adoptar su estructura nativa y llevar a cabo su función. Las proteínas en solución pueden perder de forma espontánea su estructura nativa con el tiempo, cuando esto ocurre su función se ve afectada, lo cual es deletéreo para la célula. Además debido a la exposición de dominios hidrofóbicos (que normalmente estarían en la parte interna), las proteínas mal plegadas tienen tendencia a agregarse y a atrapar a otras proteínas con las que puedan interactuar, esto debe ser evitado para que la fisiología celular no sea dañada. Las chaperonas son capaces de detectar los dominios hidrofóbicos de las proteínas mal plegadas y “patrullan” el ambiente celular detectando proteínas con conformaciones aberrantes. Cuando las detectan, se unen a ellas y las devuelven a sus conformaciones nativas, mediante cambios conformacionales que requieren el consumo de ATP. De esta manera las chaperonas protegen la célula. Si las chaperonas no consiguen devolver a una proteína su conformación nativa, esta debe ser enviada a la maquinaria de degradación proteica para su eliminación. Los mecanismos que median esta comunicación entre chaperonas y rutas de degradación no son del todo conocidos.

Además de las funciones de mantenimiento desempeñadas por las chaperonas en condiciones celulares normales, las chaperonas actúan como mecanismo de defensa celular en situaciones de estrés. A medida que aumenta la temperatura celular, las proteínas normales presentan una tendencia mayor a adoptar conformaciones aberrantes,

por encima de temperaturas críticas, la producción de chaperonas como Hsp70 y Hsp40 se dispara, estas chaperonas se unen a las proteínas aberrantes, impidiendo interacciones deletéreas y protegiendo a la célula de daños. Las chaperonas también protegen a la célula en otros casos de estrés. El incremento exponencial en la producción de chaperonas como respuesta al estrés calórico se consigue gracias a la producción del factor de transcripción HSF-1 (heat-shock factor-1). HSF-1 se une a secuencias específicas presentes en los promotores de las chaperonas (y otros factores relacionados con estrés calórico) e induce su producción masiva.

### **1.2.1.2 Ubiquitinación y degradación: el sistema Ubiquitina/Proteasoma**

La ruta de degradación de proteínas mediante el sistema Ubiquitina/Proteasoma (U/P) está implicada en la regulación de prácticamente todos los procesos celulares desde el ciclo celular, pasando por regulación de transcripción a funciones de reciclaje de componentes celulares y mantenimiento básicas. Para que las proteínas se Ubiquitinen, es necesaria la acción de un complejo formado por varios componentes:

- E1: enzima activadora de Ubiquitina.
- E2: enzima conjugador de Ubiquitina.
- E3: enzima proteína-Ubiquitina ligasa.
- E4: enzima Ubiquitina elongasa.

La Ubiquitina primero debe ser activada. Mediante una reacción que requiere el consumo de ATP, el enzima activador de Ubiquitina (E1) se une a la Ubiquitina a través de un residuo Cisteína presente en el enzima, esta unión se hace a través de un enlace tiol-éster rico en energía. La Ubiquitina es luego transferida al enzima conjugador de Ubiquitina (E2) también mediante un enlace tiol-éster. El enzima proteína-Ubiquitina ligasa E3 presenta al sustrato a la E2~Ub y cataliza la ubiquitinación de un residuo Lisina en el sustrato diana (en ocasiones la ubiquitinación se lleva a cabo en el extremo N-terminal del sustrato diana). Finalmente la cadena de Ubiquitina es extendida mediante la repetición de este ciclo, aunque en ocasiones esto también puede ser llevado a cabo por un enzima Ubiquitina elongasa (E4).

El componente que confiere la especificidad de sustrato es la E3 proteína-Ubiquitina ligasa, el análisis del genoma humano ha identificado más de mil E3 ligasas.

Dentro de este grupo existen varias familias: ligasas con dominio HECT (homologous to the E6-AP C-terminus), ligasas con RING (really important new gene) *finger*, ligasas con dominio U-box (una modificación del dominio RING), ligasas con dominio PHD. Para llevar a cabo su función, las ligasas de dominio HECT se unen covalentemente a la Ubiquitina mediante un enlace tiol-éster, y luego la transfieren al sustrato diana. Las ligasas de dominios RING *finger*, U-box y PHD actúan facilitando la reacción de transeferencia de Ubiquitina del complejo E2~Ub al sustrato diana, sin necesidad de unirse (las ligasas) covalentemente a la Ubiquitina.

Una vez marcado con Ubiquitina, el sustrato diana es degradado por el complejo proteico del proteasoma 26s. Este complejo consta de varios subcomplejos, el subcomplejo catalítico CP (core particle) de 20s, encargado de la degradación del sustrato y el subcomplejo regulador RP (regulatory particle) de 19s. Cada uno de estos subcomplejos a su vez consta de varias subunidades proteicas. El subcomplejo RP controla la entrada de sustratos en el subcomplejo CP. RP identifica las cadenas de poli-Ubiquitina, despliega la proteína que va a ser degradada para su entrada por el orificio del subcomplejo (cilíndrico) CP, esto se lleva a cabo mediante el consumo de ATP, por lo que el complejo RP consta de varios dominios ATPasa. El subcomplejo CP degrada el sustrato diana lo cual resulta en la producción de pequeños fragmentos peptídicos que serán procesados por otras proteasas de la célula. Existen otras enzimas denominadas Ubiquitina hidrolasas encargadas de recuperar la Ubiquitina unida a los fragmentos peptídico generados por el proteasoma, y hacerla disponible para futuras ubiquitinaciones.

### **1.2.1.3 Implicación de la maquinaria de control de calidad proteica en**

#### **SCA1.**

Las INs de Ataxina-1 que se observan en neuronas de pacientes y en modelos de ratón y *Drosophila* de SCA1, son positivas para Ubiquitina, chaperonas y subcomplejos del proteasoma (Cummings, et al., 1998, Fernandez-Funez, et al., 2000, Zoghbi and Orr, 2000). Observaciones similares se han hecho en INs de otras PQDs. Además las poliglutaminas tiene tendencia a formar estructuras  $\beta$ -lámina estables resistentes a

proteasas (Perutz, 1996). Esto ha llevado a la hipótesis de que la poliglutamina expandida induce cambios conformacionales aberrantes en la estructura de la proteína mutante, aumentando su tendencia a agregar y haciéndola resistente a los mecanismos empleados por la maquinaria de degradación proteica.

En el caso de SCA1 hay varias observaciones que apoyan esta hipótesis. La Ataxina-1 expandida (Ataxina-1 [92Q]) es más difícil de procesar por el sistema U/P *in vitro* que la no expandida (Cummings, et al., 1999). La inhibición de la actividad del proteasoma en células que expresan Ataxina-1 expandida, induce la aparición de INs con más frecuencia (Cummings, et al., 1999). La Ataxina-1 expandida co-precipita con la chaperona Hsp70 (Chen, et al., 2003), y se ha visto que incrementar los niveles de Hsp70 causa una disminución en la cantidad y el tamaño de los agregados de Ataxina-1 expandida en cultivo celular (Cummings, et al., 1998). Además en ratones transgénicos de SCA1, un aumento en los niveles de Hsp70 suprime mientras que una disminución en los niveles de la E3 ligasa Ubi3a potencia la neurodegeneración inducida por Ataxina-1 expandida (Cummings, et al., 1999, Cummings, et al., 2001). Un *screen* genético llevado a cabo en nuestro laboratorio con un modelo de SCA1 en *Drosophila*, identificó a las chaperonas y varios componentes del sistema U/P como moduladores de la toxicidad de la Ataxina-1 [82Q]. En este modelo, aumentar los niveles de las chaperonas Hsp70 y Hsp40 suprime la degeneración causada por Ataxina-1 [82Q], y su disminución (bien por la expresión del dominante negativo para Hsp70 *hsc-70<sup>d</sup>*, o bien mediante una pequeña delección que elimina los *loci* de *hsp70Ab*, *hsp70Ba*, *hsp70Bb* y *hsp70Bc*) potencia la toxicidad de Ataxina-1 [82Q]. Además la disminución en los niveles de Ubiquitina (*Ubi63E*), las E2-Ubiquitina conjugasas (*UbcD1* y *dUbc-E2H*) o el proteasoma, también resulta deletérea en presencia de Ataxina-1 [82Q] (Fernandez-Funez, et al., 2000).

En el caso de la SCA1 además, parece que la expansión de poliglutamina estabiliza una conformación aberrante, tóxica, que la Ataxina-1 no expandida tiene tendencia a adoptar de forma espontánea. Esto está apoyado por experimentos llevados a cabo en *Drosophila* donde, en condiciones de expresión excesiva de Ataxina-1 [30Q] (forma no expandida), se producen agregados similares a los observados con la Ataxina-1 [82Q] (a niveles tres veces menores) aunque en menor cantidad (Fernandez-Funez, et al., 2000). Además tanto la Ataxina-1 [30Q] como una forma carente de poliglutaminas

(Ataxina-1 [2Q]) forman agregados en cultivo celular (comunicación personal de Chris Cummings y Huda Zoghbi, y **Figura 1** en este trabajo). Esta interacción entre la maquinaria de control de calidad proteica y la Ataxina-1 expandida se extiende a otras PQDs, ya que en general, el incremento de la actividad tanto de las chaperonas como del sistema U/P conlleva una mejoría de los fenotipos neurodegenerativos observados en modelos animales de PQDs (revisado en (Ciechanover and Brundin, 2003)).

Además de investigar el efecto de la maquinaria de control de calidad proteica sobre las PQDs, también se ha investigado el efecto que las proteínas expandidas tienen sobre esta maquinaria. Se ha visto que tanto la expresión de un fragmento de Huntingtina expandida como la expresión de Ataxina-1 [82Q], inhiben la actividad del proteasoma (Bence, et al., 2001, Park, et al., 2005b). En un estudio reciente llevado a cabo en *C. elegans*, se observó que las poliglutaminas expandidas inducen el plegamiento aberrante de proteínas con mutaciones sensibles a temperatura (st), pero a temperaturas en las que esto no debería ocurrir. La presencia de estas proteínas st a su vez, incrementan la agregación de las poliglutaminas (Gidalevitz, et al., 2006).

Por lo tanto parece que la interacción de la maquinaria de control de calidad proteica con la Ataxina-1 expandida (y otras proteínas causantes de PQDs) tiene dos consecuencias: por un lado la Ataxina-1 expandida es difícil de plegar por las chaperonas y degradar por el sistema U/P, teniendo en cuenta que las neuronas son células postmitóticas, esto lleva a una acumulación progresiva de Ataxina-1 a lo largo del tiempo y la consiguiente intoxicación celular. Por otro lado, las proteínas expandidas saturan la capacidad de la maquinaria de control de calidad proteica, causando la acumulación de otras proteínas que puedan tener efectos tóxicos para la neurona. Encontrar E3 ligasas específicas para Ataxina-1 y otros componentes o compuestos químicos que faciliten la degradación de Ataxina-1 por el sistema U/P podría ayudar a paliar la patología de SCA1 y las demás PQDs.

### **1.2.2 Alteración de la expresión génica**

La especificidad de expresión génica a nivel local y temporal, así como su modulación como respuesta a cambios en el ambiente extra e intracelular son cruciales para el correcto funcionamiento del sistema nervioso. Esto se consigue gracias a la coordinación de las interacciones entre varios componentes entre los que se encuentran: factores de

transcripción (FT) que se unen a ADN, cofactores reguladores de estos FT, y componentes del complejo de la ARN-polimerasa. Muchos factores de transcripción y cofactores, poseen dominios activadores ricos en poliglutaminas, encargados de mediar interacciones proteína-proteína (Tanese and Tjian, 1993), lo cual los convierte en candidatos a interactuar con los dominios de poliglutamina expandida de las proteínas causantes de PQDs. La regulación de expresión génica es el otro sistema que parece estar afectado en la mayoría de PQDs incluyendo SCA1.

Los indicios de que alteraciones en la expresión génica contribuyen a la patogénesis en las PQDs son varios. Dos de las proteínas causantes de PQDs, el Receptor de Andrógeno (SBMA) y TBP (SCA17) son de hecho proteínas cuya función normal es la regulación de expresión génica, la primera es un receptor nuclear que se une a DNA y la segunda un componente de la maquinaria de transcripción (Riley and Orr, 2006). La mayoría de proteínas causantes de PQDs acumulan en el núcleo celular. Además, en el caso de SCA1 y SBMA, su importe nuclear es un requisito para que se produzca degeneración (Katsuno, et al., 2002, Klement, et al., 1998, Takeyama, et al., 2002). Lo cual indica que el núcleo es el sitio donde con mayor probabilidad estas proteínas ejercen su toxicidad. En modelos de ratón del mal de Huntington, SBMA DRPLA y SCA-7 se han observado cambios en los niveles de expresión de varios genes, analizados con “microarrays”. Algunos genes solapan entre los distintos modelos, mientras que otros son específicos (Luthi-Carter, et al., 2002). La presencia de factores de transcripción como CBP (CREB (c-amp regulatory element binding) binding protein)- un componente del complejo histona acetiltransferasa que activa la transcripción- en inclusiones nucleares de varias PQDs, sugiere que las proteínas expandidas interfieren con la función normal de estos factores. En el caso de CBP además se ha comprobado que algunas rutas activadas por este factor están alteradas tanto en modelos de ratón como en células (Sugars, et al., 2004, Sugars and Rubinsztein, 2003), y que su interacción con Huntingtina expandida o Atrofia (DRPLA) inhibe su función en el complejo acetiltransferasa (Steffan, et al., 2001, Sugars and Rubinsztein, 2003).

Aunque la función de la Ataxina-1 es de momento desconocida, varias observaciones indican que podría tener que ver con regulación de expresión génica, como son su capacidad para moverse entre los compartimentos nuclear y citoplásmico, y para

unirse a ARN (Irwin, et al., 2005, Yue, et al., 2001). Además varios interactores de la Ataxina-1 salvaje, son factores de transcripción (Okazawa, et al., 2002, Tsai, et al., 2004, Tsuda, et al., 2005).

El primer indicio de que la toxicidad de la Ataxina-1 expandida puede estar relacionada con fallos en la regulación de expresión génica se deriva del hecho de que la proteína expandida es inocua en ausencia de la señal de importe nuclear. Lo cual apunta a que el lugar donde la Ataxina-1 expandida ejerce su toxicidad es el núcleo (Klement, et al., 1998). En modelos transgénicos de SCA1 en ratón, se ha visto que existe una disminución en los niveles de expresión de genes relacionados con cascadas de señales activadas por Glutamato, y genes relacionados con la homeostasis del calcio, en células de Purkinje (previamente a su degeneración). La disminución en el segundo grupo de genes también se observó en tejidos de pacientes de SCA1 (Lin, et al., 2000, Serra, et al., 2004). Además en nuestro modelo de SCA1 en *Drosophila*, un gran número de modificadores obtenidos al azar, está formado por falta de función en genes implicados en represión de transcripción (*Sin3a*, *Rpd3*, *dCtBP*, *dSir2*, *Trap* y *TARA*) (Fernandez-Funez, et al., 2000). A todo esto se une que varias de las proteínas atrapadas en las INs de Ataxina-1 son factores de transcripción (Okazawa, et al., 2002, Tsai, et al., 2004, Uchihara, et al., 2001).

La Ataxina-1 expandida presenta interacciones moleculares con varios factores reguladores de expresión génica y algunas de estas interacciones han sido estudiadas en detalle. PQBP1 (Poly-Q tract binding-protein 1) interacciona con la ARN Polimerasa II, y es una de las proteínas presentes en INs de Ataxina-1. PQBP1 además interacciona específicamente con la forma expandida de Ataxina-1 pero no con la Ataxina-1 salvaje. Basado en experimentos de cultivo celular, se vio que esta interacción hace que se forme un complejo ARN Pol II/PQBP1/Ataxina-1-expandida que inhibe la función de la ARN Pol II y causa una disminución en los niveles basales de transcripción (Okazawa, et al., 2002).

Otra proteína que interacciona con Ataxina-1 es SMRT (Silencing mediator for retinoid and thyroid hormona receptors). SMRT es un cofactor implicado en la represión de transcripción. SMRT interacciona tanto con la Ataxina-1 normal como con la expandida, a través de la porción C-terminal de estas. Esta interacción no es dependiente

de la longitud de la secuencia de poliglutaminas. En experimentos llevados a cabo en *Drosophila*, se vio que una disminución en los niveles de SMRTER (homólogo de SMRT) causa un potenciamiento de la degeneración inducida por Ataxina-1 [82Q], y que un aumento en los niveles de SMRTER la suprime. Además ambas proteínas colocalizan en cromosomas politénicos de glándulas salivales. De esto se infiere que su interacción con Ataxina-1 [82Q] provoca la falta de función de SMRT y esto contribuye a la patogénesis en SCA1 (Tsai, et al., 2004).

### ***1.2.2.1 Gfi1/senseless***

Gfi1 (Growth factor independent 1) y sus homólogos son factores de transcripción con dominios Zinc finger. En mamíferos estos factores actúan como represores de transcripción, bien mediante su unión directa a ADN, o reclutando a correpresores como Histona-deacetilasas (HDACs). Sin embargo en ciertos contextos los genes Gfi de mamíferos pueden actuar como activadores de transcripción (Jafar-Nejad and Bellen, 2004). Un homólogo de *Gfi1* en *Drosophila* es *senseless*. La falta de función de *senseless* provoca la ausencia de órganos mecanosensores (quetas) debido a un fallo en la diferenciación de las células precursoras de órganos sensoriales (POS). Por otro lado su expresión ectópica induce la formación de órganos mecanosensores funcionales (Nolo, et al., 2000). *senseless* además está implicado en la diferenciación del fotorreceptor R8 del ojo, y se expresa en glándulas salivales, donde es inhibidor de apoptosis (Chandrasekaran and Beckendorf, 2003, Frankfort, et al., 2001). Al igual que las proteínas Gfi en mamíferos, Senseless puede actuar como activador y represor de transcripción dependiendo de los niveles a los que se exprese. Niveles bajos de Senseless causan la represión del factor proneural *achaete* en células de linaje no proneural, esta represión requiere la unión de Senseless a ADN. Por otro lado Senseless se expresa a niveles altos en las células POS que producen los órganos mecanosensores de *Drosophila*, en estas células Senseless actúa como activador del gen proneural *achaete*. Esta activación la lleva a cabo no mediante su unión a ADN, sino interaccionando con otros genes proneurales (mediante los dominios Zn finger de Senseless) para promover la expresión de *achaete* (Acar, et al., 2006). Es interesante mencionar que Senseless también tiene



dominios ricos en Glutaminas, característicos de factores activadores de transcripción (Jafar-Nejad and Bellen, 2004).

La Ataxina-1 de *Drosophila* (CG4547 o dAtx1) es homóloga de la de mamíferos en el dominio AXH de la zona C-terminal, y carece de la zona N-terminal donde se encuentran las poliglutaminas. *DAtx-1* y *senseless* presentan un patrón de expresión similar en el embrión de *Drosophila*, e interaccionan tanto en ensayos de doble híbrido de levaduras como en experimentos de coimmunoprecipitación. Basado en esta interacción, se investigó la interacción de Senseless (*Drosophila*) y Gfi1 (humano) con la Ataxina-1 humana normal y expandida. El dominio responsable de la interacción es el dominio AXH de Ataxina-1, y la expresión de Ataxina-1 [82Q] o dAtx-1 en las células POS del tórax de *Drosophila* induce una disminución significativa de los niveles de Senseless, que resulta en la esperada disminución en el número de órganos mecanoreceptores torácicos. La disminución en los niveles de Senseless es considerablemente más severa en presencia de Ataxina-1 [82Q] (humana) que con dAtx1, lo que indica que la poliglutamina expandida potencia el efecto del dominio AXH.

Dado que Ataxina-1 [82Q] y Gfi-1 también interaccionan, se investigó las consecuencias genéticas en ratón. La expresión de Ataxina-1 [82Q] en Células de Purkinje induce una disminución en los niveles de Gfi-1. Además, ratones con una falta de función homocigótica para *Gfi-1*, muestran degeneración y pérdida de Células de Purkinje. Por lo tanto la falta de función de Gfi-1 causada por Ataxina-1 podría contribuir a la patogénesis de SCA1 en humanos (Tsuda, et al., 2005).

### **1.3 Relación entre las Ataxias espinocerebelosas**

Las ataxias hereditarias son un grupo de enfermedades neurodegenerativas de origen genético y sintomatología heterogéneos pero que comparten la atrofia cerebelar como característica común, lo cual causa pérdida de equilibrio y ataxia. Hasta la fecha, se han identificado los *loci* relacionados con 25 de estas ataxias, sin que haya una relación obvia entre las proteínas que codifican ni a nivel de secuencia, ni a nivel funcional. Algunas ataxias hereditarias son recesivas, mientras que otras son de herencia dominante, donde se incluyen todas las SCAs (de las que hay 28, 6 de las cuales son PQDs) y DRPLA. Al igual que en el resto de ataxias hereditarias, el origen genético de las distintas SCAs es también heterogéneo, pero sin embargo la neuropatología en las

distintas ataxias de herencia dominante es solapante en síntomas adicionales a la ya mencionada degeneración cerebelar. Desde el punto de vista médico, es muy difícil diferenciar unas de otras (Duenas, et al., 2006, Taroni and DiDonato, 2004).

En la era pregenómica, las ataxias dominantes se clasificaron en base a su sintomatología, y se denominó a las distintas clases ADCA I, II y III (Autosomal Dominant Cerebelar Ataxia). Esta clasificación en base a sintomatología engloba a diferentes SCAs -que luego se descubrió tienen un origen genético distinto- dentro del mismo grupo sintomatológico, por ejemplo, ADCA I engloba a las SCA1, 2, 3, 6 y DRPLA. Esto es indicativo de hasta que punto los síntomas de las SCAs (y DRPLA) son similares más allá de la degeneración cerebelar (Duenas, et al., 2006).

Dentro de las SCAs, están aquellas causadas por expansión de poliglutaminas, de las que ya se ha hablado en los apartados anteriores. Es interesante que en estas SCAs, los agregados formados por la proteína expandida causante de la enfermedad a menudo son positivos para la forma no expandida de proteínas causantes de otras SCAs; esto es, en los agregados de Ataxina-3 expandida en pacientes de SCA3, se pueden encontrar Ataxina-1, Ataxina-2 y Atrofina no expandidas (cuyas formas expandidas causan SCA1, SCA2 y DRPLA), lo mismo ocurre en los agregados formados por Atrofina (DRPLA) o Ataxina-1 (SCA1) expandidas (Uchihara, et al., 2001). Otra observación interesante, es que la severidad de los síntomas en pacientes con SCA2, es dependiente en parte de la longitud que presente el fragmento de poliglutaminas de la proteína CACNA1A (causante de SCA6), dentro del rango de variación normal no patogénico (Pulst, et al., 2005). Un trabajo reciente investigó las posibles interacciones entre proteínas implicadas en degeneración de Células de Purkinje (incluyendo las proteínas causantes de ataxias hereditarias), y encontró que varias proteínas causantes de ataxia presentan interacciones moleculares. Además muchas de estas proteínas resultaron tener interacciones comunes (Lim, et al., 2006).

Todas estas observaciones han llevado a la hipótesis de que los mecanismos implicados en la degeneración de Células de Purkinje, y especialmente en el caso de las SCAs, podrían ser comunes al menos en parte, y que las proteínas causantes podrían presentar interacciones funcionales.

Debido a la relevancia específica que tiene para el trabajo aquí presentado, discutiremos en más detalle las características de la SCA2.

### **1.3.2 SCA2**

SCA2 es una enfermedad neurodegenerativa progresiva que comienza a manifestarse entre los treinta o cuarenta años y tiene una progresión de entre diez a veinte años hasta la muerte del paciente. Los síntomas principales son ataxia, disartria y temblores (parkinsonismo). Los primeros síntomas en manifestarse son ataxia en el desplazamiento, acompañada de calambres en las piernas y parkinsonismo en algunos casos. Más adelante los pacientes presentan movimientos sacádicos más lentos, que en aproximadamente la mitad de pacientes desemboca en parálisis ocular. Algunos pacientes desarrollan deficiencia cognitiva y en ciertos casos demencia. Los síntomas más tardíos son disfagia y otros signos de fracaso en el bulbo raquídeo, que causan la muerte del paciente (Zoghbi and Orr, 2000). En expansiones superiores a las 200 (CAG) en el gen *SCA2*, se producen casos infantiles de SCA2, con progresión y sintomatología mucho más severas.

Desde el punto de vista neuropatológico, los cerebros de SCA2 muestran degeneración en las regiones del cerebelo y el tronco encefálico (protuberancia, bulbo raquídeo y mesencéfalo) con una fuerte disminución en el número de células de Purkinje y células granulares. En algunos pacientes se observa atrofia en el lóbulo fronto-temporal, y degeneración de la región de células dopaminérgicas de la *substantia nigra*, lo cual es probablemente la causa del parkinsonismo observado en SCA2. También es frecuente la degeneración de las zonas de la protuberancia y el núcleo olivar (Koeppen, 2005, Zoghbi and Orr, 2000).

El polimorfismo natural de la secuencia de (CAG)<sub>n</sub> del gen *SCA2* varía entre las 14 a las 31 repeticiones, aunque el 95% de las personas tienen 22 o 23 repeticiones interrumpidas por dos codones (CAA). El umbral de patogénesis es de 33 (CAG) puros (sin interrupciones (CAA)) y puede llegar a los 200 (CAG) que causan formas infantiles de SCA2.

La Ataxina-2 (codificada por el gen *SCA2*) tiene una distribución citoplásmica y en cultivo celular se ha visto que colocaliza con marcadores de aparato de Golgi (Huynh, et al., 2003). Aunque es una proteína de expresión ubicuita, sus niveles son mayores en el cerebelo (Huynh, et al., 1999). En cerebros de pacientes con SCA2, los niveles de

Ataxina-2 parecen ser superiores a los de individuos sanos (determinado por inmunohistoquímica), lo cual indica que su degradación podría estar afectada por la expansión de poliglutamina (Huynh, et al., 2000). La Ataxina-2 expandida tiende a formar microagregados citoplasmáticos en gran parte de las neuronas afectadas en SCA2, y en 1-2% de las neuronas también se observan agregados nucleares, principalmente en neuronas de la región del tronco encefálico, y nunca en el las células de Purkinje (Armstrong, et al., 2005, Koeppen, 2005, Koyano, et al., 1999, Pang, et al., 2002). La agregación nuclear de Ataxina-2 expandida (104Q) también se ha observado en cultivo celular (Huynh, et al., 2003), aunque en modelos de ratones transgénicos que expresan Ataxina-2 expandida (58Q) usando un promotor de células de Purkinje, se observa neurodegeneración en ausencia de INs (Huynh, et al., 2000).

La función de la Ataxina-2 en mamíferos es desconocida. Los ratones mutantes para SCA2 son viables en homocigosis, con problemas de obesidad, pero sin fenotipos neurológicos relacionados con los que se observan en pacientes con SCA2 (Kiehl, et al., 2006). Esto indica que al igual que hemos visto para la mayoría de PQDs la patología de SCA2 no se debe a una haploinsuficiencia de Ataxina-2 sino a una ganancia de función tóxica de Ataxina-2 inducida por la expansión de poliglutamina.

Varias observaciones indican que la Ataxina-2 está implicada en mecanismos relacionados bien con el metabolismo de ARN (como el *splicing* de ARNm o la degradación de ARN) o con la regulación de la traducción. La porción N-terminal de Ataxina-2 contiene dominios Lsm y LsmAD (Like-Sm y Lsm Associated Domain respectivamente). Los dominios Lsm son dominios de unión a ARN presentes en proteínas implicadas tanto en *splicing* como en degradación de ARN, lo cual sugiere que Ataxina-2 es una proteína de unión a ARN (He and Parker, 2000, Neuwald and Koonin, 1998) aunque aún no se ha demostrado que la Ataxina-2 se una directamente a ARN. Por otro lado la Ataxina-2 también tiene dominios PAM2 (PABP interacting Motives), e interacciona con la proteína PABP (Poly-(A) Binding Protein) activadora de traducción (Kozlov, et al., 2001, Ralser, et al., 2005). Recientemente se ha demostrado con la Ataxina-2 de *Drosophila* (dAtx2) que el dominio PAM2 es necesario para la interacción con PABP (Satterfield and Pallanck, 2006).

Observaciones llevadas a cabo en levaduras y en *C.elegans* indican que la Ataxina-2 podría ser un inhibidor de traducción (Ciosk, et al., 2004, Dunn and Jensen, 2003, Mangus, et al., 1998). En concordancia con estas observaciones, en *Drosophila* se ha visto que dAtx2 está presente en complejos de poliribosomas, y que la interacción con poliribosomas puede ser mediada tanto por el dominio Lsm como por el dominio PAM (Satterfield and Pallanck, 2006).

El análisis de la función que dAtx2 podría desempeñar en la mosca indica que es un regulador del ensamblaje del citoesqueleto celular de Actina, si bien la falta de función o la sobreexpresión de dAtx2 no induce cambios ni en los niveles de ARN ni de proteína de la Actina, y las dos proteínas no interaccionan a nivel molecular (Satterfield, et al., 2002).

## **1.4 *Drosophila melanogaster* como modelo animal de enfermedades neurodegenerativas**

A pesar de ser un organismo más simple que los mamíferos, o tal vez en parte por esto, la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* presenta muchas ventajas para el estudio de rutas y mecanismos celulares implicados en las enfermedades neurodegenerativas. Entre las ventajas de *Drosophila* se encuentran:

- Tiempo de generación rápido, debido a un ciclo vital corto. El tiempo desde la deposición del huevo hasta la eclosión de un adulto (de la pupa) es de aproximadamente 13 días a temperatura ambiente. Además los adultos son fértiles a las pocas horas de nacer.
- Las moscas producen gran cantidad de prole, proporcionando un alto número de réplicas y alta relevancia estadística a las observaciones.
- Disponibilidad de gran cantidad de técnicas para la manipulación y expresión génica (Venken and Bellen, 2005).
- Anatomía con fenotipos fáciles de visualizar.
- Las rutas fisiológicas y principales cascadas de señales están altamente conservadas entre *Drosophila* y humano (Rubin, et al., 2000).
- Disponibilidad de un gran número de colecciones de mutantes de acceso público, tanto de genes sobreexpresados como de faltas de función en genes únicos o por

depleciones de varios genes, cuya cobertura total abarca ~50% del genoma (Parks, et al., 2004, Thibault, et al., 2004).

- Genoma secuenciado y mayoría de genes anotados (Adams, et al., 2000).

Gracias al rápido tiempo de generación, alto número de descendencia y la disponibilidad de colecciones de líneas mutantes, *Drosophila* constituye un organismo ideal a la hora de llevar a cabo búsqueda de modificadores genéticos que supriman o potencien un fenotipo determinado (*screens* genéticos). Este ha sido un planteamiento usado con frecuencia para buscar modificadores de fenotipos causados por sobreexpresión de proteínas implicadas en neurodegeneración. Las proteínas se expresan en el ojo, donde causan un fenotipo visible, y luego se cruzan con colecciones de líneas mutantes para identificar genes modificadores nuevos. Esto ha sido llevado a cabo con modelos de PQDs (Fernandez-Funez, et al., 2000, Kazemi-Esfarjani and Benzer, 2000) y el mal de Alzheimer (Shulman and Feany, 2003) por ejemplo.

Además la adaptación del sistema de expresión de *Saccharomyces cerevisiae* Gal4/UAS (Brand and Perrimon, 1993) a *Drosophila*, permite el control de la expresión del gen deseado tanto de forma espacial (en el tejido que se quiera) como temporal (en distintos estadios del desarrollo). Otra ventaja del sistema de expresión Gal4/UAS es su sensibilidad a la temperatura, que hace que para un mismo transgén se consiga bajos niveles de expresión a temperaturas bajas y niveles altos de expresión a temperaturas altas, aumentando el rango de fenotipos que un solo transgén produce.

El papel de los modelos de *Drosophila* en el estudio de las principales enfermedades neurodegenerativas ha sido muy innovador. En el campo del mal de Alzheimer, los modelos de *Drosophila* han ayudado a esclarecer el papel biológico de uno de los componentes de la enfermedad, la proteína APP (Amyloid- $\beta$  precursor protein) mostrando por ejemplo que la sobreexpresión de su homólogo (APPL) en mosca influyen el número de sinapsis neuromusculares en larvas de *Drosophila* (Torroja, et al., 1999b) y que niveles elevados de APPL causan problemas de transporte axonal que resultan en el atasco de vesículas de secreción de neurotransmisores (Torroja, et al., 1999a). Además también se ha estudiado la toxicidad de la proteína asociada a microtúbulos Tau el otro componente de toxicidad en el mal de Alzheimer, ayudando a

entender el papel que juegan las kinasas GSK3 $\beta$  (Glucogeno Sintasa Kinasa 3 $\beta$ ) y Par-1 en la fosforilación y agregación de Tau (Jackson, et al., 2002, Nishimura, et al., 2004).

En el caso del mal de Parkinson, los modelos de *Drosophila* se han usado para analizar la toxicidad de Synucleína y Pael Receptor, dos de las proteínas que se acumulan en neuronas de pacientes con parkinson. Además se han generado y estudiado los fenotipos de mutantes de la E3 Ubiquitin-ligasa *parkina* (Greene, et al., 2003, Yang, et al., 2003), y de los homólogos de *dj-1* (Meulener, et al., 2005, Meulener, et al., 2006, Park, et al., 2005a, Yang, et al., 2005) y *pink-1* (Clark, et al., 2006, Park, et al., 2006), todos genes cuya falta de función está implicada en casos de mal de Parkinson hereditario, y cuya mutación en *Drosophila* disminuye la resistencia a stress oxidativo. Además en el caso de Parkin y Pink-1, los mutantes presentan fenotipos de degeneración muscular que parecen estar causados por disfunción mitocondrial y se ha visto que ambas proteínas interaccionan a nivel genético (Clark, et al., 2006, Park, et al., 2006, Yang, et al., 2006).

El campo de las PQDs seguramente es uno de los que más se han beneficiado de los modelos de mosca. El primer modelo fue el de SCA3, mediante la expresión de un fragmento truncado de Ataxina-3 expandida que como se demostró formaba INs y era tóxica como ocurre en pacientes (Warrick, et al., 1998). Desde entonces se han generado además modelos de Huntington (con la sobreexpresión de varios fragmentos de Huntingtina expandida truncados), SCA1 y SBMA (Fernandez-Funez, et al., 2000, Jackson, et al., 1998, Takeyama, et al., 2002). Resultados obtenidos tanto en *screens* genéticos como en pruebas de genes candidatos contribuyeron a establecer el papel que juegan las rutas de control de calidad proteica y la desregulación de la transcripción en las varias PQDs revisado recientemente en (Marsh and Thompson, 2006).

En el caso del mal de Huntington, los estudios llevados a cabo en *Drosophila* han contribuido a entender la posible función de la proteína. Mediante el uso de un ARNi cuya diana es la Huntingtina de *Drosophila*, se vio que moscas con bajos niveles de Huntingtina presentan fenotipos de ojo y problemas de transporte axonal evidenciados por cúmulos de vesículas de neurotransmisores (Gunawardena, et al., 2003). Además los modelos de Huntington en *Drosophila* han sido clave para demostrar que aparte de los efectos que Huntingtina expandida tiene en el núcleo, en el mal de Huntington podría

existir un componente importante componente citoplásmico en la toxicidad. Se ha observado que la Huntingtina expandida es tóxica en el citoplasma en ausencia de translocación nuclear, y que causa disfunción neuronal debido a fallos en el transporte axonal. Además la proteína agrega en el citoplasma de neuronas en *Drosophila* (hecho que también ocurre en humanos) atrapando a otras proteínas que contienen secuencias de poliglutaminas (Gunawardena, et al., 2003, Lee, et al., 2004).

Los modelos de *Drosophila* de SCA3 han ayudado a esclarecer la función de la Ataxina-3. Esta proteína se une a poli-Ubiquitina y tiene actividad ubiquitin-proteasa. En *Drosophila* se vio que la Ataxina-3 humana salvaje (con 27Q) es capaz de suprimir la toxicidad de la Ataxina-3 expandida (con 84Q ó 74Q). Al igual que ocurre en humanos, la Ataxina-3 normal colocaliza en inclusiones de poliglutaminas expandidas e induce, por mecanismos desconocidos pero que requieren un proteasoma activo, la degradación de la Ataxina-3 expandida. Por otro lado la Ataxina-3 salvaje también es capaz de suprimir en *Drosophila* los fenotipos de degeneración en el ojo de moscas que sobreexpresan Ataxina-1 y Huntingtina expandidas. Esto constituye un fuerte indicio de que Ataxina-3 actúa en la maquinaria de control de calidad proteica, induciendo la degradación de proteínas mal plegadas (Warrick, et al., 2005).

Los estudios llevados a cabo en modelos de SCA1 en *Drosophila*, han contribuido de forma crucial a entender como la Ataxina-1 expandida desencadena toxicidad, así como el papel que desempeñan sus distintos dominios funcionales en la enfermedad. El *screen* genético llevado a cabo en nuestro laboratorio (Fernandez-Funez, et al., 2000) confirmó el papel que juegan las chaperonas y el sistema U/P en SCA1. Además fue un indicio importante de que alteraciones en la regulación de expresión génica también son un componente importante de la patogénesis en SCA1, ya que varios modificadores de la toxicidad de Ataxina-1 expandida son factores de transcripción y cofactores. El *screen* también descubrió rutas nuevas implicadas en la degeneración como el metabolismo del ARN, con la identificación de varias proteínas de unión a ARN como modificadores genéticos, que posteriormente otros estudios han que corroborado que interaccionan a nivel molecular con Ataxina-1 (Lim, et al., 2006).

En *Drosophila* se mostró que las proteínas 14-3-3 potencian la toxicidad de la Ataxina-1 [82Q], estabilizando la proteína y causando un aumento significativo de sus



niveles. Además se demostró el efecto de la fosforilación de Ataxina-1 mediada por la kinasa Akt (de la ruta de la cascada del receptor de la Insulina) en la toxicidad. Un aumento en los niveles de Akt induce la estabilización e incremento en los niveles de Ataxina-1, presumiblemente debido un aumento de la interacción 14-3-3-Ataxina-1, que resulta en mayor degeneración. La disminución en los niveles de Akt causa un efecto contrario (Chen, et al., 2003).

Los modelos de SCA1 en *Drosophila* también han ayudado a entender la interacción de Ataxina-1 expandida con los factores de transcripción SMRT y Senseless, así como la importancia del dominio AXH de Ataxina-1 que media la interacción con ambas proteínas. En *Drosophila* se vio que Ataxina-1 [82Q] inhibe la función tanto de SMRTER (homólogo de SMRT) como de Senseless. En el caso de SMRTER probablemente es secuestrado por Ataxina-1 [82Q] mientras que en el caso de Senseless lo que se observa es una disminución en los niveles de la proteína (Senseless) en presencia de Ataxina-1 [82Q] (Tsai, et al., 2004, Tsuda, et al., 2005).

## **2. Objetivos**

- 1- Identificación de posibles rutas de degradación de la Ataxina-1 expandida.
- 2- Identificar componentes comunes y componentes específicos implicados en la patogénesis de la Ataxina-1 expandida.
- 3- Investigar la relevancia de los modificadores de la toxicidad de Ataxina-1 para la patogénesis de otras enfermedades causadas por expansión de poliglutaminas.
- 4- Caracterizar a nivel molecular y funcional la interacción de Ataxina-1 con los modificadores encontrados.

### 3. Materiales y métodos

#### Generación de Construcciones para expresión en *Drosophila*

##### UAS-CHIP

El ADNc que codifica para la proteína CHIP humana (Cortesía del Dr. Cam Patterson) fue subclonado en el vector de expresión de *Drosophila* pUAST (Brand and Perrimon, 1993) para generar un vector *pUAS:CHIP*.

##### UAS-dAtx2<sup>NLS</sup> y UAS-dAtx2<sup>NES</sup>

El vector *GH27029* que contiene el ADNc de *dAtx2* fue obtenido del repositorio de BDGP (Berkeley *Drosophila* Genome Project). Mediante PCR se extrajo el ADNc de *dAtx2* y se le introdujeron los codones que codifican bien para la secuencia de exporte nuclear (NES) de PKI (Protein Kinase A Inhibitor Protein): NELALKLAGLDINKT; o bien la secuencia de localización nuclear (NLS) de SV40 (Simian Virus 40 large T antigen): PKKKRKV. Luego los ADNc de *dAtx2:NES* y *dAtx2:NLS* se subclonaron en el vector pGem@T (Promega). Los ADNc de *dAtx2:NES* y *dAtx2:NLS* se extrajeron con las enzimas de restricción BGLII y NOTI y se ligaron en un vector pUAST-FLAG (cortesía del Dr. Cohen (Weihe, et al., 2001)). De esta forma se obtuvieron los vectores *pUAS:dAtx2:NES:FLAG* y *pUAS:dAtx2:NLS:FLAG*. Entre las secuencias NES y NLS y el epítipo FLAG quedan tres aminoácidos (RGR) como subproducto de la ligación. Los ADNc fueron inyectados en embriones de *Drosophila*.

#### Inyección de Embriones y Generación de Moscas Transgénicas

Los embriones de *Drosophila* fueron inyectados para obtener transgénicos mediante el siguiente protocolo:

- 200 machos de genotipo *yw* se cruzan con 200 hembras de genotipo *yw; +; Ki, Transposase Δ2-3*.
- Usando una jaula con una placa de agar en el fondo se recogen puestas de embriones (*yw; +; Ki, Transposase Δ2-3/+*) en intervalos de 30' a 45'.

- Los embriones se decorionan en una solución al 25% lejía/H<sub>2</sub>O durante 2' y luego se lavan con H<sub>2</sub>O durante 1'.
- 100 embriones se alinean en una tira de agar y luego se transfieren a un portaobjetos cuya superficie ha sido cubierta con papel adhesivo de doble cara para que los embriones queden fijos en el borde.
- Los embriones son cubiertos en una solución de aceite mineral (Halocarbon®, Halocarbon products Inc.).
- Los vectores *pUAS:CHIP*, *pUAS:dAtx2:NES:FLAG* o *pUAS:dAtx2:NLS:FLAG* a una concentración de 400ng en H<sub>2</sub>O son inyectados en el extremo posterior del embrión donde se hayan la células de la línea germinal, usando una aguja de microinyección (Sterile Femtotips®, Eppendorf) con la ayuda de un aparato de microinyección (Eppendorf).
- Tras inyectar los embriones, los portaobjetos se transfieren a una cámara húmeda y se ponen inclinados de forma que el aceite mineral siempre cubra los embriones, y se dejan una noche a 25°C.
- A las doce horas, las larvas salen de los embriones inyectados y son transferidas a comida para que den lugar a moscas adultas, en cuya progenie se encuentran los transgénicos.
- Las moscas adultas son cruzadas con moscas (*yw*) y en la progenie de este cruce se buscan moscas con color de ojo que serán transgénicas, ya que el vector pUAST contiene un minigen *w<sup>+</sup>* que confiere color de ojo rojo (o naranja dependiendo de la dosis) a las moscas transgénicas que están en fondo *w<sup>-</sup>*.
- Las moscas transgénicas son balanceadas y se determina en que cromosoma se encuentra la inserción.

Las moscas inyectadas se encuentran en fondo yw es decir son *y<sup>-</sup>* (el color del cuerpo es amarillo) y *w<sup>-</sup>* (color de ojos blanco). Las construcciones UAS se hacen en un vector pUAST que está construido sobre una base de elemento P de moscas. Los elementos P son elementos transponibles de *Drosophila* que saltan en el genoma cuando están en presencia de Transposasa. Cuando se inyectan las construcciones pUAST en presencia de Transposasa ( $\Delta 2-3$  en este caso) estas se insertan en el genoma de las células inyectadas, la línea germinal en nuestro caso.

Cuando los embriones llegan a adultos algunas células de su línea germinal habrán sido transformadas con las construcciones pUAST. Estos adultos son cruzados con moscas en fondo  $y^w$  de nuevo, y en la progenie de este cruce es donde deberían identificarse las moscas transgénicas. El vector pUAST contiene un gene *mini-w*<sup>+</sup> que hace que en la F2 de las moscas inyectadas, las moscas transgénicas tengan color de ojo, lo que permite diferenciarlas de las no transgénicas. Estas moscas son aisladas y cruzadas con moscas que contienen cromosomas balanceadores para que no se pierdan las inserciones.

### **Otras líneas de *Drosophila* utilizadas**

Las líneas *UAS:SCAI*<sup>2Q</sup>, *UAS:SCAI*<sup>30Q</sup> y *UAS:SCAI*<sup>82Q</sup> que expresan las proteínas humanas Ataxina-1 [2Q], Ataxina-1 [30Q] y Ataxina-1 [82Q] están descritas en (Fernandez-Funez, et al., 2000). Las líneas *UAS:127QHA* cortesía del Dr. P. Kazemi-Esfarjani descritas en (Kazemi-Esfarjani and Benzer, 2000). Las líneas que sobreexpresan dAtx2 salvaje (*UAS:dAtx2*) y la línea mutante para dAtx2 (*dAtx2-XI*) cortesía del Dr. L.J. Pallanck, están descritas en (Satterfield, et al., 2002). El resto de líneas utilizadas en este trabajo fueron obtenidas de Bloomington *Drosophila* Stock Center en Indiana University.

### **Ensayos de Ubiquitinación *in Vitro***

Las proteínas Ataxina-1 [2Q] o Ataxina-1 [82Q] humanas [25µg] fueron incubadas por 2hs a 30°C en reacciones que contenían: enzima E1 de conejo [0,1µM] (Calbiochem), UBCH5a (E2) a [8µM], CHIP (E3) [4µM], Ubiquitina [2.5 mg/ml] (Sigma), [5mM] ATP en MOPS (ácido 4-morfolinpropansulfónico) [20mM] a pH 7.2, KCl [100mM], MgCl [5mM], Ditiotreitól (DTT) [10mM], fenilmetilsulfonil fluoride [1mM]. En algunas reacciones además se añadió Hsp70 [2µM]. Las reacciones se pararon con tampón de carga con Dodecil-Sulfato de Sodio (SDS) y se corrieron en geles de electroferesis de SDS/Poliacrilamida se transfirieron a membranas de Nitrocelulosa y se tiñeron con policlonal de conejo anti-Ataxina-1 (11750VII, 1:3000).

### **Coimmunoprecipitación CHIP-Ataxina-1**

Vectores para expresar las proteínas FLAG:Ataxina-1 [2Q] o FLAG:Ataxina-1 [82Q] y CHIP fueron transfectados en células HeLa usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Las células fueron homogeneizadas en tampón TST (Tris-HCl [50mM] pH7.5, NaCl

[0.15M], Triton X-100 [0.5%]) con inhibidores de proteasa. La inmunoprecipitación se llevó a cabo incubando los extractos celulares por 2 hs a 4°C con cuentas conjugadas con anti-Flag (Sigma). Luego se lavó con tampón TST cinco veces y se corrió los precipitados en geles de electroforesis SDS/poliacrilamida, se transfirió a membranas de nitrocelulosa y se tiñeron con policlonal de conejo anti-Ataxina-1 (11750VII, 1:3000) y policlonal de conejo anti-CHIP (1:2000).

### **Purificación por Coafinidad**

Los plásmidos vector para expresar una de las siguientes variedades de Ataxina-1: GST-Ataxina-1 [82Q], GST-Ataxina-1 [30Q], GST-Ataxina-1 [82Q] $\Delta$ AXH, GST-Ataxina-1C-terminal o GST-Ataxina-1AXH en combinación con Myc-hAtaxina-2 se transfectaron en células humanas HEK293T usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Las células se crecieron durante dos días en medio DMEM suplementado con suero bovino fetal [10%]. Las células fueron homogeneizadas y los extractos incubados en cuentas de Glutathion-Sefarosa para atrapar las variantes de Ataxina-1 conjugadas con GST (Glutathion-S Transferasa) y las proteínas con las que formen complejo. Para reducir las interacciones no específicas todos los tampones de lavado se prepararon con NaCl [180mM], los extractos fueron corridos en geles de electroforesis en SDS/Poliacrilamida, transferidos a membranas de PVDF y teñidos con policlonal de ratón anti-GST (Sigma) y monoclonal anti-Myc (9E10, Sigma). El vector pEGFP-C1 fue utilizado como control de transfección y carga en los experimentos.

### **Ensayos de Ubiquitinación en Vivo de Ataxina-1**

Usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen), células HeLa fueron transfectadas con vectores que expresan: FLAG:Ataxina-1 [82Q]; una de las siguientes variantes de CHIP: salvaje, CHIP<sup>K30A</sup> (mutante en el dominio TPR) o CHIP<sup>D253N,R254G</sup> (mutante en el dominio U-box); y/o Ubiquitina marcada con el epítipo Hemaglutinina (HA:Ubi). Las células se incubaron por 24hs tras lo cual se añadió el inhibidor de Proteasoma MG132 [50 $\mu$ M] (Calbiochem) y se incubó otras 8hs. Luego las células se homogeneizaron en tampón TST con inhibidores de proteasa y se llevó a cabo una inmunoprecipitación con cuentas conjugadas con anti-Flag (Sigma). Se lavó cinco veces con tampón TST y se corrió en un gel de electroforesis en SDS/Poliacrilamida, se transfirió a una membrana de

nitrocelulosa y se tiñó secuencialmente con monoclonal de ratón anti-HA (Babco) y policlonal de conejo anti-FLAG (Sigma).

### **Immunofluorescencia en Cultivo Celular**

Se llevó a cabo en células COS7 (células de riñón de mono verde africano) crecidas en cubreobjetos estériles y previamente transfectadas (Lipofectamine 2000) con vectores que expresan Ataxina-1 [2Q] o Ataxina-1 [82Q] y CHIP. Las células fueron: fijadas en una solución de Formaldehído [4%] en PBS (Phosphate Buffered Saline) durante 20'; lavadas cinco veces con PBT (PBS, Triton X-100 [0.3%]); bloqueadas 30' con PBT/BSA [2%]; incubadas en monoclonal anti-FLAG (1:500, Sigma) y policlonal de conejo anti-CHIP (1:500) 12hs a 4°C; lavadas cinco veces con PBT e incubadas con secundarios anti-ratón (1:400, AlexaFluor488, Molecular Probes) y anti-conejo (1:400, Cy3, Jackson Labs); montadas en Vectashield® (Vector Labs) y las preparaciones fueron analizadas usando microscopía confocal (BioRad 1024).

### **Microscopía Electrónica de Barrido de ojos de *Drosophila***

Las moscas fueron deshidratadas en series ascendentes de etanol/H<sub>2</sub>O hasta etanol 100%; luego fueron sometidas a un secado de punto crítico; los animales fueron montados en portaobjetos especiales y cubiertos con metal. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM 6100 microscope.

### **Ensayos de Western Blot con Tejido de *Drosophila***

Los tejidos usados fueron bien discos de ojo larvarios o bien cabezas de adulto según se indique en cada ensayo en los apartados pertinentes. Los tejidos fueron: homogeneizados en 30µl Tampón Laemmli (BioRad)/2-Mercaptoetanol [5%]; incubados 10' a 100°C; cargados y corridos en geles de electroforesis de SDS/Poliacrilamida; y transferidos a membranas de nitrocelulosa. Las membranas fueron: bloqueadas con TBS/BSA 5%; incubadas en el anticuerpo primario 12hs a 4°C; lavadas con TBST; incubadas en anticuerpo secundario correspondiente conjugado con HRP (Horse Radish Peroxidase); reveladas usando luminiscencia mediante el kit ECL (Amersham Biosciences).

Los primarios utilizados fueron: conejo anti-Ataxina-1 (1:1000, 11NQ); conejo anti-CHIP (1:2000); ratón anti-Tubulina (1:1000, Hybridoma Bank); conejo anti-dAtx2 (1:5000 cortesía del Dr. L.J. Pallanck).

Los anticuerpos secundarios conjugados con HRP utilizados fueron anti-ImmunoglobulinaG de ratón o conejo (1:5000, BioRad).

### **Immunofluorescencia en Tejidos de *Drosophila***

Los tejidos utilizados en este trabajo fueron discos de ojo o ala de larva, sistema nervioso central (SNC) de larva, glándulas salivales larvianas según se indique en el apartado correspondiente. Los tejidos fueron: diseccionados en PBS; fijados en PBS/Formaldehído [4%]; lavados con PBT; bloqueados en PBT/BSA [2%] por 1h a 25°C; incubados en el anticuerpo primario pertinente diluido en PBT/BSA [2%] por 12hs a 4°C; lavados cinco veces con PBT, incubados en el anticuerpo secundario pertinente conjugado con fluorocromo por 2hs a 25°C; lavados cinco veces en PBT; montados en Vectashield® (Vector Labs) y las preparaciones fueron analizadas usando microscopía confocal (BioRad 1024).

Los anticuerpos primarios utilizados fueron: conejo anti-Ataxina-1 (1:750 ó 1:1000, 11NQ), ratón anti-GFP (1:200; 3E10, Molecular Probes); ratón anti-dAtx2 (1:1000 ó 1:2000, cortesía de Dr. L.J. Pallanck); Lc2628 anti-dLaminaC (1:50, Hybridoma Bank); conejo o ratón anti-FLAG (1:200, Sigma); ratón anti-Ubiquitina (1:200, 6C1, Sigma)

Los secundarios utilizados fueron anti-Immunoglobulina de ratón, conejo, o cobaya combinados con AlexaFluor488 (1:400, Molecular probes), Cy3 (1:400, Jackson Lab).

### **Cuantificación de Fluorescencia en Discos de Ojo Larvianos**

Se obtuvieron 20 imágenes de cada disco de ojo a intervalos de altura de 2µm, las imágenes se proyectaron en planta de forma que la señal obtenida en la imagen es la suma de todas las imágenes obtenidas y esto se hizo para cada disco de ojo utilizado. El perímetro de cada disco de ojo fue marcado y la intensidad de fluorescencia cuantificada usando el programa de análisis de imagen de ImageJ.

### **Secciones de Parafina de Ojos de *Drosophila***

Los tejidos fueron fijados en: ácido acético[5%]/formaldehído[3.7%]/etanol[85%]; deshidratados en series de concentración creciente de etanol/H<sub>2</sub>O hasta llevarlos a etanol 100%; lavados con Xileno (Sigma) y embebidos en parafina (Paraplast Plus); cortados en secciones longitudinales de 10µm; re-hidratados a PBS; teñidos con Hematoxilina



(Sigma) y montados en Permount (Fisher). Las imágenes fueron capturadas usando una cámara AxioCam MRc (Zeiss) conectada a un microscopio Microphot-FXA (Nikon).

### **Immunohistoquímica en Tejido de Cerebro Humano**

El tejido *postmortem* recogido del área de la protuberancia o puente troncoencefálico de un cerebro de SCA1 y un cerebro control fue fijado en formol; embebido en parafina; cortado en secciones de 5µm; rehidratado en concentraciones decrecientes de Etanol/H<sub>2</sub>O y llevado a PBS; bloqueado e incubado en primario de conejo anti-CHIP (1:200) o conejo anti-Ataxina-2 humana (1:200); como anticuerpo secundario se usó anti-Immunoglobulina de conejo conjugado con Biotina (1:500, Vector Laboratories); las preparaciones se incubaron en el kit Vectastain-ABCkit[Elite] (Vector Laboratories); se revelaron usando DAB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; y se tiñó con Hematoxilina (Sigma) para dar contraste.

### **RT-PCR Semiquantitativa en Tejidos de Drosophila**

Las RT-PCRs se llevaron a cabo a partir de discos de ojo larvarios o cabezas de adultos según se indique. Los tejidos fueron: homogeneizados en TRIzol (Invitrogen) y se siguió las instrucciones proporcionadas por el fabricante para la extracción del ARN en los tejidos; el ARN extraído se trató con DNAase I libre ARNasa (Invitrogen) para eliminar la contaminación que pudiera haber de ADN genómico; la RT-PCR se llevó a cabo usando el kit Super-Script III First Strand Synthesis for RT-PCR (Invitrogen) para la obtención de los ADNc y la PCR para su ampliación se llevó a cabo usando polimerasa Platinum Taq (Invitrogen); el número de ciclos de PCR se optimizó para lograr un rango lineal en el que el producto no esté saturado. Los primers utilizados para la RT-PCR fueron:

- RP49 (control): 5'AAACGCGGTTCTGCATGAG. 3' y  
5'GACGCTTCAAGGGACAGTATCTG-3'.
- SCA1: 5'CTGCAGTTTGCGGCTCTCT-3' y  
5'GAGCTAAAGAAGGTGGAAGACTTAAA-3'.
- SV40: 5'GGAAGTGAATGGGAGCA3' y  
5'GGAAAGTCCTTGGGGTCTTC3'.

## **Ensayo de Capacidad locomotriz**

Entre 25 y 30 moscas son colectadas por ensayo, en un periodo no superior a 24hs. Para reducir la influencia de factores ambientales se toman las siguientes precauciones: las moscas son puestas en tubos con comida nueva cada día durante toda la duración del ensayo; los experimentos son llevados a cabo siempre a la misma hora del día para evitar la influencia de los ritmos circadianos; se hacen cuatro réplicas por genotipo.

El ensayo de capacidad locomotriz se lleva a cabo en un tubo de comida sin comida, en el cual se marca una línea a una altura de 5cm. Las moscas son transferidas al tubo y el tubo se golpea suavemente para que las moscas caigan al fondo, dado que las moscas tienen geotaxis negativa, tienden a subir por la pared del tubo. A los 18'' se golpea el tubo de nuevo para que las moscas vuelvan a caer y esto se repite diez veces, para "despertar" a las moscas. Una vez que las moscas están activas se repite lo anterior, pero a los 18'' se cuantifica el número de moscas que pasan la línea situada a 5cm de altura, y esto se repite 10 veces, tomando diez anotaciones/réplica/día representado. El ensayo se repite a lo largo de varios días, y se para cuando ninguna mosca es capaz de llegar a la línea de 5cm. En la gráfica se representa el porcentaje medio de moscas que alcanzan la línea situada a 5cm/réplica/día.

## **Cuantificación de Macroquetas**

Las moscas se crecieron a 25°C para niveles de expresión de Ataxina-1 82Q bajos, o a 27°C para niveles de expresión altos. Se colectaron moscas adultas a día 1 y se cuantificó el número de macroquetas/tórax de veinte animales del mismo sexo por genotipo. Se calculó el porcentaje de macroquetas en cada individuo, sobre un total de veintiséis presentes normalmente, y se representó en una gráfica el porcentaje medio.

## 4. Resultados

## 4.1 CHIP Suprime la Toxicidad de Ataxina-1 e Induce su Ubiquitinación y Degradación

### ***Introducción***

Como hemos visto las chaperonas y el sistema U/P juegan un papel importante en el desarrollo de SCA1 y las demás PQDs. Las chaperonas cubren los dominios hidrofóbicos, para evitar que las proteínas mal plegadas agreguen o secuestren a otras proteínas, intentan devolver la proteína a su estructura nativa y si fracasan la envían al sistema U/P para su degradación. Aunque es obvio que ambos sistemas (chaperonas y U/P) funcionan en sincronía y debe haber comunicación entre ellos, los mecanismos encargados de esta comunicación son mayormente desconocidos (Ma and Hendershot, 2001, Wickner, et al., 1999).

La cochaperona CHIP (C-terminus of Hsp-70 interacting protein) es uno de los eslabones que unen las chaperonas con el sistema U/P (Cyr, et al., 2002, Wiederkehr, et al., 2002). CHIP fue identificada en un ensayo de doble híbrido en levadura buscando interacciones en el dominio C-terminal de la chaperona Hsp70. CHIP consta de tres dominios TPR (Tetratricopeptide Repeat) en su extremo N-terminal capaces de interaccionar con Hsp70 y de un dominio U-box en su región C-terminal que le confiere actividad E3 Ubiquitina-proteína ligasa (Ballinger, et al., 1999, Jiang, et al., 2001). La secuencia de CHIP está muy conservada entre especies, es similar en un 98% humano-ratón y en un 60% humano-*Drosophila* (Ballinger, et al., 1999).

CHIP es una proteína de expresión ubicuita, aunque sus niveles son más elevados en tejidos de alta actividad metabólica: en el cerebro y en los músculos esqueléticos y cardíaco. Además en condiciones normales CHIP se encuentra mayormente en el citoplasma (Ballinger, et al., 1999).

CHIP está implicada en la maquinaria de control de calidad proteica a varios niveles. Gracias a su interacción con chaperonas CHIP induce la degradación de proteínas mal plegadas (Cyr, et al., 2002, Hatakeyama, et al., 2004, Murata, et al., 2003, Wiederkehr, et al., 2002). Los experimentos llevados a cabo hasta ahora indican que, una chaperona Hsp70 actúa a nivel de reconocimiento de sustrato, de tal forma que la proteína mal plegada es identificada y se une a Hsp70. La unión de CHIP a Hsp70 inhibe

la actividad ATPasa de la chaperona, de forma que detiene la ruta de plegamiento. Gracias al dominio U-box CHIP ubiquitina el sustrato unido a Hsp70 marcándolo así para su degradación. CHIP además es capaz de ubiquitinar a Hsp70 y de autoubiquitinarse, lo cual no resulta en la degradación de Hsp70 y CHIP sino que parece que sirve para que ambas transporten el sustrato al proteasoma. Esto también está apoyado por la observación de que CHIP interacciona con subunidades del proteasoma y que CHIP y el proteasoma colocalizan en células cuando se añaden inhibidores del proteasoma (revisado en (McDonough and Patterson, 2003)).

Las observaciones de que las chaperonas Hsp70 actúan como factores de reconocimiento de sustrato para CHIP y de que la concentración de esta cochaperona es superior en tejidos con alta tasa metabólica sugieren que CHIP debe jugar un papel en la respuesta a stress. Esto también está apoyado por el hecho de que CHIP depende para su actividad E3 ligasa de Ubiquitina-conjugasas (E2) de la familia UBC4/UBC5 (UBCH5a, UBCH5b y UBCH5c en humanos), una familia de Ubiquitina-conjugasas que se activan en respuesta a stress (Jiang, et al., 2001, Murata, et al., 2001, Seufert and Jentsch, 1990).

Además de la degradación de proteínas mal plegadas, CHIP tiene otras funciones en la maquinaria de control de calidad proteica. Se ha visto que puede ayudar a plegar correctamente proteínas mal plegadas, conjuntamente con Hsp70 (Kampinga, et al., 2003). Por otro lado, CHIP también activa la producción del factor HSF-1, que activa la expresión de chaperonas, mejorando por lo tanto la resistencia de la célula al estrés (Dai, et al., 2003).

Dado que CHIP es uno de los eslabones mejor estudiados entre las chaperonas y el sistema U/P, y que podría tener un papel fundamental en respuesta a estrés celular, quisimos analizar la posible interacción entre CHIP y Ataxina-1 y su relevancia para a patogénesis de SCA1.

## **CHIP Interacciona con la Ataxina-1 Expandida y no Expandida**

Para dilucidar si CHIP y Ataxina-1 expandida (Ataxina-1 [82Q]) interactúan, llevamos a cabo ensayos de coimmunoprecipitación (co-IP) entre ambas proteínas, tras su expresión en células en cultivo. Como se muestra en la **Figura 1A**, carril-4, la Ataxina-1 [82Q] coprecipita con CHIP.

Como se dijo en la introducción, la expresión de Ataxina-1 no expandida también induce fenotipos neurodegenerativos tanto en *Drosophila* como en ratón, similares a los causados por la Ataxina-1 [82Q] aunque mucho más leves, incluyendo la formación de INs, lo cual sugiere que la Ataxina-1 no expandida también adopta conformaciones aberrantes (Fernandez-Funez, et al., 2000). Por ello nos preguntamos si CHIP también interactuaría con una variante de Ataxina-1 pero carente de poliglutaminas. Para esto llevamos a cabo ensayos de co-IP con extractos de células que coexpresan CHIP con Ataxina-1 [2Q]. En el carril-5 de la **Figura 1A**, se muestra que la Ataxina-1 [2Q] también coprecipita con CHIP.

## **CHIP se encuentra en las INs de Ataxina-1 tanto en cultivo celular como en neuronas de cerebros con SCA1**

Los resultados de los ensayos de co-IP indican que la Ataxina-1 [82Q] y CHIP interactúan en el ambiente celular. Para confirmar este resultado, llevamos a cabo experimentos de inmunofluorescencia para determinar si CHIP y Ataxina-1 [82Q] colocalizan en células COS7 co-expresando ambas proteínas. Como se muestra en la **Figura 1B-D**, CHIP y Ataxina-1 [82Q] colocalizan en las INs que se observan en estas células.

Dado que la Ataxina-1 [2Q] también interactúa con CHIP en los ensayos de co-IP, nos preguntamos si ambas proteínas también colocalizarían en células. La Ataxina-1 no expandida ([30Q] y [2Q]) también forma INs tanto en cultivo celular como en *Drosophila*, aunque con una frecuencia muy baja (comunicación personal de Cummings, C. y Zoghbi, H.Y. y (Fernandez-Funez, et al., 2000)). Como se muestra en la **Figura 1E-G**, CHIP también se encuentra en las INs formadas por Ataxina-1 [2Q] en cultivo celular, lo cual confirma la interacción de ambas proteínas en vivo.

Para investigar la relevancia de las interacciones descritas arriba para la patogénesis de SCA1, analizamos la localización de la proteína CHIP endógena humana en neuronas de la región de la protuberancia o puente tanto de cerebros control como de cerebros de pacientes con SCA1 por medio de tinción inmunohistoquímica. La proteína CHIP en los cerebros control es citoplásmica en estas neuronas y no se observa tinción en el núcleo, **Figura 1H**. Sin embargo la señal de CHIP se observa en el 100% (n=102) de las INs observadas en neuronas de cerebros de pacientes de SCA1, **Figura 1I**.

### ***CHIP ubiquitina tanto a la Ataxina-1 expandida como a la no expandida in vitro, y Hsp70 potencia esta ubiquitinación***

La interacción entre Ataxina-1 y CHIP en ensayos de co-IP y la presencia de CHIP en las INs, indican que CHIP podría estar implicada en la ubiquitinación de Ataxina-1. Para investigar esta idea llevamos a cabo ensayos de ubiquitinación *in vitro*. Las proteínas Ataxina-1 [82Q] y Ataxina-1 [2Q] fueron incubadas con CHIP como E3 ligasa y los demás componentes necesarios para la ubiquitinación (ver leyenda en **Figura 2**). La ubiquitinación de una proteína *in vitro*, en ausencia de proteasoma, da lugar a una especie de mancha en un gel de electroforesis, debido a que las cadenas de poliubiquitinas aumentan el peso específico aparente de la proteína. Como se ve en la **Figura 2A**, CHIP promueve la ubiquitinación tanto de la Ataxina-1 [82Q] como la [2Q], nótese la mancha en los geles de electroforesis, indicativa de ubiquitinación cuando las dos variantes de Ataxina-1 son incubadas con todos los componentes necesarios, en comparación con la señal nítida de Ataxina-1 que se observa en los controles negativos. Otro control llevado a cabo fue para ver si CHIP es capaz de inducir la ubiquitinación de Luciferasa no desnaturalizada, una proteína que no presenta conformación aberrante. CHIP no indujo la ubiquitinación de Luciferasa no desnaturalizada *in vitro*, lo que indica que CHIP tiene tendencia a identificar proteínas con conformaciones aberrantes (datos no mostrados).

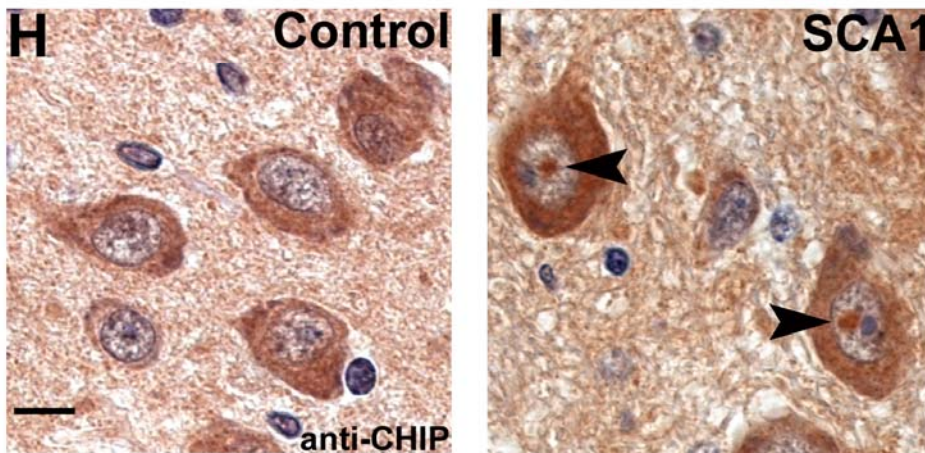
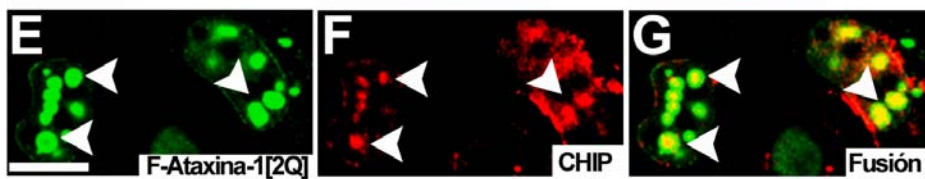
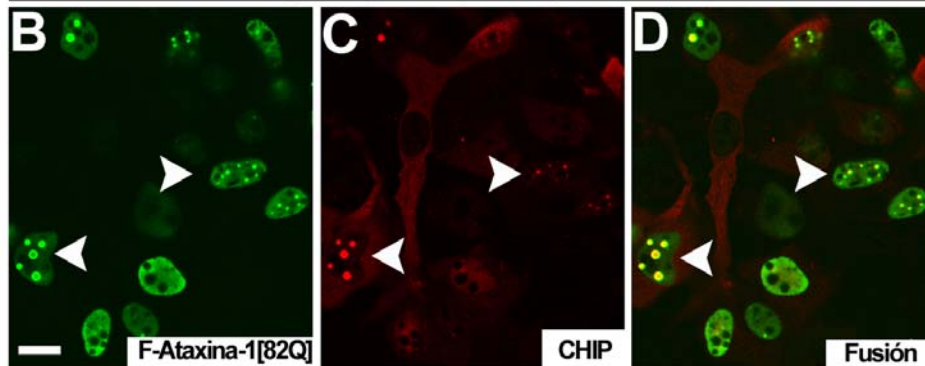
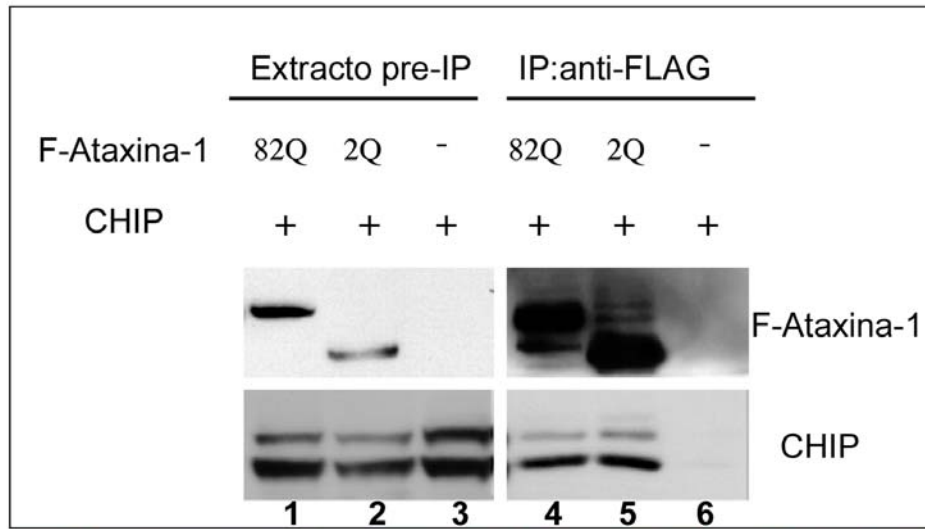
Hsp70 modula la toxicidad de Ataxina-1 [82Q] y además interacciona con CHIP (Ballinger, et al., 1999, Cummings, et al., 1998, Cummings, et al., 2001, Fernandez-Funez, et al., 2000), por ello investigamos el efecto que Hsp70 tendría sobre la

**Figura 1, CHIP interacciona con la Ataxina-1 expandida y la no expandida, y está presente en las INs de Ataxina-1 que se observan tanto en cultivo celular como en neuronas de cerebros con SCA1.** **A**, ensayos de co-IP entre FLAG-Ataxina-1 (F-Ataxina-1) [82Q] o F-Ataxina-1 [2Q] y CHIP. Carriles 1-3 los extractos previos al co-IP, de células que coexpresan CHIP con F-Ataxina-1 [82Q] (carril-1), F-Ataxina-1 [2Q] (carril-2) o un vector vacío como control (carril-3). La señal de CHIP revela dos bandas, la superior corresponde a CHIP monoubiquitinado (comunicación personal de Dr. Patterson, C.). Tras llevar a cabo la inmunoprecipitación con anti-FLAG, CHIP es coprecipitado tanto con F-Ataxina-1 [82Q] como con F-Ataxina-1 [2Q] (carriles 4 y 5 respectivamente). Notese que no hay señal de CHIP en la reacción control (carril 6). Los anticuerpos utilizados fueron conejo policlonal anti-Ataxina-1 (11750VII) y conejo policlonal contra CHIP. **B-D**, tinción con inmunofluorescencia en células que coexpresan F-Ataxina-1 [82Q] (verde) y CHIP (rojo). **B**, F-Ataxina-1 [82Q] forma INs (cabeza de flecha) cuando se expresa en cultivo celular. **C-D**, CHIP es detectado en las INs de F-Ataxina-1 [82Q]. **E-G**, Tinción similar a la de **B-D**, llevada a cabo en células que coexpresan F-Ataxina-1 [2Q] y CHIP. CHIP también es detectado en las INs formadas por Ataxina-1 [2Q] (cabeza de flecha). **H-I**, secciones de parafina de la región de la protuberancia o puente troncoencefálico de tejido cerebral (*postmortem*) de un individuo control y un individuo con SCA1, teñidos con anti-CHIP. **H**, la señal de CHIP es citoplásmica en las neuronas de la protuberancia del cerebro control, y no se observa señal de CHIP en el núcleo. **I**, en las neuronas del cerebro de SCA1, además de la señal de CHIP citoplásmica, también se encuentra CHIP en el núcleo asociado a las INs (cabeza de flecha). Se analizaron un total de 102 neuronas con INs en la muestra de SCA1, y todas tenían señal positiva para CHIP. **B-L**, escala=10µm.



Figura 1

**A**



ubiquitinación de Ataxina-1 mediada por CHIP. Se añadió Hsp70 a la reacción de ubiquitinación *in vitro* descrita arriba. Encontramos que la adición de Hsp70 potencia la ubiquitinación llevada a cabo por CHIP tanto sobre Ataxina-1 [82Q] como sobre la Ataxina-1 [2Q] (**Figura 2B**). Dado que este experimento se ha llevado a cabo *in Vitro*, es indicativo de que CHIP es capaz de reconocer a la Ataxina-1 [2Q] directamente.

### ***CHIP induce la ubiquitinación de Ataxina-1 [82Q] en cultivo celular, de forma dependiente del dominio TPR***

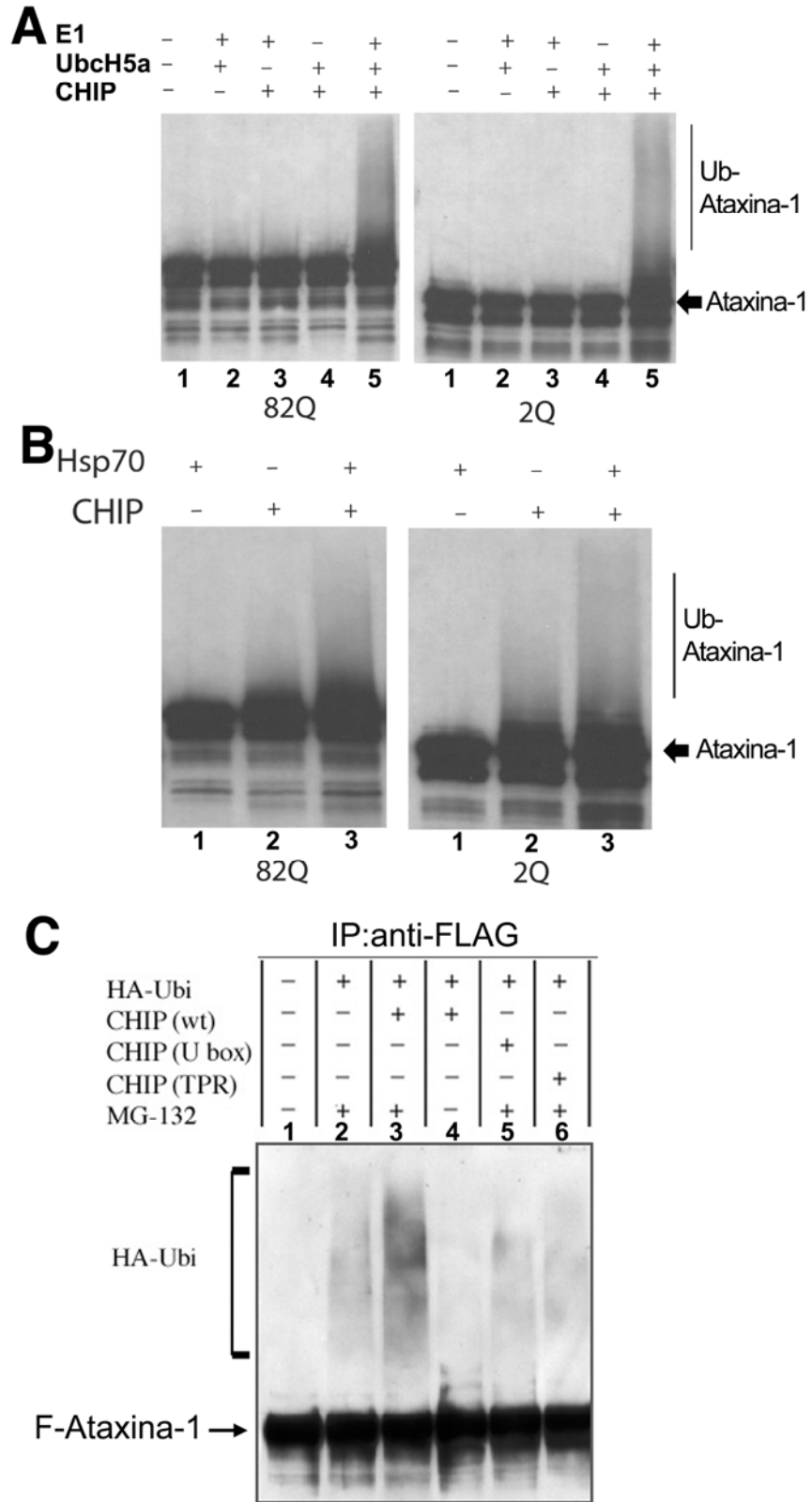
Nuestro próximo experimento fue ver si la observación *in vitro* de que CHIP ubiquitina a la Ataxina-1 [82Q] tiene relevancia *in vivo*. Cuando se incuban células (HeLa) que expresan Ataxina-1 [82Q] con el inhibidor de Proteasoma MG-132 se hace patente la ubiquitinación de Ataxina-1 (**Figura 2C**, carriles 1 y 2). Esta ubiquitinación es mucho mayor en células que coexpresan CHIP con Ataxina-1 [82Q] (**Figura 2C**, carril 3), lo cual es indicativo de que CHIP es capaz de inducir la ubiquitinación de Ataxina-1 [82Q] en estas células.

Como se vio en la introducción CHIP consta de dos dominios principales para llevar a cabo su función, el dominio U box es la zona catalítica de la proteína, y lleva a cabo la reacción de ubiquitinación del sustrato. El dominio TPR es un dominio de interacción proteína-proteína y medía la interacción de CHIP con las chaperonas (McDonough and Patterson, 2003). Para averiguar la función de los distintos dominios de CHIP en la ubiquitinación de Ataxina-1 [82Q], generamos varios constructos de CHIP mutantes. Para investigar el efecto del dominio U box, coexpresamos CHIP con las sustituciones de los aminoácidos: D253N y R254G (mutante en el dominio U-box o CHIP<sup>U box</sup>) con Ataxina-1 [82Q]. Como se muestra en la **Figura 2C** (carril 5), CHIP<sup>U box</sup> no induce la ubiquitinación de Ataxina-1 [82Q] por encima de los niveles basales que se observan en el carril 2. Junto a la observación *in vitro*, esto indica que CHIP ubiquitina directamente a la Ataxina-1 [82Q] en células.

También investigamos el papel de los dominios TPR en la ubiquitinación de Ataxina-1 [82Q] mediada por CHIP. Para ello generamos una construcción de CHIP con un dominio TPR no funcional (K30A o CHIP<sup>TPR</sup>). Como se ve en la **Figura 2C** (carril 6), la función del dominio TPR también es requerida para que CHIP ubiquitine a Ataxina-1 [82Q]. Este resultado sugiere que *in vivo*, las interacciones mediadas por el dominio TPR,

**Figura 2, CHIP ubiquitina a la Ataxina-1 expandida y no expandida. A,** Western blots mostrando los resultados de reacciones de ubiquitinación *in vitro* llevadas a cabo con CHIP y Ataxina-1 [82Q] (membrana de la izqda.) o Ataxina-1 [2Q] (membrana de la dcha.). Carril-1, no se ve ubiquitinación alguna cuando Ataxina-1 [82Q] o [2Q] se incuban en la ausencia de todos los componentes de la maquinaria de ubiquitinación necesarios. De igual manera, no se detecta ubiquitinación de Ataxina-1 [82Q] o [2Q] cuando falta uno de los siguientes componentes: CHIP (E3), UBCH5a (E2) o E1 de conejo (Carriles 2-4 respectivamente). El carril 5 en ambas membranas muestra una clara mancha indicativa de ubiquitinación (Ub-Ataxina-1) cuando bien la Ataxina-1 [82Q] o bien la [2Q] son incubadas en presencia de todos los componentes listados arriba. Las membranas fueron teñidas con policlonal de conejo contra Ataxina-1 (11750 VII). **B,** ensayo de ubiquitinación *in vitro* entre CHIP y Ataxina-1 [82Q] (izqda.) o [2Q] (dcha.) en ausencia o presencia de Hsp70 (todos los demás componentes necesarios están presentes en las reacciones). El carril 1 en ambas membranas muestra que la incubación de Hsp70 con Ataxina-1 [82Q] o [2Q] pero en ausencia de CHIP, no induce ubiquitinación. El carril 2 en ambas membranas muestra algo de ubiquitinación presente (Ub-Ataxina-1) cuando se incuban CHIP y Ataxina-1 [82Q] o [2Q]. La incubación de Ataxina-1 [82Q] o [2Q] con CHIP y Hsp70 a la vez induce un incremento en los niveles de ubiquitinación de Ataxina-1 cuando se compara con el inducido por CHIP solo (comparar carriles 3 y 2 en ambas membranas). **C,** Ensayos de ubiquitinación *in vivo*, en células que expresan F-Ataxina-1 [82Q], Ubiquitina marcada con el epítipo Hemaglutinina (HA-Ubi) y una de las siguientes variantes de CHIP: CHIP salvaje (wt, carril 3), CHIP con un dominio U box mutante (U box, carril 5) o CHIP con un dominio TPR mutante (TPR, carril 6). Carril 1, no se detecta ubiquitinación (HA-Ubi) en controles que solo expresan F-Ataxina-1 [82Q]. Carril 2, se ve algo de ubiquitinación de Ataxina-1 [82Q] cuando las células que la expresan son incubadas con el inhibidor de proteasoma MG-132. Carril 3, la coexpresión de CHIP con F-Ataxina-1 [82Q] induce un incremento de la ubiquitinación de Ataxina-1 en células tratadas con MG-132. Carril 4, No se detecta ubiquitinación en células similares a las del carril 3 pero sin tratamiento de MG-132. Carriles 5 y 6, no se observa un aumento en la ubiquitinación de Ataxina-1 [82Q] en células que coexpresan F-Ataxina-1 [82Q] y las variantes de CHIP: CHIP<sup>U box</sup> y CHIP<sup>TPR</sup>. La inmunoprecipitación de F-Ataxina-1 se llevó a cabo con cuentas conjugadas con anti-FLAG, la membrana se teñió conjuntamente con anticuerpos anti-FLAG (Sigma) y anti-HA (BabCo).

**Figura 2**



seguramente con chaperonas, son necesarias para que CHIP reconozca a la Ataxina-1 [82Q].

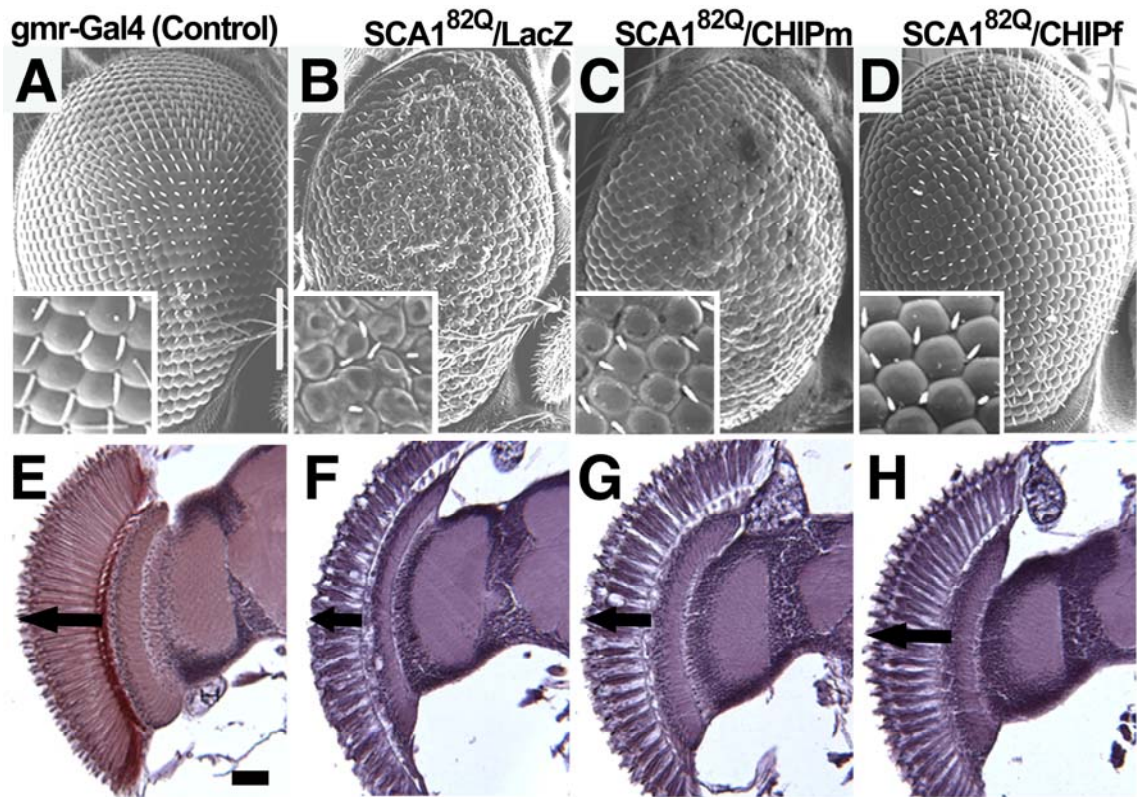
### ***CHIP suprime la toxicidad de la Ataxina-1expandida en un modelo de SCA1 en Drosophila***

La ubiquitinación de Ataxina-1 [82Q] por parte de CHIP y la colocalización de ambas proteínas en INs tanto en cultivo celular como en neuronas de SCA1 indican que CHIP podría proteger de la toxicidad inducida por la Ataxina-1 expandida.

Para investigar esta hipótesis recurrimos al modelo de SCA1 en *Drosophila* desarrollado en nuestro laboratorio. Como se mencionó en la introducción, la expresión de Ataxina-1 [82Q] en el ojo de *Drosophila* (usando el sistema Gal4/UAS) induce un fenotipo degenerativo (Fernandez-Funez, et al., 2000). Generamos moscas transgénicas para sobreexpresar la proteína CHIP humana. Varias líneas *UAS-CHIP* fueron generadas, y escogimos para nuestros experimentos una línea de expresión media y una línea de expresión fuerte a las que nos referiremos como CHIPm y CHIPf respectivamente **Figura 4A**). Usando *gmr-Gal4* para dirigir la expresión de las líneas UAS en el ojo, comparamos los fenotipos de ojo de moscas que expresan Ataxina-1 [82Q] y un transgen neutral (*SCA1<sup>82Q</sup>/UAS-LacZ*) con los de moscas que coexpresaban Ataxina-1 [82Q] y CHIPm o CHIPf (*SCA1<sup>82Q</sup>/CHIPm* y *SCA1<sup>82Q</sup>/CHIPf*). El ojo de *Drosophila* presenta una estructura externa formada por facetas hexagonales (ommatidias) organizadas en líneas paralelas, bien estructuradas y con quetas mecanosensoras en las esquinas (**Figura 3A**). Internamente en la retina de los ojos de *Drosophila* se observan los fotorreceptores, que se extienden de forma alargada entre el cerebro y la córnea (**Figura 3E**). La Ataxina-1 [82Q] induce un fenotipo degenerativo severo en el ojo de *Drosophila*, a nivel externo se observa una fuerte desorganización de las ommatidias, también se observan ommatidias fusionadas, y hay pérdida de las quetas presentes entre las ommatidias (**Figura 3B**). A nivel interno, los fotorreceptores de estos ojos son más cortos y redondeados y hay cierto grado de vacuolización indicativa de degeneración (**Figura 3F**). La coexpresión de CHIP con Ataxina-1 [82Q] suprime los fenotipos degenerativos del ojo tanto a nivel externo, donde se ve una notable mejoría en la organización de las ommatidias y una mayor presencia de quetas (**Figura 3C y D**) como a nivel interno donde se observa que los

**Figura 3, CHIP suprime la degeneración inducida por Ataxina-1 [82Q] en el ojo de *Drosophila*.** **A-D** imágenes de microscopía electrónica de barrido (MEB) y **E-H** secciones frontales de parafina, de ojos que expresan Ataxina-1 [82Q] (*SCA1<sup>82Q</sup>*) y diferentes niveles de CHIP con el driver de ojo *gmr-Gal4*, los genotipos simplificados se muestran sobre los paneles. La expresión de Ataxina-1 [82Q] con una proteína neutral (*SCA182Q/LacZ*) induce una fuerte desorganización de los ommatidios y una reducción fuerte en la longitud de los fotorreceptores (comapre **A** con **B** y **E** con **F**). La coexpresión de Ataxina-1 [82Q] con CHIP suprime tanto la desorganización externa (comparar **B** con **C** y **D**) como la degeneración de la retina (comparar **F** con **G** y **H**) inducidas por la Ataxina-1 [82Q]. Esta supresión es visiblemente mejor con una línea de CHIP de expresión alta (*SCA1<sup>82Q</sup>/CHIPf*) que con una línea de CHIP de expresión media (*SCA1<sup>82Q</sup>/CHIPm*). Genotipos: (**A, E**) *yw; gmr-GAL4/+*. (**B, F**) *UAS-SCA1<sup>82Q</sup>[F7]/yw; gmr-GAL4/UAS-LacZ*. (**C, G**) *UAS-SCA1<sup>82Q</sup>[F7]/yw; gmr-GAL4/+; UAS-CHIPm/+*. (**D, H**) *UAS-SCA1<sup>82Q</sup>[F7]/yw; gmr-GAL4/UAS-CHIPf*. Escala (**A-D**)=100µm; los recuadros de magnificación mayor son de 50µm X 50µm. Escala (**E-H**)=10µm. **A-D**: hechos a 27°C. **E-H**: hechos a 25 °C.

Figura 3



fotorreceptores están más alargados y hay menos vacuolización (**Figura 3G y H**). La calidad de la supresión es dependiente de la cantidad de CHIP que se coexpresa con Ataxina-1 [82Q], ya que la supresión observada con la línea CHIPf es visiblemente superior a la observada con CHIPm (comparar **Figura 3C y G** con **3D y H**).

### ***La expresión de CHIP reduce los niveles de Ataxina-1 [82Q] en vivo***

La interacción genética observada en *Drosophila* sugiere que CHIP induce la degradación de Ataxina-1 [82Q] y de esa manera suprime la degeneración. Para investigar esta idea, analizamos los niveles de Ataxina-1 en moscas que coexpresan Ataxina-1 [82Q] con distintos niveles de CHIP.

Primero detectamos los niveles de Ataxina-1 [82Q] mediante Western blot. Dado que la expresión de Ataxina-1 [82Q] causa una degeneración severa del ojo de adulto, utilizamos discos de ojo larvarios para cuantificar los niveles de Ataxina-1 antes de que se produzca degeneración. Como se muestra en la **Figura 4B**, se detecta menos Ataxina-1 en discos de ojo que coexpresan Ataxina-1 [82Q] y CHIP que en controles que sobreexpresan Ataxina-1 [82Q] y LacZ (comparar carriles 2, 3 y 4). La reducción en los niveles de Ataxina-1 [82Q] es proporcional a la cantidad de proteína CHIP coexpresada.

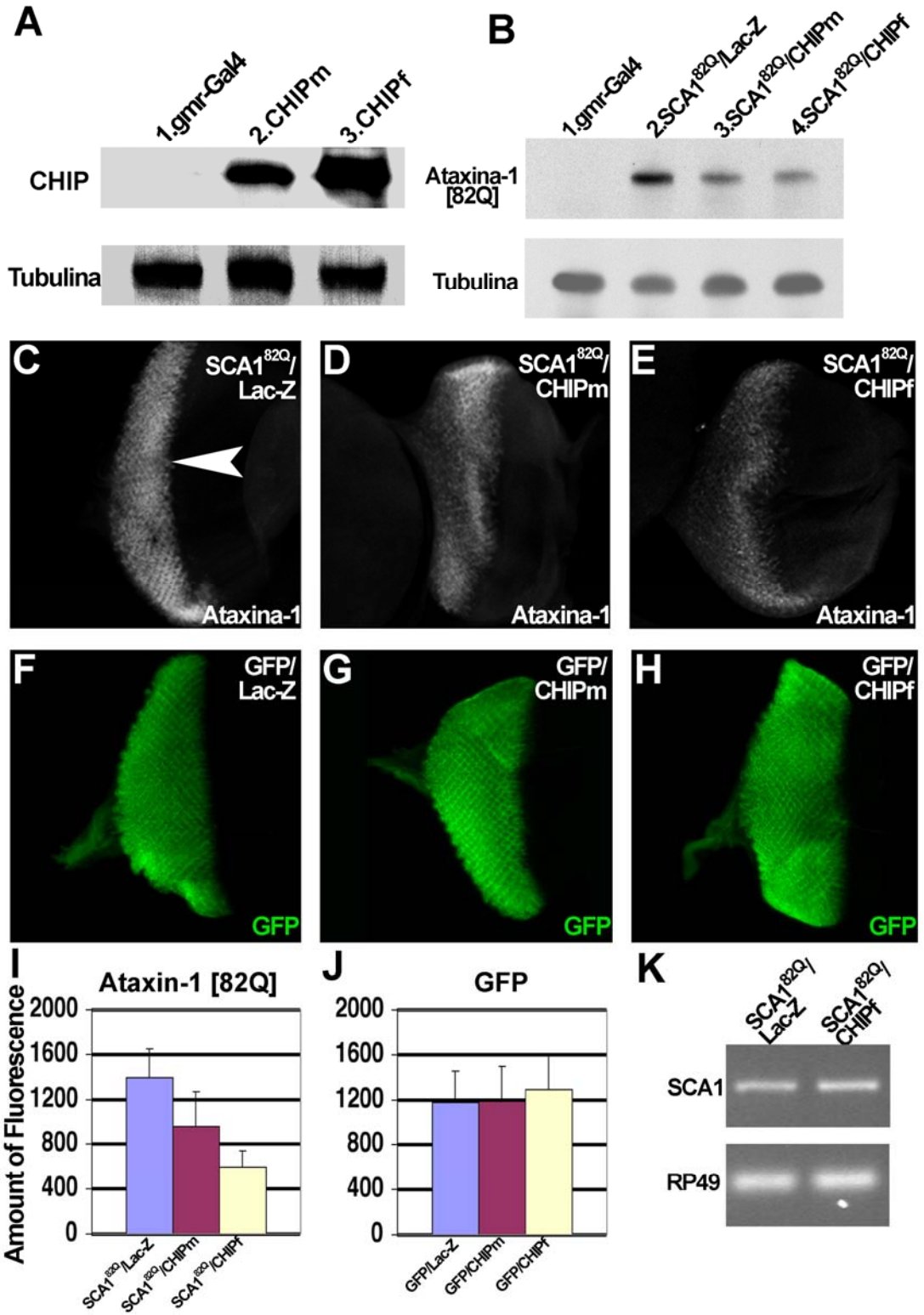
La Ataxina-1 [82Q], como las demás proteínas causantes de PQDs, podría formar agregados insolubles que por lo tanto no son detectables en Western blot. Para resolver esta duda, analizamos los niveles de Ataxina-1 [82Q] mediante inmunofluorescencia, lo cual nos permite detectar tanto la fracción soluble como la fracción agregada de Ataxina-1 [82Q]. Los discos de ojo que sobreexpresan Ataxina-1 [82Q] y CHIP muestran una clara disminución en los niveles de Ataxina-1 [82Q] detectados por inmunofluorescencia en comparación con controles que coexpresan Ataxina-1 [82Q] y LacZ **Figura 4C-E** y cuantificación en **I**). Al igual que se observó en los ensayos de Western, la reducción en los niveles de Ataxina-1 [82Q] es proporcional a la cantidad de CHIP que se coexpresa.

Los resultados mencionados arriba podrían producirse si CHIP interfiriera de alguna manera con el sistema Gal4/UAS. Para analizar esta posibilidad, examinamos si CHIP es capaz de modificar los niveles de GFP expresada de una construcción *UAS-GFP*. La cuantificación de GFP en discos de ojo que coexpresan GFP con diferentes niveles de CHIP, tanto por inmunofluorescencia como por Western blot



**Figura 4, CHIP reduce los niveles de Ataxina-1 en *Drosophila*.** **A**, Western blot en el que se muestran los niveles de expresión de las líneas transgénicas *UAS-CHIPm* y *UAS-CHIPf* en el ojo usando *gmr-Gal4* (cinco cabezas fueron usadas por genotipo). Las membranas fueron teñidas de forma secuencial con policlonal de conejo contra CHIP y monoclonal de ratón anti-Tubulina (como control de carga). **B**, Western blot que muestra los niveles de Ataxina-1 [82Q] presentes en discos de ojo (diez por genotipo) de larvas de la misma edad, de las combinaciones genotípicas indicadas sobre los paneles, expresadas con *gmr-Gal4*. Las membranas fueron teñidas secuencialmente con anti-Ataxina-1 (11NQ) y anti-Tubulina. El carril 1 no muestra señal de Ataxina-1, en controles *gmr-Gal4* solo. El carril 2 muestra los niveles de Ataxina-1 presentes cuando se coexpresa Ataxina-1 [82Q] con una proteína neutral (LacZ). Carriles 3 y 4 muestran un descenso progresivo de los niveles de Ataxina-1 [82Q] cuando se coexpresa con CHIPm o CHIPf respectivamente en los discos de ojo (relación carril2/carril3=1.5, relación carril2/carril4=2.5). **C-E**, tinción por inmunofluorescencia anti-Ataxina-1 e I cuantificación de la señal en discos de ojo que expresan Ataxina-1 [82Q] y distintos niveles de CHIP. **C**, los discos de ojo que coexpresan Ataxina-1 y LacZ muestran tinción para la Ataxina-1 que se extiende desde el surco morfogenético (cabeza de flecha) hasta la parte posterior del disco. La coexpresión de CHIPm (**D**) o CHIPf (**E**) con Ataxina-1 [82Q] causa una disminución en la señal detectada por inmunofluorescencia anti-Ataxina-1 (comparar **C** con **D** y **E** y ver cuantificación en **I**). La disminución de señal observada con la línea CHIPf es mayor que la inducida con CHIPm ( $p < 0.01$  para CHIPm y  $p < 0.001$  para CHIPf, tras análisis con el test de la t de Student; las cuantificaciones se llevaron a cabo en discos de ojo de siete animales por genotipo). **F-H**, tinción por inmunofluorescencia anti-GFP y **J** cuantificación de la señal en discos de ojo que expresan GFP y distintos niveles de CHIP. Nótese que ni CHIPm ni CHIPf inducen una disminución en la intensidad de señal anti-GFP cuando se compara con el control GFP/LacZ. **K**, RT-PCR semicuantitativa llevada a cabo con extractos de discos de ojo (siete animales/genotipo) de los genotipos indicados, expresados con *gmr-Gal4*. La expresión de CHIP no causa cambios en los niveles de ARNm de *SCA1<sup>82Q</sup>*. *RP-49* fue utilizado como control para la reacción y la carga. Genotipos: Control: *yw; gmr-GAL4/+; UAS-LacZ/+*. CHIPm: *yw; gmr-GAL4/+; UAS-CHIPm/+*. CHIPf: *yw; gmr-GAL4/UAS-CHIPf*. SCA1<sup>82Q</sup>/Lac-Z: *UAS-SCA1<sup>82Q</sup>[F7]/yw; gmr-GAL4/+; UAS-LacZ/+*. SCA1<sup>82Q</sup>/CHIPm: *UAS-SCA1<sup>82Q</sup>[F7]/yw; gmr-GAL4/+; UAS-CHIPm/+*. SCA1<sup>82Q</sup>/CHIPf: *UAS-SCA1<sup>82Q</sup>[F7]/yw; gmr-GAL4/UAS-CHIPf*. GFP/Lac-Z: *gmr-GAL4, UAS-CD8:GFP/+; UAS-LacZ/+*. GFP/CHIPm: *gmr-GAL4,UAS-CD8:GFP/+; UAS-CHIPm/+*. GFP/CHIPf: *gmr-GAL4, UAS-CD8:GFP/UAS-CHIPf*.

Figura 4



indica que CHIP no induce una disminución en los niveles de GFP (**Figura 4F-H** y datos no mostrados).

Por último investigamos la posibilidad de que la disminución en los niveles de Ataxina-1 [82Q] observada con CHIP se debiera a una reducción en los niveles del ARNm de *SCAI*<sup>82Q</sup>. Para esto llevamos a cabo reacciones de RT-PCR semicuantitativa para detectar el ARNm de *SCAI*<sup>82Q</sup> en discos de ojo larvarios que coexpresan *SCAI*<sup>82Q</sup> y *LacZ* o *SCAI*<sup>82Q</sup> y *CHIPf*. Como se muestra en la **Figura 4K**, los niveles de ARNm de *SCAI*<sup>82Q</sup> son similares en el contexto de *CHIPf* o *LacZ*. Los resultados con los niveles de GFP y de ARNm indican que el efecto de CHIP sobre Ataxina-1 [82Q] es a nivel de la proteína.

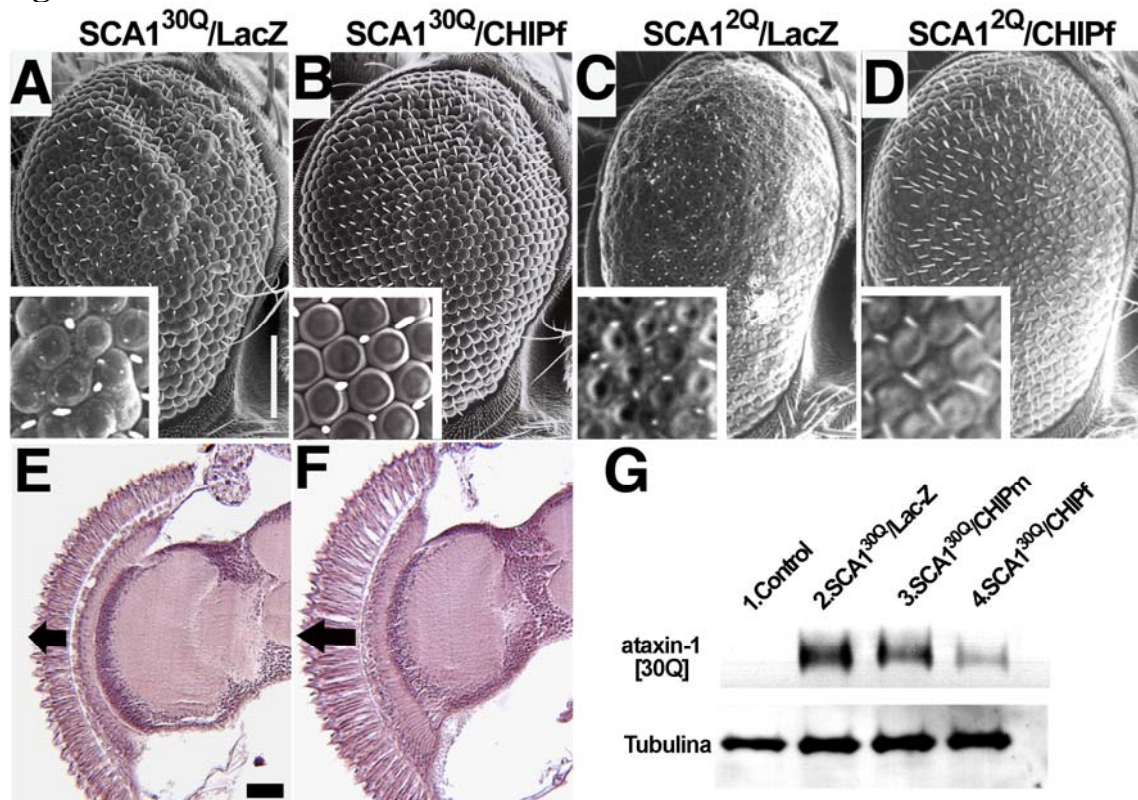
### ***CHIP suprime la toxicidad de Ataxina-1 no expandida e induce una reducción en sus niveles***

Dado que CHIP induce la ubiquitinación de la Ataxina-1 [2Q] y ambas proteínas interaccionan en ensayos de co-IP (**Figura 2**), quisimos analizar el resultado funcional de esta interacción in vivo. Investigamos el efecto de coexpresar CHIP junto con dos variantes de Ataxina-1 no expandida: Ataxina-1 [30Q] y Ataxina-1 [2Q] (*SCAI*<sup>30Q</sup> y *SCAI*<sup>2Q</sup>). La línea de Ataxina-1 [30Q] utilizada expresa a niveles cuatro veces superiores a los de la línea de Ataxina-1 [82Q] mostrada en la **Figura 3**. En estas condiciones, la Ataxina-1 [30Q] induce un fenotipo externo débil en el ojo a 29°C **Figura 5A**, y a 27°C causa una reducción en la longitud de los fotorreceptores similar a la observada con Ataxina-1 [82Q] **Figura 5E**. La línea de Ataxina-1 [2Q] expresa a niveles seis veces superiores a los de la línea de Ataxina-1 [82Q] y causa un fenotipo ligeramente más fuerte que ésta **Figura 5C**. La coexpresión de *CHIPf* con estas líneas de Ataxina-1 no expandida induce una supresión de los fenotipos degenerativos causados por las mismas. CHIP reduce la desorganización externa inducida por Ataxina-1 [30Q] y [2Q] (**Figura 5B y D**) así como el fenotipo causado en los fotorreceptores por la Ataxina-1 [30Q] (**Figura 5F**).

También comparamos los niveles de Ataxina-1 [30Q] en discos de ojo que coexpresan Ataxina-1 [30Q] y *LacZ* con los de ojos que coexpresan Ataxina-1 [30Q] y *CHIPm* o *CHIPf*. Al igual que sucede en el caso de Ataxina-1 [82Q], los niveles de

**Figura 5, CHIP suprime la toxicidad de la Ataxina-1 no expandida e induce una disminución de sus niveles en *Drosophila*. A-B**, imágenes de MOB y **E-F**, secciones frontales de parafina, de ojos que coexpresan Ataxina-1 [30Q] con LacZ o con CHIPf. La expresión de Ataxina-1 [30Q] a niveles superiores a los de la Ataxina-1 [82Q] de la **Figura 3**, muestran una leve desorganización de los ommatidios (**A** comparar con **Figura 3A**), y una reducción en la extensión de los fotorreceptores similar a la causada por Ataxina-1 [82Q] (comparar **E** con **Figura 3E-F**). La coexpresión de la línea CHIPf con la Ataxina-1 [30Q] suprime tanto el fenotipo de desorganización externa, como el fenotipo de los fotorreceptores (**B** y **F**). **C-D**, imágenes de MEB de ojos que coexpresan Ataxina-1 [2Q] con LacZ o con CHIPf. La expresión de Ataxina-1 [2Q] a niveles seis veces superiores a los de Ataxina-1 [82Q] induce una degeneración severa de la estructura externa del ojo (**C**, comparar con **Figura 3A**). La coexpresión de CHIPf con Ataxina-1 [2Q] causa una supresión de su toxicidad. Nótese la mejor organización de las facetas externas y la mejoría en las quetas (comparar **C** y **D**). **G**, Western blot mostrando los niveles de Ataxina-1 [30Q] en ojos de moscas (cinco por genotipo) de los genotipos indicados, expresados con *gmr-Gal4*. Carril 1, no hay señal de Ataxina-1 en los controles negativos. Carril 2, niveles de Ataxina-1 presentes en moscas que coexpresan Ataxina-1 [30Q] y LacZ. Carriles 3 y 4, descenso en los niveles de Ataxina-1 en moscas que coexpresan Ataxina-1 [30Q] con CHIPm o CHIPf respectivamente. Genotipos: SCA1<sup>30Q</sup>/LacZ: UAS- SCA1<sup>30Q</sup>[F1]/yw; *gmr-GAL4*/+; UAS-LacZ/+. SCA1<sup>30Q</sup>/CHIPm: UAS- SCA1<sup>30Q</sup>[F1]/yw; *gmr-GAL4*/+; UAS-CHIPm/+. SCA1<sup>30Q</sup>/CHIPs: UAS- SCA1<sup>30Q</sup> [F1]/yw; *gmr-GAL4*/UAS-CHIPs. SCA1<sup>2Q</sup>/LacZ: UAS- SCA1<sup>2Q</sup>[F5]/yw; *gmr-GAL4*/+; UAS-LacZ/+. SCA1<sup>2Q</sup>/CHIPf: UAS- SCA1<sup>2Q</sup> [F5]/yw; *gmr-GAL4*/UAS-CHIPf. Escala en **A-D**=100µm; los recuadros son de 50µmX50µm. Escala en **E-F**=10µm. **A-B** se crecieron a 29°C y **C-F** a 27°C.

Figura 5



Ataxina-1 [30Q] son menores en presencia de CHIP (**Figura 5G**, comparar carriles 2, 3 y 4), y esto es proporcional a la cantidad de CHIP que se coexpresa (**Figura 5G**, comparar carriles 3 y 4), indicando que CHIP también induce la degradación de la Ataxina-1 no expandida en vivo.

### ***El contexto proteico influye en la protección de CHIP contra la toxicidad de poliglutaminas expandidas***

Las observaciones de que CHIP suprime la toxicidad tanto de la Ataxina-1 expandida como de la no expandida, sugieren que el esqueleto proteico es importante para que CHIP lleve a cabo su acción neuroprotectora.

Comparamos la capacidad de CHIP para proteger de la toxicidad de una expansión similar de poliglutaminas pero en distintos contextos proteicos. Primero analizamos el efecto de CHIP sobre la toxicidad de un fragmento de [127Q] al cual se añadió un epítipo Hemaglutinina (*UAS-127Q-HA*). La expresión de *127Q-HA* en el ojo de *Drosophila* causa un fuerte fenotipo degenerativo (Kazemi-Esfarjani and Benzer, 2000) con una desorganización externa severa y pérdida de algunas quetas (**Figura 6A**). La estructura interna de estos ojos revela una fuerte degeneración con abundante vacuolización y una reducción dramática de la extensión de la capa de fotorreceptores (**Figura 6**, comparar **C** con **E**). La **Figura 6B** y **D** muestran que la coexpresión de CHIPf no es capaz de suprimir los fenotipos degenerativos causados por 127Q-HA.

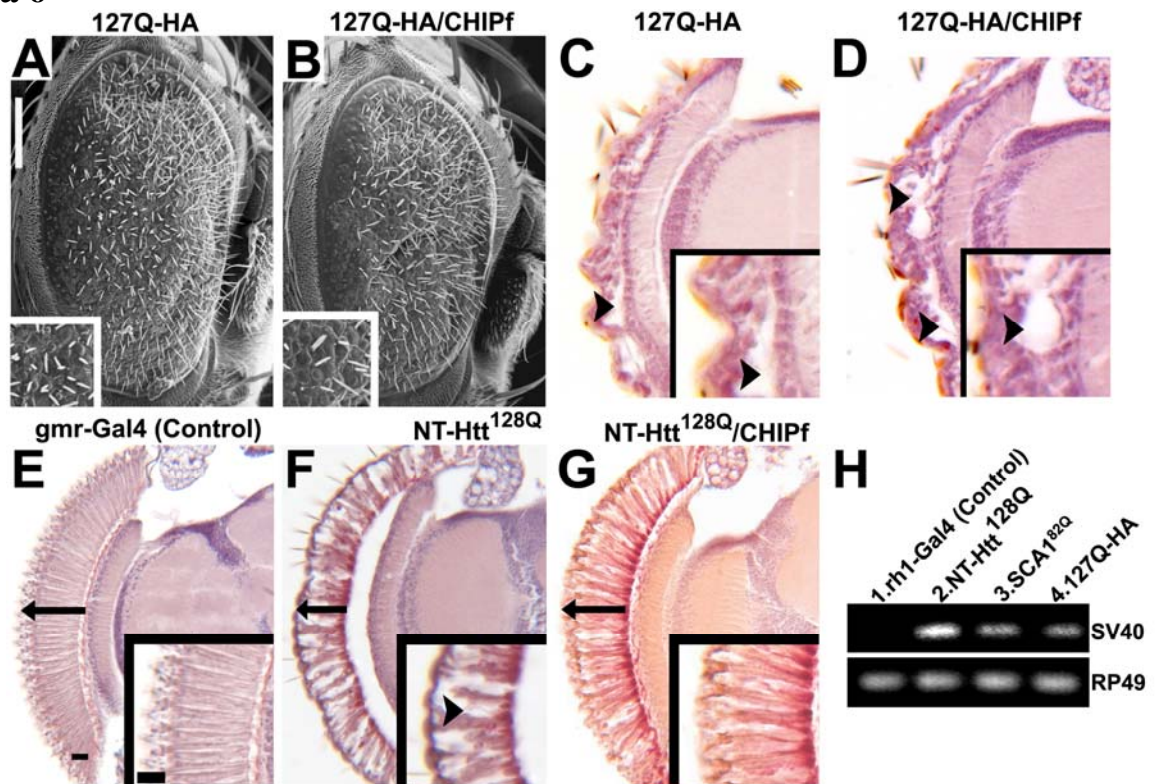
También analizamos el efecto de CHIP sobre la toxicidad inducida por un péptido compuesto por los aminoácidos de la región N-terminal de la Huntingtina expandida (aa:1-276), en los que se engloba un fragmento de 128Q (NT-Htt[128Q]). La expresión del péptido NT-Htt[128Q] en el ojo (con *gmr-Gal4*) no induce un fenotipo externo visible (datos no mostrados). Sin embargo, a nivel interno el péptido NT-Htt[128Q] causa una degeneración progresiva, caracterizada por una severa vacuolización y pérdida de fotorreceptores claramente visible a día 6 (**Figura 6** comparar **F** con **E**). Como se muestra en la **Figura 6G** CHIPf es un fuerte supresor de la toxicidad inducida por NT-Htt[128Q] en la retina.

Los diferentes efectos que la coexpresión de CHIP ejerce sobre las diferentes proteínas utilizadas en estos experimentos (Ataxina-1 [82Q], 127Q-HA y NT-Htt[128Q]) podría tener que ver con los niveles de expresión relativos de los distintos transgenes. Para

**Figura 6, el esqueleto proteico influye en la capacidad de CHIP para proteger de la toxicidad inducida por poliglutaminas expandidas. A-B**, imágenes de MEB y **C-D**, secciones frontales de parafina con ojos de *Drosophila* que coexpresan 127Q-HA con GFP (**A, C**) o con CHIPf (**B, D**). La expresión de 127Q-HA en el ojo induce un alisamiento de la superficie externa, y una desorganización severa de los ommatidios (**A**) además de una fuerte degeneración de la retina con abundante vacuolización (**C**). La coexpresión de CHIPf con 127Q-HA no modifica de estos fenotipos degenerativos (**B** y **D**). **E-G**, secciones de parafina horizontales, de ojos de moscas control (*gmr-Gal4*, **E**) o moscas que coexpresan NT-Htt[128Q] con GFP (**F**) o con CHIPf (**G**). Todas las retinas son de animales cinco días post-eclosión. La expresión de NT-Htt[128Q] induce una degeneración severa de la retina tras cinco días a 25°C, aparente tanto en la reducción de la extensión de los fotorreceptores (flecha en **F**) como en la abundante vacuolización (cabeza de flecha en recuadro de **F**). La coexpresión de CHIPf con NT-Htt[128Q] suprime el fenotipo mostrado en **F**. Note la mejoría a nivel de extensión de los fotorreceptores (flecha en **G**) y la reducción de la vacuolización (recuadro en **G**). **H**, RT-PCR semicuantitativa llevada a cabo con moscas control (*rh1-Gal4*) o moscas que expresan *NT-Htt[128Q]*, *SCA1<sup>82Q</sup>* o *127Q-HA* bajo el control de *rh1-Gal4*. La RT-PCR fue diseñada de forma que detecte la secuencia de terminación de transcripción (de SV40), presente en todas las construcciones UAS, ya que es parte del vector pUAST. *RP49* fue usado como control de carga para la reacción. Los carriles 2-4 muestran que la línea *UAS-127Q-HA* utilizada tiene niveles de expresión inferiores a los de *NT-Htt[128Q]* o *SCA1<sup>82Q</sup>*, las cuales presentan niveles de expresión similares. Genotipos: (**A, C**) *yw; gmr-GAL4, UAS-127Q HA/UAS-eGFP; +*. (**B, D**) *yw; gmr-GAL4, UAS-127Q HA/UAS-CHIPf; +*. (**E**) *yw ; gmr-GAL4/+*. (**F**) *yw; gmr-GAL4/UAS-eGFP; UAS-NT-Htt[128Q] /+*. (**G**) *yw; gmr-GAL4/+; UAS-NT-Htt[128Q] / UAS-CHIPf*. (**H**) Control: *rh1-GAL4/+*. NT-Htt[128Q]: *rh1-GAL4/+; +; UAS-NT-Htt[128Q]/+*. SCA1<sup>82Q</sup>: *rh1-GAL4/SCA1<sup>82Q</sup>[F7]*. 127Q-HA: *rh1-GAL4/+; UAS-127Q-HA/+*. **A-B**, cruces hechos a 25°C. Escala=100 µm y recuadros de 50µm X 50µm. **C-G**, cruces hechos a 25°C, escala= 10 µm.



Figura 6





investigar esta posibilidad, llevamos a cabo reacciones de RT-PCR semicuantitativa en moscas de un día de edad que expresaban los distintos transgenes con un Gal4 de expresión tardía (~70% pupa) en el ojo (*rhl-Gal4*). Usamos este Gal4, para evitar modificaciones que pudieran estar causados por la degeneración celular inducida cuando estas proteínas tóxicas se expresan con *gmr-Gal4*. En la **Figura 6H** se muestra que *UAS-127Q-HA*, el transgen que causa los niveles más altos de toxicidad, es expresado a niveles más bajos que los transgenes *SCAI<sup>82Q</sup>* y *NT-Htt[128Q]*. Por lo tanto los niveles de expresión de *UAS-127Q-HA* no explican porque CHIP es incapaz de suprimir la toxicidad inducida por el péptido 127Q-HA.

## 4.2 La Ataxina-2 contribuye a la toxicidad inducida por Ataxina-1 expandida

### ***Introducción***

Como se vio en la introducción, a pesar de tener un origen genético heterogéneo, las diferentes ataxias de herencia dominante presentan como síntoma común la degeneración del cerebelo. Además en el caso de las SCAs originadas por expansión de poliglutaminas, se ha observado que varias de las proteínas causantes interactúan a nivel molecular y colocalizan en INs (Lim, et al., 2006, Uchihara, et al., 2001). Por otro lado se ha visto que varias de las proteínas causantes de ataxia comparten interacciones con proteínas comunes. Estos datos indican que podrían existir relaciones funcionales entre las distintas proteínas causantes de ataxia, que desencadenan mediante mecanismos similares la degeneración cerebelar observada en estas enfermedades.

En un *screen* genético llevado a cabo en nuestro laboratorio, se identificó al *EP3145* como un potenciador del fenotipo inducido por la Ataxina-1 [82Q]. El *EP3145* es una inserción de un elemento transponible (EP) en la región 5' del gen *dAtx2*, homólogo en *Drosophila* de la *Ataxina-2* humana. Los EPs son elementos transponibles basados en los elementos P, pero que contienen una secuencia UAS, de forma que si el EP se inserta en la misma orientación que un gen X, en la zona del promotor o del ORF, puede inducir la sobreexpresión de dicho gen X en presencia de Gal4 (Rorth, et al., 1998). Los análisis moleculares revelaron que el *EP3145* está insertado 3121 pares de bases antes del codón de inicio de traducción (ATG) del gen *dAtx2* y en la misma orientación (5'-3'), sugiriendo que el potenciamiento del fenotipo de Ataxina-1 [82Q] causado por *EP3145* podría deberse a la sobreexpresión de *dAtx2*. Esta observación nos incitó a investigar la posible interacción entre Ataxina-1 y Ataxina-2, dos proteínas responsables de SCAs.

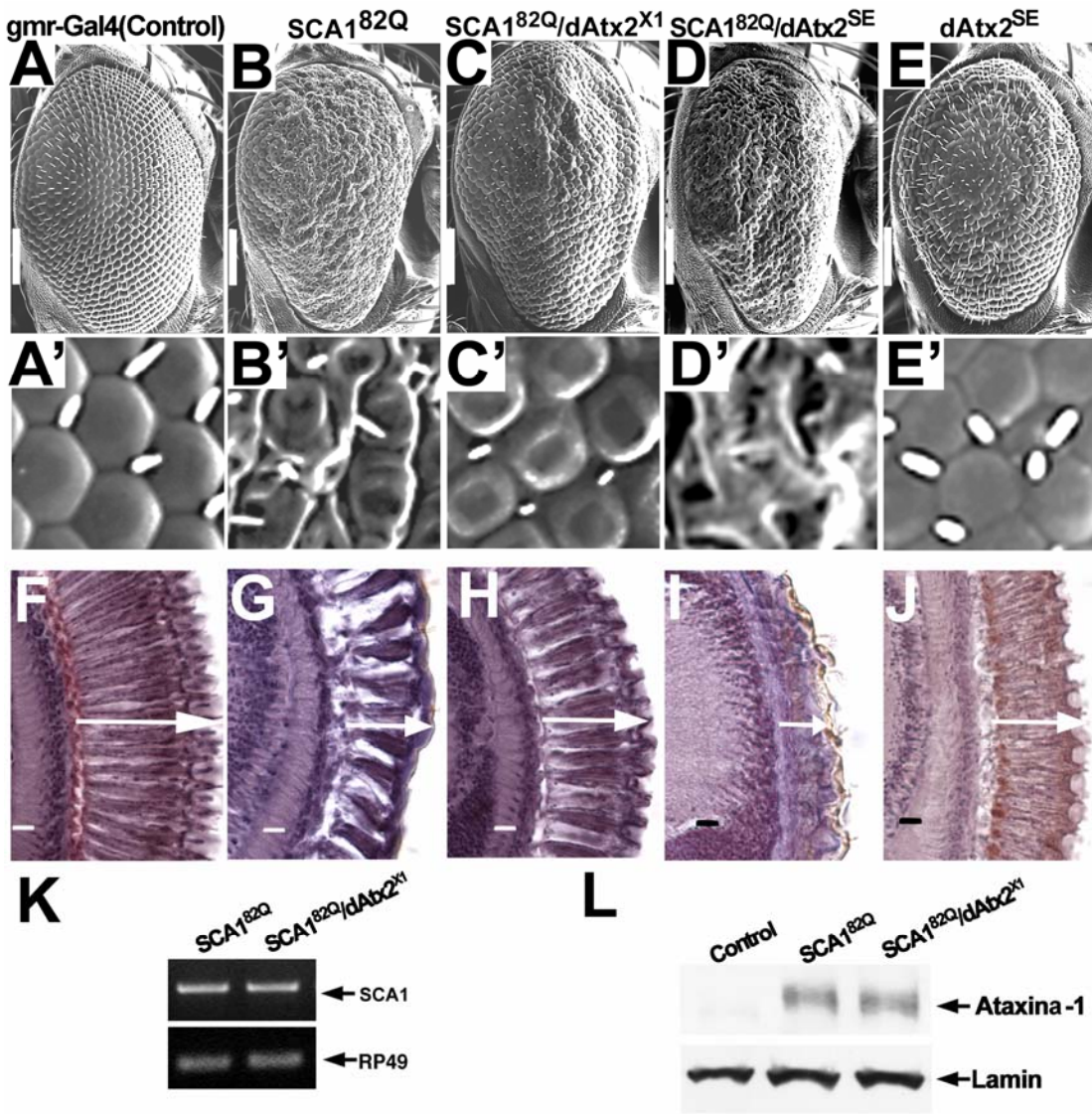
## **Aumentar los niveles de dAtx2 potencia la toxicidad de Ataxina-1 [82Q] y su disminución la suprime**

Para confirmar el resultado obtenido en nuestro *screen*, y aclarar si en verdad el potenciamiento del fenotipo de Ataxina-1 [82Q] en el ojo con el *EP3145* se debe a que este EP induce la sobreexpresión de Ataxina-2 de *Drosophila* (dAtx2), utilizamos moscas transgénicas con una construcción para sobreexpresar la forma salvaje de dAtx2 bajo el control de una secuencia UAS (*dAtx2<sup>SE</sup>*). Como se ve en la **Figura 7D, I** la coexpresión de UAS-dAtx2 con Ataxina-1 [82Q] (*SCAI<sup>82Q</sup>/dAtx2<sup>SE</sup>*) induce un fuerte potenciamiento del fenotipo causado por Ataxina-1 [82Q] (*SCAI<sup>82Q</sup>*, comparar **Figura 7D-B y I-G**). Externamente las moscas *SCAI<sup>82Q</sup>/dAtx2<sup>SE</sup>* presentan una mayor desorganización de los ommatidios, y muestran una total ausencia de quetas en comparación con moscas *SCAI<sup>82Q</sup>*. A nivel interno, la capa de fotorreceptores en moscas *SCAI<sup>82Q</sup>/dAtx2<sup>SE</sup>* es más estrecha que en moscas *SCAI<sup>82Q</sup>*. Notese que la sobreexpresión de los mismos niveles de dAtx2 en el ojo por si misma también induce cierta desorganización tanto a nivel externo como en la retina (**Figura 7E y J** y (Satterfield, et al., 2002)).

Para investigar la especificidad de la interacción Ataxina-1 [82Q]–dAtx2, analizamos el efecto que tendría sobre la toxicidad de Ataxina-1 [82Q] la disminución en los niveles de dAtx2. Para esto, utilizamos una delección de 1.4 kb en locus de *dAtx2* que elimina parte del promotor del gen, el ATG de inicio de transcripción y se extiende en el primer intrón. Este alelo al que nos referiremos como *dAtx2<sup>XI</sup>*, ha sido previamente descrito como una fuerte falta de función de dAtx2, que causa la ausencia de proteína cuando está en homocigosis (Satterfield, et al., 2002). En moscas que expresan Ataxina-1 [82Q] y que son heterocigóticas para el alelo *dAtx2<sup>XI</sup>* (*SCAI<sup>82Q</sup>/dAtx2<sup>XI</sup>*) se observa que el fenotipo de Ataxina-1 [82Q] es suprimido en comparación con moscas que expresan solo Ataxina-1 [82Q] (*SCAI<sup>82Q</sup>*) (comparar **Figura 7C-B y H-G**). Los ojos de moscas *SCAI<sup>82Q</sup>/dAtx2<sup>XI</sup>* muestran una mejor disposición de los ommatidios y las quetas en comparación con ojos de moscas *SCAI<sup>82Q</sup>* (**Figura 7 C-B**). La supresión también es evidente en la retina, donde se ve que los fotorreceptores de moscas *SCAI<sup>82Q</sup>/dAtx2<sup>XI</sup>* son alargados y sin espacios entre medias (**Figura 7 H-G**), similares a los de moscas control (*gmr-Gal4*, **Figura 7A**).

**Figura 7, Menos dAtx2 suprime y más dAtx2 potencia la toxicidad de Ataxina-1 [82Q] en el ojo de *Drosophila*.** (A-E') imágenes de ojos tomadas con m.e.b. y (F-J) secciones de parafina de retinas, de moscas control o moscas que sobreexpresan Ataxina-1 [82Q] con diferentes niveles de dAtx2. (A, A' y F) ojo de una mosca control (*gmr-GAL4*) mostrando una perfecta organización de las facetas y quietas a nivel externo, y a nivel interno se ve una retina ancha con fotorreceptores alargados y sin espacios. (B, B' y G) efecto de la sobreexpresión de Ataxina-1 [82Q] en el ojo de *Drosophila*. A nivel externo se observa una superficie rugosa de facetas malformadas cuya distribución es desorganizada. A nivel interno los fotorreceptores son más acortados que en el control, aparecen en menor número y con espacios entre ellos. (C, C' y H) efecto de bajar los niveles de dAtx2 en el ojo de moscas que sobreexpresan Ataxina-1 [82Q]. A nivel externo los ojos  $SCA1^{82Q}/dAtx2^{X1}$  muestran una mejor organización que los ojos  $SCA1^{82Q}$  con hileras paralelas de omatidios, y mejor distribución de las quietas. A nivel interno, los fotorreceptores están mejor organizados, son más alargados, y sin grandes espacios entre ellos. (D, D' e I) Efecto de aumentar los niveles de dAtx2 en moscas que sobreexpresan Ataxina-1 [82Q]. A nivel externo, los ojos de moscas  $SCA1^{82Q}/dAtx2^{SE}$  muestran una superficie más desorganizada que la de ojos que expresan Ataxina-1 [82Q] con niveles normales de dAtx2, en estos ojos  $SCA1^{82Q}/dAtx2^{SE}$  además las quietas están prácticamente ausentes. A nivel interno, los fotorreceptores están altamente degenerados, no se distingue una organización clara y la retina está muy acortada cuando se compara con moscas  $SCA1^{82Q}$ . (E, E' y J) efecto de aumentar solo los niveles de dAtx2 en el ojo de *Drosophila*. Estos ojos presentan cierto nivel de desorganización en comparación con controles *gmr-GAL4*. A nivel interno la capade receptores es más acortada que en controles *gmr-GAL4*. (K) RT-PCR para detectar los niveles de ARNm de *SCA1* en moscas que expresan Ataxina-1 [82Q] con niveles normales de dAtx2 ( $SCA1^{82Q}$ ) o moscas con niveles reducidos de dAtx2 ( $SCA1^{82Q}/dAtx2^{X1}$ ). El ARNm de RP49 se utiliza como control de carga. (L) western blot mostrando los niveles de Ataxina-1 en moscas control (*gmr-GAL4*) y en moscas que expresan Ataxina-1 [82Q] en fondo normal ( $SCA1^{82Q}$ ) o en fondo heterocigótico mutante para dAtx2 ( $SCA1^{82Q}/dAtx2^{X1}$ ). Genotipos: (A-L): Control: *yw/+; gmr-GAL4/UAS-LacZ*.  $SCA1^{82Q}$ : *UAS- SCA1<sup>82Q</sup> [F7]/yw; gmr-GAL4/+*.  $SCA1^{82Q}/dAtx2^{X1}$ : *SCA1<sup>82Q</sup> [F7]/yw; gmr-GAL4/+; dAtx2<sup>X1</sup>/+*.  $SCA1^{82Q}/dAtx2^{SE}$ : *UAS-SCA1<sup>82Q</sup> [F7]/yw; gmr-GAL4/UAS-dAtx2 [4]*.  $dAtx2^{SE}$ : *gmr-GAL4/UAS- dAtx2 [4]*. (A-E) m.e.b barra=100µm. (A'-E') 30µm X 30µm. (F-J) barra=10µm. Los cruces fueron hechos a 27°C.

**Figura 7**



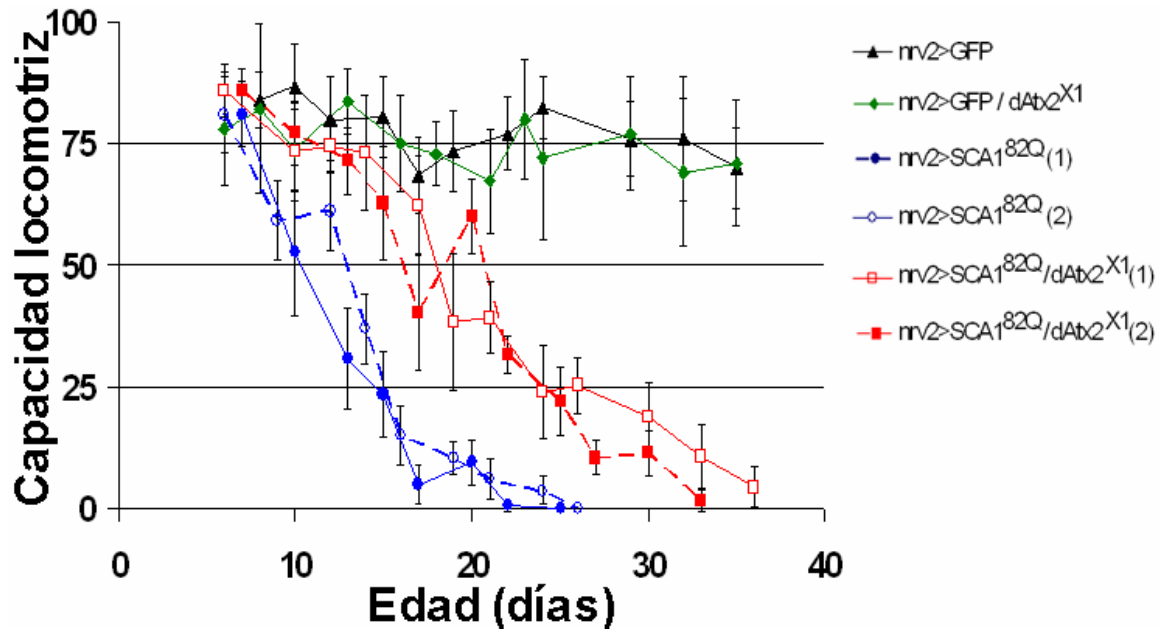
Dada la posibilidad de que la dAtx2 sea una proteína de unión a ARN, quisimos investigar si la reducción de los niveles de dAtx2 induce cambios en los niveles bien del ARNm de *SCAI*<sup>82Q</sup> o bien en los niveles de la proteína Ataxina-1 [82Q] que expliquen la interacción observada. Como se muestra en la **Figura 7 K-L**, la alteración de los niveles de dAtx2 no afecta ni a los niveles de ARNm de *SCAI*<sup>82Q</sup> ni a los niveles de la proteína Ataxina-1 [82Q].

### ***La reducción de los niveles de dAtx2 suprime la toxicidad de Ataxina-1 [82Q] en el sistema nervioso de Drosophila***

Para comprobar que la interacción genética entre Ataxina-1 y dAtx2 no se limita al ojo, analizamos la interacción genética de Ataxina-1 [82Q] y dAtx2 en el sistema nervioso (SN) de *Drosophila*.

La capacidad locomotriz de las moscas disminuye en función de la edad, esto se puede cuantificar usando un ensayo denominado “ensayo de trepar” (traducción literal de “climbing assay”)(Ganetzky and Flanagan, 1978). Este ensayo consiste en medir el número de moscas que suben, en un tubo de ensayo, hasta una cierta altura y en un tiempo determinando (ver materiales y métodos para procedimientos exactos) y ha sido usado para cuantificar el efecto de proteínas tóxicas en otros modelos de enfermedades neurodegenerativas en *Drosophila* (Feany and Bender, 2000, Iijima, et al., 2004). Para nuestro experimento utilizamos el GAL4 de sistema nervioso *nrv2-Gal4*. Las moscas control (*nrv2-Gal4*) no muestran una pérdida significativa de su capacidad locomotriz hasta una edad muy avanzada. En la **Figura 8** se muestra que ~74% de las moscas control sigue subiendo tras 36 días (triángulos). Por otro lado, las moscas que expresan Ataxina-1 [82Q], muestran un deterioro progresivo de su capacidad locomotriz, **Figura 8**, círculos). En el contexto del ciclo vital de *Drosophila*, este fenotipo equivale a una edad mediana y es progresivo, comparado con la capacidad de las moscas control en el mismo periodo de tiempo. La disminución de los niveles de dAtx2 suprime el fenotipo causado por Ataxina-1 [82Q]. Las moscas *SCAI*<sup>82Q</sup>/*dAtx2*<sup>X1</sup> muestran una mejor capacidad locomotriz en comparación con moscas *SCAI*<sup>82Q</sup> con niveles normales de dAtx2 (**Figura 8**, cuadrados). Nótese que mientras que todos los animales *SCAI*<sup>82Q</sup> han

**Figura 8**



**Figura 8, Menos dAtx2 suprime la toxicidad de Ataxina-1 [82Q] en el sistema nervioso de *Drosophila*.** Gráfica mostrando la capacidad locomotriz de moscas de los genotipos indicados representada como: %de moscas que llegan a una línea de 5cm en 18''/Día. Cada punto mostrado equivale a la media de 10 repeticiones hecha ese día y cada línea representa una réplica independiente, las barras de error representan la desviación estándar. En moscas control con el Gal4 de sistema nervioso *nrv2-Gal4* y niveles normales de dAtx2 (*nrv2-Gal4>GFP*, línea negra con triángulos) o moscas con *nrv2-Gal4* y niveles reducidos de dAtx2 (*nrv2-Gal4>GFP/dAtx2<sup>X1</sup>*, línea verde con rombos) no detecta una degeneración significativa de la capacidad locomotriz durante los primeros 36. La sobreexpresión de Ataxina-1 [82Q] en el sistema nervioso de *Drosophila* (*nrv2-Gal4>SCA1<sup>82Q</sup>*, líneas azules con círculos) da lugar a una degeneración paulatina de su capacidad locomotriz que desemboca en una incapacidad absoluta para trepar alrededor del día 26. La disminución de los niveles de dAtx2 en moscas que expresan Ataxina-1 [82Q] en el sistema nervioso (*nrv2-Gal4>SCA1<sup>82Q</sup>/dAtx2<sup>X1</sup>*, líneas rojas con cuadrados) resulta en una supresión parcial del fenotipo inducido por Ataxina-1 [82Q]. La pendiente de pérdida de capacidad locomotriz se suaviza, y estos animales aún son capaces de trepar pasado el día 32. Genotipos: *nrv2>GFP*: +; *nrv2-GAL4/UAS-eGFP*. *nrv2> SCA1<sup>82Q</sup>*: +; *nrv2-GAL4/+*; *UAS-SCA1<sup>82Q</sup> [M6]/+*. *nrv2> SCA1<sup>82Q</sup>/dAtx2<sup>X1</sup>*: +; *nrv2-GAL4/+*; *UAS-SCA1<sup>82Q</sup> [M6]/dAtx2<sup>X1</sup>*. Experimentos llevados a cabo a 27°C.

parado de trepar tras 26 días, ~25% de los animales  $SCAI^{82Q}/dAtx2^{X1}$  aún son capaces de trepar. De modo que la discapacidad locomotriz inducida por la Ataxina-1 [82Q] es suprimida al disminuir los niveles endógenos de dAtx2.

### **Los niveles de dAtx2 modulan la pérdida de mecanorreceptores inducida por Ataxina-1 [82Q]**

Como se explico en la introducción, Senseless (Sens) es un factor proneural expresado en las células precursoras de órganos sensoriales (POS) y es requerido para el desarrollo normal de quetas mecanoreceptoras en *Drosophila* (Nolo, et al., 2000). La expresión de Ataxina-1 [82Q] en las células POS torácicas usando el GAL4 *scabrous-GAL4* (*sca-GAL4*) induce una reducción en los niveles de la proteína Sens con la consiguiente pérdida de las quetas mecanoreceptoras grandes (macroquetas) presentes en el tórax de moscas adultas (Tsuda, et al., 2005). Por lo tanto, el número de macroquetas torácicas en animales que expresen Ataxina-1 [82Q] nos proporciona un fenotipo cuantitativo con una causa molecular que conocemos.

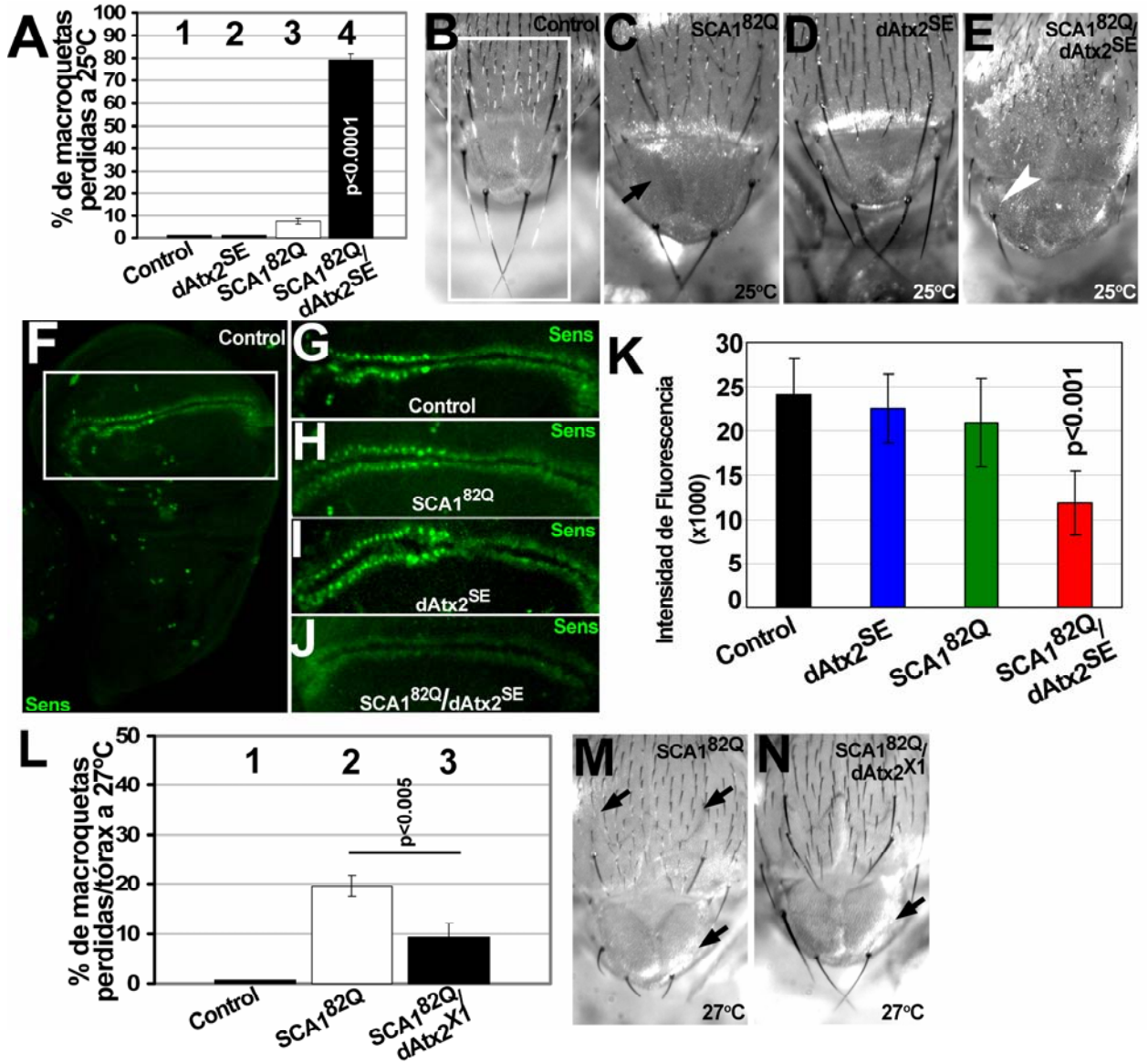
Quisimos investigar el efecto de alterar los niveles de dAtx2 sobre el fenotipo de pérdida de macroquetas inducido por Ataxina-1 [82Q]. Como se muestra en la **Figura 9 A (comparar columnas 1 y 3 y Figura 9B con C)** la expresión de Ataxina-1 [82Q] a niveles bajos (25°C) en las células POS induce una leve disminución (~9%) en el número de macroquetas que tienen estos animales en comparación con controles *sca-GAL4*. El aumento de los niveles de dAtx2, mediante la coexpresión de dAtx2 salvaje con Ataxina-1 [82Q] ( $SCAI^{82Q}/dAtx2^{SE}$ ) potencia la pérdida de macroquetas inducida por Ataxina-1 [82Q]. La cuantificación en la **Figura 9 A (columna-4)** muestra una disminución en el número de macroquetas de ~80% en los animales  $SCAI^{82Q}/dAtx2^{SE}$  comparado con controles *sca-GAL4*. La severidad de esta interacción queda ilustrada en la **Figura 9E**. Este potenciamiento del fenotipo de Ataxina-1 [82Q] constituye una interacción sinérgica entre Ataxina-1 [82Q] y dAtx2, ya que la sobreexpresión de los mismos niveles de dAtx2 por si misma ( $dAtx2^{SE}$ ) no causa una pérdida significativa de macroquetas **Figura 9 A(columna 2) y Figura 9D**.

También investigamos si la interacción entre dAtx2 y Ataxina-1 [82Q] causaría una alteración en los niveles de Sens. Para ello teñimos discos de ala larvarios con anti-



**Figura 9, los niveles de dAtx2 modulan la pérdida mecanoreceptores inducida por Ataxina-1 [82Q].** (A) % de macroquetas torácicas perdidas, de un total de 26, en moscas de los genotipos indicados, crecidas a 25°C. **Columnas 1 y 2**, no se detecta pérdida alguna de macroquetas en moscas control (*scabrous-Gal4*) o tras la sobre-expresión de dAtx2 en las células precursoras de órganos sensoriales (POS) torácicas con el Gal4 *sca-Gal4* (*dAtx2<sup>SE</sup>*) respectivamente. **Columna 3**, la expresión de Ataxina-1 [82Q] en las células POS torácicas (*SCA1<sup>82Q</sup>*) induce una leve pérdida (~10%) de quetas a 25°C ( $p < 0.0001$ ). **Columna 4**, la coexpresión de Ataxina-1 [82Q] y dAtx2 (*SCA1<sup>82Q</sup>/dAtx2<sup>SE</sup>*) en las células POS torácicas causa la pérdida de ~80% de las macroquetas torácicas ( $p < 0.0001$ ). Barras=s.e.m. (B-E) Detalle de las macroquetas presentes en la parte posterior del *notum* y en el *scutelum* (marcados por rectángulo blanco) en moscas de los mismos genotipos que A. (B) las moscas control tienen 8 quetas en esta área. (C-E) la coexpresión de dAtx2 potencia la pérdida de macroquetas inducida por Ataxina-1 [82Q]. Las flechas blancas indican la posición de macroquetas ausentes, y la punta de flecha en E señala la única queta presente en una mosca *SCA1<sup>82Q</sup>/dAtx2<sup>SE</sup>* de las 8 que debería haber. (F) Inmunofluorescencia contra Senseles que muestra su patrón normal de distribución en el disco de ala. El rectángulo blanco resalta las células POS y precursoras de quetas del borde del ala. (G-J) detalle del territorio precursor del borde del ala mostrando la intensidad de tinción para Sens en: moscas control (*sca-Gal4*, G), moscas que expresan Ataxina-1 [82Q] en células POS (H), moscas que sobre-expresan dAtx2 en células POS (I) y moscas que co-expresan Ataxina-1 [82Q] y dAtx2 en células POS (J). (K) Cuantificación de la intensidad de inmunofluorescencia anti-Sens en las células POS del borde del ala en discos imaginales de larvas de los genotipos indicados debajo. Se usaron 20 discos/genotipo y los cruces se hicieron a 25°C. Barras = desviación estándar. (L) % de macroquetas torácicas perdidas en moscas que expresan Ataxina-1 [82Q] a niveles altos (27°C) y bien con niveles normales o bien con niveles reducidos de dAtx2. **Columna 1**, los controles (*sca-Gal4*) no muestran pérdida de quetas. **Columna 2**, la expresión de Ataxina-1 [82Q] (*SCA1<sup>82Q</sup>*) a 27°C en las células POS induce una pérdida de ~20% de las macroquetas torácicas ( $p < 0.0001$ ). **Columna 3**, bajar los dAtx2 induce una supresión parcial del fenotipo causado por Ataxina-1 [82Q] en moscas *SCA1<sup>82Q</sup>/dAtx2<sup>X1</sup>* ( $p < 0.005$ ). Barras=s.e.m. (M-N) Detalle de las macroquetas presentes en la parte posterior del *notum* y en el *scutelum* de moscas que expresan Ataxina-1 [82Q] con niveles normales (M) o con niveles reducidos de dAtx2 (N) a 27°C. Flechas indican quetas ausentes. Genotipos: control: +; *sca<sup>109-68</sup>-GAL4/UAS-GFP*;+. dAtx2<sup>SE</sup>: +; *sca<sup>109-68</sup>-GAL4/ UAS-dAtx2[4]*; +. SCA1<sup>82Q</sup>: *UAS-SCA1<sup>82Q</sup>[F7]*/+; *sca<sup>109-68</sup>-GAL4/+*; +. SCA1<sup>82Q</sup>/dAtx2<sup>SE</sup>: *UAS-SCA1<sup>82Q</sup>[F7]*/+; *sca<sup>109-68</sup>-GAL4/UAS-dAtx2[4]*; +. SCA1<sup>82Q</sup>/dAtx2<sup>X1</sup>: *UAS-SCA1<sup>82Q</sup>[F7]*/+; *sca<sup>109-68</sup>-GAL4/+*; *dAtx2<sup>X1</sup>/+*.

Figura 9



Sens. En la **Figura 9F** se muestra el patrón normal de distribución de Sens. Como se puede observar Sens tiene en general una distribución dispersa que coincide con los precursores de varias sensilas, entre las que se encuentran las macroquetas torácicas (**Figura 9F**, células aisladas). Además Sens se expresa en dos filas de células paralelas en los bordes dorsal y ventral del ala, que darán lugar a los órganos sensoriales y quetas de esta región (**Figura 9F**, recuadro). Para investigar el efecto de dAtx2 sobre la reducción de Sens inducida por Ataxina-1 [82Q], decidimos cuantificar la intensidad de inmunofluorescencia anti-Sens en la zona del borde del ala. Como se puede ver en la **Figura 9H**, la expresión de Ataxina-1 [82Q] a 25°C no produce una bajada detectable de la señal de Sens en esta área. De forma similar, la sobreexpresión de dAtx2 salvaje por sí misma tampoco produce una disminución significativa de la señal de Sens (**Figura 9I**). Sin embargo, la coexpresión de ambas proteínas en el disco de ala produce una clara bajada en los niveles de Sens en las células de los bordes del ala (**Figura 9J**). Nótese que los niveles de Sens detectados por inmunofluorescencia son aproximadamente la mitad que los observados en los controles (**Figura 9K**). Esta bajada en los niveles de Sens en moscas  $SCA1^{82Q}/dAtx2^{SE}$  concuerda con la fuerte disminución del número de quetas observada en estas moscas, e indica que la dAtx2 potencia el efecto que la Ataxina-1 [82Q] tiene sobre Sens.

También quisimos investigar la consecuencia que tendría una bajada en los niveles de dAtx2 sobre la reducción en los niveles de Sens inducida por Ataxina-1 [82Q]. A 27°C la expresión de Ataxina-1 sí produce una bajada en los niveles de Sens en los bordes del ala, sin embargo no detectamos diferencias en este ensayo entre moscas  $SCA1^{82Q}$  y moscas  $SCA1^{82Q}/dAtx2^{X1}$  (datos no mostrados). Esto se podría deber a varias razones, podría ser que nuestro ensayo carece de la sensibilidad necesaria para detectar diferencias sutiles en los niveles de Sens. Por otro lado, podría ser que la diferencia se observe en un punto posterior del desarrollo. Por ello, analizamos el efecto de disminuir los niveles de dAtx2 sobre la pérdida de macroquetas inducida por Ataxina-1 [82Q]. La expresión de Ataxina-1 [82Q] a niveles altos (27°C) en las células POS induce una pérdida de ~20% de las macroquetas torácicas en comparación con controles *sca-GAL4* **Figura 9L y M**. Sin embargo en moscas que expresan Ataxina-1 [82Q] pero con niveles más bajos de dAtx2 ( $SCA1^{82Q}/dAtx2^{X1}$ ) observamos un rescate parcial en el número de

macroquetas **Figura 9L y N**. La pérdida de macroquetas en los animales *SCAI<sup>82Q</sup>/dAtx2<sup>XI</sup>* es aproximadamente la mitad (~10%) que la observada en animales *SCAI<sup>82Q</sup>* con niveles normales de dAtx2 **Figura 9L**.

## ***Las proteínas Ataxina-1 y Ataxina-2 humanas interactúan en ensayos de co-AP***

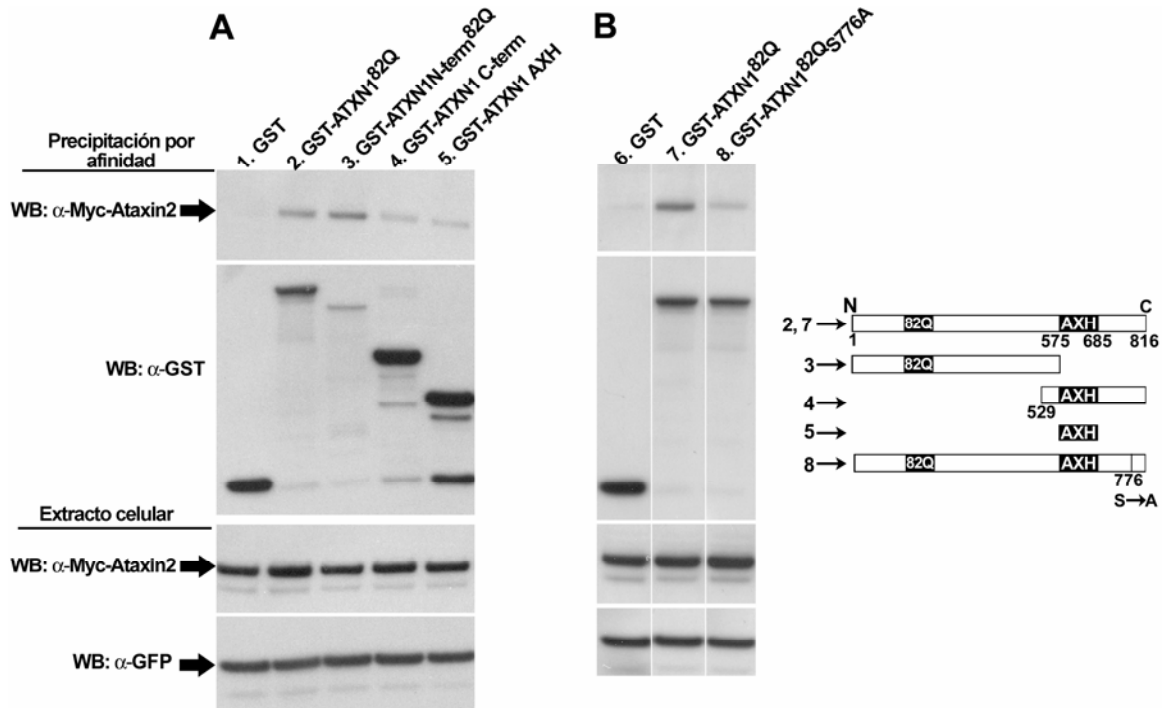
Para analizar en más detalle la interacción entre Ataxina-1 y Ataxina-2, investigamos si existen interacciones moleculares entre ambas proteínas. Llevamos a cabo ensayos de purificación por co-afinidad (co-AP) con extractos de células que sobreexpresan las proteínas humanas Myc-hAtaxin-2 y GST-Ataxin-1[82Q], en columnas de sefrosa conjugadas con Glutathione. Como se muestra en la **Figura 10A (columnas 1-2)**, GST-Ataxin-1[82Q] co-precipita con Myc-hAtaxin-2, lo cual indica que ambas proteínas interactúan.

También investigamos el papel de los dominios de la Ataxina-1 en la interacción con la Ataxina-2. Llevamos a cabo ensayos de co-AP con extractos de células que sobreexpresan Myc-hAtaxin-2 y uno de los siguientes fragmentos de Ataxina-1 marcados con GST:

- GST-ATXN1N-term<sup>82Q</sup>: porción N-terminal con expansión de 82 poliglutaminas (aa# 1-575, **Figura 10A, columna-3**).
- GST-ATXN1C-term: porción C-terminal con el dominio AXH (aa# 529-816; **Figura 10A, columna-4**).
- GST-ATXN1AXH: dominio AXH por si mismo (aa# 558-700; **Figura 10A, columna-5**).

Todos los fragmentos analizados interactúan independientemente con Myc-hAtaxin-2 (**Figura 10A, columna-4**). Si bien la interacción entre la región N-terminal expandida de la Ataxina-1 y la Ataxina-2 parece ser más fuerte que la interacción de la Ataxina-2 con los dominios C-terminales, ya que menos cantidad del péptido GST-ATXN1N-term<sup>82Q</sup> causa la precipitación de más Myc-Ataxina-2. Como se muestra en los controles de carga, tanto la cantidad de Myc-Ataxina-2 como la cantidad de un vector GFP utilizado como control de transfección y carga son similares entre todos los carriles.

**Figura 10**



**Figura 10, La Ataxina-1 [82Q] y la Ataxina-2 humanas interactúan a nivel molecular. (A)** Ensayos de precipitación por co-afinidad con columnas de Glutation/sefarosa entre Ataxina-2 humana (Myc-hAtaxina-2) con la Ataxina-1 humana expandida entera (GST-ATXN1<sup>82Q</sup>) o con diferentes dominios de la proteína Ataxina-1. **Columna 1**, el control con solo GST no co-purifica con Myc-hAtaxina-2. **Columna 2**, GST-ATXN1<sup>82Q</sup> copurifica con Myc-hAtaxina-2. **Columna 3**, la porción N-terminal de la Ataxina-1 [82Q] humana expandida (GST-ATXN1N-term<sup>82Q</sup>) sin el dominio AXH (aa# 1-575) también copurifica con Myc-hAtaxina-2. Las **Columnas 4 y 5** muestran que tanto el dominio C-terminal de Ataxina-1 (aa# 529-816; columna 4) como el dominio AXH por sí mismo (aa# 558-700; columna 5) coprecipitan con Myc-hAtaxina-2. Nótese que la interacción de estos dominios con Myc-hAtaxina-2 es significativamente más débil que GST-ATXN1N-term<sup>82Q</sup>/Myc-hAtaxina-2. En la parte baja se muestran western con el extracto celular previo a la purificación mostrando tanto la cantidad de Myc-hAtaxina-2 como la de el control de transfección GFP son similares entre las diferentes muestras. (B) Ensayos de precipitación por co-afinidad entre Myc-hAtaxina-2 y GST-ATXN1<sup>82Q</sup> o GST-ATXN1<sup>82Q</sup>S776A. **Columna 6**, muestra control GST solo. **Columna 7**, GST-ATXN1<sup>82Q</sup> coprecipita con Myc-hAtaxina-2. **Columna 8**, GST-ATXN1<sup>82Q</sup>S776A presenta una interacción más débil con Myc-hAtaxina-2 que la observada con Myc-hAtaxina-2.

Como se vio en la introducción, en modelos de SCA1 en ratón y en *Drosophila* se ha visto que la fosforilación de Ataxina-1 [82Q] en el residuo S776, influencia su toxicidad. Quisimos investigar si la fosforilación de Ataxina-1 [82Q] modificaría su interacción con Ataxina-2, para ello llevamos a cabo ensayos de co-AP con Myc-hAtaxina-2 y una variante de Ataxina-1 [82Q] con una sustitución S776A. Como se ve en la **Figura 10B**, la Ataxina-1 [82Q]<sup>S776A</sup> muestra una interacción más débil con Myc-hAtaxina-2 que la Ataxina-1 [82Q] normal, esto sugiere que la fosforilación en el residuo S776 de Ataxina-1 potencia la interacción con Myc-hAtaxina-2. Esta observación también indica que, a pesar de que la interacción con Ataxina-2 es llevada a cabo predominantemente por la parte N-terminal de la Ataxina-1, las modificaciones post-transcripcionales de la zona C-terminal de la Ataxina-1 son capaces de modular interacciones mediadas por la porción N-terminal, donde se hayan las poliglutaminas.

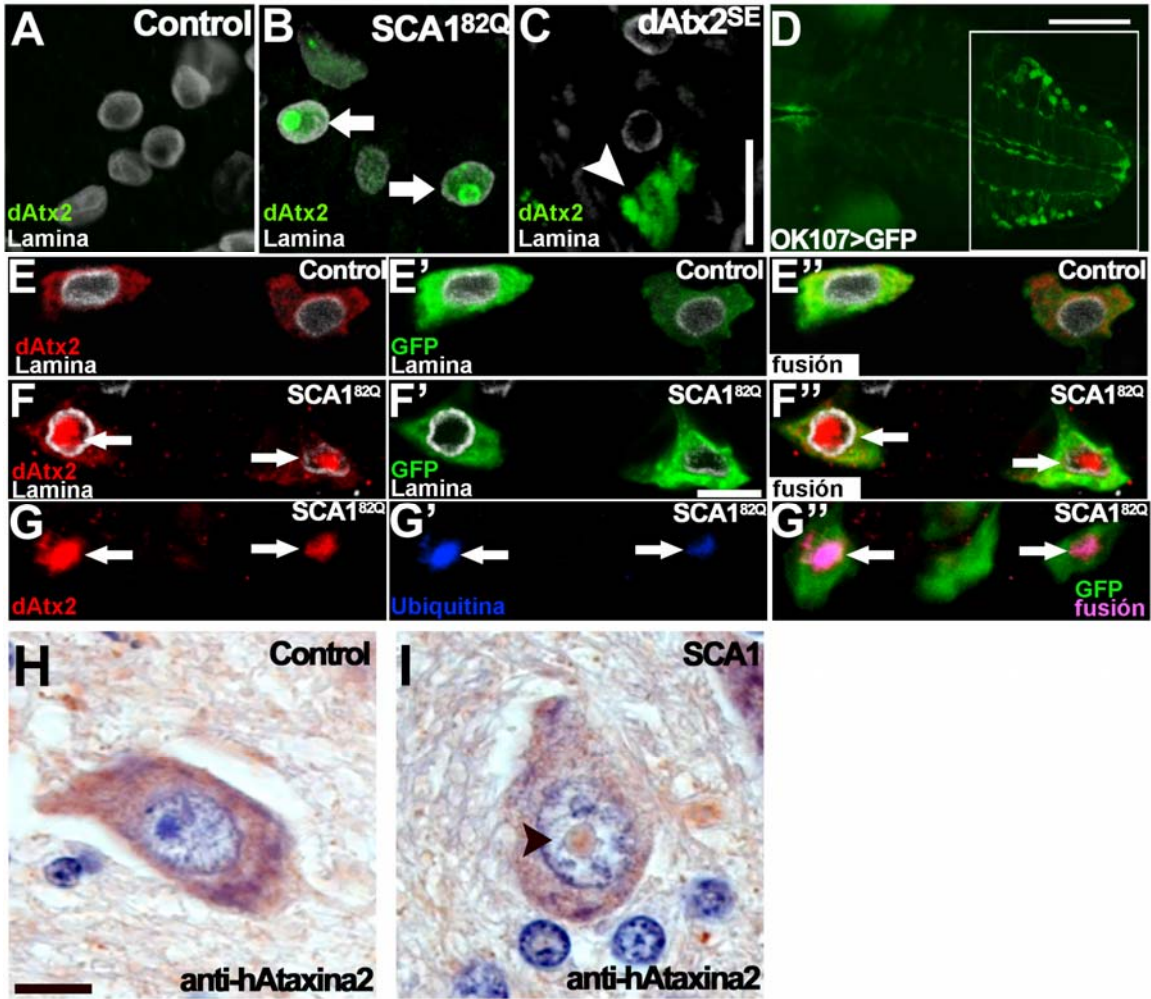
### **Acumulación nuclear de Ataxina-2 en neuronas que expresan Ataxina-1 expandida.**

Los ensayos de co-AP llevados a cabo con Ataxina-1 [82Q] y Ataxina-2 indican que ambas proteínas interactúan a nivel molecular. Sin embargo, la Ataxina-1 [82Q] es nuclear en neuronas de *Drosophila* y en las células transfectadas para los experimentos de co-AP, mientras que Ataxina-2 es una proteína de localización citoplásmica. Por lo tanto para investigar la relevancia in vivo de los ensayos de co-AP en células, analizamos la localización de Ataxina-2 en neuronas de *Drosophila* que expresaran Ataxina-1 [82Q]. Dado que en el ojo de *Drosophila* observamos que los niveles de dAtx2 modulan la toxicidad de la Ataxina-1 [82Q], primero estudiamos la localización de dAtx2 en células de la retina.

Como se observa en la **Figura 11**, la dAtx2 no se detecta normalmente en las células de retinas de moscas control (*gmr-GAL4*, **Figura 11A**) ni de moscas que sobreexpresan dAtx2 (*dAtx2<sup>SE</sup>*, **Figura 11C**). Sin embargo, en células de la retina de moscas *SCA1<sup>82Q</sup>* encontramos que la dAtx2 endógena se detecta en los núcleos de células de la retina (**Figura 11B**). Nótese que la señal de dAtx2 se observa tanto difusa por el nucleoplasma como presente en INs (posiblemente colocalizando con Ataxina-1). Para confirmar este resultado inesperado, examinamos la localización de dAtx2 en otras

**Figura 11, la Ataxina-1 [82Q] induce la acumulación de Ataxina-2 en el núcleo.** (A-C) tinción anti-dAtx2 (verde) en secciones de parafina de retinas de moscas control (*gmr-Gal4*, **A**) o moscas que expresan Ataxina-1 [82Q] (**B**) o que sobreexpresan dAtx2 (**C**); las secciones también fueron teñidas con anti-Lámina para marcar los núcleos (blanco). Nunca se detecta señal de dAtx2 ni en las retinas de moscas control (**A**) ni en las de moscas que sobreexpresan dAtx2 (**C**). Estas últimas si presentan niveles elevados de dAtx2 en el citoplasma (punta de flecha). Sin embargo en moscas que sobreexpresan Ataxina-1 [82Q] (**B**) se detecta la acumulación de dAtx2 (endógena) en los núcleos de la retina. Esta acumulación es tanto difusa en el nucleoplasma, como concentrada en INs (flechas). (**D**) GNV mostrando el patrón de distribución de las neuronas cubiertas por *ok107-Gal4* detectadas mediante CD8:GFP. El rectángulo muestra el área en el que llevamos a cabo nuestro análisis. (**E-E''**) Secciones de microscopía confocal de neuronas del GNV (*ok107-Gal4*) que solo expresan CD8:GFP (verde) y teñidas con anti-dAtx2 (rojo) y anti-Lámina (blanco). Nótese en las distintas imágenes que no se detecta dAtx2 en el núcleo, sino que esta está confinada al citoplasma. (**F-F''**) Secciones de microscopía confocal equivalentes a las mostradas en E-E'', pero que expresan Ataxina-1 [82Q]. Nótese que al igual que ocurriera en la retina, la dAtx2 endógena (rojo) está altamente concentrada en el núcleo, donde se acumula en INs (flechas). (**G-G''**) Secciones de microscopía confocal de neuronas de GNV (*ok107-Gal4*) que expresan Ataxina-1 [82Q] y teñidas con anti-dAtx2 (rojo) y anti-Ubiquitina (azul). La ausencia de CD8:GFP (verde, marcador citoplásmico) revela la posición del núcleo. Nótese en las distintas imágenes la colocalización entre las señales de anti-Ubiquitina y anti-dAtx2 (flechas indican INs). (**H e I**) Secciones de parafina de tejido humano, *postmortem*, de la zona del puente troncoencefálico tomadas de un individuo control (**H**) y de un paciente de SCA1 (**I**). Las secciones fueron teñidas con anti-dAtx2 (marrón) y Hematoxilina (azul) para resaltar el núcleo. (**H**) no se detecta señal de dAtx2 en el núcleo de neuronas del individuo control. (**I**) Al igual que vimos en *Drosophila*, la Ataxina-2 humana se encuentra presente en las INs (flecha) observadas en las neuronas del cerebro SCA1, que expresan Ataxina-1 expandida. Genotipos: (**A**) *gmr-GAL4/+*. (**B**) *UAS-SCA1<sup>82Q</sup>[F7]/+; gmr-GAL4/+*. (**C**) *gmr-GAL4/UAS-dAtx2[4]*. (**D, E-E''**) *UAS-CD8:GFP/+; +; ok107-GAL4/+*. (**F-F'' and G-G''**) *UAS-CD8:GFP/+; UAS-SCA1<sup>82Q</sup>[M6]/+; ok107-GAL4/+*.

Figura 11





neuronas que expresaran Ataxina-1 [82Q]. Para ello expresamos Ataxina-1 [82Q] en las neuronas del ganglio nervioso ventral (larvario) mediante *ok107-GAL4* (**Figura 11D**). Al igual que las observaciones en células de la retina, en las neuronas del GNV de *Drosophila* la dAtx2 endógena es citoplásmica, y no se observa en el núcleo (**Figura 11E-E''**). Sin embargo las neuronas del GNV que sobreexpresan Ataxina-1 [82Q] muestran una acumulación clara de dAtx2 en sus nucleos en forma de INs (**Figura 11F-F''**).

También quisimos investigar si la Ataxina-1 [82Q] y dAtx2 colocalizan en las INs observadas. La co-tinción de ambas proteínas no es posible, ya que los anticuerpos contra ambas fueron generados en el mismo huésped (conejo). Sin embargo, sabemos que las INs de Ataxina-1 [82Q] son positivas para anti-Ubiquitina (Fernandez-Funez, et al., 2000), de forma que llevamos a cabo una doble tinción con anti-Ubiquitina y anti-dAtx2. La **Figura 11G-G''** muestra que las INs de dAtx2 presentes en neuronas *SCA1<sup>82Q</sup>* son positivas para Ubiquitina, lo cual sugiere que son las mismas INs formadas por Ataxina-1. Estos resultados indican que la presencia de Ataxina-1 [82Q] produce la acumulación nuclear de dAtx2 y sugieren que ambas proteínas colocalizan en INs.

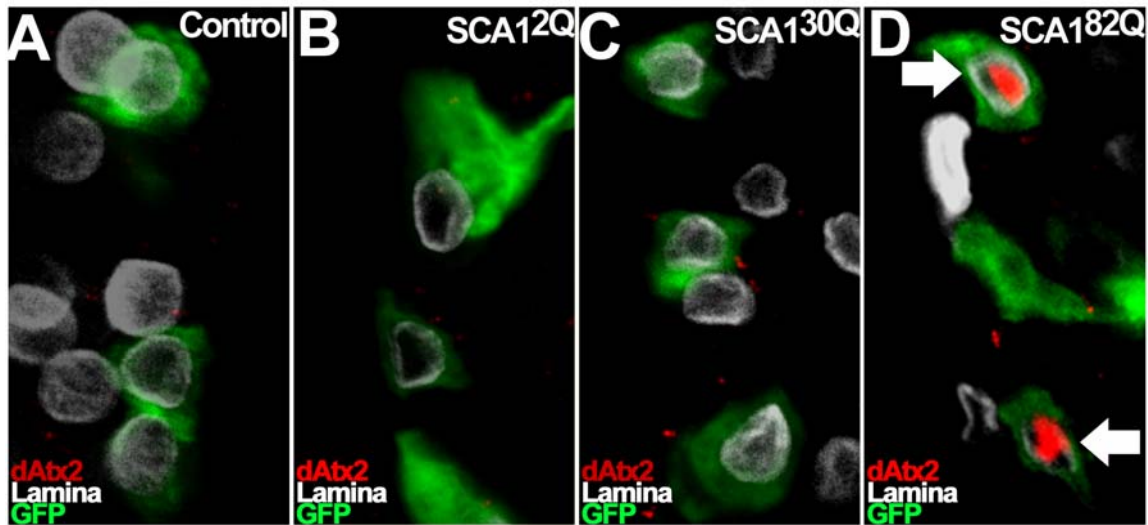
Para validar nuestros resultados y averiguar su relevancia para la patogénesis de SCA1 en humanos, analizamos mediante inmunohistoquímica, la localización de la

Ataxina-2 humana en neuronas de cerebros de pacientes con SCA1 (postmortem). Las neuronas del puente troncoencefálico de cerebros control muestran señal positiva para Ataxina-2 solamente en el citoplasma (**Figura 11H-I**). Además estas neuronas no muestran INs. Las neuronas de la misma región en cerebros de pacientes de SCA1 muestran frecuentes inclusiones nucleares claramente visibles gracias a la ausencia de tinción con Hematoxilina. Encontramos que ~20% de las neuronas con INs daban señal positiva para Ataxina-2. Este resultado junto con los ensayos de co-AP con las proteína Ataxina-1 y Ataxina-2 humanas indican que las interacciones genéticas observadas en *Drosophila* tienen relevancia para la patogénesis de la SCA1 en humanos.

### **Solo la Ataxina-1 expandida induce la acumulación nuclear de Ataxina-2.**

Como se vio en la introducción, la patogénesis en SCA1 se desencadena por la expansión de la secuencia de poliglutaminas más allá de 39-44 (dependiendo de si están

**Figura 12**



**Figura 12**, la acumulación de dAtx2 en el núcleo se observa en presencia de la Ataxina-1 [82Q] patogénica y no de variantes de Ataxina-1 no expandidas. (A-D) inmunofluorescencia anti-dAtx2 (rojo) en neuronas del GNV (*ok107-Gal4*) que expresan distintas variantes de Ataxina-1 y CD8:GFP (verde), también se muestra anti-Lámina (blanco). (A) neuronas control (*ok107-Gal4/CD8:GFP*) donde no hay dAtx2 nuclear. (B) neuronas que expresan la variante Ataxina-1 [2Q] (*SCA1<sup>2Q</sup>*) tampoco muestran señal de dAtx2 en el núcleo. (C) dAtx2 tampoco es detectada en los núcleos de neuronas que sobreexpresan la variante no expandida Ataxina-1 [30Q] (*SCA1<sup>30Q</sup>*). (D) Al igual que vimos en la **Figura 11** la expresión de Ataxina-1 [82Q] (*SCA1<sup>82Q</sup>*) en neuronas del GNV induce la acumulación intranuclear de dAtx2 (flechas). Genotipos: (A) *UAS-CD8:GFP/+; +; ok107-GAL4/+*. (B) *UAS-CD8:GFP/+; UAS-SCA1<sup>2Q</sup> [F14]/+; ok107-GAL4/+* (C) *UAS-SCA1<sup>30Q</sup> [F1]/+; UAS-CD8:GFP/+; ok107-GAL4/+*. (D) *UAS-CD8:GFP/+; UAS-SCA1<sup>82Q</sup> [M6]/+; ok107-GAL4/+*.

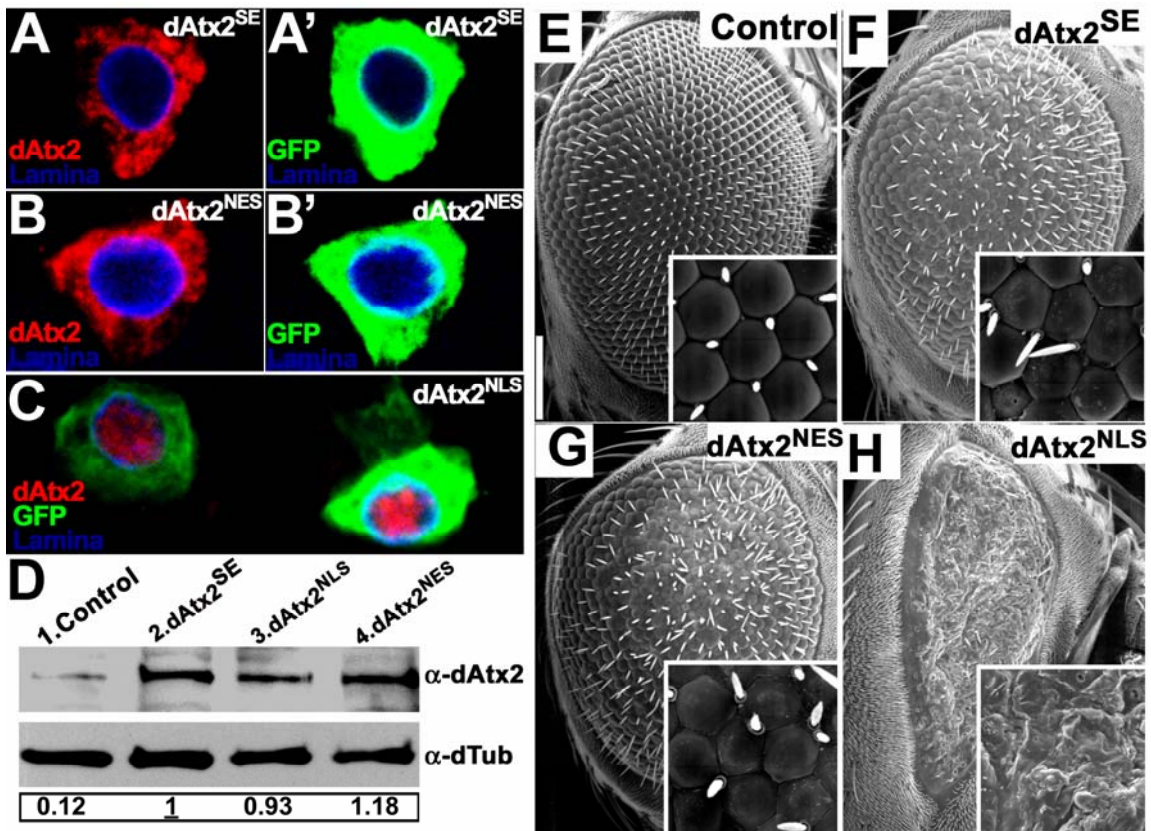
interrumpidas o no) (Orr and Zoghbi, 2001). Por ello quisimos investigar si la acumulación nuclear de Ataxina-2 se producía específicamente con la forma expandida. Para ello investigamos la localización de dAtx2 en neuronas del GNV que expresaran Ataxina-1 con diferentes expansiones de poliglutamina: Ataxina-1 [2Q], Ataxina-1 [30Q] ó Ataxina-1 [82Q]. La línea de Ataxina-1 [2Q] utilizada expresa a niveles superiores a los de la Ataxina-1 [30Q] y [82Q] las cuales presentan niveles similares de expresión entre si. La **Figura 12A-C** muestra que ni las neuronas control (*ok107-GAL4*) ni neuronas que sobreexpresen las formas de Ataxina-1 [2Q] ó [30Q] muestran acumulación nuclear de dAtx2. Sin embargo, como se vio arriba, las neuronas que sobreexpresan Ataxina-1 [82Q] si presentan acumulación nuclear de dAtx2 **Figura 11D**. Este resultado indica que la acumulación nuclear de Ataxina-2 se produce específicamente con la forma expandida de Ataxina-1.

### ***La acumulación de Ataxina-2 en el núcleo es altamente tóxica.***

Las observaciones de que la Ataxina-1 expandida induce la acumulación de Ataxina-2 en el núcleo, y que la disminución en los niveles endógenos de Ataxina-2 suprime la toxicidad en animales *SCA1<sup>82Q</sup>*, sugieren que la acumulación nuclear de Ataxina-2 podría ser tóxica. Para investigar esta hipótesis generamos moscas transgénicas que expresan dAtx2 con una señal de localización nuclear en su extremo C-terminal (*dAtx2<sup>NLS</sup>*) (**Figura 13A-C**). Aunque la dAtx2 salvaje es normalmente citoplásmica, no podemos descartar por completo su presencia en el núcleo, por lo tanto, también generamos moscas que expresan dAtx2 con una señal de exporte nuclear en su extremo C-terminal (*dAtx2<sup>NES</sup>*) que sirvieran como controles adicionales. Se obtuvieron diez líneas transgénicas para cada variante de dAtx2, con variedad en los niveles de expresión. Para nuestros experimentos, seleccionamos líneas que expresaran *dAtx2<sup>NLS</sup>* y *dAtx2<sup>NES</sup>* a los mismos niveles que la línea de dAtx2 salvaje (*dAtx2<sup>OE</sup>*) utilizada con anterioridad (**Figura 13D** comparar carriles 2 y 3) y comparamos su toxicidad en el ojo de *Drosophila*. En la **Figura 13E-H** se puede ver que la sobreexpresión de *dAtx2<sup>NLS</sup>* induce una toxicidad mucho más severa que la causada por la dAtx2 salvaje o *dAtx2<sup>NES</sup>*. La expresión de *dAtx2<sup>NLS</sup>* produce una degeneración fuerte del ojo, con las facetas externas mostrando un alto grado de desorganización y una completa ausencia de quetas, además

**Figura 13, la acumulación de dAtx2 en el núcleo incrementa su toxicidad en vivo.** (A-C) tinción de inmunofluorescencia para detectar la localización de dAtx2 (rojo) en neuronas *ok107-Gal4* que sobreexpresan dAtx2 salvaje (*dAtx2<sup>SE</sup>*, A-A'), dAtx2 con señal de exporte nuclear (*dAtx2<sup>NES</sup>*, B-B') o dAtx2 con señal de importe nuclear (*dAtx2<sup>NLS</sup>*, C). La señal de anti-Lamina (azul) y de CD8:GFP (verde) también se muestra para visualizar los compartimentos nuclear y citoplásmico respectivamente. (D) Western blot anti-dAtx2 demostrando niveles similares de expresión en las diferentes variantes de dAtx2 utilizadas en este trabajo. Las variantes de dAtx2 se expresaron mediante *gmr-Gal4*, a 25°C y se usaron discos de ojo larvarios (10/genotipo) antes de que haya ocurrido una degeneración que pueda modificar la observación. SE utilizó anti-tubulina como control de carga. La cuantificación se muestra en la parte inferior del panel, utilizando como referencia la línea que sobreexpresa dAtx2 salvaje (*dAtx2<sup>SE</sup>*). (E-H) imágenes de m.e.b. de ojos, mostrando el fenotipo causado por la sobreexpresión de cada variante de dAtx2 utilizada con *gmr-Gal4* a 25°C. (E) estructura de ojos control (*gmr-Gal4*). (F y G) la sobreexpresión tanto de dAtx2 salvaje (*dAtx2<sup>SE</sup>*) como de *dAtx2<sup>NES</sup>* en el ojo causa un fenotipo parecido, con cierta desorganización de las dacetos externas y pérdida de algunas quetas. (H) La expresión de *dAtx2<sup>NLS</sup>* induce un fenotipo degenerativo severo, con fuerte reducción del tamaño total del ojo, y desorganización de omatidios, además de una ausencia absoluta de quetas. Genotipos: (A, A') *UAS-CD8-GFP/UAS-dAtx2[4]; ok107-GAL4/+*. (B-B') *UAS-CD8-GFP/+; UAS-dAtx2<sup>NES</sup>/+; ok107-GAL4/+*. (C) *UAS-CD8-GFP/UAS-dAtx2<sup>NLS</sup>; ok107-GAL4/+*. (D-H) Control: *gmr-GAL4/UAS-GFP*. *dAtx2<sup>SE</sup>*: *gmr-GAL4/UAS-dAtx2[4]*. *dAtx2<sup>NLS</sup>*: *gmr-GAL4/UAS-dAtx2<sup>NLS</sup>*. *dAtx2<sup>NES</sup>*: *gmr-GAL4/+; UAS-dAtx2<sup>NES</sup> /+*.

Figura 13



de una fuerte reducción en el tamaño del ojo (**Figura 13H**). Estos resultados fueron consistentes entre varias líneas transgénicas (datos no mostrados). Por lo tanto un aumento en los niveles nucleares de Ataxina-2 es suficiente para causar una degeneración severa. Estas observaciones apuntan a que la toxicidad de Ataxina-1 [82Q] es mediada en parte por la acumulación nuclear de Ataxina-2.

### ***La Ataxina-2 nuclear causa una bajada en los niveles de Senseless y pérdida de mecanoreceptores.***

En los discos de ala larvarios, el factor de transcripción Sens acumula en las células POS y precursores de quetas de los bordes del ala. Esta expresión se observa en forma de dos filas de células paralelas a ambos lados del borde de los compartimentos dorsal-ventral del ala (**Figura 14A y A'**). La expresión de Ataxina-1 [82Q] en el borde de los compartimentos anterior-posterior (por medio de *dpp-GAL4*) induce una disminución de los niveles de Sens solo en las células del borde del ala cubiertas por *dpp-GAL4* (**Figura 14B y B'**, punta de flecha)(Tsuda, et al., 2005). Lo cual constituye una manifestación molecular de la neurotoxicidad inducida por la Ataxina-1 [82Q].

Para investigar la hipótesis de que la acumulación nuclear de Ataxina-2 contribuye a la toxicidad de la Ataxina-1 expandida, quisimos analizar el efecto que causarían los diferentes transgenes de dAtx2 (*dAtx2<sup>NES</sup>* y *dAtx2<sup>NLS</sup>*) sobre la distribución de Sens en las células de los bordes anterior y posterior del ala.

Primero analizamos el efecto de *dAtx2<sup>NES</sup>*. La expresión de *dAtx2<sup>NES</sup>* con *dpp-GAL4* no causa reducción en los niveles de Sens (**Figura 14C y C'**, punta de flecha). Nótese que la distribución de Sens en estos discos imaginales no varía. También investigamos el efecto de dAtx2 con la señal de importe nuclear sobre los niveles de Sens. Al igual que se observa con la Ataxina-1 [82Q], la expresión de *dAtx2<sup>NLS</sup>* con *dpp-GAL4* induce la pérdida de Sens en las células de los bordes del ala (**Figura 14D y D'**, punta de flecha).

También investigamos el efecto de *dAtx2<sup>NES</sup>* y *dAtx2<sup>NLS</sup>* sobre Sens en otros tipos celulares. Las células de las glándulas salivares expresan altos niveles de Sens(Nolo, et al., 2000) en el núcleo (**Figura 14E-H**). Las glándulas salivares que sobreexpresan *dAtx2<sup>NES</sup>* no muestran cambios detectables en los niveles o distribución de Sens (**Figura 14I-L**). Sin embargo la expresión de *dAtx2<sup>NLS</sup>* en las glándulas salivales también causa

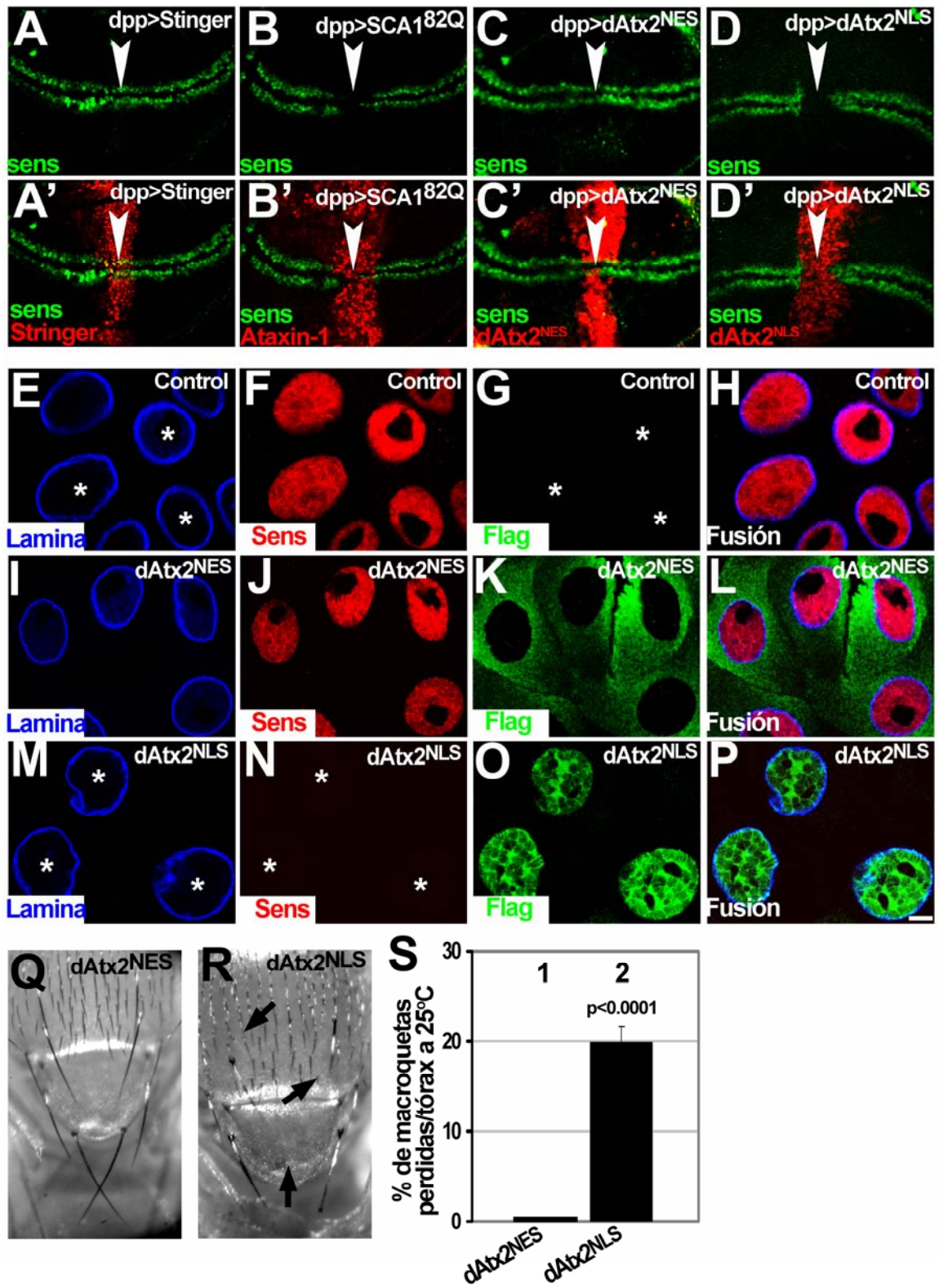
una fuerte caída en los niveles de Sens (**Figura 14M-P**). Los núcleos de estas células siguen estando, y su morfología parece normal, lo cual descarta la posibilidad de que la pérdida de Sens se deba a muerte celular. Estos resultados en discos de ala y glándulas salivares indican que la dAtx2 nuclear tiene un efecto similar a la Ataxina-1 [82Q] sobre Sens.

La expresión de Ataxina-1 [82Q] en las células POS del tórax de *Drosophila* (con *sca-GAL4*) induce una pérdida de sensilas que se traduce en pérdida de quetas torácicas (**Figura 9** y ref.(Tsuda, et al., 2005)). Por lo tanto, también investigamos el efecto de la dAtx2 citoplásmica o nuclear sobre el desarrollo de las macroquetas torácicas. Al igual que ocurriera con la dAtx2 salvaje (**Figura 9**), la expresión de dAtx2<sup>NES</sup> en las células POS torácicas no causa cambios en el número de macroquetas torácicas en el adulto (**Figura 14Q** y **Figura 14S columna-1**). Sin embargo, la expresión de dAtx2<sup>NLS</sup> induce un descenso significativo en el número de macroquetas observadas en el tórax de adulto, con una reducción en su número de ~20% en comparación con controles *sca-GAL4* (**Figura 14R** y **Figura 14S columna-2**). Por lo tanto la acumulación nuclear de dAtx2 tiene un efecto similar al de la Ataxina-1 [82Q] sobre el desarrollo de sensilas.

**Figura 14, la acumulación de dAtx2 en el núcleo causa una bajada en los niveles de Senseless (Sens) y pérdida de mecanoreceptores. (A-D')** Immunofluorescencia anti-Sens (verde) donde se muestra su patrón de distribución en las células POS del borde del ala en discos imaginales de larvas de los genotipos indicados. **(A y A')** el patrón de Sens no es modificado por la expresión de la proteína neutral NLS-DsRED (RedStinger, rojo) en el borde anteroposterior mediante *dpp-Gal4*. **(B y B')** la expresión de Ataxina-1 [82Q] en el borde anteroposterior (*dpp-Gal4*) causa una bajada en los niveles de Sens. Nótese la ausencia de señal en el punto donde la señal de Ataxina-1 (rojo) se cruza con la de Sens (punta de flecha). **(C-C')** la expresión de dAtx2<sup>NES</sup> (rojo) no causa una modificación visible en el patrón de Sens (punta de flecha). **(D-D')** la expresión de dAtx2<sup>NLS</sup> (rojo) con *dpp-Gal4* induce una bajada de los niveles de Sens. Nótese la ausencia de señal en la zona donde ambas señales se cruzan (punta de flecha). **(E-P)** tinción de inmunofluorescencia contra Sens (rojo), dAtx2<sup>NES</sup> o dAtx2<sup>NLS</sup> (verde) y Lámina (azul) en glándulas salivares de larvas de los genotipos mostrados. **(E-H)** glándulas salivares de animales control mostrando una señal robusta de Sens (rojo) en sus núcleos (azul). **(I-L)** la glándula salivares que expresan dAtx2<sup>NES</sup> (verde) muestran niveles normales de Sens en comparación con controles. **(M-P)** la expresión de dAtx2<sup>NLS</sup> (verde) en las glándulas salivares induce una bajada en los niveles de Sens (rojo) (comparar **N** con **F** y **J**). Los asteriscos en **N** marcan la posición de los núcleos. **(Q-S)** efecto que tiene expresar dAtx2<sup>NES</sup> o dAtx2<sup>NLS</sup> en células POS torácicas sobre la formación de macroquetas a 25°C. **(Q)** la expresión de dAtx2<sup>NES</sup> en las células POS (*sca-Gal4*) no tiene un efecto obvio sobre las macroquetas del tórax. **(R)** la expresión de dAtx2<sup>NLS</sup> en las células POS causa la pérdida de ~20% de las macroquetas torácicas ( $p < 0.0001$ ). Las flechas señalan macroquetas ausentes. **(S)** cuantificación de pérdida de quetas en animales de los mismos genotipos que **Q** y **R**. Datos basados en 20 moscas-genotipo. Barras=s.e.m. Genotipos: (A, A') *dpp-GAL4/ UAS-RedStinger*. (B, B') *UAS-SCA1<sup>82Q</sup>[F7]/+; +; dpp-GAL4/+*. (C, C', I-L) *dpp-GAL4/UAS-dAtx2<sup>NES</sup>*. (D, D', M-P) *UAS-dAtx2<sup>NLS</sup> /+; dpp-GAL4/+* (E-H) *dpp-GAL4/+*. (Q-S) *dAtx2<sup>NES</sup>*: *sca<sup>109-68</sup>-GAL4/+; UAS-dAtx2<sup>NES</sup> /+*. *dAtx2<sup>NLS</sup>*: *sca<sup>109-68</sup>-GAL4/ UAS-dAtx2<sup>NLS</sup>*.



Figura 14



## 5. Discusión y Conclusiones

### ***Interacción CHIP-Ataxina-1 Expandida***

La co-chaperona CHIP desempeña un papel regulador clave dentro de la maquinaria de control de calidad proteica de la célula haciendo de eslabón y punto de control entre las chaperonas y el sistema U/P (Cyr, et al., 2002, Wiederkehr, et al., 2002). Por otro lado, existen trabajos que indican que CHIP es capaz de interactuar con, y degradar varias proteínas con tendencia a la agregación e implicadas en enfermedades neurodegenerativas, como son: la proteína asociada a microtúbulos TAU, Sinucleína y Superóxido dismutasa (SOD) implicadas en el mal de Alzheimer, el mal de Parkinson y la esclerosis amiotrófica lateral (ALS) respectivamente (Choi, et al., 2004, Hatakeyama, et al., 2004, Petrucelli, et al., 2004, Shimura, et al., 2004, Shin, et al., 2005, Urushitani, et al., 2004).

En este trabajo se ha investigado la relación entre CHIP y la Ataxina-1 y su relevancia para la patogénesis de SCA1. Hemos encontrado que CHIP interactúa con la Ataxina-1 [82Q] en ensayos de co-IP y es detectada en las INs de Ataxina-1 [82Q] en cultivo celular. Más destacable aún, es el hecho de que CHIP también se detecta en las INs de Ataxina-1 expandida en neuronas (*post-mortem*) del cerebro de pacientes humanos con SCA1. Estos resultados son una importante indicación de que CHIP está implicado en la patogénesis de SCA1.

Para investigar el posible papel de CHIP en SCA1, llevamos a cabo ensayos de ubiquitinización con CHIP y Ataxina-1 expandida. Encontramos que CHIP ubiquitina la Ataxina-1 expandida tanto *in vitro* como en cultivo celular. Además Hsp70 potencia la ubiquitinización de Ataxina-1 [82Q] mediada por CHIP *in vitro*; esta observación es reforzada por el hecho de que en cultivo celular no hemos detectado ubiquitinización de Ataxina-1 [82Q] con una proteína CHIP con mutación en el dominio TPR conocido por mediar la interacción con las chaperonas (Ballinger, et al., 1999). Por tanto, parece que la interacción con chaperonas es imprescindible para la función ubiquitinizadora de CHIP *in vivo*.

En un trabajo anterior se describió que CHIP interactúa con otras E3 ligasas y potencia su actividad (Imai, et al., 2002), lo cual hace posible que *in vivo* la ubiquitinización de la Ataxina-1 expandida sea mediada por una E3 ligasa distinta a CHIP. Para investigar esta posibilidad usamos un mutante CHIP<sup>U-box</sup> que carece de actividad ubiquitin-ligasa. En nuestros ensayos celulares, este mutante de CHIP no es capaz de inducir la ubiquitinización de la Ataxina-1 expandida, lo cual indica que CHIP ubiquitina a la Ataxina-1 directamente.

Los resultados mostrados arriba sugieren un papel neuroprotector de CHIP en el contexto de Ataxina-1 expandida. Para investigar esta posibilidad en un ensayo animal recurrimos a un modelo de SCA1 en *Drosophila*. Encontramos que la sobre-expresión de CHIP suprime dramáticamente la toxicidad inducida por Ataxina-1 [82Q] en el ojo de *Drosophila*. El grado de supresión es mayor cuanto mayores son los niveles de CHIP que se co-expresen. Además, en concordancia con los datos de ubiquitinización obtenidos *in vitro* y en cultivo celular, encontramos que el aumento de los niveles de CHIP conduce a un descenso en los niveles de Ataxina-1 [82Q] en *Drosophila* observados tanto mediante inmunofluorescencia como por análisis en Western blot.

Todas estas observaciones juntas sugieren un papel neuroprotector para CHIP en la patología de SCA1. Según nuestros resultados, CHIP marcaría a la ataxina-1 expandida para su degradación por el proteosoma, y de manera dependiente de chaperonas.

La neuroprotección de CHIP podría extenderse a otras PQDs, ya que existen reportes similares al nuestro, que señalan a CHIP como un factor protector de otras proteínas con poliglutaminas (Ataxina-3 y Huntigntina) promoviendo su degradación por el proteosoma (Jana, et al., 2005) y reduciendo la agregación (Miller, et al., 2005).

En modelos condicionales de ratón para SCA1 y el mal de Huntington, prevenir la expresión de los transcritos que codifican para poliglutaminas induce la supresión del proceso neurodegenerativo (Yamamoto, et al., 2000, Zu, et al., 2004). Estos hallazgos junto con el descubrimiento de potentes supresores genéticos de la toxicidad inducida por poliglutaminas como CHIP hacen el prospecto de encontrar futuros tratamientos para SCA1 y otras enfermedades causadas por poliglutaminas más brillante que nunca.

## ***Interacción CHIP-Ataxina-1 no Expandida***

La teoría más aceptada a día de hoy para explicar la ganancia de función de proteínas con expansión de poliglutaminas es que, dicha expansión causa conformaciones aberrantes en la proteína portadora, que conducen a la exposición de residuos hidrofóbicos normalmente ocultos en su interior. Las chaperonas identifican a estas proteínas mal plegadas y se unen a ellas en un esfuerzo para plegarlas y devolverlas a sus conformaciones nativas inocuas (Ma and Hendershot, 2001, Wickner, et al., 1999).

Como se vio en la introducción, el contexto proteico de la Ataxina-1 parece desempeñar un papel crucial en el desarrollo de la toxicidad inducida por la expansión de poliglutaminas. En esta línea, es interesante destacar el descubrimiento de que CHIP no sólo interactúa con la Ataxina-1 expandida, sino que también lo hace con una isoforma no expandida carente de poliglutaminas, en ensayos de co-IP. Esta sorprendente observación sugiere que incluso la Ataxina-1 no expandida puede adoptar una conformación tóxica. A esta interacción se une la observación de que CHIP también es capaz de ubiquitinar a la Ataxina-1 no expandida, y esta actividad además es potenciada por la chaperona Hsp70, cuya función es reconocer y unirse a proteínas mal plegadas. Además, en *Drosophila* vemos que CHIP es capaz de suprimir la toxicidad de la Ataxina-1 no expandida, y que también induce su degradación. Dado que CHIP es una proteína altamente especializada en reconocer proteínas con conformación aberrante, todos estos datos indican que la Ataxina-1 es una proteína capaz de adoptar conformaciones tóxicas de forma espontánea en ausencia de la expansión, y que las poliglutaminas actuarían favoreciendo la estabilización de dicha estructura.

Esta observación no se puede generalizar sin embargo, ya que CHIP se une a la ataxina-3 o a la huntingtina expandidas y potencia su degradación, pero no la de sus isoformas no expandidas (Jana, et al., 2005).

Hemos usado a *Drosophila* para comparar los efectos de CHIP en una secuencia de poliglutaminas pura de 127Qs o en un fragmento N-terminal de la Huntingtina con una expansión de 128Qs (que normalmente se encuentra en neuronas del mal de Huntington). Mientras que no pudimos detectar una disminución de la toxicidad causada por las 127Qs, CHIP sí es capaz de suprimir el fenotipo de la Huntingtina con 128Qs. La diferencia tan dramática en la capacidad de CHIP para proteger de la neurotoxicidad

causada por expansiones de poliglutaminas de tamaño similar, pero rodeadas por en una secuencia aminoacídica distinta, enfatiza la importancia del contexto proteico en la neurodegeneración inducida por poliglutaminas. Estas observaciones deberían ser consideradas cuando se interpretan los resultados obtenidos con modelos de poliglutaminas que no estén en el contexto proteico adecuado. Estos modelos pueden no recapitular características importantes de la enfermedad en humanos como son residuos en las proteínas correspondientes que son requeridos para ubiquitinización, fosforilación, u otras modificaciones que ocurren tras la traducción.

## **dAtx2 modula la toxicidad de Ataxina-1 [82Q] y ambas proteínas son capaces de interactuar físicamente**

Como ya se mencionó las ataxias espinocerebelosas son un amplio grupo de enfermedades neurodegenerativas, cada una de las cuales afecta a una población neuronal específica, pero que comparten la malfunción del cerebelo como síntoma compartido. Esto sugiere que podrían tener algún mecanismo patogénico común, al menos a nivel de la atrofia cerebelar.

En este trabajo mostramos la existencia de interacciones funcionales entre proteínas que causan dos ataxias espinocerebelosas distintas. Mostramos que dAtx2 salvaje, la homóloga en *Drosophila* de Ataxina-2 (proteína que cuando está en su forma expandida causa la SCA2) media, al menos en parte, la degeneración neuronal causada por la Ataxina-1 expandida (proteína que causa la SCA1). Como demuestran varios ensayos independientes, la toxicidad inducida por la Ataxina-1 [82Q] es potenciada al aumentar los niveles de dAtx2. Más importante aún, el descenso de los niveles de dAtx2 suprime los fenotipos degenerativos inducidos por la Ataxina-1 en *Drosophila* en el ojo, sistema nervioso (capacidad locomotriz), y desarrollo de mecanorreceptores torácicos.

Encontramos que la Ataxina-1 expandida y la Ataxina-2 interactúan en ensayos de co-AP. Además, la Ataxina-1 expandida induce la acumulación de la Ataxina-2 en el núcleo tanto de neuronas de *Drosophila* como en tejido de cerebro con SCA1. Estas observaciones sugieren que ambas proteínas podrían interactuar en vivo. Además el hecho de que la Ataxina-1 y Ataxina-2 humanas interactúen en co-AP y que la Ataxina-2

humana se encuentre en INs de SCA1 sugieren que las observaciones en *Drosophila* podrían tener relevancia en humanos.

## **Acumulación Nuclear de dAtx2**

Las observaciones de dAtx2 en el núcleo de neuronas que expresan Ataxina-1 [82Q] son sorprendentes, ya que la Ataxina-2 es una proteína citoplasmática tanto en humanos como en *Drosophila*. Por otro lado, la supresión de los fenotipos de la Ataxina-1 [82Q] por pérdida de función parcial de *dAtx2* va en contra de un posible mecanismo mediante el cual el secuestro y por tanto la no disponibilidad (o la falta) de Ataxina-2 contribuiría a la neurodegeneración inducida por Ataxina-1 [82Q]. Esto es apoyado también por el hecho de que ratones deficientes para Ataxina-2 (*SCA2<sup>-/-</sup>*) no presentan anomalías en el cerebelo u otras poblaciones neuronas (Kiehl, et al., 2006).

La Ataxina-1 salvaje puede causar neurotoxicidad cuando es sobre-expresada, aunque mucho menor que la que produce la Ataxina-1 expandida (Fernandez-Funez, et al., 2000) y **Figura 5**. Sin embargo, la acumulación nuclear de dAtx2 es causada por la forma patogénica de la Ataxina-1 y no por la salvaje, al menos a niveles detectables. En conjunto estos datos sugieren que la acumulación de la Ataxina-2 en el núcleo contribuye a la alta toxicidad de la Ataxina-1, y es importante en el mecanismo de la patogénesis de la SCA1. Para investigar esta hipótesis dirigimos dAtx2 al núcleo mediante una señal de localización nuclear (SNL) exógena. Encontramos que la dAtx2<sup>SNL</sup> es suficiente para causar un aumento dramático en la toxicidad cuando se compara con la dAtx2 salvaje o una dAtx2 con una señal de exporte nuclear (SEN) exógena (dAtx2<sup>SEN</sup>) que expresa a niveles similares.

Para apoyar más la hipótesis de que la acumulación nuclear de la Ataxina-2 contribuye a la neurodegeneración causada por la Ataxina-1 expandida investigamos los niveles de Sens. Sens y su ortólogo en ratón Gfi1 son factores proneurales cuyos niveles descienden en presencia de la Ataxina-1 expandida (Tsuda, et al., 2005); lo cual nos da una lectura molecular de la neurotoxicidad de la Ataxina-1. En *Drosophila*, la reducción de los niveles de Sens conduce a una pérdida de mecanorreceptores (Tsuda, et al., 2005), por lo que se observó la expresión de Sens en el contexto de moscas que expresan dAtx2<sup>SNL</sup> o dAtx2<sup>SEN</sup> pero no el transgen Ataxina-1 [82Q]. Encontramos que la isoforma

dirigida al núcleo de dAtx2, pero no la dirigida al citoplasma, reproduce los fenotipos causados por la Ataxina-1 [82Q] de reducción de Sens y pérdida de mecanorreceptores.

La Ataxina-2 expandida se acumula tanto en citoplasma como en el núcleo de cerebros con SCA2 post mortem (Armstrong, et al., 2005, Koeppen, 2005, Koyano, et al., 1999, Pang, et al., 2002). En modelos de ratón y de cultivo celular de SCA2 la Ataxina-2 se acumula en el citoplasma y su acumulación en el núcleo no es necesaria para inducir toxicidad (Huynh, et al., 2000, Huynh, et al., 2003). De cualquier manera, la acumulación nuclear de la Ataxina-2 expandida también se da en células cultivadas (Huynh, et al., 2003), y se observa consistentemente en neuronas (postmortem) del tronco encefálico de pacientes SCA2 (Armstrong, et al., 2005, Koeppen, 2005, Koyano, et al., 1999, Pang, et al., 2002). Estas observaciones sugieren que mecanismos patogénicos tanto nucleares como citoplasmáticos contribuyen a la neurodegeneración en SCA2, como se sabe que ocurre en otras enfermedades causadas por poliglutaminas como HD y SCA3 (Gunawardena, et al., 2003, Hackam, et al., 1999, Li and Li, 2004). Una posibilidad es que la Ataxina-2 se mueva entre el núcleo y el citoplasma aunque la proteína se detecte normalmente en el citoplasma. Nuestros datos muestran que la acumulación de dAtx2 en el núcleo es más nociva que en el citoplasma. Por tanto, las neuronas con Ataxina-2 nuclear en pacientes con SCA2 podrían estar relativamente más comprometidas que aquellas neuronas en las que la Ataxina-2 se acumule en el citoplasma. De acuerdo con esta posibilidad, la Ataxina-2 expandida se encuentra en el núcleo de la región del puente troncoencefálico de cerebros con SCA2, uno de los grupos de neuronas y áreas del cerebro que presentan una degeneración más prominente en SCA2 (Armstrong, et al., 2005, Koeppen, 2005, Koyano, et al., 1999, Pang, et al., 2002).

La reducción de los niveles de Ataxina-2 suprime la toxicidad de la Ataxina-1 expandida, lo cual va fuertemente en contra de un mecanismo de patogeneicidad por pérdida de función de la Ataxina-2 en el citoplasma. Por tanto, es poco probable que la toxicidad nuclear de la Ataxina-2 esté relacionada con sus funciones en la regulación de la traducción (Ciosk, et al., 2004, Dunn and Jensen, 2003, Mangus, et al., 1998, Satterfield and Pallanck, 2006).

Los datos descritos en este estudio descubren interacciones funcionales inesperadas entre proteínas implicadas en dos SCAs diferentes. La acumulación nuclear

de la Ataxina-2, normalmente una proteína citoplasmática, es un denominador común entre SCA1 y SCA2 y conduce a la reducción de al menos un factor proneural importante, Sens, cuyo ortólogo en mamíferos Gfi1 se requiere para la supervivencia de las células de Purkinge (Tsuda, et al., 2005). Por tanto, las proteínas causantes de dos ataxias diferentes pueden inducir degeneración neuronal a través de mecanismos comunes, siendo uno de estos mecanismos la acumulación nuclear de dAtx2.



## 6. Bibliografía y Referencias

- Acar, M., Jafar-Nejad, H., Giagtzoglou, N., Yallampalli, S., David, G., He, Y., Delidakis, C. and Bellen, H. J. (2006). Senseless physically interacts with proneural proteins and functions as a transcriptional co-activator. *Development* 133, 1979-1989.
- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F., George, R. A., Lewis, S. E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S. N., Sutton, G. G., Wortman, J. R., Yandell, M. D., Zhang, Q., Chen, L. X., Brandon, R. C., Rogers, Y. H., Blazej, R. G., Champe, M., Pfeiffer, B. D., Wan, K. H., Doyle, C., Baxter, E. G., Helt, G., Nelson, C. R., Gabor, G. L., Abril, J. F., Agbayani, A., An, H. J., Andrews-Pfannkoch, C., Baldwin, D., Ballew, R. M., Basu, A., Baxendale, J., Bayraktaroglu, L., Beasley, E. M., Beeson, K. Y., Benos, P. V., Berman, B. P., Bhandari, D., Bolshakov, S., Borkova, D., Botchan, M. R., Bouck, J., Brokstein, P., Brottier, P., Burtis, K. C., Busam, D. A., Butler, H., Cadieu, E., Center, A., Chandra, I., Cherry, J. M., Cawley, S., Dahlke, C., Davenport, L. B., Davies, P., de Pablos, B., Delcher, A., Deng, Z., Mays, A. D., Dew, I., Dietz, S. M., Dodson, K., Doup, L. E., Downes, M., Dugan-Rocha, S., Dunkov, B. C., Dunn, P., Durbin, K. J., Evangelista, C. C., Ferraz, C., Ferriera, S., Fleischmann, W., Fosler, C., Gabrielian, A. E., Garg, N. S., Gelbart, W. M., Glasser, K., Glodek, A., Gong, F., Gorrell, J. H., Gu, Z., Guan, P., Harris, M., Harris, N. L., Harvey, D., Heiman, T. J., Hernandez, J. R., Houck, J., Hostin, D., Houston, K. A., Howland, T. J., Wei, M. H., Ibegwam, C., Jalali, M., Kalush, F., Karpen, G. H., Ke, Z., Kennison, J. A., Ketchum, K. A., Kimmel, B. E., Kodira, C. D., Kraft, C., Kravitz, S., Kulp, D., Lai, Z., Lasko, P., Lei, Y., Levitsky, A. A., Li, J., Li, Z., Liang, Y., Lin, X., Liu, X., Mattei, B., McIntosh, T. C., McLeod, M. P., McPherson, D., Merkulov, G., Milshina, N. V., Mobarry, C., Morris, J., Moshrefi, A., Mount, S. M., Moy, M., Murphy, B., Murphy, L., Muzny, D. M., Nelson, D. L., Nelson, D. R., Nelson, K. A., Nixon, K., Nusskern, D. R., Pacleb, J. M., Palazzolo, M., Pittman, G. S., Pan, S., Pollard, J., Puri, V., Reese, M. G., Reinert, K., Remington, K., Saunders, R. D., Scheeler, F., Shen, H., Shue, B. C., Siden-Kiamos, I., Simpson, M., Skupski, M. P., Smith, T., Spier, E., Spradling, A. C., Stapleton, M., Strong, R., Sun, E., Svirskas, R., Tector, C., Turner, R., Venter, E., Wang, A. H., Wang, X., Wang, Z. Y., Wassarman, D. A., Weinstock, G. M., Weissenbach, J., Williams, S. M., Woodage, T., Worley, K. C., Wu, D., Yang, S., Yao, Q. A., Ye, J., Yeh, R. F., Zaveri, J. S., Zhan, M., Zhang, G., Zhao, Q., Zheng, L., Zheng, X. H., Zhong, F. N., Zhong, W., Zhou, X., Zhu, S., Zhu, X., Smith, H. O., Gibbs, R. A., Myers, E. W., Rubin, G. M. and Venter, J. C. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185-2195.
- Armstrong, J., Bonaventura, I., Rojo, A., Gonzalez, G., Corral, J., Nadal, N., Volpini, V. and Ferrer, I. (2005). Spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2) with white matter involvement. *Neurosci Lett* 381, 247-251.
- Arrasate, M. and Finkbeiner, S. (2005). Automated microscope system for determining factors that predict neuronal fate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 3840-3845.

**Ballinger, C. A., Connell, P., Wu, Y., Hu, Z., Thompson, L. J., Yin, L. Y. and Patterson, C. (1999).** Identification of CHIP, a novel tetratricopeptide repeat-containing protein that interacts with heat shock proteins and negatively regulates chaperone functions. *Mol Cell Biol* *19*, 4535-4545.

**Bence, N. F., Sampat, R. M. and Kopito, R. R. (2001).** Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science* *292*, 1552-1555.

**Bowman, A. B., Yoo, S. Y., Dantuma, N. P. and Zoghbi, H. Y. (2005).** Neuronal dysfunction in a polyglutamine disease model occurs in the absence of ubiquitin-proteasome system impairment and inversely correlates with the degree of nuclear inclusion formation. *Hum Mol Genet* *14*, 679-691.

**Brand, A. H. and Perrimon, N. (1993).** Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* *118*, 401-415.

**Burright, E. N., Clark, H. B., Servadio, A., Matilla, T., Feddersen, R. M., Yunis, W. S., Duvick, L. A., Zoghbi, H. Y. and Orr, H. T. (1995).** SCA1 transgenic mice: a model for neurodegeneration caused by an expanded CAG trinucleotide repeat. *Cell* *82*, 937-948.

**Burright, E. N., Davidson, J. D., Duvick, L. A., Koshy, B., Zoghbi, H. Y. and Orr, H. T. (1997).** Identification of a self-association region within the SCA1 gene product, ataxin-1. *Hum Mol Genet* *6*, 513-518.

**Chandrasekaran, V. and Beckendorf, S. K. (2003).** senseless is necessary for the survival of embryonic salivary glands in *Drosophila*. *Development* *130*, 4719-4728.

**Chen, H. K., Fernandez-Funez, P., Acevedo, S. F., Lam, Y. C., Kaytor, M. D., Fernandez, M. H., Aitken, A., Skoulakis, E. M., Orr, H. T., Botas, J. and Zoghbi, H. Y. (2003).** Interaction of Akt-phosphorylated ataxin-1 with 14-3-3 mediates neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 1. *Cell* *113*, 457-468.

**Chen, Y. W., Allen, M. D., Veprintsev, D. B., Lowe, J. and Bycroft, M. (2004).** The structure of the AXH domain of spinocerebellar ataxin-1. *J Biol Chem* *279*, 3758-3765.

**Choi, J. S., Cho, S., Park, S. G., Park, B. C. and Lee, D. H. (2004).** Co-chaperone CHIP associates with mutant Cu/Zn-superoxide dismutase proteins linked to familial amyotrophic lateral sclerosis and promotes their degradation by proteasomes. *Biochem Biophys Res Commun* *321*, 574-583.

**Ciechanover, A. and Brundin, P. (2003).** The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: sometimes the chicken, sometimes the egg. *Neuron* *40*, 427-446.

**Ciosk, R., DePalma, M. and Priess, J. R. (2004).** ATX-2, the *C. elegans* ortholog of ataxin 2, functions in translational regulation in the germline. *Development* *131*, 4831-4841.

**Clark, I. E., Dodson, M. W., Jiang, C., Cao, J. H., Huh, J. R., Seol, J. H., Yoo, S. J., Hay, B. A. and Guo, M. (2006).** *Drosophila* pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature* *441*, 1162-1166.

**Cummings, C. J., Mancini, M. A., Antalffy, B., DeFranco, D. B., Orr, H. T. and Zoghbi, H. Y. (1998).** Chaperone suppression of aggregation and altered subcellular proteasome localization imply protein misfolding in SCA1. *Nat Genet* *19*, 148-154.

**Cummings, C. J., Reinstein, E., Sun, Y., Antalffy, B., Jiang, Y., Ciechanover, A., Orr, H. T., Beaudet, A. L. and Zoghbi, H. Y. (1999).** Mutation of the E6-AP ubiquitin

ligase reduces nuclear inclusion frequency while accelerating polyglutamine-induced pathology in SCA1 mice. *Neuron* 24, 879-892.

**Cummings, C. J., Sun, Y., Opal, P., Antalfy, B., Mestril, R., Orr, H. T., Dillmann, W. H. and Zoghbi, H. Y. (2001).** Over-expression of inducible HSP70 chaperone suppresses neuropathology and improves motor function in SCA1 mice. *Hum Mol Genet* 10, 1511-1518.

**Cyr, D. M., Hohfeld, J. and Patterson, C. (2002).** Protein quality control: U-box-containing E3 ubiquitin ligases join the fold. *Trends Biochem Sci* 27, 368-375.

**Dai, Q., Zhang, C., Wu, Y., McDonough, H., Whaley, R. A., Godfrey, V., Li, H. H., Madamanchi, N., Xu, W., Neckers, L., Cyr, D. and Patterson, C. (2003).** CHIP activates HSF1 and confers protection against apoptosis and cellular stress. *Embo J* 22, 5446-5458.

**Davies, A. F., Mirza, G., Sekhon, G., Turnpenny, P., Leroy, F., Speleman, F., Law, C., van Regemorter, N., Vamos, E., Flinter, F. and Ragoussis, J. (1999).** Delineation of two distinct 6p deletion syndromes. *Hum Genet* 104, 64-72.

**Duenas, A. M., Goold, R. and Giunti, P. (2006).** Molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxias. *Brain* 129, 1357-1370.

**Dunn, C. D. and Jensen, R. E. (2003).** Suppression of a defect in mitochondrial protein import identifies cytosolic proteins required for viability of yeast cells lacking mitochondrial DNA. *Genetics* 165, 35-45.

**Emamian, E. S., Kaytor, M. D., Duvick, L. A., Zu, T., Tousey, S. K., Zoghbi, H. Y., Clark, H. B. and Orr, H. T. (2003).** Serine 776 of ataxin-1 is critical for polyglutamine-induced disease in SCA1 transgenic mice. *Neuron* 38, 375-387.

**Feany, M. B. and Bender, W. W. (2000).** A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature* 404, 394-398.

**Fernandez-Funez, P., Nino-Rosales, M. L., de Gouyon, B., She, W. C., Luchak, J. M., Martinez, P., Turiegano, E., Benito, J., Capovilla, M., Skinner, P. J., McCall, A., Canal, I., Orr, H. T., Zoghbi, H. Y. and Botas, J. (2000).** Identification of genes that modify ataxin-1-induced neurodegeneration. *Nature* 408, 101-106.

**Frankfort, B. J., Nolo, R., Zhang, Z., Bellen, H. and Mardon, G. (2001).** senseless repression of rough is required for R8 photoreceptor differentiation in the developing *Drosophila* eye. *Neuron* 32, 403-414.

**Ganetzky, B. and Flanagan, J. R. (1978).** On the relationship between senescence and age-related changes in two wild-type strains of *Drosophila melanogaster*. *Exp Gerontol* 13, 189-196.

**Gatchel, J. R. and Zoghbi, H. Y. (2005).** Diseases of unstable repeat expansion: mechanisms and common principles. *Nat Rev Genet* 6, 743-755.

**Gidalevitz, T., Ben-Zvi, A., Ho, K. H., Brignull, H. R. and Morimoto, R. I. (2006).** Progressive disruption of cellular protein folding in models of polyglutamine diseases. *Science* 311, 1471-1474.

**Graham, R. K., Deng, Y., Slow, E. J., Haigh, B., Bissada, N., Lu, G., Pearson, J., Shehadeh, J., Bertram, L., Murphy, Z., Warby, S. C., Doty, C. N., Roy, S., Wellington, C. L., Leavitt, B. R., Raymond, L. A., Nicholson, D. W. and Hayden, M. R. (2006).** Cleavage at the caspase-6 site is required for neuronal dysfunction and degeneration due to mutant huntingtin. *Cell* 125, 1179-1191.

**Greene, J. C., Whitworth, A. J., Kuo, I., Andrews, L. A., Feany, M. B. and Pallanck, L. J. (2003).** Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in *Drosophila parkin* mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 4078-4083.

**Gunawardena, S., Her, L. S., Bruschi, R. G., Laymon, R. A., Niesman, I. R., Gordesky-Gold, B., Sintasath, L., Bonini, N. M. and Goldstein, L. S. (2003).** Disruption of axonal transport by loss of huntingtin or expression of pathogenic polyQ proteins in *Drosophila*. *Neuron* *40*, 25-40.

**Hackam, A. S., Hodgson, J. G., Singaraja, R., Zhang, T., Gan, L., Gutekunst, C. A., Hersch, S. M. and Hayden, M. R. (1999).** Evidence for both the nucleus and cytoplasm as subcellular sites of pathogenesis in Huntington's disease in cell culture and in transgenic mice expressing mutant huntingtin. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* *354*, 1047-1055.

**Hashida, H., Goto, J., Suzuki, T., Jeong, S., Masuda, N., Ooie, T., Tachiiri, Y., Tsuchiya, H. and Kanazawa, I. (2001).** Single cell analysis of CAG repeat in brains of dentatorubral-pallidolucylian atrophy (DRPLA). *J Neurol Sci* *190*, 87-93.

**Hatakeyama, S., Matsumoto, M., Kamura, T., Murayama, M., Chui, D. H., Planel, E., Takahashi, R., Nakayama, K. I. and Takashima, A. (2004).** U-box protein carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein (CHIP) mediates poly-ubiquitylation preferentially on four-repeat Tau and is involved in neurodegeneration of tauopathy. *J Neurochem* *91*, 299-307.

**He, W. and Parker, R. (2000).** Functions of Lsm proteins in mRNA degradation and splicing. *Curr Opin Cell Biol* *12*, 346-350.

**Holmberg, M., Duyckaerts, C., Durr, A., Cancel, G., Gourfinkel-An, I., Damier, P., Faucheux, B., Trotter, Y., Hirsch, E. C., Agid, Y. and Brice, A. (1998).** Spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7): a neurodegenerative disorder with neuronal intranuclear inclusions. *Hum Mol Genet* *7*, 913-918.

**Humbert, S., Bryson, E. A., Cordelieres, F. P., Connors, N. C., Datta, S. R., Finkbeiner, S., Greenberg, M. E. and Saudou, F. (2002).** The IGF-1/Akt pathway is neuroprotective in Huntington's disease and involves Huntingtin phosphorylation by Akt. *Dev Cell* *2*, 831-837.

**Huynh, D. P., Del Bigio, M. R., Ho, D. H. and Pulst, S. M. (1999).** Expression of ataxin-2 in brains from normal individuals and patients with Alzheimer's disease and spinocerebellar ataxia 2. *Ann Neurol* *45*, 232-241.

**Huynh, D. P., Figueroa, K., Hoang, N. and Pulst, S. M. (2000).** Nuclear localization or inclusion body formation of ataxin-2 are not necessary for SCA2 pathogenesis in mouse or human. *Nat Genet* *26*, 44-50.

**Huynh, D. P., Yang, H. T., Vakharia, H., Nguyen, D. and Pulst, S. M. (2003).** Expansion of the polyQ repeat in ataxin-2 alters its Golgi localization, disrupts the Golgi complex and causes cell death. *Hum Mol Genet* *12*, 1485-1496.

**Iijima, K., Liu, H. P., Chiang, A. S., Hearn, S. A., Konsolaki, M. and Zhong, Y. (2004).** Dissecting the pathological effects of human Abeta40 and Abeta42 in *Drosophila*: a potential model for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 6623-6628.

**Imai, Y., Soda, M., Hatakeyama, S., Akagi, T., Hashikawa, T., Nakayama, K. I. and Takahashi, R. (2002).** CHIP is associated with Parkin, a gene responsible for familial Parkinson's disease, and enhances its ubiquitin ligase activity. *Mol Cell* *10*, 55-67.

**Irwin, S., Vandelft, M., Pinchev, D., Howell, J. L., Graczyk, J., Orr, H. T. and Truant, R. (2005).** RNA association and nucleocytoplasmic shuttling by ataxin-1. *J Cell Sci* 118, 233-242.

**Jackson, G. R., Salecker, I., Dong, X., Yao, X., Arnheim, N., Faber, P. W., MacDonald, M. E. and Zipursky, S. L. (1998).** Polyglutamine-expanded human huntingtin transgenes induce degeneration of *Drosophila* photoreceptor neurons. *Neuron* 21, 633-642.

**Jackson, G. R., Wiedau-Pazos, M., Sang, T. K., Wagle, N., Brown, C. A., Massachi, S. and Geschwind, D. H. (2002).** Human wild-type tau interacts with wingless pathway components and produces neurofibrillary pathology in *Drosophila*. *Neuron* 34, 509-519.

**Jafar-Nejad, H. and Bellen, H. J. (2004).** Gfi/Pag-3/senseless zinc finger proteins: a unifying theme? *Mol Cell Biol* 24, 8803-8812.

**Jana, N. R., Dikshit, P., Goswami, A., Kotliarova, S., Murata, S., Tanaka, K. and Nukina, N. (2005).** Co-chaperone CHIP associates with expanded polyglutamine protein and promotes their degradation by proteasomes. *J Biol Chem* 280, 11635-11640.

**Jiang, J., Ballinger, C. A., Wu, Y., Dai, Q., Cyr, D. M., Hohfeld, J. and Patterson, C. (2001).** CHIP is a U-box-dependent E3 ubiquitin ligase: identification of Hsc70 as a target for ubiquitylation. *J Biol Chem* 276, 42938-42944.

**Kampinga, H. H., Kanon, B., Salomons, F. A., Kabakov, A. E. and Patterson, C. (2003).** Overexpression of the cochaperone CHIP enhances Hsp70-dependent folding activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 23, 4948-4958.

**Katsuno, M., Adachi, H., Kume, A., Li, M., Nakagomi, Y., Niwa, H., Sang, C., Kobayashi, Y., Doyu, M. and Sobue, G. (2002).** Testosterone reduction prevents phenotypic expression in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Neuron* 35, 843-854.

**Kaytor, M. D. and Warren, S. T. (1999).** Aberrant protein deposition and neurological disease. *J Biol Chem* 274, 37507-37510.

**Kazemi-Esfarjani, P. and Benzer, S. (2000).** Genetic suppression of polyglutamine toxicity in *Drosophila*. *Science* 287, 1837-1840.

**Kiehl, T. R., Nechiporuk, A., Figueroa, K. P., Keating, M. T., Huynh, D. P. and Pulst, S. M. (2006).** Generation and characterization of Sca2 (ataxin-2) knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 339, 17-24.

**Klement, I. A., Skinner, P. J., Kaytor, M. D., Yi, H., Hersch, S. M., Clark, H. B., Zoghbi, H. Y. and Orr, H. T. (1998).** Ataxin-1 nuclear localization and aggregation: role in polyglutamine-induced disease in SCA1 transgenic mice. *Cell* 95, 41-53.

**Koeppen, A. H. (2005).** The pathogenesis of spinocerebellar ataxia. *Cerebellum* 4, 62-73.

**Koshy, B., Matilla, T., Burright, E. N., Merry, D. E., Fischbeck, K. H., Orr, H. T. and Zoghbi, H. Y. (1996).** Spinocerebellar ataxia type-1 and spinobulbar muscular atrophy gene products interact with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Hum Mol Genet* 5, 1311-1318.

**Koyano, S., Uchihara, T., Fujigasaki, H., Nakamura, A., Yagishita, S. and Iwabuchi, K. (1999).** Neuronal intranuclear inclusions in spinocerebellar ataxia type 2: triple-labeling immunofluorescent study. *Neurosci Lett* 273, 117-120.

**Kozlov, G., Trempe, J. F., Khaleghpour, K., Kahvejian, A., Ekiel, I. and Gehring, K. (2001).** Structure and function of the C-terminal PABC domain of human poly(A)-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4409-4413.

**La Spada, A. R., Wilson, E. M., Lubahn, D. B., Harding, A. E. and Fischbeck, K. H. (1991).** Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature* 352, 77-79.

**Lee, W. C., Yoshihara, M. and Littleton, J. T. (2004).** Cytoplasmic aggregates trap polyglutamine-containing proteins and block axonal transport in a *Drosophila* model of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 3224-3229.

**Li, S. H. and Li, X. J. (2004).** Huntingtin and its role in neuronal degeneration. *Neuroscientist* 10, 467-475.

**Lim, J., Hao, T., Shaw, C., Patel, A. J., Szabo, G., Rual, J. F., Fisk, C. J., Li, N., Smolyar, A., Hill, D. E., Barabasi, A. L., Vidal, M. and Zoghbi, H. Y. (2006).** A protein-protein interaction network for human inherited ataxias and disorders of Purkinje cell degeneration. *Cell* 125, 801-814.

**Lin, X., Antalffy, B., Kang, D., Orr, H. T. and Zoghbi, H. Y. (2000).** Polyglutamine expansion down-regulates specific neuronal genes before pathologic changes in SCA1. *Nat Neurosci* 3, 157-163.

**Luo, S., Vacher, C., Davies, J. E. and Rubinsztein, D. C. (2005).** Cdk5 phosphorylation of huntingtin reduces its cleavage by caspases: implications for mutant huntingtin toxicity. *J Cell Biol* 169, 647-656.

**Luthi-Carter, R., Strand, A. D., Hanson, S. A., Kooperberg, C., Schilling, G., La Spada, A. R., Merry, D. E., Young, A. B., Ross, C. A., Borchelt, D. R. and Olson, J. M. (2002).** Polyglutamine and transcription: gene expression changes shared by DRPLA and Huntington's disease mouse models reveal context-independent effects. *Hum Mol Genet* 11, 1927-1937.

**Ma, Y. and Hendershot, L. M. (2001).** The unfolding tale of the unfolded protein response. *Cell* 107, 827-830.

**Mangus, D. A., Amrani, N. and Jacobson, A. (1998).** Pbp1p, a factor interacting with *Saccharomyces cerevisiae* poly(A)-binding protein, regulates polyadenylation. *Mol Cell Biol* 18, 7383-7396.

**Marsh, J. L. and Thompson, L. M. (2006).** *Drosophila* in the study of neurodegenerative disease. *Neuron* 52, 169-178.

**Matilla, A., Roberson, E. D., Banfi, S., Morales, J., Armstrong, D. L., Burrell, E. N., Orr, H. T., Sweatt, J. D., Zoghbi, H. Y. and Matzuk, M. M. (1998).** Mice lacking ataxin-1 display learning deficits and decreased hippocampal paired-pulse facilitation. *J Neurosci* 18, 5508-5516.

**McDonough, H. and Patterson, C. (2003).** CHIP: a link between the chaperone and proteasome systems. *Cell Stress Chaperones* 8, 303-308.

**Meulener, M., Whitworth, A. J., Armstrong-Gold, C. E., Rizzu, P., Heutink, P., Wes, P. D., Pallanck, L. J. and Bonini, N. M. (2005).** *Drosophila* DJ-1 mutants are selectively sensitive to environmental toxins associated with Parkinson's disease. *Curr Biol* 15, 1572-1577.

**Meulener, M. C., Xu, K., Thomson, L., Ischiropoulos, H. and Bonini, N. M. (2006).** Mutational analysis of DJ-1 in *Drosophila* implicates functional inactivation by oxidative damage and aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 12517-12522.

**Michalik, A. and Van Broeckhoven, C. (2003).** Pathogenesis of polyglutamine disorders: aggregation revisited. *Hum Mol Genet 12 Spec No 2*, R173-186.

**Miller, V. M., Nelson, R. F., Gouvion, C. M., Williams, A., Rodriguez-Lebron, E., Harper, S. Q., Davidson, B. L., Rebagliati, M. R. and Paulson, H. L. (2005).** CHIP suppresses polyglutamine aggregation and toxicity in vitro and in vivo. *J Neurosci 25*, 9152-9161.

**Mizutani, A., Wang, L., Rajan, H., Vig, P. J., Alaynick, W. A., Thaler, J. P. and Tsai, C. C. (2005).** Boat, an AXH domain protein, suppresses the cytotoxicity of mutant ataxin-1. *Embo J 24*, 3339-3351.

**Murata, S., Chiba, T. and Tanaka, K. (2003).** CHIP: a quality-control E3 ligase collaborating with molecular chaperones. *Int J Biochem Cell Biol 35*, 572-578.

**Murata, S., Minami, Y., Minami, M., Chiba, T. and Tanaka, K. (2001).** CHIP is a chaperone-dependent E3 ligase that ubiquitylates unfolded protein. *EMBO Rep 2*, 1133-1138.

**Nakamura, K., Jeong, S. Y., Uchihara, T., Anno, M., Nagashima, K., Nagashima, T., Ikeda, S., Tsuji, S. and Kanazawa, I. (2001).** SCA17, a novel autosomal dominant cerebellar ataxia caused by an expanded polyglutamine in TATA-binding protein. *Hum Mol Genet 10*, 1441-1448.

**Neuwald, A. F. and Koonin, E. V. (1998).** Ataxin-2, global regulators of bacterial gene expression, and spliceosomal snRNP proteins share a conserved domain. *J Mol Med 76*, 3-5.

**Nishimura, I., Yang, Y. and Lu, B. (2004).** PAR-1 kinase plays an initiator role in a temporally ordered phosphorylation process that confers tau toxicity in *Drosophila*. *Cell 116*, 671-682.

**Nolo, R., Abbott, L. A. and Bellen, H. J. (2000).** Senseless, a Zn finger transcription factor, is necessary and sufficient for sensory organ development in *Drosophila*. *Cell 102*, 349-362.

**Okazawa, H., Rich, T., Chang, A., Lin, X., Waragai, M., Kajikawa, M., Enokido, Y., Komuro, A., Kato, S., Shibata, M., Hatanaka, H., Mouradian, M. M., Sudol, M. and Kanazawa, I. (2002).** Interaction between mutant ataxin-1 and PQBP-1 affects transcription and cell death. *Neuron 34*, 701-713.

**Ordway, J. M., Tallaksen-Greene, S., Gutekunst, C. A., Bernstein, E. M., Cearley, J. A., Wiener, H. W., Dure, L. S. t., Lindsey, R., Hersch, S. M., Jope, R. S., Albin, R. L. and Detloff, P. J. (1997).** Ectopically expressed CAG repeats cause intranuclear inclusions and a progressive late onset neurological phenotype in the mouse. *Cell 91*, 753-763.

**Orr, H. T., Chung, M. Y., Banfi, S., Kwiatkowski, T. J., Jr., Servadio, A., Beaudet, A. L., McCall, A. E., Duvick, L. A., Ranum, L. P. and Zoghbi, H. Y. (1993).** Expansion of an unstable trinucleotide CAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1. *Nat Genet 4*, 221-226.

**Orr, H. T. and Zoghbi, H. Y. (2001).** SCA1 molecular genetics: a history of a 13 year collaboration against glutamines. *Hum Mol Genet 10*, 2307-2311.

**Pang, J. T., Giunti, P., Chamberlain, S., An, S. F., Vitaliani, R., Scaravilli, T., Martinian, L., Wood, N. W., Scaravilli, F. and Ansorge, O. (2002).** Neuronal intranuclear inclusions in SCA2: a genetic, morphological and immunohistochemical study of two cases. *Brain 125*, 656-663.

**Pardo, R., Colin, E., Regulier, E., Aebischer, P., Deglon, N., Humbert, S. and Saudou, F. (2006).** Inhibition of calcineurin by FK506 protects against polyglutamine-huntingtin toxicity through an increase of huntingtin phosphorylation at S421. *J Neurosci* 26, 1635-1645.

**Park, J., Kim, S. Y., Cha, G. H., Lee, S. B., Kim, S. and Chung, J. (2005a).** Drosophila DJ-1 mutants show oxidative stress-sensitive locomotive dysfunction. *Gene* 361, 133-139.

**Park, J., Lee, S. B., Lee, S., Kim, Y., Song, S., Kim, S., Bae, E., Kim, J., Shong, M., Kim, J. M. and Chung, J. (2006).** Mitochondrial dysfunction in Drosophila PINK1 mutants is complemented by parkin. *Nature* 441, 1157-1161.

**Park, Y., Hong, S., Kim, S. J. and Kang, S. (2005b).** Proteasome function is inhibited by polyglutamine-expanded ataxin-1, the SCA1 gene product. *Mol Cells* 19, 23-30.

**Parks, A. L., Cook, K. R., Belvin, M., Dompe, N. A., Fawcett, R., Huppert, K., Tan, L. R., Winter, C. G., Bogart, K. P., Deal, J. E., Deal-Herr, M. E., Grant, D., Marcinko, M., Miyazaki, W. Y., Robertson, S., Shaw, K. J., Tabios, M., Vysotskaia, V., Zhao, L., Andrade, R. S., Edgar, K. A., Howie, E., Killpack, K., Milash, B., Norton, A., Thao, D., Whittaker, K., Winner, M. A., Friedman, L., Margolis, J., Singer, M. A., Kopczyński, C., Curtis, D., Kaufman, T. C., Plowman, G. D., Duyk, G. and Francis-Lang, H. L. (2004).** Systematic generation of high-resolution deletion coverage of the Drosophila melanogaster genome. *Nat Genet* 36, 288-292.

**Pearson, C. E., Nichol Edamura, K. and Cleary, J. D. (2005).** Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations. *Nat Rev Genet* 6, 729-742.

**Perutz, M. F. (1996).** Glutamine repeats and inherited neurodegenerative diseases: molecular aspects. *Curr Opin Struct Biol* 6, 848-858.

**Petrucelli, L., Dickson, D., Kehoe, K., Taylor, J., Snyder, H., Grover, A., De Lucia, M., McGowan, E., Lewis, J., Prihar, G., Kim, J., Dillmann, W. H., Browne, S. E., Hall, A., Voellmy, R., Tsuboi, Y., Dawson, T. M., Wolozin, B., Hardy, J. and Hutton, M. (2004).** CHIP and Hsp70 regulate tau ubiquitination, degradation and aggregation. *Hum Mol Genet* 13, 703-714.

**Pulst, S. M., Santos, N., Wang, D., Yang, H., Huynh, D., Velazquez, L. and Figueroa, K. P. (2005).** Spinocerebellar ataxia type 2: polyQ repeat variation in the CACNA1A calcium channel modifies age of onset. *Brain* 128, 2297-2303.

**Ralser, M., Albrecht, M., Nonhoff, U., Lengauer, T., Lehrach, H. and Krobitsch, S. (2005).** An integrative approach to gain insights into the cellular function of human ataxin-2. *J Mol Biol* 346, 203-214.

**Riley, B. E. and Orr, H. T. (2006).** Polyglutamine neurodegenerative diseases and regulation of transcription: assembling the puzzle. *Genes Dev* 20, 2183-2192.

**Robitaille, Y., Schut, L. and Kish, S. J. (1995).** Structural and immunocytochemical features of olivopontocerebellar atrophy caused by the spinocerebellar ataxia type 1 (SCA-1) mutation define a unique phenotype. *Acta Neuropathol (Berl)* 90, 572-581.

**Rorth, P., Szabo, K., Bailey, A., Laverty, T., Rehm, J., Rubin, G. M., Weigmann, K., Milan, M., Benes, V., Ansoerge, W. and Cohen, S. M. (1998).** Systematic gain-of-function genetics in Drosophila. *Development* 125, 1049-1057.

**Ross, C. A. and Poirier, M. A. (2004).** Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med* 10 Suppl, S10-17.



Rubin, G. M., Yandell, M. D., Wortman, J. R., Gabor Miklos, G. L., Nelson, C. R., Hariharan, I. K., Fortini, M. E., Li, P. W., Apweiler, R., Fleischmann, W., Cherry, J. M., Henikoff, S., Skupski, M. P., Misra, S., Ashburner, M., Birney, E., Boguski, M. S., Brody, T., Brokstein, P., Celniker, S. E., Chervitz, S. A., Coates, D., Cravchik, A., Gabrielian, A., Galle, R. F., Gelbart, W. M., George, R. A., Goldstein, L. S., Gong, F., Guan, P., Harris, N. L., Hay, B. A., Hoskins, R. A., Li, J., Li, Z., Hynes, R. O., Jones, S. J., Kuehl, P. M., Lemaitre, B., Littleton, J. T., Morrison, D. K., Mungall, C., O'Farrell, P. H., Pickeral, O. K., Shue, C., Vosshall, L. B., Zhang, J., Zhao, Q., Zheng, X. H. and Lewis, S. (2000). Comparative genomics of the eukaryotes. *Science* 287, 2204-2215.

Satterfield, T. F., Jackson, S. M. and Pallanck, L. J. (2002). A *Drosophila* homolog of the polyglutamine disease gene SCA2 is a dosage-sensitive regulator of actin filament formation. *Genetics* 162, 1687-1702.

Satterfield, T. F. and Pallanck, L. J. (2006). Ataxin-2 and its *Drosophila* homolog, ATX2, physically assemble with polyribosomes. *Hum Mol Genet* 15, 2523-2532.

Schilling, B., Gafni, J., Torcassi, C., Cong, X., Row, R. H., LaFevre-Bernt, M. A., Cusack, M. P., Ratovitski, T., Hirschhorn, R., Ross, C. A., Gibson, B. W. and Ellerby, L. M. (2006). Huntingtin phosphorylation sites mapped by mass spectrometry. Modulation of cleavage and toxicity. *J Biol Chem* 281, 23686-23697.

Serra, H. G., Byam, C. E., Lande, J. D., Tousey, S. K., Zoghbi, H. Y. and Orr, H. T. (2004). Gene profiling links SCA1 pathophysiology to glutamate signaling in Purkinje cells of transgenic mice. *Hum Mol Genet* 13, 2535-2543.

Servadio, A., Koshy, B., Armstrong, D., Antalffy, B., Orr, H. T. and Zoghbi, H. Y. (1995). Expression analysis of the ataxin-1 protein in tissues from normal and spinocerebellar ataxia type 1 individuals. *Nat Genet* 10, 94-98.

Seufert, W. and Jentsch, S. (1990). Ubiquitin-conjugating enzymes UBC4 and UBC5 mediate selective degradation of short-lived and abnormal proteins. *Embo J* 9, 543-550.

Shimura, H., Schwartz, D., Gygi, S. P. and Kosik, K. S. (2004). CHIP-Hsc70 complex ubiquitinates phosphorylated tau and enhances cell survival. *J Biol Chem* 279, 4869-4876.

Shin, Y., Klucken, J., Patterson, C., Hyman, B. T. and McLean, P. J. (2005). The co-chaperone carboxyl terminus of Hsp70-interacting protein (CHIP) mediates alpha-synuclein degradation decisions between proteasomal and lysosomal pathways. *J Biol Chem* 280, 23727-23734.

Shulman, J. M. and Feany, M. B. (2003). Genetic modifiers of tauopathy in *Drosophila*. *Genetics* 165, 1233-1242.

Skinner, P. J., Koshy, B. T., Cummings, C. J., Klement, I. A., Helin, K., Servadio, A., Zoghbi, H. Y. and Orr, H. T. (1997). Ataxin-1 with an expanded glutamine tract alters nuclear matrix-associated structures. *Nature* 389, 971-974.

Slow, E. J., Graham, R. K., Osmand, A. P., Devon, R. S., Lu, G., Deng, Y., Pearson, J., Vaid, K., Bissada, N., Wetzel, R., Leavitt, B. R. and Hayden, M. R. (2005). Absence of behavioral abnormalities and neurodegeneration in vivo despite widespread neuronal huntingtin inclusions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 11402-11407.

Steffan, J. S., Agrawal, N., Pallos, J., Rockabrand, E., Trotman, L. C., Slepko, N., Illes, K., Lukacsovich, T., Zhu, Y. Z., Cattaneo, E., Pandolfi, P. P., Thompson, L. M.

**and Marsh, J. L. (2004).** SUMO modification of Huntingtin and Huntington's disease pathology. *Science* 304, 100-104.

**Steffan, J. S., Bodai, L., Pallos, J., Poelman, M., McCampbell, A., Apostol, B. L., Kazantsev, A., Schmidt, E., Zhu, Y. Z., Greenwald, M., Kurokawa, R., Housman, D. E., Jackson, G. R., Marsh, J. L. and Thompson, L. M. (2001).** Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in *Drosophila*. *Nature* 413, 739-743.

**Sugars, K. L., Brown, R., Cook, L. J., Swartz, J. and Rubinsztein, D. C. (2004).** Decreased cAMP response element-mediated transcription: an early event in exon 1 and full-length cell models of Huntington's disease that contributes to polyglutamine pathogenesis. *J Biol Chem* 279, 4988-4999.

**Sugars, K. L. and Rubinsztein, D. C. (2003).** Transcriptional abnormalities in Huntington disease. *Trends Genet* 19, 233-238.

**Takeyama, K., Ito, S., Yamamoto, A., Tanimoto, H., Furutani, T., Kanuka, H., Miura, M., Tabata, T. and Kato, S. (2002).** Androgen-dependent neurodegeneration by polyglutamine-expanded human androgen receptor in *Drosophila*. *Neuron* 35, 855-864.

**Tanese, N. and Tjian, R. (1993).** Coactivators and TAFs: a new class of eukaryotic transcription factors that connect activators to the basal machinery. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 58, 179-185.

**Taroni, F. and DiDonato, S. (2004).** Pathways to motor incoordination: the inherited ataxias. *Nat Rev Neurosci* 5, 641-655.

**Thibault, S. T., Singer, M. A., Miyazaki, W. Y., Milash, B., Dompe, N. A., Singh, C. M., Buchholz, R., Demsky, M., Fawcett, R., Francis-Lang, H. L., Ryner, L., Cheung, L. M., Chong, A., Erickson, C., Fisher, W. W., Greer, K., Hartouni, S. R., Howie, E., Jakkula, L., Joo, D., Killpack, K., Laufer, A., Mazzotta, J., Smith, R. D., Stevens, L. M., Stuber, C., Tan, L. R., Ventura, R., Woo, A., Zakrajsek, I., Zhao, L., Chen, F., Swimmer, C., Kopczyński, C., Duyk, G., Winberg, M. L. and Margolis, J. (2004).** A complementary transposon tool kit for *Drosophila melanogaster* using P and piggyBac. *Nat Genet* 36, 283-287.

**Torroja, L., Chu, H., Kotovsky, I. and White, K. (1999a).** Neuronal overexpression of APPL, the *Drosophila* homologue of the amyloid precursor protein (APP), disrupts axonal transport. *Curr Biol* 9, 489-492.

**Torroja, L., Packard, M., Gorczyca, M., White, K. and Budnik, V. (1999b).** The *Drosophila* beta-amyloid precursor protein homolog promotes synapse differentiation at the neuromuscular junction. *J Neurosci* 19, 7793-7803.

**Tsai, C. C., Kao, H. Y., Mizutani, A., Banayo, E., Rajan, H., McKeown, M. and Evans, R. M. (2004).** Ataxin 1, a SCA1 neurodegenerative disorder protein, is functionally linked to the silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 4047-4052.

**Tsuda, H., Jafar-Nejad, H., Patel, A. J., Sun, Y., Chen, H. K., Rose, M. F., Venken, K. J., Botas, J., Orr, H. T., Bellen, H. J. and Zoghbi, H. Y. (2005).** The AXH domain of Ataxin-1 mediates neurodegeneration through its interaction with Gfi-1/Senseless proteins. *Cell* 122, 633-644.

**Uchihara, T., Fujigasaki, H., Koyano, S., Nakamura, A., Yagishita, S. and Iwabuchi, K. (2001).** Non-expanded polyglutamine proteins in intranuclear inclusions of hereditary

ataxias--triple-labeling immunofluorescence study. *Acta Neuropathol (Berl)* 102, 149-152.

**Urushitani, M., Kurisu, J., Tateno, M., Hatakeyama, S., Nakayama, K., Kato, S. and Takahashi, R. (2004).** CHIP promotes proteasomal degradation of familial ALS-linked mutant SOD1 by ubiquitinating Hsp/Hsc70. *J Neurochem* 90, 231-244.

**Venken, K. J. and Bellen, H. J. (2005).** Emerging technologies for gene manipulation in *Drosophila melanogaster*. *Nat Rev Genet* 6, 167-178.

**Warrick, J. M., Morabito, L. M., Bilen, J., Gordesky-Gold, B., Faust, L. Z., Paulson, H. L. and Bonini, N. M. (2005).** Ataxin-3 suppresses polyglutamine neurodegeneration in *Drosophila* by a ubiquitin-associated mechanism. *Mol Cell* 18, 37-48.

**Warrick, J. M., Paulson, H. L., Gray-Board, G. L., Bui, Q. T., Fischbeck, K. H., Pittman, R. N. and Bonini, N. M. (1998).** Expanded polyglutamine protein forms nuclear inclusions and causes neural degeneration in *Drosophila*. *Cell* 93, 939-949.

**Watase, K., Weeber, E. J., Xu, B., Antalffy, B., Yuva-Paylor, L., Hashimoto, K., Kano, M., Atkinson, R., Sun, Y., Armstrong, D. L., Sweatt, J. D., Orr, H. T., Paylor, R. and Zoghbi, H. Y. (2002).** A long CAG repeat in the mouse *Sca1* locus replicates SCA1 features and reveals the impact of protein solubility on selective neurodegeneration. *Neuron* 34, 905-919.

**Weihe, U., Milan, M. and Cohen, S. M. (2001).** Regulation of Apterous activity in *Drosophila* wing development. *Development* 128, 4615-4622.

**Wickner, S., Maurizi, M. R. and Gottesman, S. (1999).** Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science* 286, 1888-1893.

**Wiederkehr, T., Bukau, B. and Buchberger, A. (2002).** Protein turnover: a CHIP programmed for proteolysis. *Curr Biol* 12, R26-28.

**Yamamoto, A., Lucas, J. J. and Hen, R. (2000).** Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a conditional model of Huntington's disease. *Cell* 101, 57-66.

**Yang, Y., Gehrke, S., Haque, M. E., Imai, Y., Kosek, J., Yang, L., Beal, M. F., Nishimura, I., Wakamatsu, K., Ito, S., Takahashi, R. and Lu, B. (2005).** Inactivation of *Drosophila* DJ-1 leads to impairments of oxidative stress response and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 13670-13675.

**Yang, Y., Gehrke, S., Imai, Y., Huang, Z., Ouyang, Y., Wang, J. W., Yang, L., Beal, M. F., Vogel, H. and Lu, B. (2006).** Mitochondrial pathology and muscle and dopaminergic neuron degeneration caused by inactivation of *Drosophila* Pink1 is rescued by Parkin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 10793-10798.

**Yang, Y., Nishimura, I., Imai, Y., Takahashi, R. and Lu, B. (2003).** Parkin suppresses dopaminergic neuron-selective neurotoxicity induced by Pael-R in *Drosophila*. *Neuron* 37, 911-924.

**Yee, A. S., Paulson, E. K., McDevitt, M. A., Rieger-Christ, K., Summerhayes, I., Berasi, S. P., Kim, J., Huang, C. Y. and Zhang, X. (2004).** The HBP1 transcriptional repressor and the p38 MAP kinase: unlikely partners in G1 regulation and tumor suppression. *Gene* 336, 1-13.

**Yue, S., Serra, H. G., Zoghbi, H. Y. and Orr, H. T. (2001).** The spinocerebellar ataxia type 1 protein, ataxin-1, has RNA-binding activity that is inversely affected by the length of its polyglutamine tract. *Hum Mol Genet* 10, 25-30.

**Zhuchenko, O., Bailey, J., Bonnen, P., Ashizawa, T., Stockton, D. W., Amos, C., Dobyns, W. B., Subramony, S. H., Zoghbi, H. Y. and Lee, C. C. (1997).** Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the alpha 1A-voltage-dependent calcium channel. *Nat Genet* 15, 62-69.

**Zoghbi, H. Y. and Orr, H. T. (2000).** Glutamine repeats and neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci* 23, 217-247.

**Zoghbi, H. Y., Pollack, M. S., Lyons, L. A., Ferrell, R. E., Daiger, S. P. and Beaudet, A. L. (1988).** Spinocerebellar ataxia: variable age of onset and linkage to human leukocyte antigen in a large kindred. *Ann Neurol* 23, 580-584.

**Zu, T., Duvick, L. A., Kaytor, M. D., Berlinger, M. S., Zoghbi, H. Y., Clark, H. B. and Orr, H. T. (2004).** Recovery from polyglutamine-induced neurodegeneration in conditional SCA1 transgenic mice. *J Neurosci* 24, 8853-8861.

# CHIP Protects from the Neurotoxicity of Expanded and Wild-type Ataxin-1 and Promotes Their Ubiquitination and Degradation<sup>\*[5]</sup>

Received for publication, February 21, 2006, and in revised form, July 5, 2006. Published, JBC Papers in Press, July 10, 2006, DOI 10.1074/jbc.M601603200

Ismael Al-Ramahi<sup>‡§</sup>, Yung C. Lam<sup>¶</sup>, Hung-Kai Chen<sup>‡</sup>, Beatrice de Gouyon<sup>‡</sup>, Minghang Zhang<sup>‡</sup>, Alma M. Pérez<sup>‡</sup>, Joana Branco<sup>‡1</sup>, Maria de Haro<sup>‡§</sup>, Cam Patterson<sup>||</sup>, Huda Y. Zoghbi<sup>‡¶\*\*2</sup>, and Juan Botas<sup>‡3</sup>

From the <sup>‡</sup>Departments of Molecular and Human Genetics and <sup>¶</sup>Neuroscience, <sup>\*\*</sup>Howard Hughes Medical Institute, Baylor College of Medicine, Houston, Texas 77030, the <sup>||</sup>Carolina Cardiovascular Biology Center and Departments of Medicine, Pharmacology, and Cell and Developmental Biology, University of North Carolina, Chapel Hill, North Carolina 27599, and the <sup>§</sup>Departamento de Biología, Facultad de Ciencias-University Autonoma de Madrid, Madrid 28049, Spain

CHIP (C terminus of Hsc-70 interacting protein) is an E3 ligase that links the protein folding machinery with the ubiquitin-proteasome system and has been implicated in disorders characterized by protein misfolding and aggregation. Here we investigate the role of CHIP in protecting from ataxin-1-induced neurodegeneration. Ataxin-1 is a polyglutamine protein whose expansion causes spinocerebellar ataxia type-1 (SCA1) and triggers the formation of nuclear inclusions (NIs). We find that CHIP and ataxin-1 proteins directly interact and co-localize in NIs both in cell culture and SCA1 postmortem neurons. CHIP promotes ubiquitination of expanded ataxin-1 both *in vitro* and in cell culture. The Hsp70 chaperone increases CHIP-mediated ubiquitination of ataxin-1 *in vitro*, and the tetratricopeptide repeat domain, which mediates CHIP interactions with chaperones, is required for ataxin-1 ubiquitination in cell culture. Interestingly, CHIP also interacts with and ubiquitinates unexpanded ataxin-1. Overexpression of CHIP in a *Drosophila* model of SCA1 decreases the protein steady-state levels of both expanded and unexpanded ataxin-1 and suppresses their toxicity. Finally we investigate the ability of CHIP to protect against toxicity caused by expanded polyglutamine tracts in different protein contexts. We find that CHIP is not effective in suppressing the toxicity caused by a bare 127Q tract with only a short hemagglutinin tag, but it is very efficient in suppressing toxicity caused by a 128Q tract in the context of an N-terminal huntingtin backbone. These data underscore the importance of the protein framework for modulating the effects of polyglutamine-induced neurodegeneration.

Polyglutamine (poly-Q)<sup>4</sup> diseases are a group of neurodegenerative disorders caused by expansion of glutamine-encoding

<sup>\*</sup> This work was supported in part by National Institutes of Health Grants NS42179 (to J. B.) and NS27699 (to H. Y. Z.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

<sup>[5]</sup> The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Figs. 1 and 2.

<sup>1</sup> Supported by the Portuguese Foundation for Science and Technology.

<sup>2</sup> A Howard Hughes Medical Institute Investigator.

<sup>3</sup> To whom correspondence should be addressed. Tel.: 713-798-5937; Fax: 713-798-8142; E-mail: jbotas@bcm.tmc.edu.

<sup>4</sup> The abbreviations used are: poly-Q, poly-glutamine; E1, ubiquitin-activating enzyme; E2, ubiquitin carrier protein; E3, ubiquitin protein ligase; Ub, ubiquitin; HA, hemagglutinin; SCA1, spinocerebellar ataxia type 1; SCA1<sup>70</sup>, gene

(CAG)<sub>n</sub> repeats in genes whose sequence is otherwise unrelated (1, 2). One such protein is ataxin-1, where expansion of its N terminus glutamine repeat triggers spinocerebellar ataxia type 1. SCA1 is an adult-onset disorder characterized by loss of motor coordination and balance, which progresses to affect vital brain functions such as breathing and swallowing. Brain dysfunction is in part due to degeneration of cerebellar Purkinje cells, brainstem neurons, and the spinocerebellar tracts. Strong evidence supports the idea of a gain of function mechanism triggered by the poly-Q expansion in ataxin-1 (1, 3–5).

One pathological hallmark of poly-Q disorders is the presence of neuronal aggregates (nuclear or cytoplasmic) that contain the poly-Q-expanded protein. These aggregates are found as nuclear inclusions (NIs) in SCA1 neurons, and in addition to aggregated mutant ataxin-1, they also contain components of the protein quality control machinery, *e.g.* ubiquitin, proteasome subunits, and chaperones. Such quality control proteins are key players in the toxicity of ataxin-1 and other proteins involved in poly-Q diseases (6–9).

Interestingly, high levels of unexpanded ataxin-1 form NIs and cause degenerative phenotypes similar to, but milder than, the phenotypes induced by expanded ataxin-1 both in *Drosophila* and mouse SCA1 models (10). Overexpression of either a human ataxin-1 deletion construct lacking the poly-Q repeat or *dAtx1* (the *Drosophila* ataxin-1 orthologue, which also lacks the N-terminal poly-Q tract) have been found to cause toxicity in two different fly models (3, 11). Taken together these observations suggest that poly-Q expansion favors a toxic and aggregation-prone conformation in ataxin-1 that the protein backbone may already have a tendency to adopt.

Chaperones and the ubiquitin proteasome system are responsible for maintaining the cell environment free of toxic misfolded proteins (12, 13). Although not well understood, there is a tight regulatory mechanism that decides when a protein is refolded and when it needs to be degraded. One link that

coding for ataxin-1 [nQ] protein; NI, nuclear inclusion; CHIP, C-terminus of Hsc-70 interacting protein; TPR, tetratricopeptide repeat; GFP, green fluorescent protein; RT, reverse transcriptase; F-ataxin-1, FLAG-tagged ataxin-1; SEM, scanning electron microscopy; EID, eye imaginal disc; 127Q-HA, hemagglutinin-tagged glutamine 127; NT-Htt[128Q], glutamine 128-expanded N-terminal huntingtin; co-IP, co-immunoprecipitation; MOPS, 4-morpholinepropanesulfonic acid; PBS, phosphate-buffered saline.

Supplemental Material can be found at:  
<http://www.jbc.org/cgi/content/full/M601603200/DC1>

connects chaperones and the ubiquitin-proteasome machinery, possibly acting as a regulator, is the co-chaperone CHIP (C terminus of Hsc70 interacting protein) (14, 15).

CHIP has three tetratricopeptide repeat (TPR) domains that allow it to interact with chaperones (16), as well as a U-box domain that confers this co-chaperone with an E3 ubiquitin ligase activity (17). CHIP has been shown to work in the protein quality control machinery at different levels. It can induce the degradation of misfolded proteins (14, 15, 18, 19). CHIP can also cause increased refolding of non-native proteins in an Hsp70-dependent manner (20) and activates heat shock factor 1 improving the stress tolerance in cells (21).

CHIP is known to interact with aggregation-prone proteins implicated in degenerative diseases protecting against their toxicity. Among these proteins are superoxide dismutase, Tau, poly-Q-expanded ataxin-3, poly-Q-expanded N-terminal huntingtin, and  $\alpha$ -synuclein (22–29).

Given the ability of CHIP to recognize and protect against aberrantly folded proteins, we tested its ability to suppress ataxin-1-induced neurodegeneration and used it as a tool to investigate the surprising toxicity observed in unexpanded ataxin-1. Here we report that: 1) CHIP is able to interact with both expanded and unexpanded ataxin-1 proteins and targets them for degradation by promoting their ubiquitination. 2) CHIP localizes to ataxin-1 NIs in cultured cells and human SCA1 neurons. 3) Increased CHIP activity suppresses neurodegeneration triggered by either expanded or unexpanded ataxin-1 by reducing their steady-state levels in a *Drosophila* model of SCA1. 4) Finally we investigate the importance of the protein backbone for CHIP neuroprotection. We find that CHIP has little protection activity against the toxicity caused by a pure poly-Q tract but is very effective in protecting against a similar poly-Q tract in the context of a protein backbone.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**In Vitro Ubiquitination Assays**—Bacterially expressed ataxin-1 [2Q] or [82Q] (0.25  $\mu$ g) was incubated in reactions containing 0.1  $\mu$ M purified rabbit E1 (Calbiochem), 8  $\mu$ M UBCH5a, 4  $\mu$ M CHIP, 2.5 mg/ml ubiquitin (Sigma), 5 mM ATP in 20 mM MOPS, pH 7.2, 100 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride for 2 h at 30 °C. In some reactions, 2  $\mu$ M Hsp70 was included. Reactions were stopped with SDS loading buffer and subjected to SDS-PAGE, then immunoblotted with anti-ataxin-1 antibody.

**Co-immunoprecipitation and in Vivo Ubiquitination**—HeLa cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum (5% CO<sub>2</sub>). Transfections of FLAG-tagged ataxin-1 2Q, 82Q, and human CHIP were performed using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Cells were lysed in TST extraction buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M NaCl, and 0.5% Triton X-100) containing protease inhibitors and subjected to immunoprecipitation with anti-FLAG-conjugated gel (Sigma) for 2 h at 4 °C.

For determining ataxin-1 ubiquitination *in vivo*, HeLa cells in 10-cm dishes were transfected with vectors expressing FLAG-tagged ataxin-1 [82Q] (6  $\mu$ g), human CHIP variants (wild-type; TPR mutant K30A; and U-box double mutant

D253N,R254G) (5  $\mu$ g) and/or hemagglutinin-tagged ubiquitin (5  $\mu$ g). After 24 h, the cells were treated with 50  $\mu$ M MG132 (Calbiochem) for 8 h and were lysed and subjected to immunoprecipitation with anti-FLAG-conjugated gel. Immunoprecipitates were washed with lysis buffer five times and were separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting with appropriate antibodies. The antibodies used were as follows: rabbit polyclonal anti-ataxin-1 (11750VII) (1:3000), rabbit polyclonal anti-CHIP (1:2000), and mouse monoclonal anti-HA (Babco) and rabbit polyclonal anti-FLAG (Sigma).

**Cell Culture Immunofluorescence**—Transient expression of FLAG-tagged ataxin-1 and human CHIP in COS7 cells was accomplished by transfection with Lipofectamine 2000 in 6-well tissue culture plates containing sterile coverslips. Immunofluorescence staining was done as described in Ref. 7. Mouse monoclonal antibodies M2 anti-FLAG (1:500, Sigma) and/or rabbit anti-CHIP (1:500) were used. Subsequently, cells were incubated with either anti-mouse Alexa-488 conjugated (Molecular Probes) or anti-rabbit-Cy3 (The Jackson Laboratory) mounted in anti-fade solution (Vectashield mounting medium, Vector Laboratories) and analyzed by laser confocal microscopy (Bio-Rad 1024).

**Drosophila Strains**—The UAS-CHIP constructs were generated by cloning a cDNA coding for human CHIP in the pUAST *Drosophila* expression vector (30). Transgenic *Drosophila* lines were generated by injecting this construct in embryos following standard methods.

UAS-SCA1<sup>82Q</sup> and UAS-SCA1<sup>30Q</sup> strains have been described previously (10). Flies carrying UAS-127Q:HA (MGGPP-STPQ<sub>n</sub>TSRTYPYDVPDYA) were provided by Dr. P. Kazemi-Esfarjani. All other strains were obtained from the Bloomington Stock Center.

**Western Blot Assays**—For immunoblots from larval tissue, eye imaginal discs from 10 animals per genotype were dissected in PBS. Tissue was homogenized in 30  $\mu$ l of Laemmli sample buffer (Bio-Rad) and loaded on a 7.5% Tris-HCl Ready Gel (Bio-Rad). For adult tissues, five heads per genotype were homogenized and processed in the same way.

Membranes were stained with primary antibodies 11NQ anti-ataxin-1 (1:1000) and mouse anti-tubulin (Hybridoma Bank, 1:1000). Horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse or anti-rabbit IgG secondary antibodies (1:5000; Bio-Rad) were used. Membranes were developed using a ECL Western blot detection kit (Amersham Biosciences).

**Immunofluorescence Staining and Quantification on Drosophila Imaginal Discs**—Eye imaginal discs from seven different larvae per genotype were dissected in PBS and fixed with 4% formaldehyde (in PBS) for 30 min. Primary antibodies 11NQ anti-ataxin-1 (1:1000) or 3E10 anti-GFP (1/200; Molecular Probes) were used. For the secondary antibody staining we used Alexa-488-tagged antibodies (1:200; Molecular Probes). Image acquisition and signal quantification were carried out following previously published procedures (31).

**Immunohistochemical Staining of Human Brain Tissue**—Brain tissue from a SCA1 autopsy and a non-SCA1 control was fixed in formol and embedded in paraffin. 5- $\mu$ m sections were obtained from the pons area of both brains and then

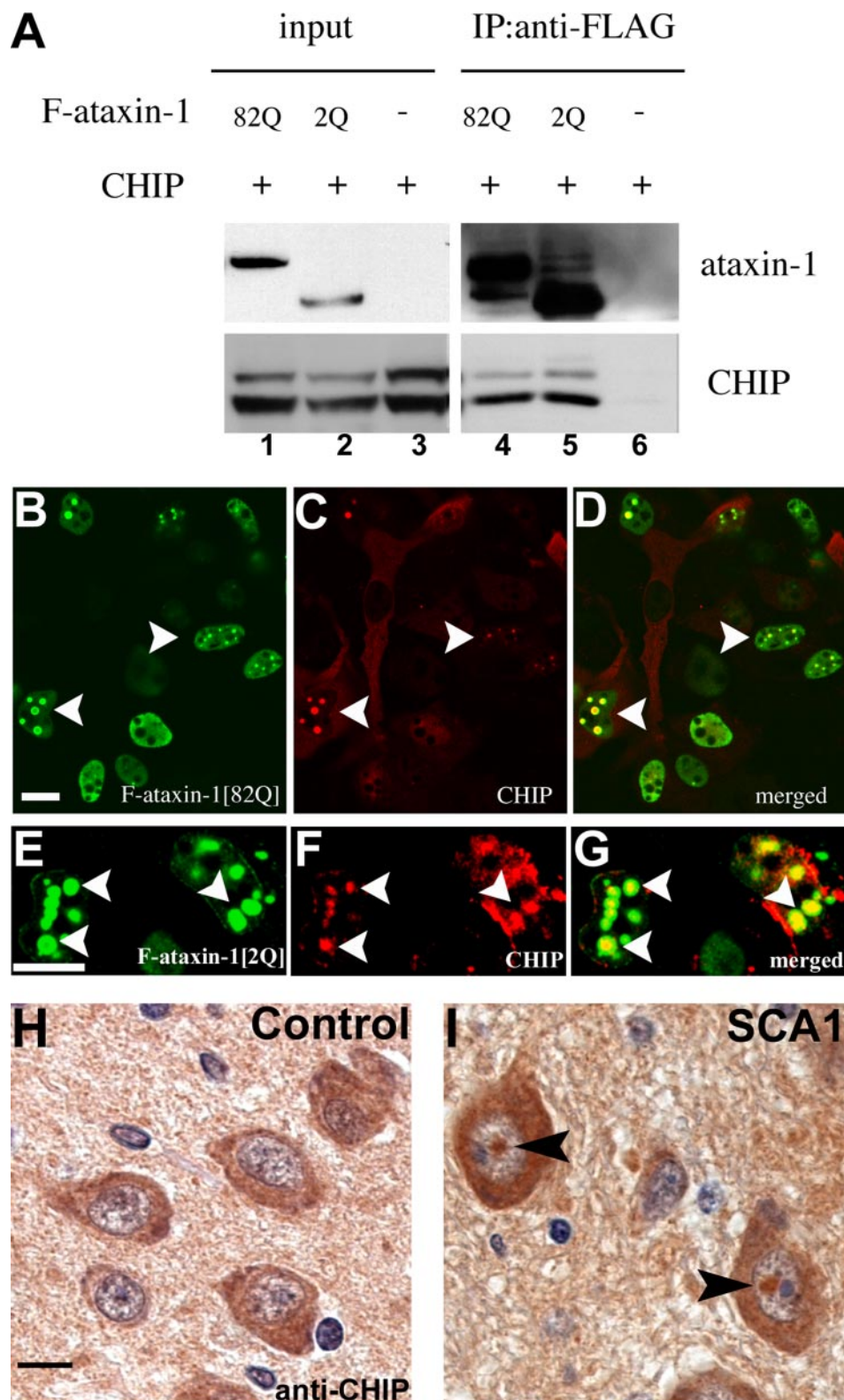


## CHIP Degrades Ataxin-1 and Suppresses Its Toxicity

rehydrated to PBS. Slides were stained using primary antibody rabbit anti-human CHIP (1:200). Biotin anti-rabbit (Vector Laboratories) was used as a secondary antibody. Slides were developed using DAB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> after 1-h incubation in the Vectastain-ABCkit[Elite] (Vector Laboratories). Hematoxylin (Sigma) was used for counterstaining.

*Scanning Electron Microscopy and Eye Paraffin Sections*—Processing of *Drosophila* for scanning electron microscopy (SEM) and image acquisition were performed following previously published procedures (10).

For paraffin sections, flies were fixed with 4% formaldehyde (in PBS). Heads were dehydrated in increasing concentrations



of ethanol and embedded in paraffin. Ten- $\mu\text{m}$  serial sections were obtained and rehydrated to PBS. Sections were stained with hematoxylin (Sigma). Images were captured using an AxioCam MRc camera (Zeiss) attached to a Microphot-FXA microscope (Nikon).

**Reverse Transcriptase-PCR**—Total RNA from the imaginal eye discs of seven different larvae per genotype was extracted using the TRIzol reagent (Invitrogen) and treated with RNase-free DNase I (Invitrogen). Reverse transcription and PCR were conducted using Super-Script III First Strand Synthesis for RT-PCR kit with Platinum Taq (Invitrogen) following indications from the supplier. The number of cycles was optimized to allow a linear range of detection of transcripts. SCA1 transcripts were amplified along with transcripts for RP49, which served as an internal control. The primers used were as follows: SCA1, 5'-CTGCAGTTTGCAGGCTCTCT-3' and 5'-GAGCTAAAGAAGGTGGAAGACTTAAA-3'; RP49, 5'-AAACGCGGTTCTGCATGAG-3' and 5'-GACGCTTCAAGGGACAGTATCTG-3'; and SV40, 5'-GGAAGTGAATGGGAGCA-3' and 5'-GGAAAGTCTTGGGGTCTTC-3'.

## RESULTS

**CHIP Interacts with Expanded and Unexpanded Human Ataxin-1 in Cultured Cells**—To assess whether CHIP and expanded ataxin-1 [82Q] interact, we performed co-immunoprecipitation (co-IP) assays. As shown in *lane 4* of Fig. 1A, ataxin-1 [82Q] pulls down CHIP.

Overexpression of unexpanded ataxin-1 leads to neurodegenerative phenotypes in *Drosophila* and mouse models that are similar to, but milder than, the degeneration caused by ataxin-1 [82Q] (10). Prompted by this observation, we asked whether CHIP is able to interact with a wild-type ataxin-1 protein without the poly-Q expansion. We performed a co-IP assay with cells co-expressing CHIP and an ataxin-1 protein with only 2 glutamines (normal human ataxin-1 has 6–39 glutamines). *Lane 5* in Fig. 1A shows that ataxin-1 [2Q] also pulls down CHIP. The finding that CHIP interacts with the ataxin-1 protein backbone supports the idea that even unexpanded ataxin-1 has a tendency to misfold.

The interaction between CHIP and ataxin-1 may be direct or mediated by chaperones that are known to interact with both CHIP and ataxin-1 in co-IP and other experiments (7, 10, 16, 17, 19, 31).

**CHIP Localizes to Ataxin-1 Nuclear Inclusions in Cultured Cells and Neurons from SCA1 Brains**—We used indirect immunofluorescence to determine whether CHIP and ataxin-1 co-

## CHIP Degrades Ataxin-1 and Suppresses Its Toxicity

localize in cultured cells co-expressing CHIP and expanded ataxin-1. As shown in Fig. 1, *B–D*, CHIP accumulates in ataxin-1 [82Q] NIs formed in SCA1<sup>82Q</sup>-expressing cells. This observation suggests that CHIP may have a role in the clearance of aggregated mutant ataxin-1 *in vivo*. CHIP also localizes to unexpanded ataxin-1 [2Q] NIs (Fig. 1, *E–G*), further supporting the idea that unexpanded ataxin-1 can adopt aberrant conformations.

To investigate whether the CHIP-ataxin-1 interactions described above are relevant for SCA1 pathology, we analyzed the distribution of endogenous human CHIP on pontine neurons from a SCA1 or control brain tissue. CHIP localizes to the cytoplasm in neurons of control brains and is not detected in the nucleus (Fig. 1*H*). In contrast, CHIP label was detected in 100% ( $n = 102$ ) of the NIs present in the SCA1 brain tissue that we studied (Fig. 1*I*). Recruitment of CHIP to the NIs in SCA1 neurons suggests a role for CHIP in the clearance of expanded ataxin-1 in humans.

**CHIP Ubiquitinates Both Expanded and Unexpanded Ataxin-1 *In Vitro***—The interactions between ataxin-1 and CHIP suggest that CHIP may promote ataxin-1 ubiquitination and target it for degradation. To test this possibility, we carried out *in vitro* ubiquitination experiments. Either ataxin-1 [82Q] or ataxin-1 [2Q] were incubated with the appropriate ubiquitination machinery components using CHIP as the E3 ligase. We found that CHIP promotes ubiquitination of both expanded and unexpanded ataxin-1 proteins (Fig. 2A), further suggesting that unexpanded ataxin-1 can adopt an aberrant conformation in the absence of the poly-Q expansion. In contrast, CHIP does not ubiquitinate a native control protein (luciferase) as shown in supplemental Fig. 1.

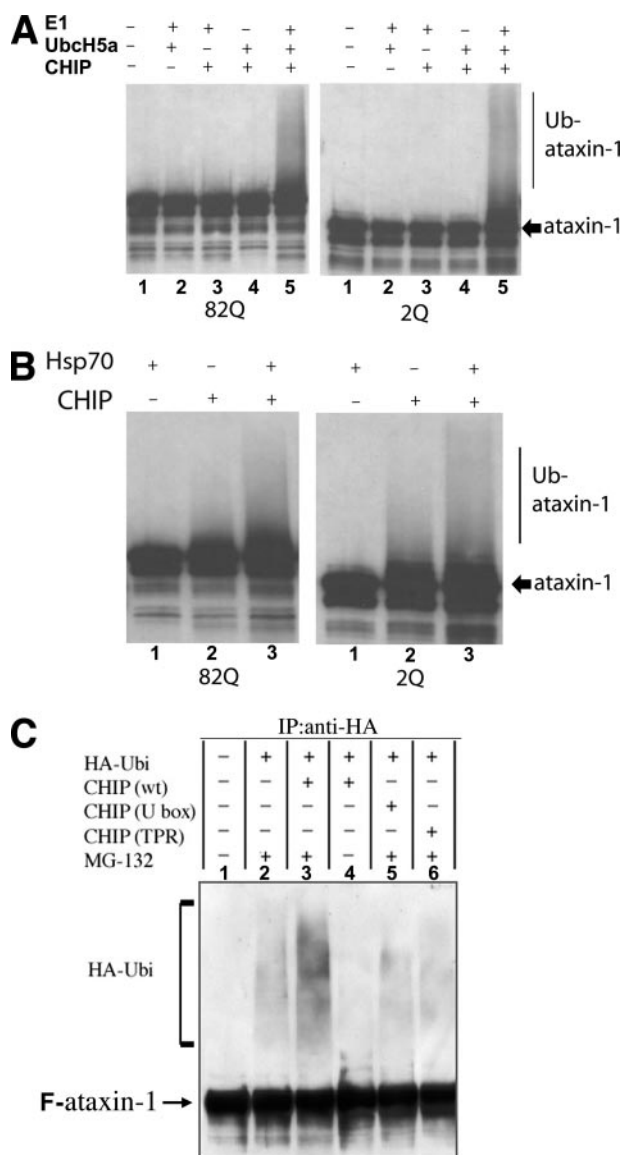
**Hsp70 Enhances CHIP-mediated Ataxin-1 Ubiquitination *In Vitro***—Because Hsp70 modulates ataxin-1 [82Q] toxicity and is also known to interact with CHIP (7, 9, 10, 16), we investigated the effect of Hsp70 on CHIP-mediated ataxin-1 [82Q] ubiquitination. Hsp70 was added to the *in vitro* ubiquitination assay described above. The addition of Hsp70 results in increased ubiquitination of ataxin-1 [82Q] when compared with CHIP alone. A similar result was obtained for ataxin-1 [2Q] (Fig. 2B). Because Hsp70 interacts with misfolded proteins, these findings support the idea that a portion of unexpanded ataxin-1 [2Q] molecules adopts an aberrant conformation.

**CHIP Mediates Ataxin-1 Ubiquitination in Cell Culture and Requires a Functional TPR Domain**—In cells expressing SCA1<sup>82Q</sup>, ataxin-1 ubiquitination is evident after incubation with the proteasome inhibitor MG-132 (Fig. 2C, *lanes 1* and 2).

**FIGURE 1. CHIP interacts with both expanded and unexpanded ataxin-1 and is recruited to ataxin-1 nuclear inclusions in cultured cells and SCA1 neurons.** A, co-IP assays between FLAG-ataxin-1 [82Q] (F-ataxin-1) or F-ataxin-1 [2Q] and CHIP. *Lanes 1–3* show the inputs from cells co-expressing CHIP and either FLAG-ataxin-1 [82Q] (*lane 1*), F-ataxin-1 [2Q] (*lane 2*), or an empty vector control (*lane 3*). The upper CHIP band corresponds to mono-ubiquitinated CHIP (C. Patterson, unpublished observation). CHIP is pulled down by both F-ataxin-1 [82Q] and F-ataxin-1 [2Q] (*lanes 4* and *5*, respectively), after anti-FLAG immunoprecipitation (IP). No CHIP is detected after immunoprecipitation in the negative control (*lane 6*). Ataxin-1 was detected with rabbit polyclonal anti-ataxin-1 (11750V11); CHIP was detected with rabbit polyclonal anti-CHIP. *B–D*, immunofluorescence staining in cells co-expressing F-ataxin-1 [82Q] (*green*) and CHIP (*red*). *B*, F-ataxin-1 [82Q] accumulates in NIs (*arrowheads*) in cultured cells. *C* and *D*, CHIP is recruited to F-ataxin-1 [82Q] nuclear inclusions. *E–G*, similar staining as *B–D* performed on cells expressing F-ataxin-1 [2Q] and CHIP. Notice that CHIP is also recruited to unexpanded ataxin-1 nuclear inclusions (*arrowheads*). *H* and *I*, paraffin sections of the pontine area of the brain from either a control or an SCA1 autopsy immunostained with anti-hCHIP antibody. *H*, CHIP staining is cytoplasmic in control pontine neurons and undetectable in nuclei. *I*, in addition to the cytoplasmic CHIP, pontine neurons from the SCA1 brain show intra-nuclear anti-CHIP staining in the form of NIs (*arrowhead*). A total of 102 neurons with NIs were studied and all of them were positive for CHIP. *B–I*, scale bars = 10  $\mu\text{m}$ . In control experiments in which SCA1 autopsy brain tissue was stained with secondary but no anti-CHIP primary antibody, the ataxin-1 NIs are clearly visible with the hematoxylin counter-stain (see supplemental Fig. 2).



## CHIP Degrades Ataxin-1 and Suppresses Its Toxicity



**FIGURE 2. CHIP ubiquitinates both expanded and unexpanded ataxin-1.** *A*, *in vitro* ubiquitination assay with either ataxin-1 [82Q] (left blot) or ataxin-1 [2Q] (right blot) and CHIP. Lane 1 in both blots shows no ubiquitinated ataxin-1 (*Ub-ataxin-1*) in the absence of any ubiquitination machinery components. Similarly, no ubiquitinated ataxin-1 is detected when lacking one of the following components, CHIP (E3), *ubcH5a* (E2), or rabbit E1 (lanes 2–4, respectively). Lane 5 in both blots shows a clear ubiquitination smear (*Ub-ataxin-1*) when all the ubiquitination machinery components are present in combination with either ataxin-1 [82Q] or ataxin-1 [2Q]. Blots were stained with rabbit polyclonal anti-ataxin-1 (11750V11). *B*, *in vitro* ubiquitination assay with ataxin-1 [82Q] (left blot) or ataxin-1 [2Q] (right blot) and CHIP in the absence or presence of Hsp70. No ubiquitinated ataxin-1 (*Ub-ataxin-1*) is detected following incubation with Hsp70 alone (lane 1 in both blots). Some ubiquitinated ataxin-1 is detected after incubation with CHIP alone (lane 2 in both blots). Lane 3 in both blots shows increased ubiquitinated ataxin-1 when incubated with CHIP and Hsp70 simultaneously. *C*, *in vivo* ubiquitination assay in cells co-expressing F-ataxin-1 [82Q], hemagglutinin-Ubiquitin (*HA-Ubi*), and either normal CHIP (*CHIP(wt)*, lane 3) or CHIP with a point mutation in its catalytic U-box (*CHIP(U box)*, lane 5) or its tetratricopeptide (*TPR*, lane 6) domains. Lane 1, no ubiquitinated ataxin-1 (*HA-Ubi*) is detected in F-ataxin-1 [82Q] control cells. Lane 2 shows some ubiquitinated ataxin-1 [82Q] when cultured cells were treated with the proteasome inhibitor MG-132. Co-expression of *CHIP(wt)* and F-ataxin-1 [82Q] causes increased ataxin-1 [82Q] ubiquitination in MG-132 treated cells (lane 3). No ubiquitinated ataxin-1 [82Q] is detected in similar cells as lane 3 without the MG-132 treatment (lane 4). No increase in ubiquitinated ataxin-1 [82Q] is detected in F-ataxin-1 [82Q] cells co-expressing the U-box or TPR *CHIP* mutants (lanes 5 and 6, respectively). Immunoprecipitation of F-ataxin-1 was done with anti-FLAG-conjugated beads; the blot was jointly probed with anti-HA (Babco) and anti-FLAG (Sigma) antibodies.

The levels of ubiquitinated ataxin-1 are increased in cells simultaneously expressing *SCA1*<sup>82Q</sup> and *CHIP* (Fig. 2C, lane 3). To investigate whether the U-box domain in CHIP is necessary for ataxin-1 ubiquitination *in vivo*, we used a mutant CHIP with a nonfunctional U-box domain (*CHIP*<sup>U-box</sup>). Cells co-expressing *CHIP*<sup>U-box</sup> and *SCA1*<sup>82Q</sup> failed to show an increase in ataxin-1 ubiquitination when compared with cells expressing *SCA1*<sup>82Q</sup> alone (Fig. 2C, lane 5). These results confirm our *in vitro* observations, indicate that CHIP is able to target ataxin-1 [82Q] for degradation *in vivo*, and are in accordance with the role of the U-box domain in providing an interface for interactions with the ubiquitin conjugase (32).

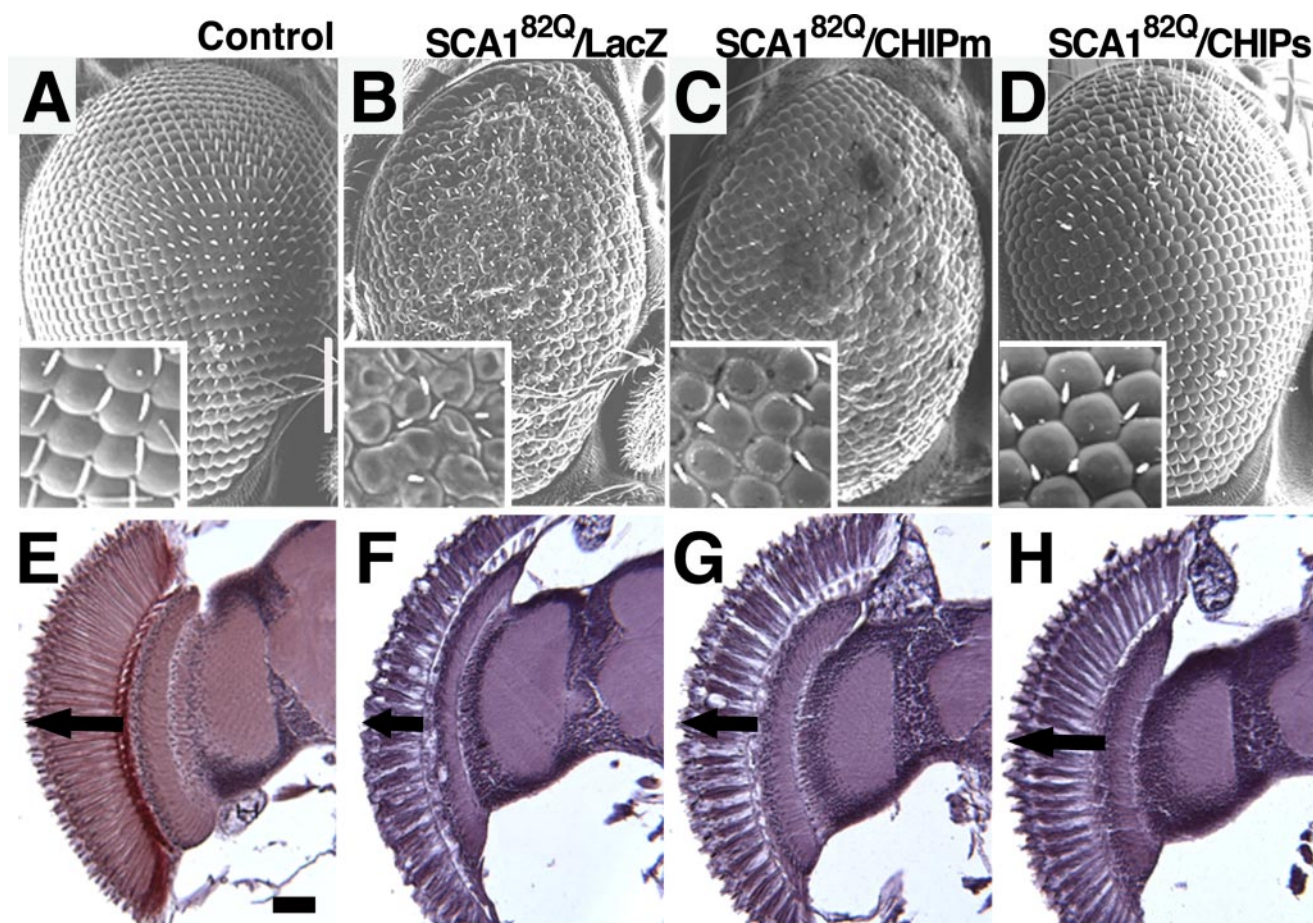
TPR domains in CHIP have been shown to interact with chaperones (16). We monitored ataxin-1 [82Q] ubiquitination in cells co-expressing *SCA1*<sup>82Q</sup> and a *CHIP* construct with a nonfunctional TPR domain (*CHIP*<sup>TPR</sup>). Lysates from these cells failed to show increased ataxin-1 ubiquitination when compared with those coming from cells expressing *SCA1*<sup>82Q</sup> alone (Fig. 2C, lane 6). This observation suggests that interactions with chaperones are required for CHIP-mediated ataxin-1 [82Q] ubiquitination *in vivo*.

*CHIP Suppresses the Toxicity of Expanded Ataxin-1 in a Drosophila Model of SCA1*—The ubiquitination of ataxin-1 by CHIP and its co-localization in NIs in both cell culture and *SCA1* neurons suggest that CHIP may protect against ataxin-1-induced neurotoxicity.

To test this hypothesis we used a well characterized animal model of *SCA1*. We have previously shown that *SCA1*<sup>82Q</sup> expression in the *Drosophila* eye causes a degenerative phenotype (10). The fly genome contains a *CHIP* orthologue for which no mutations are available. However, we compared the eye phenotype of flies co-expressing *SCA1*<sup>82Q</sup> and a control transgene (*UAS-LacZ*) with the phenotype of flies expressing *SCA1*<sup>82Q</sup> together with human *CHIP* (Fig. 3). Two *CHIP* transgenic lines were used for our analysis, one medium and one strong (referred to as *CHIPm* and *CHIPs*, respectively) based on the amount of *CHIP* protein being expressed (Fig. 4A). Flies co-expressing *SCA1*<sup>82Q</sup> and *LacZ* show a severe external eye phenotype characterized by ommatidial disorganization and fusion as well as interommatidial bristle loss (Fig. 3, compare A and B). Internally, these eyes present severe retinal degeneration evident by reduction in the depth of the retina (Fig. 3, compare E and F). In contrast, eyes co-expressing *CHIP* and *SCA1*<sup>82Q</sup> show a clear amelioration of the ommatidial disorganization (Fig. 3, C and D) as well as retinal phenotypes (Figs. 3, G and H). The extent of phenotype suppression is dependent on the amount of *CHIP* protein being co-expressed with ataxin-1 [82Q] as evidenced comparing the effects of *CHIPs* with *CHIPm*.

*CHIP Overexpression Reduces the Levels of Expanded Ataxin-1 in Vivo*—To further test the hypothesis that CHIP protects against *SCA1*-induced neurodegeneration by targeting ataxin-1 for degradation, we monitored the amounts of ataxin-1 [82Q] protein present in tissues expressing *SCA1*<sup>82Q</sup> and different levels of *CHIP*.

First we monitored the levels of ataxin-1 [82Q] by Western blot analysis. Since substantial cell loss occurs in the adult eye due to *SCA1*<sup>82Q</sup> expression, we used third instar eye imaginal



**FIGURE 3. CHIP suppresses eye degeneration induced by expanded ataxin-1 in *Drosophila*.** A, SEM images (A) and horizontal paraffin sections of fly eyes expressing  $SCA1^{82Q}$  and different levels of *CHIP* (genotype combinations indicated on top) (E–H) are shown.  $SCA1^{82Q}$ -expressing eyes present strong ommatidial disorganization and severe reduction in retinal depth when compared with controls (compare A with B and E with F). Combining  $SCA1^{82Q}$  with either a medium or a strong expressing *CHIP* line (*CHIPm* and *CHIPs*, respectively) suppresses the  $SCA1^{82Q}$ -induced external eye (compare C and D with B) and retinal phenotypes (compare G and H with F). Note that *CHIPs* is a better suppressor than *CHIPm* (compare C with D and G with H). Genotypes: A and E,  $yw$ ;  $gmr-GAL4/+$ ; B and F,  $UAS-SCA1^{82Q}[F7]/yw$ ;  $gmr-GAL4/UAS-LacZ$ ; C and G,  $UAS-SCA1^{82Q}[F7]/yw$ ;  $gmr-GAL4/+$ ;  $UAS-CHIPm/+$ ; D and H,  $UAS-SCA1^{82Q}[F7]/yw$ ;  $gmr-GAL4/UAS-CHIPs$ . Scale bar in A–D = 100  $\mu m$ ; insets are 50  $\times$  50  $\mu m$ . Scale bar in E–H = 10  $\mu m$ . A–D, done at 27  $^{\circ}C$ . E–H, done at 25  $^{\circ}C$ .

discs to quantify ataxin-1 [82Q] levels. Less ataxin-1 [82Q] is detected in eye discs co-expressing *CHIP* and  $SCA1^{82Q}$  than in  $SCA1^{82Q}/LacZ$  controls. The decrease in the amount of ataxin-1 [82Q] inversely correlates to the amount of *CHIP* being expressed (Fig. 4B).

Because expanded ataxin-1 [82Q] forms insoluble aggregates, Western blots might only resolve the extractable protein fraction. To circumvent this limitation we also monitored the levels of ataxin-1 [82Q] by immunofluorescence analysis. This method allowed us to quantify both the soluble and the aggregated fractions of ataxin-1 [82Q]. Eye imaginal discs expressing  $SCA1^{82Q}$  and *CHIP* show a clear decrease in ataxin-1 [82Q] signal when compared with  $SCA1^{82Q}/LacZ$  controls after fluorescence quantification (Fig. 4, C–E and I). Like the Western blot data, this decrease was inversely correlated to the amount of *CHIP* protein being expressed.

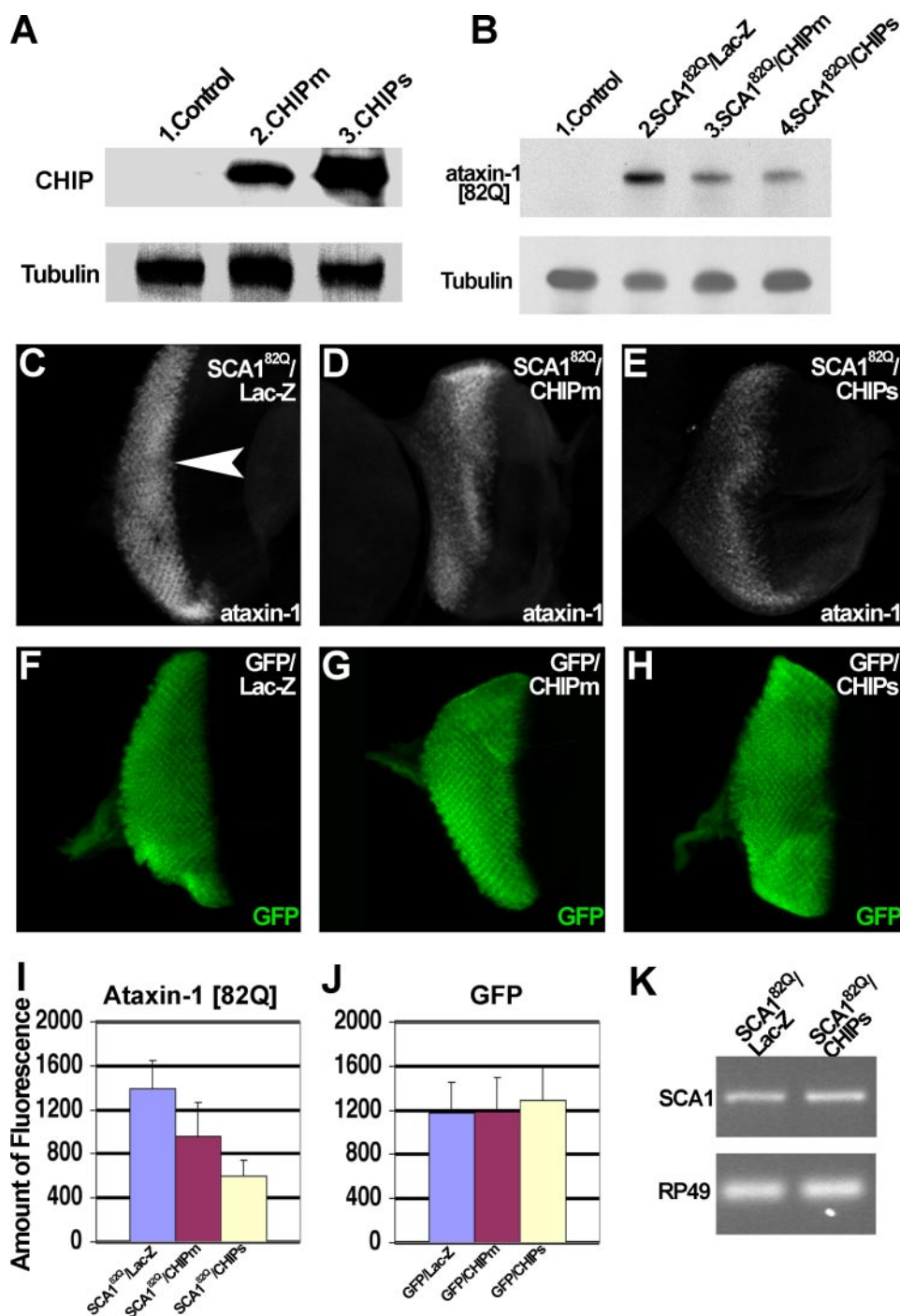
These results might be explained if *CHIP* interferes with the *GAL4-UAS* system used to drive  $SCA1^{82Q}$  expression. To test this possibility we investigated whether *CHIP* modifies the amount of GFP expressed from a *UAS-GFP* control transgene. Quantification of GFP by immunofluorescence (Fig. 4, F–H and J) as well as Western blot analysis (data not shown) on eye discs

co-expressing GFP and different levels of *CHIP* failed to show a decrease in the amount of total GFP.

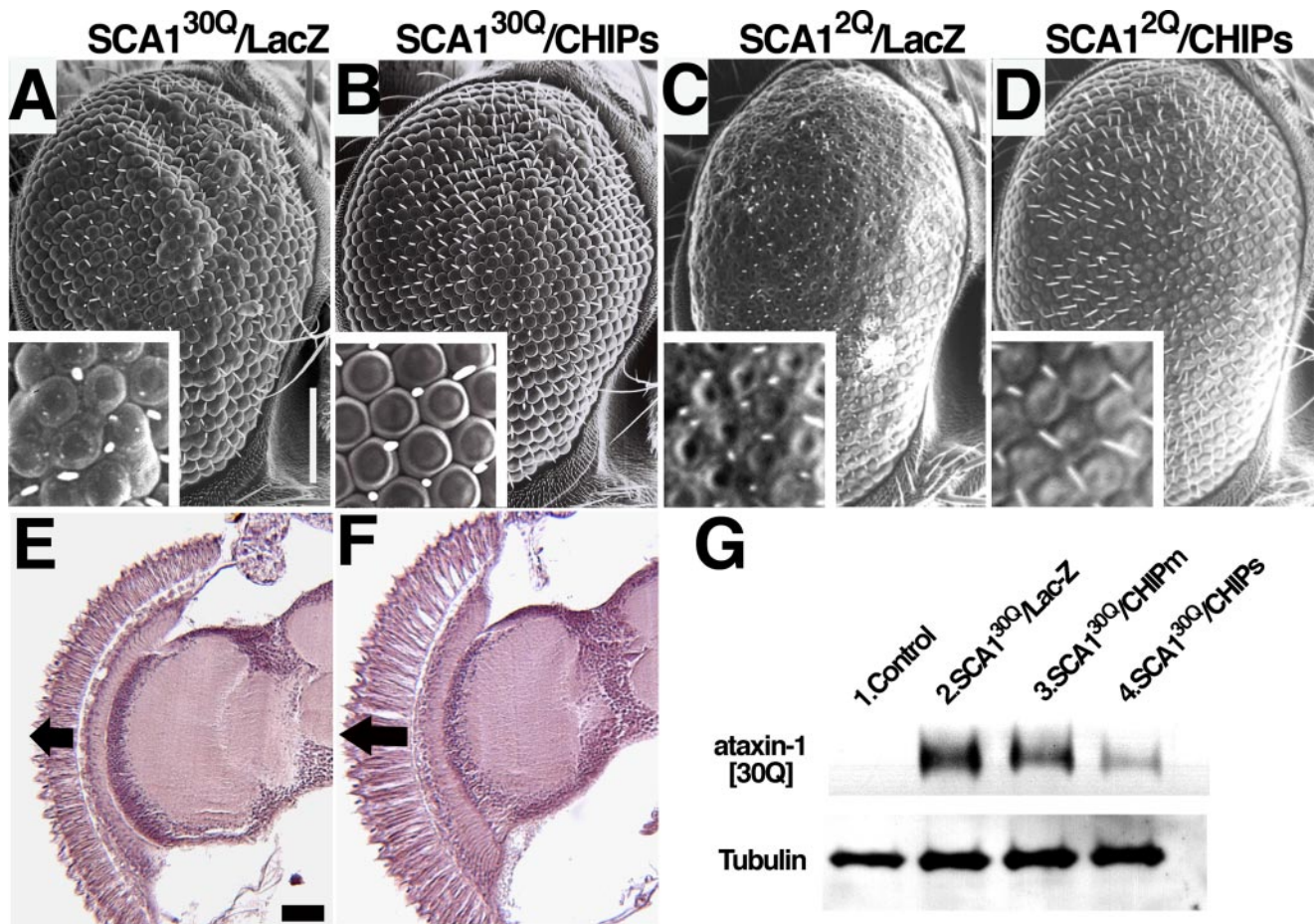
Finally, we tested the possibility that a *CHIP*-mediated decrease in the amount of ataxin-1 protein is caused by reduction of *SCA1* messenger RNA. We performed semiquantitative RT-PCR analysis using larval eye imaginal discs co-expressing either  $SCA1^{82Q}$  and *LacZ* or  $SCA1^{82Q}$  and *CHIPs*. The amounts of  $SCA1^{82Q}$  mRNA in the context of the *CHIPs* and *LacZ* transgenes are similar (Fig. 4K). Thus, the GFP and RT-PCR data show that the effects of *CHIP* on ataxin-1 [82Q] neurodegeneration are at the protein level.

**CHIP Suppresses the Toxicity and Reduces the Levels of Unexpanded Ataxin-1**—Since *CHIP* promotes ubiquitination of, and is pulled down by, ataxin-1 [2Q] (Fig. 2), we asked whether it is able to interact with unexpanded ataxin-1 *in vivo*. We investigated the effect of *CHIP* co-expression in flies carrying two different unexpanded human *SCA1* transgenes ( $SCA1^{30Q}$  and  $SCA1^{82Q}$ ). The  $SCA1^{30Q}$  line expresses four times more protein than the  $SCA1^{82Q}$  line used above (data not shown). In these conditions,  $SCA1^{30Q}$  causes a moderate external eye phenotype at 29  $^{\circ}C$  (Fig. 5A) and a reduction in retinal depth similar to that caused by  $SCA1^{82Q}$  at 27  $^{\circ}C$  (Fig. 5E). The  $SCA1^{2Q}$  line





**FIGURE 4. CHIP overexpression reduces the steady-state levels of expanded ataxin-1 in *Drosophila*.** *A*, immunoblot showing the expression levels of CHIPm versus CHIPs transgenic lines in the eye (five fly heads per lane). Notice the higher levels of CHIP in lane 3 (CHIPs) than in lane 2 (CHIPm). Blots were sequentially probed with rabbit anti-CHIP and mouse anti-tubulin (used as a loading control). *B*, Western blot showing the levels of ataxin-1 [82Q] present in larval eye imaginal discs (EIDs) from age matched animals of the indicated genotype combinations driven by *gmr-GAL4*. Blots were sequentially probed with rabbit anti-ataxin-1 (1TNQ) and mouse anti-tubulin (used as a loading control). Lane 1, no ataxin-1 signal detected in control EIDs. Lane 2, normal ataxin-1 [82Q] levels present following co-expression of *SCA1*<sup>82Q</sup> and a neutral *LacZ* transgene in the EIDs. Lanes 3 and 4, progressive decrease of ataxin-1 [82Q] levels when co-expressed with either *CHIPm* or *CHIPs*, respectively, in the larval EIDs (ratio lane 2/lane 3 = 1.5, ratio lane 2/lane 4 = 2.5). *C–E*, anti-ataxin-1 immunofluorescence staining; *I*, quantification of anti-ataxin-1 signal, on EIDs expressing *SCA1*<sup>82Q</sup> and different levels of *CHIP*. *C*, EIDs co-expressing *SCA1*<sup>82Q</sup> and *LacZ* show ataxin-1 staining that extends from the morphogenetic furrow (arrowhead) to the most posterior part of the disc. Co-expression of either *CHIPm* (*D*) or *CHIPs* (*E*) with *SCA1*<sup>82Q</sup> causes a decrease in the intensity of the ataxin-1 signal (compare *C* with *D* and *E* and see quantification in *I*). *CHIPs* causes a greater decrease in the ataxin-1 signal than *CHIPm* (compare *D* with *E* and see *I*,  $p < 0.01$  for *CHIPm* and  $p < 0.001$  for *CHIPs* analyzed by Student's *t* test). *F–H*, anti-GFP immunofluorescence staining; *J*, quantification of GFP signal intensity on EIDs expressing the genotypes indicated on top. Neither *CHIPm* nor *CHIPs* decrease the intensity of GFP compared with the control (compare *F* with *G* and *H* and see quantification in *J*). *K*, semiquantitative RT-PCR performed on EIDs of the indicated genotypes. Expression of *CHIP* does not cause a change in the amount of the *SCA1* mRNA transcript. *RP-49* was used as a loading control for the reaction. Genotypes are as follows: Control, *yw*; *gmr-GAL4/+*; *UAS-LacZ/+*. *CHIPm*, *yw*; *gmr-GAL4/+*; *UAS-CHIPm/+*. *CHIPs*, *yw*; *gmr-GAL4/UAS-CHIPs*. *SCA1*<sup>82Q</sup>/*LacZ*, *UAS-SCA1*<sup>82Q</sup>[F7]*yw*; *gmr-GAL4/+*; *UAS-LacZ/+*. *SCA1*<sup>82Q</sup>/*CHIPm*, *UAS-SCA1*<sup>82Q</sup>[F7]*yw*; *gmr-GAL4/+*; *UAS-CHIPm/+*. *SCA1*<sup>82Q</sup>/*CHIPs*, *UAS-SCA1*<sup>82Q</sup>[F7]*yw*; *gmr-GAL4/UAS-CHIPs*. *GFP/LacZ*, *gmr-GAL4*, *UAS-CD8:GFP/+*; *UAS-LacZ/+*. *GFP/CHIPm*, *gmr-GAL4*, *UAS-CD8:GFP/+*; *UAS-CHIPm/+*. *GFP/CHIPs*, *gmr-GAL4*, *UAS-CD8:GFP/+*; *UAS-CHIPs*.



**FIGURE 5. CHIP suppresses the eye degeneration induced by unexpanded ataxin-1 and decreases its levels in *Drosophila*.** *A* and *B*, SEM images; *E* and *F*, horizontal paraffin sections of eyes expressing human unexpanded SCA1<sup>30Q</sup> with either a control transgene (*LacZ*) or with *CHIPs* (genotype combinations indicated on top). Eyes expressing unexpanded SCA1<sup>30Q</sup> at levels four times higher than the SCA1<sup>30Q</sup> line shown in Fig. 3 have a relatively mild ommatidial disorganization (*A*, compare with Fig. 3*A*); however, they show a reduction in retinal depth similar to the line expressing SCA1<sup>82Q</sup> (compare *E* with Fig. 3, *E* and *F*). Co-expression of *CHIPs* with SCA1<sup>30Q</sup> causes a suppression of both external eye and retinal phenotypes (*B* and *F*). *C* and *D*, SEM images of flies expressing SCA1<sup>2Q</sup> with either a control transgene (*LacZ*) or with *CHIPs*. SCA1<sup>2Q</sup> eyes show severe ommatidial and bristle disorganization phenotypes (*C*, compare with Fig. 3*A*). The UAS-SCA1<sup>2Q</sup> line shown expresses six times higher levels than the UAS-SCA1<sup>82Q</sup> line used in Fig. 3*B* (data not shown) but causes a similar eye phenotype. Co-expression of *CHIPs* together with SCA1<sup>2Q</sup> suppresses the ataxin-1 [2Q]-induced phenotype. Notice the improvement in ommatidial and bristle phenotypes (compare *C* and *D*). *G*, Western blot showing unexpanded ataxin-1 [30Q] protein levels in fly eyes expressing the genotype combinations indicated on top. Ataxin-1 is detected with rabbit anti-ataxin-1 (11N9); mouse anti-tubulin was used as loading control. *Lane 1*, no ataxin-1 signal detected in control eyes. *Lane 2*, ataxin-1 [30Q] protein levels present in eyes co-expressing SCA1<sup>30Q</sup> and *LacZ*. Notice a decrease in ataxin-1 [30Q] levels, in eyes from animals co-expressing SCA1<sup>82Q</sup> and either *CHIPm* or *CHIPs* (*lanes 3* and *4*, respectively). The genotypes are as follows; SCA1<sup>30Q</sup>/*LacZ*, UAS-SCA1<sup>30Q</sup>[F1]/*yw*; *gmr-GAL4*/+; UAS-*LacZ*/+; SCA1<sup>30Q</sup>/*CHIPm*, UAS-SCA1<sup>30Q</sup>[F1]/*yw*; *gmr-GAL4*/+; UAS-*CHIPm*/+; SCA1<sup>30Q</sup>/*CHIPs*, UAS-SCA1<sup>30Q</sup> [F1]/*yw*; *gmr-GAL4*/UAS-*CHIPs*; SCA1<sup>2Q</sup>/*LacZ*, UAS-SCA1<sup>2Q</sup>[F5]/*yw*; *gmr-GAL4*/+; UAS-*LacZ*/+; SCA1<sup>2Q</sup>/*CHIPs*, UAS-SCA1<sup>2Q</sup> [F5]/*yw*; *gmr-GAL4*/UAS-*CHIPs*. Scale bar in *A–D* = 100 μm; insets are 50 × 50 μm. Scale bar in *E* and *F* = 10 μm. *A* and *B*, done at 29 °C. *C–F*, done at 27 °C.

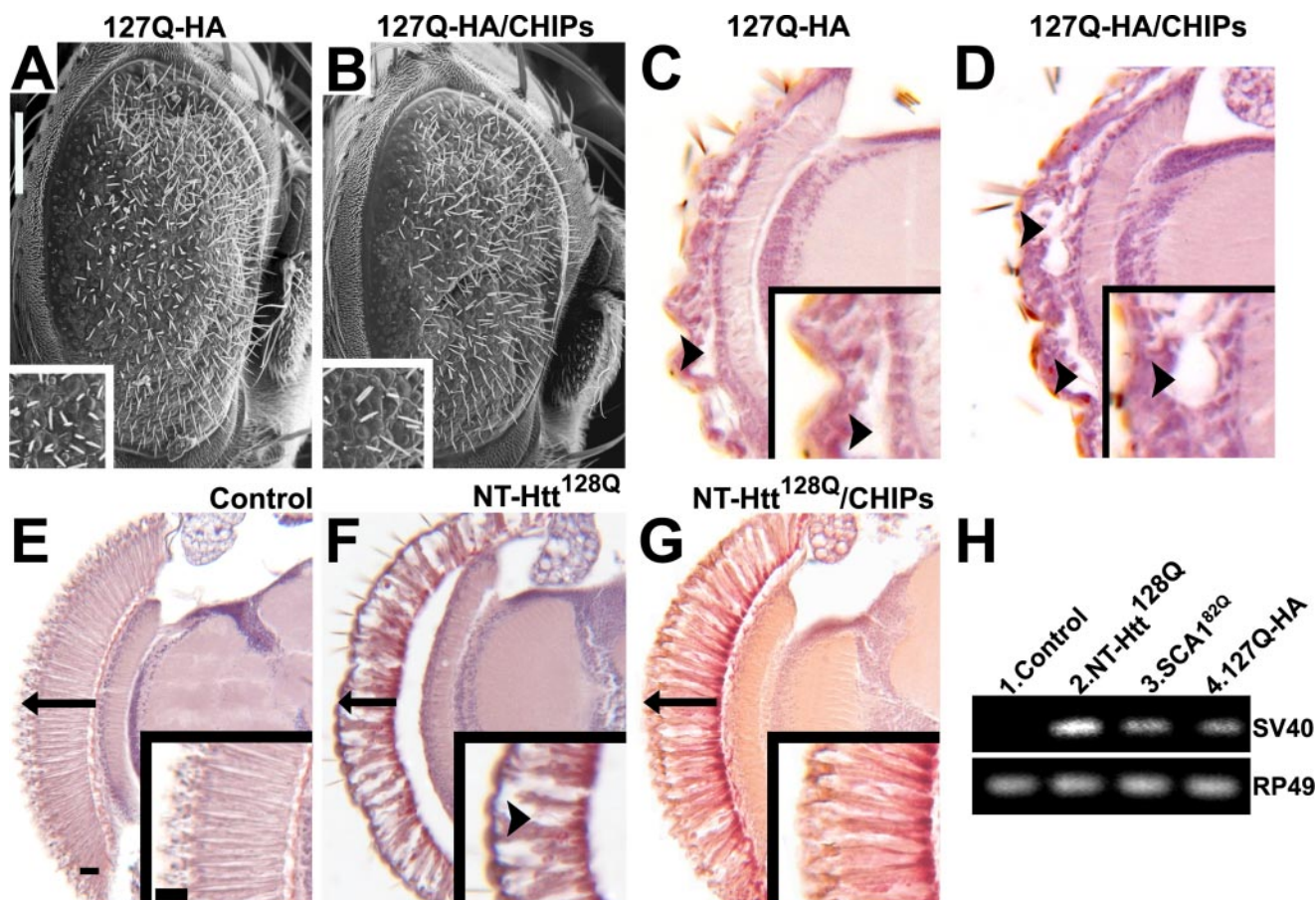
expresses six times more protein and causes a slightly more severe phenotype than the SCA1<sup>82Q</sup> line (Fig. 5*C*). Co-expression of *CHIPs* suppresses both the external eye and retinal phenotypes caused by SCA1<sup>30Q</sup> (Fig. 5, *B* and *F*) and the external phenotype of SCA1<sup>2Q</sup> (Fig. 5*D*).

We also monitored ataxin-1 [30Q] levels in eye discs co-expressing SCA1<sup>30Q</sup> and *LacZ* or SCA1<sup>30Q</sup> and different levels of *CHIP*. Like in the case of ataxin-1 [82Q], *CHIP* expression leads to a decrease in the amount of unexpanded ataxin-1 [30Q]. This decrease was again inversely correlated to the amount of *CHIP* being co-expressed (Fig. 5*G*).

**Protein Context Is Important for *CHIP* Protection against Polyglutamine-induced Neurotoxicity**—The observations that *CHIP* protects against both expanded and unexpanded ataxin-1-triggered neurodegeneration suggest that the protein backbone is important for neuroprotection mediated by *CHIP*.

We compared the ability of *CHIP* to protect from similarly expanded polyglutamine tracts in the context of different protein backbones. First we tested a virtually bare polyglutamine tract with only a short hemagglutinin tag as a backbone. Expression of the 127Q-*HA* transgene in the eye causes a strong external phenotype (33) with severe ommatidial disorganization and bristle loss (Fig. 6*A*). Internally, these eyes present severe retinal degeneration with abundant vacuolization (Fig. 6*C*). Fig. 6, *B* and *D*, show no detectable amelioration of the 127Q-*HA* external and internal eye phenotypes following *CHIP* overexpression. We also tested expression of a similar 128Q tract in the context of an N-terminal fragment of the huntingtin protein containing amino acids 1–276 (NT-Htt[128Q]). Expression of NT-Htt[128Q] in the eye causes no visible external phenotype (data not shown). However, internally NT-Htt[128Q] causes progressive retinal degeneration with severe vacuolization (Fig.





**FIGURE 6. Protein context is important for CHIP protection against polyglutamine-induced neurotoxicity.** *A* and *B*, SEM images of *Drosophila* eyes co-expressing a transgene encoding hemagglutinin-tagged 127Q (127Q-HA) and either GFP (*A*) or CHIPs (*B*). Expression of 127Q-HA causes a glassy external eye phenotype and severe ommatidial disorganization. Co-expressing CHIPs together with the 127Q-HA transgene does not modify this phenotype. *C* and *D*, horizontal paraffin sections of eye retinas from flies of the same genotypes as *A* and *B*. *C*, 127Q-HA expression causes severe retinal degeneration with abundant vacuolization (arrowheads). Compare with control in *E*. *D*, co-expression of CHIPs does not modify 127Q-HA-induced retinal degeneration (compare *C* and *D* and insets). *E*–*G*, horizontal paraffin sections of eyes from control flies (*E*) or eyes co-expressing the N-terminal region (amino acids 1–276) of expanded human Huntingtin (NT-Htt<sup>128Q</sup>) with either GFP (*F*) or CHIPs (*G*). All retinas are from 5-day-old animals. Retinas co-expressing NT-Htt<sup>128Q</sup> and GFP reveal a severe degeneration manifested as a reduction in the depth of the retina (see arrow in *F*) and abundant vacuolization (inset in *F*, arrowhead), when compared with control retinas (*E*). Co-expression of CHIPs together with NT-Htt<sup>128Q</sup> suppresses the phenotype shown in *F*. Note the dramatic improvement in retinal depth (arrow) and vacuolization phenotypes (*G* and inset). *H*, semiquantitative RT-PCR performed on control eyes or eyes expressing NT-Htt<sup>128Q</sup>, SCA1<sup>82Q</sup>, or 127Q-HA. RT-PCR was designed to detect the SV40 transcription termination sequence, which is present in the three transcripts (part of the pUAST vector). RP49 was used as loading control. Lane 1 shows the absence of SV40-containing transcripts. Comparison of lanes 2–4 shows that NT-Htt<sup>128Q</sup> (lane 2) is expressed at higher levels than SCA1<sup>82Q</sup> (lane 3) or 127Q-HA (lane 4), which have similar levels of expression. Genotypes are as follows for each panel: *A* and *C*, *yw; gmr-GAL4, UAS-127Q HA/UAS-eGFP; +*; *B* and *D*, *yw; gmr-GAL4, UAS-127Q HA/UAS-CHIPs; +*; *E*, *yw; gmr-GAL4/+*; *F*, *yw; gmr-GAL4/UAS-eGFP; UAS-NT-Htt[128Q]/+*; *G*, *yw; gmr-GAL4/+; UAS-NT-Htt[128Q]/UAS-CHIPs*; *H*, control: *Rh1-GAL4/+*; NT-Htt<sup>128Q</sup>: *Rh1-GAL4/+; +*; UAS-NT-Htt<sup>128Q</sup>/+: *SCA1<sup>82Q</sup>; Rh1-GAL4/SCA1<sup>82Q</sup>[F7]*. 127Q-HA: *Rh1-GAL4/+; UAS-127Q-HA/+*. *A* and *B*, crosses done at 25 °C; scale bar = 100 μm, and insets are 50 × 50 μm. *C*–*G*, crosses done at 25 °C; scale bars = 10 μm.

6, compare *F* with *E*). Fig. 6*G* show that CHIP is able to strongly ameliorate the retinal phenotypes caused by expression of NT-Htt<sup>128Q</sup> in the eye.

The different effects of CHIP on ataxin-1 [82Q], NT-Htt<sup>128Q</sup>, or 127Q-HA toxicities may be caused by differences in the expression levels of the respective transgenes. To investigate this possibility we performed semiquantitative RT-PCR analysis of 1-day-old flies expressing these transgenes from the adult eye driver *Rh1-GAL4*. This driver was used to avoid quantification artifacts caused from cell loss that occurs because of the relatively early expression of the toxic transgenes when using *Gmr-GAL4*. Fig. 6*H* shows that 127Q-HA, the most toxic transgene, is expressed at a lower level than the SCA1<sup>82Q</sup> or NT-Htt<sup>128Q</sup> transgenes. Thus, the expression level of 127Q-HA does not explain the failure of CHIP to suppress its toxicity.

The different effects of CHIP on ataxin-1 [82Q], NT-Htt<sup>128Q</sup>, or 127Q-HA toxicities is, more likely, a consequence of differences among the backbones of these polyglutamine polypeptides. In contrast to the ataxin-1 [82Q] and NT-Htt<sup>128Q</sup> polypeptides, 127Q-HA does not contain a lysine residue for ubiquitination. These findings emphasize the importance of appropriate protein context for polyglutamine-induced neurodegeneration.

## DISCUSSION

CHIP plays a critical regulatory function in the protein quality control machinery of the cell (14, 15) and has been implicated in the pathology of several neurological disorders characterized by protein misfolding and aggregation (22–29).

Here we investigate the relationship between CHIP and ataxin-1 and its relevance for SCA1 pathogenesis. We find that CHIP interacts with expanded ataxin-1 in Co-IP assays and is recruited to ataxin-1 NIs in cell culture. More importantly, CHIP also localizes to the ataxin-1 NIs present in human SCA1 neurons from post-mortem tissue. CHIP ubiquitinates expanded ataxin-1 *in vitro* and in cell culture and Hsp70 enhances this activity. However, we cannot detect ataxin-1 ubiquitination with a CHIP protein carrying a mutation in the TPR domain that is known to mediate interactions with chaperones (16). Thus, it appears that chaperone interaction is essential for CHIP ubiquitination function *in vivo*. It has been reported that CHIP interacts with and enhances the activity of other E3 ligases (34), raising the possibility that *in vivo* ataxin-1 ubiquitination is mediated by an E3 ligase other than CHIP. To investigate this possibility we used a CHIP<sup>U-box</sup> mutant lacking E3 ligase activity. This CHIP mutant fails to induce ataxin-1 ubiquitination indicating that CHIP directly ubiquitinates ataxin-1. Next we asked whether increased activity of CHIP is able to modify a neurodegenerative phenotype caused by expanded ataxin-1 in a *Drosophila* model of SCA1. We found that CHIP overexpression dramatically decreases expanded ataxin-1-induced toxicity in the *Drosophila* eye. The degree of suppression is higher with increasing levels of CHIP. In accordance with the cell culture ubiquitination data, we find that higher amounts of CHIP lead to lower levels of expanded ataxin-1 in *Drosophila* as determined by immunofluorescence quantification and Western blot analysis.

Taken together these observations indicate that CHIP plays a protective role in SCA1 neuropathology by targeting expanded ataxin-1 for proteasomal degradation in a chaperone dependent manner. These findings are consistent with previous reports implicating CHIP as a protective factor of other polyglutamine proteins by promoting proteasomal degradation (27) and reducing aggregation (26).

Expansion of poly-Q tracts are thought to cause aberrant conformations leading to exposure of hydrophobic residues in the corresponding proteins. Chaperones identify and bind these misfolded proteins in an effort to refold them to their native non-toxic conformations (12, 13). Interestingly, we find that CHIP not only interacts with expanded ataxin-1 but also with the unexpanded isoform in co-IP experiments. This unexpected observation suggests that ataxin-1 can misfold into a toxic conformation even in the absence of the poly-Q expansion. In addition CHIP ubiquitinates unexpanded ataxin-1, and this activity is enhanced by Hsp70. In contrast to ataxin-1, CHIP differentially binds to and enhances the degradation of expanded ataxin-3 or huntingtin but not their unexpanded counterparts (27). Thus unlike other poly-Q proteins, wild-type ataxin-1 may adopt a misfolded toxic conformation that is perhaps stabilized by the poly-Q expansion. In support of this idea unexpanded ataxin-1, unlike normal ataxin-3 or huntingtin, aggregates and triggers neurodegeneration when expressed at high enough levels (10). These and other observations (2, 3, 11, 35, 36) implicate normal function of ataxin-1 in SCA1 pathogenesis, and they also suggest that protein context is important for poly-Q-induced neurodegeneration.

We used *Drosophila* to compare the effects of CHIP on either a pure 127Q tract or an N-terminal huntingtin with a 128Q expansion. While we could not detect amelioration of the toxicity caused by the 127Q tract, CHIP strongly suppresses the 128Q-huntingtin phenotype. The dramatic difference in the ability of CHIP to protect against neurotoxicity caused by similarly expanded poly-Q tracts emphasizes the importance of the protein context in polyglutamine-induced neurodegeneration. These data should be considered when interpreting the results of poly-Q models that lack an appropriate protein context. These models may not recapitulate important features of the human disease, e.g. residues in the corresponding proteins that are required for ubiquitination, phosphorylation, or other post-translational modifications.

In conditional mouse models of SCA1 and Huntington disease, halting expression of the polyglutamine-encoding transcript can lead to recovery of the neurodegenerative process (37, 38). These findings and the discovery of powerful genetic suppressors of polyglutamine-induced neurotoxicity such as CHIP make the prospects for future treatment for SCA1 and other polyglutamine diseases brighter than ever.

*Acknowledgments*—We thank the Baylor College of Medicine Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Center core facilities (HD24062) and B. Antalffy for sectioning and staining the human material, J. Barrish for help with the SEM, R. Atkinson for advice with confocal microscopy, P. Kazemi-Esfarjani for the UAS-127Q-HA strain, and the Bloomington Stock Center for many other *Drosophila* strains.

## REFERENCES

- Zoghbi, H. Y., and Orr, H. T. (2000) *Annu. Rev. Neurosci.* **23**, 217–247
- Gatchel, J. R., and Zoghbi, H. Y. (2005) *Nat. Rev. Genet.* **6**, 743–755
- Tsuda, H., Jafar-Nejad, H., Patel, A. J., Sun, Y., Chen, H. K., Rose, M. F., Venken, K. J., Botas, J., Orr, H. T., Bellen, H. J., and Zoghbi, H. Y. (2005) *Cell* **122**, 633–644
- Klement, I. A., Skinner, P. J., Kaytor, M. D., Yi, H., Hersch, S. M., Clark, H. B., Zoghbi, H. Y., and Orr, H. T. (1998) *Cell* **95**, 41–53
- Matilla, A., Roberson, E. D., Banfi, S., Morales, J., Armstrong, D. L., Burri-ght, E. N., Orr, H. T., Sweatt, J. D., Zoghbi, H. Y., and Matzuk, M. M. (1998) *J. Neurosci.* **18**, 5508–5516
- Ciechanover, A., and Brundin, P. (2003) *Neuron* **40**, 427–446
- Cummings, C. J., Mancini, M. A., Antalffy, B., DeFranco, D. B., Orr, H. T., and Zoghbi, H. Y. (1998) *Nat. Genet.* **19**, 148–154
- Cummings, C. J., Reinstein, E., Sun, Y., Antalffy, B., Jiang, Y., Ciechanover, A., Orr, H. T., Beaudet, A. L., and Zoghbi, H. Y. (1999) *Neuron* **24**, 879–892
- Cummings, C. J., Sun, Y., Opal, P., Antalffy, B., Mestrlil, R., Orr, H. T., Dillmann, W. H., and Zoghbi, H. Y. (2001) *Hum. Mol. Genet.* **10**, 1511–1518
- Fernandez-Funez, P., Nino-Rosales, M. L., de Gouyon, B., She, W. C., Luchak, J. M., Martinez, P., Turiegano, E., Benito, J., Capovilla, M., Skinner, P. J., McCall, A., Canal, I., Orr, H. T., Zoghbi, H. Y., and Botas, J. (2000) *Nature* **408**, 101–106
- Mizutani, A., Wang, L., Rajan, H., Vig, P. J., Alaynick, W. A., Thaler, J. P., and Tsai, C. C. (2005) *EMBO J.* **24**, 3339–3351
- Ma, Y., and Hendershot, L. M. (2001) *Cell* **107**, 827–830
- Wickner, S., Maurizi, M. R., and Gottesman, S. (1999) *Science* **286**, 1888–1893
- Cyr, D. M., Hohfeld, J., and Patterson, C. (2002) *Trends Biochem. Sci.* **27**, 368–375
- Wiederkehr, T., Bukau, B., and Buchberger, A. (2002) *Curr. Biol.* **12**,

## CHIP Degrades Ataxin-1 and Suppresses Its Toxicity

- R26–R28
- Ballinger, C. A., Connell, P., Wu, Y., Hu, Z., Thompson, L. J., Yin, L. Y., and Patterson, C. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**, 4535–4545
  - Jiang, J., Ballinger, C. A., Wu, Y., Dai, Q., Cyr, D. M., Hohfeld, J., and Patterson, C. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 42938–42944
  - Murata, S., Chiba, T., and Tanaka, K. (2003) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **35**, 572–578
  - Hatakeyama, S., Matsumoto, M., Yada, M., and Nakayama, K. I. (2004) *Genes Cells* **9**, 533–548
  - Kampinga, H. H., Kanon, B., Salomons, F. A., Kabakov, A. E., and Patterson, C. (2003) *Mol. Cell. Biol.* **23**, 4948–4958
  - Dai, Q., Zhang, C., Wu, Y., McDonough, H., Whaley, R. A., Godfrey, V., Li, H. H., Madamanchi, N., Xu, W., Neckers, L., Cyr, D., and Patterson, C. (2003) *EMBO J.* **22**, 5446–5458
  - Urushitani, M., Kurisu, J., Tateno, M., Hatakeyama, S., Nakayama, K., Kato, S., and Takahashi, R. (2004) *J. Neurochem.* **90**, 231–244
  - Shin, Y., Klucken, J., Patterson, C., Hyman, B. T., and McLean, P. J. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 23727–23734
  - Shimura, H., Schwartz, D., Gygi, S. P., and Kosik, K. S. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 4869–4876
  - Petrucelli, L., Dickson, D., Kehoe, K., Taylor, J., Snyder, H., Grover, A., De Lucia, M., McGowan, E., Lewis, J., Prihar, G., Kim, J., Dillmann, W. H., Browne, S. E., Hall, A., Voellmy, R., Tsuboi, Y., Dawson, T. M., Wolozin, B., Hardy, J., and Hutton, M. (2004) *Hum. Mol. Genet.* **13**, 703–714
  - Miller, V. M., Nelson, R. F., Gouvion, C. M., Williams, A., Rodriguez-Lebron, E., Harper, S. Q., Davidson, B. L., Rebagliati, M. R., and Paulson, H. L. (2005) *J. Neurosci.* **25**, 9152–9161
  - Jana, N. R., Dikshit, P., Goswami, A., Kotliarova, S., Murata, S., Tanaka, K., and Nukina, N. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 11635–11640
  - Hatakeyama, S., Matsumoto, M., Kamura, T., Murayama, M., Chui, D. H., Planel, E., Takahashi, R., Nakayama, K. I., and Takashima, A. (2004) *J. Neurochem.* **91**, 299–307
  - Choi, J. S., Cho, S., Park, S. G., Park, B. C., and Lee do, H. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **321**, 574–583
  - Brand, A. H., and Perrimon, N. (1993) *Development (Camb.)* **118**, 401–415
  - Chen, H. K., Fernandez-Funez, P., Acevedo, S. F., Lam, Y. C., Kaytor, M. D., Fernandez, M. H., Aitken, A., Skoulakis, E. M., Orr, H. T., Botas, J., and Zoghbi, H. Y. (2003) *Cell* **113**, 457–468
  - Zhang, M., Windheim, M., Roe, S. M., Pegg, M., Cohen, P., Prodromou, C., and Pearl, L. H. (2005) *Mol. Cell.* **20**, 525–538
  - Kazemi-Esfarjani, P., and Benzer, S. (2000) *Science* **287**, 1837–1840
  - Imai, Y., Soda, M., Hatakeyama, S., Akagi, T., Hashikawa, T., Nakayama, K. I., and Takahashi, R. (2002) *Mol. Cell.* **10**, 55–67
  - Tsai, C. C., Kao, H. Y., Mitzutani, A., Banayo, E., Rajan, H., McKeown, M., and Evans, R. M. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 4047–4052
  - Emamian, E. S., Kaytor, M. D., Duvick, L. A., Zu, T., Tousey, S. K., Zoghbi, H. Y., Clark, H. B., and Orr, H. T. (2003) *Neuron* **38**, 375–387
  - Zu, T., Duvick, L. A., Kaytor, M. D., Berlinger, M. S., Zoghbi, H. Y., Clark, H. B., and Orr, H. T. (2004) *J. Neurosci.* **24**, 8853–8861
  - Yamamoto, A., Lucas, J. J., and Hen, R. (2000) *Cell* **101**, 57–66



## **Ataxin-2 mediates expanded Ataxin-1-induced neurodegeneration**

Ismael Al-Ramahi<sup>1,4</sup>, Alma Pérez<sup>1</sup>, Janghoo Lim<sup>1</sup>, Minghang Zhang<sup>1</sup>, Rie Sorensen<sup>1</sup>,  
Joana Branco<sup>1</sup>, Stefan M. Pulst<sup>5</sup>, Huda Y. Zoghbi<sup>1,2,3</sup> & Juan Botas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departments of Molecular and Human Genetics and <sup>2</sup>Neuroscience, <sup>3</sup>Howard Hughes Medical Institute, Baylor College of Medicine, Houston, Texas 77030, <sup>4</sup>Departamento de Biología, Facultad de Ciencias-University Autonoma de Madrid, Madrid 28049, Spain, and <sup>5</sup>Division of Neurology, Cedars-Sinai Medical Center, USA; Departments of Medicine and Neurobiology, David Geffen School of Medicine at UCLA.

Correspondence should be addressed to J.B. (jbotas@bcm.tmc.edu).



## Abstract

Spinocerebellar ataxias (SCAs) are a genetically heterogeneous group of neurodegenerative disorders sharing atrophy of the cerebellum as a common feature. SCA1 and SCA2 are two ataxias caused by expansion of polyglutamine tracts in Ataxin-1 and Ataxin-2 respectively, two proteins otherwise unrelated. Here we use a *Drosophila* model of SCA1 to unveil molecular mechanisms linking Ataxin-1 with Ataxin-2 during SCA1 pathogenesis. We show that wild-type Ataxin-2 is a major genetic modifier of expanded Ataxin-1 (Ataxin-1[82Q]) toxicity. Increased Ataxin-2 levels enhance, and more importantly, decreased Ataxin-2 levels suppress Ataxin-1[82Q]-induced neurodegeneration, thereby ruling out a pathogenic mechanism by depletion of Ataxin-2. Although Ataxin-2 normally accumulates in the cytoplasm and Ataxin-1[82Q] is nuclear, we show that both proteins physically interact. Furthermore, we show that expanded Ataxin-1 induces intranuclear accumulation of Ataxin-2 in both *Drosophila* and SCA1 postmortem neurons. These observations suggest that nuclear accumulation of Ataxin-2 contributes to expanded Ataxin-1-induced toxicity. We tested this hypothesis engineering Ataxin-2 transgenes with nuclear localization and nuclear export signals. We find that NLS-Ataxin-2, but not NES-Ataxin-2, mimics the neurodegenerative phenotypes caused by Ataxin-1[82Q] including repression of the proneural factor Senseless. Altogether, these findings reveal a previously unknown functional link between neurodegenerative disorders with common clinical features but different etiology.

## Introduction

Inherited ataxias are a genetically heterogeneous group of neurodegenerative diseases characterized by loss of motor coordination and balance. They can be caused by loss-of-function or gain-of-function mechanisms; some ataxias are triggered by missense mutations, while others by triplet repeat expansions, which may occur either in coding or non-coding sequences. Furthermore, the gene products implicated in the different ataxias do not share obvious functional or structural relationships to each other. In spite of this genetic heterogeneity, many ataxias show striking similarities. In particular, it is often difficult to distinguish between Spinocerebellar ataxias (SCAs) based only on clinical and pathological observations, and their differential diagnosis often requires genetic testing. In addition, a common neuropathological feature of SCAs is the atrophy of the cerebellar module (reviewed in [1,2]). These similarities suggest that SCAs, and perhaps other ataxias, may also share common mechanisms of pathogenesis. In support of this hypothesis a recent study reported a network of physical protein-protein interactions among many factors associated with ataxia and Purkinje cell degeneration in humans and mice [3]. However, no specific molecular mechanisms are known that can account for the clinical and neuropathological similarities among SCAs and other ataxias.

SCA1 is caused by the expansion of a CAG repeat encoding a poly-glutamine tract in the protein Ataxin-1 that induces a toxic gain of function [4]. The expanded protein accumulates in neuronal nuclear inclusions (NIs) that also contain transcription factors, chaperones, proteasome subunits, and other components of the protein quality control/degradation machinery like CHIP or Ataxin-3 [4-10]. Abnormally long poly-glutamine tracts are the common cause of pathogenesis in at least five other SCAs (2, 3, 6, 7 and 17) and three additional neurodegenerative diseases including Huntington's disease (HD) [1,11]. Protein quality control machinery as well as transcriptional

dysregulation are general mechanisms that have been implicated in the pathogenesis of these poly-glutamine disorders [12-14].

Although the poly-glutamine expansion triggers the toxicity of Ataxin-1, experiments in *Drosophila* and mouse SCA1 models have shown that protein context plays a key role in expanded Ataxin-1-induced neurodegeneration (reviewed in [14]). The nuclear localization signal[15] and phosphorylation[16] influence the toxicity of expanded Ataxin-1. In addition, certain interacting partners of unexpanded Ataxin-1 are critical to expanded Ataxin-1 toxicity [8,17,18]. In this context, expanded Ataxin-1 was recently found to induce a decrease in the levels of Senseless (Sens) and its murine orthologue growth factor independent 1 (Gfi1) [17]. These are transcription factors that interact with unexpanded Ataxin-1 and are necessary for Purkinje cell survival in mice [17] and for sensory organ development in *Drosophila* [19]. The importance of the protein framework has also been shown in models of other poly-glutamine diseases [14,20].

Genetic screening in *Drosophila* models of neurodegenerative diseases is a powerful approach to identify modifier genes and pathways implicated in pathogenesis [21-23]. We previously reported an unbiased genetic screen with a *Drosophila* model of SCA1 [24]. Here we report the identification of the *Drosophila* homolog of Ataxin-2 (*dAtx2*) as a major modifier of expanded Ataxin-1-induced toxicity. Ataxin-2 is a widely expressed cytoplasmic protein with no similarity to Ataxin-1 except for the poly-glutamine domain. The normal function of Ataxin-2 remains unclear, although it has been implicated in mRNA processing [25] and translational regulation in yeast [26,27], *C. elegans*[28] and *Drosophila*[29], where it is also required for actin filament formation [30]. However, expansion of its poly-glutamine domain leads to SCA2 [31-33]. The functional interactions between human Ataxin-1 and Ataxin-2 described here

mechanistically tie these two proteins and point to previously unknown links between two inherited ataxias.

## RESULTS

### **Increased/reduced levels of Ataxin-2 enhance/suppress expanded Ataxin-1 toxicity in the *Drosophila* eye.**

Expression of Ataxin-1[82Q] in the eye of *SCAI*<sup>82Q</sup> flies causes external and internal abnormal phenotypes [24]. Externally, the eyes of these animals show severe ommatidial disorganization as well as interommatidial bristle loss when compared with control eyes (**Figure 1**, compare **A** and **A'** with **B** and **B'**). Internally, examination of the retina reveals tissue loss and shortened and curved photoreceptor neurons (**Figure 1**, compare **F** with **G**). In a screen for genetic modifiers of Ataxin-1[82Q]-induced toxicity we recovered *EP(3)3145* as an enhancer of the eye phenotype (data not shown). This is an insertion of an EP transposable element [34] in the 5' end of *dAtx2*, the *Drosophila* orthologue of human Ataxin-2. The *Drosophila* and human proteins share 23% amino acid identity and 36% amino-acid similarity over the entire protein with the most conserved sequences corresponding to the ATX2-N and ATX2-C domains (43% and 62% identity, respectively)[30]. Molecular analysis revealed that the EP element is inserted 3121 bp upstream of the ATG and in the same orientation as the *dAtx2* transcription unit (data not shown and [30]). These data suggested that *EP(3)3145* over-expresses the *dAtx2* transcription unit to enhance the *SCAI*<sup>82Q</sup> eye phenotype. As described below, this possibility was confirmed using a transgene that over-expresses the *dAtx2* cDNA.

Co-expression of a wild-type *dAtx2* transgene (*dAtx2*<sup>OE</sup>) induces a severe enhancement of the Ataxin-1[82Q]-induced eye phenotype. Externally, the eyes of *SCAI*<sup>82Q</sup>/*dAtx2*<sup>OE</sup> animals show no bristles and increased ommatidial disorganization

when compared with the eyes of *SCA1<sup>82Q</sup>* controls (compare **Figure 1D** and **D'** with **B** and **B'**). Internally, photoreceptor cells are considerably shorter (compare **Figure 1I** with **G**). Expression of the same levels of dAtx2 alone in the eye causes relatively mild external disorganization and reduction of the retinal width (**Figure 1E, E'** and **J**). Overexpression of dAtx2 from *EP(3)3145* and *UAS-dAtx2* also aggravates the phenotypes of other fly models of neurodegenerative diseases besides SCA1 [35,36]. However, since overexpression of dAtx2 causes an eye phenotype by itself (**Figure 1E, E'** and **J**) it is difficult to make strong conclusions about the specificity of these genetic interactions.

To test the specificity of the genetic interaction, we investigated if decreasing the levels of endogenous dAtx2 modifies expanded Ataxin-1-induced toxicity. For this, we used a 1.4 kb deletion in the *dAtx2* locus (*dAtx2<sup>X1</sup>*) that removes part of the *dAtx2* promoter, the ATG codon and extends into the first intron[30]. We find that flies expressing Ataxin-1[82Q] and heterozygous for the *dAtx2<sup>X1</sup>* mutant allele show a strong suppression of the eye phenotype, with much improved arrangement of the ommatidia and bristles compared to eyes from flies expressing Ataxin-1[82Q] with normal dAtx2 levels (compare **Figure 1C** and **C'** with **B** and **B'**). This suppression is also evident in the retinas of *SCA1<sup>82Q</sup>/dAtx2<sup>X1</sup>* flies that show elongated photoreceptors and very little tissue loss (compare **Figure 1H** with **G**). Since dAtx2 is an RNA binding protein, we investigated if the observed suppression of Ataxin-1[82Q] toxicity was the result of dAtx2 affecting the levels of the *SCA1<sup>82Q</sup>* mRNA transcript or the levels of Ataxin-1 [82Q] protein. As shown in **Figure 1K** and **L** neither the levels of *SCA1<sup>82Q</sup>* mRNA nor the levels of the Ataxin-1[82Q] protein are affected by changing the levels of dAtx2.

### **Reduced levels of Ataxin-2 suppress expanded Ataxin-1-induced neuronal dysfunction in *Drosophila*.**

To verify that the genetic interaction between Ataxin-1 and dAtx2 is not specific to the eye, we analyzed the effect of altering dAtx2 levels on expanded Ataxin-1-induced neuronal dysfunction.

The motor performance of flies as a function of age can be quantified using a climbing assay [37]. This assay has been used to analyze the effects of toxic proteins on neurons in other *Drosophila* models of neurodegenerative diseases [38,39]. Control flies show no significant decrease in their motor performance until late in life. **Figure 1M** shows that ~74% of control flies still climb after thirty-six days (triangles). Flies expressing Ataxin-1[82Q] specifically in the nervous system (using *nrv2-GAL4*) display a progressive impairment of their motor performance (**Figure 1M**, open circles). In the context of the *Drosophila* life span, this is a late onset and progressive phenotype as compared to the performance of control flies in the same period of time. We then analyzed the effect of decreased levels of dAtx2 on the climbing phenotype caused by Ataxin-1[82Q]. As shown in **Figure 1M** (squares) in *SCA1<sup>82Q</sup>* flies also heterozygous for the *dAtx2<sup>X1</sup>* mutation climbing performance is significantly improved compared to flies with normal dAtx2 levels ( $p < 0.0001$  for repeated measures anova (rma) between genotypes). **Figure 1M and supplementary Figure 1** show that while all *SCA1<sup>82Q</sup>* animals fail to climb after 26 days, ~25% of *SCA1<sup>82Q</sup>/dAtx2<sup>X1</sup>* flies are still able to climb ( $p < 0.0001$  for rma contrast at 26 days). Thus the impairments in motor performance caused by neuronal expression of Ataxin-1[82Q] are suppressed by decreased *dAtx2* levels.

**Ataxin-2 levels modulate expanded Ataxin-1-induced loss of mechanoreceptors caused by repression of *Senseless*.**

Senseless (*Sens*) is a proneural factor that is expressed and required in the sensory organ precursor (SOP) cells of the peripheral nervous system [19]. Expression of high levels of Ataxin-1[82Q] in the thoracic SOPs using *scabrous-GAL4* (*sca-GAL4*) leads to a reduction in *Sens* protein levels in these cells and loss of large mechanoreceptors (macrochaetae) in the thorax of adult flies [17]. Therefore, scoring adult thoracic macrochaetae in *SCAI*<sup>82Q</sup> animals provides a quantitative phenotype with a known molecular foundation.

We analyzed the effect of altering Ataxin-2 levels on Ataxin-1[82Q]-induced loss of mechanoreceptors. This was performed by quantifying the number of macrochaetae in the adult thorax of *SCAI*<sup>82Q</sup> animals with different levels of dAtx2. Using a relatively low expressing Ataxin-1[82Q] line, we defined conditions in which *sca-GAL4*-mediated expression in the SOP cells causes only 9% of macrochaetae loss (**Figure 2A-column-3 and Fig 2C**, compare to controls **Figure 2A-column-1 and Figure 2B**). Expression of wild-type dAtx2 alone (*dAtx2*<sup>OE</sup>) leads to no loss of macrochaetae (**Figure 2A-column-2 and Figure 2D**), but co-expression of dAtx2 and Ataxin-1[82Q] (*SCAI*<sup>82Q</sup>/*dAtx2*<sup>OE</sup>) leads to a severe loss of macrochaetae compared to Ataxin-1[82Q] alone (**Figure 2E**, compare with **Figure 2B**). Quantification shows an ~80% decrease in the number of macrochaetae when both proteins are co-expressed compared to controls (**Figure 2A-columns 1-4**,  $p < 0.0001$ , Tukey-Kramer HSD).

In the wing imaginal disc, *Sens* expression includes the precursors of the large thoracic mechanoreceptor bristles, and the two parallel rows of bristles at each side of the wing margin (**Figs. 2F-G**). We quantified the amount of fluorescence detected after anti-*Sens* immunostaining in wing margin cells expressing Ataxin-1[82Q] with normal or increased levels of dAtx2. Expression of either low levels of Ataxin-1[82Q] or dAtx2

with *sca-Gal4* (at 25°C) produces no detectable decrease in the levels of Sens in the wing margin (**Fig2H and I** compare with **G** and quantification in **K**). However co-expression of both Ataxin-1[82Q] and dAtx2 in the same conditions induces a strong decrease in the levels of Sens (**Figure 2J**). Quantification of the Sens signal in *SCA1<sup>82Q</sup>/dAtx2<sup>OE</sup>* animals (**Figure 2K, fourth column**) reveals a decrease of ~50% in the amount of Sens signal when compared to either wild type, *SCA1<sup>82Q</sup>* or *dAtx2<sup>OE</sup>* controls ( $p < 0.001$ , Tukey-Kramer HSD).

In addition, we investigated the consequences of decreasing the amount of dAtx2 (using the *dAtx2<sup>XI</sup>* allele) in conditions where Ataxin-1[82Q] reduces Sens levels in the wing margin (i.e. at 27°C and 29°C). However, we did not detect a significant modification (data not shown). Since it is possible that we are not able to detect small changes on Sens levels in wing discs from late third instar larvae, or this changes might happen later in the SOP development, we also investigated the effect of decreasing the amount of Ataxin-2 on Ataxin-1[82Q]-induced mechanoreceptor loss. Expression of Ataxin-1[82Q] at high levels (27°C) in the SOP cells results in the loss of ~20% of thoracic macrochaetae when compared to controls (**Figure 2L** compare **columns 1** and **2**  $p < 0.0001$ , Tukey-Kramer HSD; see **Figure 2M**). Reducing the levels of endogenous dAtx2 with the heterozygous *dAtx2<sup>XI</sup>* mutation partially rescues the Ataxin-1[82Q]-induced bristle phenotype. Loss of macrochaetae in *SCA1<sup>82Q</sup>/dAtx2<sup>XI</sup>* animals is approximately half of that seen in animals with normal levels Ataxin-2 (**Figure 2L**, compare **columns 2** and **3**  $p = 0.0048$ , Tukey-Kramer HSD, and see **Figure 2N**).

### **Physical interaction between human expanded Ataxin-1 and Ataxin-2 proteins.**

To further characterize the interactions between Ataxin-1 and Ataxin-2, we investigated possible protein-protein interactions. Lysates from cells expressing Myc-hAtaxin-2 and GST-Ataxin-1[82Q] were subjected to co-affinity purification (co-AP) glutathione-S-transferase (GST) pull-down assays. As shown in **Figure 3A (lanes 1-2)**, GST-Ataxin-



1[82Q] pulls down Myc-hAtaxin-2, which indicates that both proteins physically interact.

We investigated whether particular domains of the hAtaxin-1 protein were responsible for the interaction with hAtaxin-2. Co-AP experiments were carried out with lysates from cells expressing Myc-hAtaxin-2 and one of the following hAtaxin-1 fragments: poly-Q expanded N-terminal (aa# 1-575, **lane-3**), C-terminus Ataxin-1 containing the AXH domain (aa# 529-816; **lane-4**) or the AXH domain alone (aa# 558-700; **lane-5**), all of them tagged with GST. All three fragments pull-down Myc-hAtaxin-2, indicating that each Ataxin-1 fragment can interact independently with hAtaxin-2 (**Figure 3A lanes 3-5**). The interaction of hAtaxin-2 is stronger with the N-terminal Ataxin-1 fragment (**Figure 3A, lane-3**) as compared to the C-terminal or AXH portions (**lanes 4 and 5** respectively), since less N-terminal peptide pulls down more hAtaxin-2.

Ataxin-1[82Q] is phosphorylated at Serine residue 776 on the C-terminal portion of the protein. Mutating this residue (Ser776Ala) inhibits the toxicity of Ataxin-1[82Q] in mouse Purkinje Cells[16]. We investigated whether mutating Ser776 would affect the Ataxin-1[82Q]-Ataxin-2 interaction. As shown in **Figure 3B** the interaction of Ataxin-2 with Ataxin-1[82Q]<sup>S776A</sup> is much weaker than with normal Ataxin-1[82Q]. Therefore, although the interaction of Ataxin-2 is stronger with the N-terminal portion of Ataxin-1[82Q] than with its C-terminal portion, the modification of one residue on the C-terminal portion of Ataxin-1[82Q] is enough to inhibit this interaction.

### **Ataxin-2 accumulates in the nucleus of expanded Ataxin-1-expressing *Drosophila* cells and human neurons.**

The co-AP assays with expanded hAtaxin-1 and hAtaxin-2 indicate that the two proteins are able to interact. However, Ataxin-1 normally localizes to the nucleus in *Drosophila*

and many human cell types, while Ataxin-2 is a cytoplasmic protein. To address whether the interaction observed in cultured cells is relevant *in vivo*, we monitored the localization of Ataxin-2 in *Drosophila* cells expressing Ataxin-1[82Q]. Since Ataxin-1[82Q]-induced toxicity is suppressed by *dAtx2* loss of function in the *Drosophila* eye; we first analyzed the localization of dAtx2 in retinal cells. dAtx2 is not normally detected in the nuclei of retinal cells from either control eyes or eyes overexpressing dAtx2 (**Figure 4A** and **C** respectively). In contrast, we find that endogenous dAtx2 localizes to the nuclei of retinal cells expressing Ataxin-1[82Q]. Furthermore, nuclear dAtx2 signal is detected both diffuse in the nucleoplasm as well as in nuclear inclusions (NIs) (**Figure 4B**). To confirm this unexpected result, we examined the localization of dAtx2 in other Ataxin-1[82Q]-expressing neurons. Similar to the results obtained in the retina, endogenous dAtx2 normally localizes to the cytoplasm and is not detected in the nuclei of neurons from the ventral nerve cord (**Figure 4 E-E''**, *ok107-GAL4* pattern shown in **D**). However, Ataxin-1[82Q]-expressing VNC neurons show nuclear accumulation of dAtx2 (**Figure 4 F-F''**). Next we investigated whether dAtx2 and Ataxin-1 co-aggregate. Co-staining of Ataxin-1 and dAtx2 is not possible since the available antibodies for both proteins were raised in rabbit; however, Ataxin-1 NIs in *Drosophila* neurons are positive for Ubiquitin [24], so we performed a double staining for dAtx2 and Ubiquitin. **Figure 4G-G''** shows that the dAtx2 NIs present in the neurons of *SCA1<sup>82Q</sup>* flies are positive for Ubiquitin. These results indicate that expanded Ataxin-1 causes dAtx2 to localize to the nucleus and suggest that both proteins co-aggregate in NIs.

To validate these results and investigate their importance for SCA1 pathogenesis, we analyzed the localization of hAtaxin-2 in SCA1 neurons from human postmortem brain samples by anti-Ataxin-2 immunohistochemistry. Pontine neurons from control samples consistently show cytoplasmic localization of hAtaxin-2 (**Figure 4H**). In addition, these neurons do not have NIs. Pontine neurons from SCA1 brain samples

display frequent Ataxin-1 NIs that are clearly visible with Hematoxylin staining. We found that approximately twenty percent of these NIs are positive for hAtaxin-2 (**Figure 4I**); see also[9]. These findings, together with the co-AP data using human Ataxin-1 and Ataxin-2 proteins, indicate that the Ataxin-1-Ataxin-2 interactions observed in *Drosophila* are relevant for SCA1 pathology.

**Nuclear accumulation of Ataxin-2 is induced by pathogenic Ataxin-1[82Q], but not unexpanded Ataxin-1[2Q] and Ataxin-1[30Q].**

SCA1 pathogenesis is triggered by poly-glutamine expansion in Ataxin-1 beyond 39-44 residues [4]. To investigate if nuclear accumulation of Ataxin-2 is specific to the pathogenic Ataxin-1 form, we analyzed dAtx2 localization in *Drosophila* VNC neurons expressing human Ataxin-1 with different poly-glutamine lengths: Ataxin-1[2Q], Ataxin-1[30Q] and Ataxin-1[82Q]. The Ataxin-1[2Q] line used has higher levels of protein expression than the Ataxin-1[30Q] and [82Q] lines, both of which have comparable expression levels (Western blot data not shown). **Figure 5A-D** shows that no nuclear dAtx2 signal is detected in control neurons (**Figure 5A**), or neurons expressing Ataxin-1[2Q] or [30Q] (**Figure 5B** and **C**). In contrast, accumulation of dAtx2 is detected in the nucleus of Ataxin-1[82Q]-expressing neurons (**Figure 5D**). Although this result does not rule out an interaction between wild-type Ataxin-1 and dAtx2, it indicates that nuclear accumulation of Ataxin-2 is specific to the expanded Ataxin-1 form responsible for SCA1 pathogenesis.

**Nuclear accumulation of Ataxin-2 causes severe eye toxicity.**

The observations that expanded Ataxin-1 induces nuclear accumulation of Ataxin-2 and that decreasing the levels of endogenous Ataxin-2 suppresses toxicity in *SCA1*<sup>82Q</sup> flies, suggest that nuclear accumulation of Ataxin-2 may lead to neurotoxicity. To test this hypothesis, we generated dAtx2 transgenic flies with an exogenous nuclear localization

signal (NLS) engineered on its C-terminus end ( $dAtx2^{NLS}$ ) (**Figure 6** compare **A-A'** with **C**). Although wild-type Ataxin-2 is only detected in the cytoplasm in *Drosophila* and human neurons, it is difficult to rule out the possibility that some Ataxin-2 may be present in the nucleus. Therefore, we also generated flies carrying a dAtx2 construct with an exogenous nuclear export signal (NES) ( $dAtx2^{NES}$ ) to use as additional controls (**Figure 6B-B'**). Ten transgenic lines were recovered for each dAtx2 construct, with a wide range of expression levels for each transgene. We selected transgenic lines expressing wild-type dAtx2 ( $dAtx2^{OE}$ ),  $dAtx2^{NES}$  or  $dAtx2^{NLS}$  at similar levels (**Figure 6D** compare lanes 2-4) and compared their toxicity in the eye. As shown in **Figure 6E-H**,  $dAtx2^{NLS}$  is more toxic than wild-type dAtx2 or  $dAtx2^{NES}$ . While both wild-type dAtx2 and  $dAtx2^{NES}$  induce a relatively mild eye phenotype compared to controls (**Figure 6 E-G**), expression of  $dAtx2^{NLS}$  results in strong eye toxicity (**Figure 6H**). Eyes of  $dAtx2^{NLS}$  flies show a severely disorganized ommatidial lattice and a complete absence of interommatidial bristles (**Figure 6H**). These observations were consistent in several lines for each of the dAtx2 constructs at similar levels of expression (data not shown).

In summary, expression of  $dAtx2^{NES}$  and wild-type dAtx2 in the eye cause similar mild phenotypes. This is consistent with dAtx2 being mainly cytoplasmic, and with observations of SCA2 pathogenesis in the cytoplasm[40,41]. Interestingly, increasing the levels of Ataxin-2 in the nucleus is sufficient to cause a much more severe eye phenotype. These observations suggest that the toxicity of expanded Ataxin-1 is mediated in part, by the nuclear accumulation of Ataxin-2.

### **Nuclear Ataxin-2 decreases Sens protein levels and induces loss of mechanoreceptor bristles.**

To further test the hypothesis that nuclear Ataxin-2 contributes to expanded Ataxin-1-induced toxicity, we analyzed the effect of expressing the different *dAtx2*

transgenes on Sens distribution in the wing margin SOPs. Expression of Ataxin-1[82Q] in the antero-posterior compartment boundary (using *dpp-GAL4*) induces a cell autonomous decrease of Sens only in the *dpp-GAL4* expressing area of the wing margin (**Figs. Figure 7A, A' and 7B, B'**, arrowhead). This provides a molecular read-out of Ataxin-1[82Q]-induced neurotoxicity.

Expression of dAtx2<sup>NES</sup> from *dpp-GAL4* does not reduce Sens levels (**Figure 7C and C'**, arrowhead). Sens distribution in these imaginal wing discs is unchanged. Next, we tested the effect of dAtx2 with a nuclear localization signal (*dAtx2<sup>NLS</sup>*). Like Ataxin-1[82Q], expression of dAtx2<sup>NLS</sup> induces loss of Sens in the wing margin SOPs (**Figure 7D and D'**, arrowhead). dAtx2<sup>NLS</sup>-induced loss of Sens is also observed in other cell types. Salivary gland cells express Sens at high levels [19], which localizes to the nucleus (**Figure 7E-H**). Salivary gland cells expressing dAtx2<sup>NES</sup> show no detectable change in Sens levels or distribution (**Figure 7I-L**). In contrast, expression of dAtx2<sup>NLS</sup> causes a dramatic decrease in the amount of Sens (**Figure 7M-P**). The nuclei of *dAtx2<sup>NLS</sup>* cells are still present and their morphology is similar to controls, indicating that Sens loss is unlikely a consequence of cell death. Therefore, nuclear dAtx2 mimics Ataxin-1[82Q] in causing loss of Sens protein accumulation.

Expression of Ataxin-1 in the thoracic SOPs (using *sca-GAL4*) leads to loss of macrochaetae in the adult thorax (**Figure 2** and ref.[17]). Therefore, we also investigated the consequences of nuclear or cytoplasmic Ataxin-2 accumulation on the development of adult macrochaetae. As with wild-type dAtx2 (**Figure 2**), expression of dAtx2<sup>NES</sup> in the thoracic SOP cells causes no visible change in the number of macrochaetae in the adult thorax (**Figure 7Q** and **Figure 7S column-1**). In contrast, expression of dAtx2<sup>NLS</sup> induces a significant decrease in the number of macrochaetae, with an approximate twenty percent reduction in comparison to control animals (**Figure 7R** and **Figure 7S column-2**). These results indicate that increasing the levels of

nuclear dAtx2 mimics expanded Ataxin-1 in inducing loss of mechanoreceptors and reducing the levels of Sens protein.

## Discussion

Here we report functional interactions between the proteins causing two distinct Spinocerebellar ataxias. We show that wild-type Ataxin-2 (the protein that when expanded causes SCA2) mediates, at least in part, neuronal degeneration caused by expanded Ataxin-1 (the protein triggering SCA1). As shown in several independent assays, Ataxin-1[82Q]-induced toxicity is worsened by increasing the levels of dAtx2. More importantly, decreasing the levels of dAtx2 suppresses expanded Ataxin-1-induced neuronal degeneration. The suppression of Ataxin-1[82Q] phenotypes by partial loss of function of *dAtx2* argues against a possible mechanism by which sequestration and depletion of Ataxin-2 contributes to expanded Ataxin-1-induced neurodegeneration. This is further supported by lack of cerebellar or other neuronal abnormalities in mice that are deficient for Ataxin-2[42].

We find that the human expanded Ataxin-1 and Ataxin-2 proteins interact in co-AP assays. In addition, expanded Ataxin-1 induces accumulation of Ataxin-2 in the nucleus, where the two proteins co-localize in NIs both in *Drosophila* neurons and SCA1 human brain tissue. These are surprising observations since Ataxin-2 is normally a cytoplasmic protein both in humans and *Drosophila*. Interestingly, wild-type Ataxin-1 can cause neurotoxicity when overexpressed, although to a much lesser extent than expanded Ataxin-1 [24]. However, nuclear accumulation of dAtx2 is triggered by pathogenic but not wild-type forms of Ataxin-1, at least in detectable amounts. Taken together these data suggested that accumulation of Ataxin-2 in the nucleus contributes to the exacerbated toxicity of expanded Ataxin-1, and is an important mechanism of pathogenesis in SCA1. To investigate this hypothesis we targeted dAtx2 to the nucleus

by means of an exogenous NLS signal. We find that dAtx2<sup>NLS</sup> is sufficient to cause a dramatic increase of its toxicity, when compared to either wild-type dAtx2 or dAtx2 with an exogenous nuclear export signal (dAtx2<sup>NES</sup>) expressed at similar levels.

To further test the hypothesis that nuclear accumulation of Ataxin-2 contributes to neurodegeneration caused by expanded Ataxin-1 we investigated Sens levels. Sens and its murine orthologue Gfi1 are proneural factors whose levels are decreased in the presence of expanded Ataxin-1[17]; thus providing a molecular readout for the neurotoxicity of Ataxin-1. In *Drosophila*, reduction of Sens levels leads to the loss of mechanoreceptors[17], so we monitored Sens in the context of flies expressing either dAtx2<sup>NLS</sup> or dAtx2<sup>NES</sup> but not carrying the Ataxin-1[82Q] transgene. We find that nuclear targeted, but not cytoplasmic, dAtx2 mimics both the Sens reduction and mechanoreceptor loss phenotypes caused by Ataxin-1[82Q].

Expanded Ataxin-2 accumulates both in the cytoplasm and the nuclei of SCA2 postmortem brains[2,43-45]. In mouse and cell culture models of SCA2 expanded Ataxin-2 accumulates in the cytoplasm and its nuclear accumulation is not necessary to induce toxicity[40,41]. However, nuclear accumulation of expanded Ataxin-2 also occurs in cultured cells[41], and is consistently observed in human SCA2 postmortem brainstem neurons [2,43-45]. These observations suggest that both nuclear and cytoplasmic mechanisms of pathogenesis contribute to neurodegeneration in SCA2, as it is known to occur in other poly-glutamine diseases like HD and SCA3 [46-48]. One possibility is that Ataxin-2 shuttles between the nucleus and the cytoplasm although the protein is normally detected only in the cytoplasm. Our data shows that accumulation of dAtx2 in the nucleus is more harmful than in the cytoplasm. Thus, neurons with nuclear Ataxin-2 in SCA2 patients may be relatively more compromised than neurons where Ataxin-2 accumulates in the cytoplasm. In agreement with this possibility, expanded

Ataxin-2 is found in the nuclei of pontine neurons of SCA2 brains, one of the neuronal groups and brain regions with prominent degeneration in SCA2 [2,43-45].

Reducing Ataxin-2 levels suppresses expanded Ataxin-1 toxicity, strongly arguing against a mechanism of pathogenesis by loss of function of Ataxin-2 in the cytoplasm. Thus, it is unlikely that the nuclear toxicity of Ataxin-2 is related to its functions in translational regulation [26-29].

The data described here uncover unexpected functional interactions between proteins involved in two different SCAs. Nuclear accumulation of Ataxin-2, normally a cytoplasmic protein, is a common denominator of SCA1 and SCA2 and leads to reduced levels of at least one important proneural factor; i.e. *Sens*, whose mammalian orthologue *Gfi1* is required for Purkinje cell survival [17]. Thus neuronal degeneration may take place through common mechanisms in different ataxias, and one of these mechanisms may involve the abnormal accumulation of Ataxin-2 in neuronal nuclei.

## Methods

***Drosophila* strains.** The cDNA GH27029 containing *dAtx2* was obtained from the BDGP repository. SV40 nuclear localization signal and PKI nuclear export signal were engineered on the 3' end of *dAtx2* cDNA by PCR. Both constructs were then subcloned first in pGEM<sup>®</sup>-T (Promega) and then in a previously generated pUAST-flag expression vector[49,50]. The *Drosophila* transgenic lines *UAS-dAtx2<sup>NES</sup>* and *UAS-dAtx2<sup>NLS</sup>* were obtained by injecting both constructs following standard procedures[49]. *EP(3)3145* was obtained from the Szeged *Drosophila* Stock Center in Hungary. The wild type *UAS-dAtx2* (*dAtx2<sup>OE</sup>*) and mutant *dAtx2-X1* lines [30] were kindly provided by Dr. Pallanck, L.J.. The *UAS-SCA1<sup>82Q</sup>*, *UAS-SCA1<sup>30Q</sup>* and *UAS-SCA1<sup>2Q</sup>* lines have been



previously described [6,24]. All other *Drosophila* strains were obtained from the Bloomington *Drosophila* Stock Center at Indiana University.

**Scanning electron microscopy and retinal paraffin sections.** Both techniques were performed following previously published procedures [6,24].

**Scoring of macrochaetae in adult thoraxes.** Flies were raised at either 25°C for low Ataxin-1[82Q] expression levels or 27°C for high Ataxin-1[82Q] expression levels. Flies were collected at day 1 and the number of macrochaetae per thorax of same sex flies was counted for 20 animals per genotype. The percentage of lost macrochaetae over a total of 26 was calculated, and the average per genotype was plotted in the chart.

**Motor performance assay.** Between 25 and 30 adult females per genotype are collected for periods no longer than 24 hours. Flies are transferred to vials containing new food every day. The assay is carried out in an empty vial. The vial is tapped so all flies fall to the bottom then we score flies that climb past a line 5cm high in 18 seconds, and this procedure is repeated ten times for each day shown in the chart. . The average percentage of flies climbing per day is then calculated and plotted in Microsoft Excel. Experiments are always performed at the same time in the day to ensure no circadian rhythm effects. Four replicas ( $25 < n < 30$ ) are analyzed per genotype. Motor performance in each replica is measured until all animals failed to reach the 5 cm line.

**Protein-protein interaction assay.** Gst co-affinity purification assays between GST-ATXN1<sup>82Q</sup>, GST-ATXN1N-term<sup>82Q</sup>, GST-ATXN1C-term or GST-ATXN1-AXH, Myc-hAtaxin-2 and GST-ATXN1<sup>82Q</sup>S776A, were carried out as previously published [51]. pEGFP-C1 vector was used for control and constructs were transfected in HEK293T cells. Immunoblots were carried out following standard procedures and stained with mouse anti-Myc (9E10) and rabbit anti-GST antibodies (Sigma).

**Immunofluorescence staining.** Tissues were dissected and fixed in 4% formaldehyde. Following standard procedures tissues were incubated with rabbit anti-dAtx2 (1:2000, courtesy of Leo J. Pallanck), Lc2628 anti-nuclear Lamin (1:50, Hybridoma Bank), rabbit anti-flag (1:200, Sigma), 11NQ rabbit anti-Ataxin-1 (1:750), 6C1 mouse anti-Ubiquitin (Sigma), guinea pig anti-Sens (1:1000, Hugo Bellen). Secondary antibodies were obtained from Jackson Labs and Molecular Probes. The fluorescent images were documented in a LSM510 Zeiss confocal microscope.

**Quantification of Sens signal.** Sens quantification in the SOP and bristle precursor cells of the wing margins was carried as follows: animals were raised at 25°C. immunofluorescence was done on wing discs of the different genotypes (gp anti-Sens 1:1000, Hugo Bellen). Confocal images were obtained throughout the thickness of the wing margin (20 sections per wing disc with 2µm interval) and then the signal was stacked and summed. Quantification was carried out by selecting the area covered by each wing margin (dorsal or ventral) separately and calculating fluorescence and area. Data corresponding to 20 wing discs per genotype was analyzed by Tukey-Kramer HSD and plotted in a chart.

**Immunohistochemistry on human post-mortem brain tissue.** Materials were stained as previously described [6].

**dAtx2 immunoblotting.** Eye imaginal discs from ten larvae per genotype were dissected in cold PBS, homogenized in 30 µl of Laemmli buffer (Bio-Rad) using a pellet pestle motor (Kontes) and loaded on a 7.5% Tris-HCl Ready Gel (Bio-Rad). Membranes were stained with primary antibodies rabbit anti-dAtx2 (1:5000, L.J. Pallanck) and mouse anti-tubulin (Hybridoma Bank, 1:1000). Horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse or anti-rabbit IgG secondary antibodies (1:5000; Bio-Rad) were used and membranes were developed using ECL Western blot detection kit (Amersham Biosciences).

## Acknowledgements

We thank the Bloomington and Szeged *Drosophila* Stock Centers for fly strains; the Developmental Studies Hybridoma Bank for monoclonal antibodies; B. Antalffy and the MRDDRC cores (HD24062) for sectioning and staining the human material; J. Barrish for help with SEM; R. Atkinson for help with confocal microscopy; Dr. L.J. Pallanck for the wild type *UAS:dAtx2* and the *dAtx2<sup>X1</sup>* mutant *Drosophila* lines and anti-dAtx2 antibody; Dr. H.J. Bellen for anti-Sens antibody; L. Koehler for technical assistance and H. Jafar-Nejad and the members of the Botas laboratory for helpful discussion.

**Funding.** This work was supported by a grant from the NIH to JB (NS42179). HYZ is a Howard Hughes Medical Institute investigator.

**Competing interests.** The authors have declared that no competing interests exist.

## Figure Legends

**Figure 1** dAtx2 levels modulate Ataxin-1[82Q] induced neurodegeneration *in vivo*. (**A-E** and **A'-E'**) Scanning electron microscopy (SEM) eye images and (**F-J**) retinal paraffin sections of eyes from the genotype combinations indicated on the top. Arrows indicate photoreceptor length. Transgenes are expressed from the *gmr-GAL4* eye driver. (**A and F**) Control eyes show regularly arranged ommatidia and evenly distributed interommatidial bristles (**A**). Control retinas have long, straight photoreceptors with no gaps (**F**). (**B and G**) *SCAI*<sup>82Q</sup> eyes have disorganized ommatidia and interommatidial bristles are unevenly distributed or missing (compare **B** and **A**). *SCAI*<sup>82Q</sup> retinas show fewer photoreceptors that are shortened and curved (compare **G** with **F**). (**C and F**) Suppression of external and retinal degeneration in *SCAI*<sup>82Q</sup> flies with decreased dAtx2 levels (*SCAI*<sup>82Q</sup>/*dAtx2*<sup>X1</sup>). Note the regular arrangement of the ommatidia in *SCAI*<sup>82Q</sup>/*dAtx2*<sup>X1</sup> animals when compared to *SCAI*<sup>82Q</sup> eyes with normal levels of dAtx2 (compare **C** with **B**). Note also the improved retinal organization with longer straight photoreceptors (compare **H** with **G**) (**D and I**) Eyes co-expressing Ataxin-1[82Q] and wild type dAtx2 (*SCAI*<sup>82Q</sup>/*dAtx2*<sup>OE</sup>) have more disorganized ommatidia when compared to *SCAI*<sup>82Q</sup> alone. Note the absence of bristles (compare **D** with **B**). In addition, photoreceptors are shorter and more degenerated (compare **I** with **H**). (**E and J**) Eyes overexpressing dAtx2 alone (*dAtx2*<sup>OE</sup>) show mild ommatidial disorganization, with few missing bristles (compare **E** with **A**). Internally, photoreceptor cells are shortened (compare **J** with **F**). **A-E** flies were raised at 27°C and **F-J** at 25°C. (**K**) Semiquantitative RT-PCR revealing the levels of *SCAI*<sup>82Q</sup> messenger RNA in flies with different levels of dAtx2. (**L**) Western blot analysis revealing the levels of Ataxin-1[82Q] protein in flies with different levels of dAtx2. (**M**) Motor performance quantification of flies expressing Ataxin-1[82Q] from the CNS driver *nrv2-GAL4* and with either normal dAtx2 levels or heterozygous for a loss of function mutation in *dAtx2* (*dAtx2*<sup>X1</sup>). Control flies expressing just GFP perform well in the motor assay for 36 days (*nrv2*>*GFP*,

triangles). Flies expressing Ataxin-1[82Q] in the CNS show a progressive impairment in their motor performance when compared with controls ( $nrv2 > SCA1^{82Q}$ , circles). All  $nrv2 > SCA1^{82Q}$  flies stop climbing after 26 days. Flies expressing Ataxin-1[82Q] in the CNS but with decreased dAtx2 levels show improved motor performance ( $nrv2 > SCA1^{82Q}/dAtx2^{X1}$ , squares). Error bars represent standard deviation. Flies were raised at 27°C. Genotypes: **(A-J)**: Control:  $yw/+; gmr-GAL4/UAS-LacZ$ . SCA1<sup>82Q</sup>:  $UAS-SCA1^{82Q} [F7]/yw; gmr-GAL4/+$ . SCA1<sup>82Q</sup>/dAtx2<sup>X1</sup>:  $SCA1^{82Q} [F7]/yw; gmr-GAL4/+; dAtx2^{X1}/+$ . SCA1<sup>82Q</sup>/dAtx2<sup>OE</sup>:  $UAS-SCA1^{82Q} [F7]/yw; gmr-GAL4/UAS-dAtx2 [4]$ . dAtx2<sup>OE</sup>:  $gmr-GAL4/UAS-dAtx2 [4]$ . **(A-E)** SEM scale bar=100µm. **(A'-E')** are 30µm X 30µm. **(F-J)** scale bar=10µm. **(K)**: nrv2>GFP:  $+$ ;  $nrv2-GAL4/UAS-eGFP$ . nrv2>SCA1<sup>82Q</sup>:  $+$ ;  $nrv2-GAL4/+; UAS-SCA1^{82Q} [M6]/+$ . nrv2>SCA1<sup>82Q</sup>/dAtx2<sup>X1</sup>:  $+$ ;  $nrv2-GAL4/+; UAS-SCA1^{82Q} [M6]/dAtx2^{X1}$ .

**Figure 2** DAtx2 levels modulate Ataxin-1[82Q] induced loss of mechanoreceptors. **(A)** Percentage of lost thoracic macrochaetae (large mechanoreceptor bristles) over a total of 26, in flies with the indicated genotypes raised at 25°C. **Columns-1 and 2**, no macrochaetae loss is detected in control flies or flies over-expressing dAtx2 ( $dAtx2^{OE}$ ) in the thoracic sensory organ precursor (SOP) cells respectively with the *scabrous-GAL4* driver. **Column-3**, mild decrease in thoracic macrochaetae number caused by expression of Ataxin-1[82Q] at low levels in the SOP cells ( $p < 0.0001$ ). **Column-4**, ~80% decrease in the number of thoracic macrochaetae in animals co-expressing Ataxin-1[82Q] and dAtx2 ( $SCA1^{82Q}/dAtx2^{OE}$ ) in the SOPs ( $p < 0.0001$ ). Error bars=s.e.m. **(B-E)** Close-ups of the macrochaetae present in the posterior *notum* and *scutellum* (white rectangle in **B**) of flies with same genotypes as **(A)**. **(B)** Control thoraxes have eight macrochaetae in the selected area (white rectangle). **(C-E)** Over-expression of dAtx2 enhances Ataxin-1[82Q] induced macrochaetae loss. Black arrows indicate missing bristles and white arrow in **E** points to the only bristle present in the *scutellum* of an  $SCA1^{82Q}/dAtx2^{OE}$  animal. Flies grown at 25°C. **(F)** Anti-Sens immunofluorescence

revealing the normal pattern of Sens distribution in the wing disc. White rectangle highlights the wing margin SOP and bristle precursor cells. **(G-J)** Close up of the wing margin region from control animals **(G)**, animals expressing Ataxin-1[82Q] alone **(H)**, wild type dAtx2 **(I)** or coexpressing Ataxin-1[82Q] and dAtx2 **(J)**. **(K)** Quantification of anti-Sens signal in the wing margin of animals of the genotypes indicated on the bottom. 20 wing discs were used per genotype and experiments carried out at 25°C (see materials and methods for more details). Bars=Std. Dev. **(L)** Percentage of lost macrochaetae in flies expressing Ataxin-1[82Q] with normal or decreased levels of dAtx2, grown at 27°C to boost expression levels of the *GAL4/UAS* system. **Column-1**, control animals do not show macrochaetae loss. **Column-2**, ~20% of thoracic macrochaetae are lost after expression of Ataxin-1[82Q] at high levels in the SOP cells ( $p < 0.0001$ ). **Column-3**, partial rescue of Ataxin-1[82Q]-induced macrochaetae loss in animals heterozygous for the *dAtx2<sup>X1</sup>* mutant ( $p < 0.005$ ). Bars= s.e.m. **(M-N)** Close-ups of the macrochaetae present in the posterior *notum* and *scutelum* (white rectangle in **B**) of flies with same genotypes as **L**. **(M-N)** Suppression of Ataxin-1[82Q] induced macrochaetae loss by decreasing the levels of dAtx2. Arrows indicate missing bristles. Flies grown at 27°C. Genotypes: control: +; *sca<sup>109-68</sup>-GAL4/UAS-GFP*; +. dAtx2<sup>OE</sup>: +; *sca<sup>109-68</sup>-GAL4/ UAS- dAtx2 [4]*; +. SCA1<sup>82Q</sup>: *UAS- SCA1<sup>82Q</sup> [F7]*/+; *sca<sup>109-68</sup>-GAL4/+*; +. SCA1<sup>82Q</sup>/dAtx2<sup>OE</sup>: *UAS- SCA1<sup>82Q</sup> [F7]*/+; *sca<sup>109-68</sup>-GAL4/ UAS- dAtx2 [4]*; +. SCA1<sup>82Q</sup>/dAtx2<sup>X1</sup>: *UAS-SCA1<sup>82Q</sup> [F7]*/+; *sca<sup>109-68</sup>-GAL4/+*; *dAtx2<sup>X1</sup>/+*.

**Figure 3** The Ataxin-1[82Q] and Ataxin-2 human proteins physically interact. **(A)** GST Co-AP pull-down experiments between Myc-hAtaxin-2 and GST-constructs carrying full-length human expanded Ataxin-1 (GST-ATXN1<sup>82Q</sup>) or different domains of the Ataxin-1 protein. **Lane-1**, GST alone does not pull down Myc-hAtaxin2. **Lane-2**, GST-ATXN1<sup>82Q</sup> pulls down Myc-hAtaxin2. **Lane-3** expanded N-terminal Ataxin-1 (GST-ATXN1N-term<sup>82Q</sup>) lacking the AXH domain (aa# 1-575) also pulls down Myc-hAtaxin-2 with high affinity. **Lanes-4** and **5** show that both the C-terminus portion of Ataxin-1

containing the AXH domain (aa# 529-816; **lane-4**) or the AXH domain alone (aa# 558-700; **lane-5**) pull down Myc-hAtaxin2. These interactions are weaker than that of the N-terminus part (compare **lanes 4** and **5** with lane **3**). Cell lysates for co-AP were ran through Glutathione conjugated beads, and blots stained with anti-GST or anti-Myc. Immunoblots for Myc-hAtaxin2 and GFP carried out on cell lysates before the co-AP pull-down reveal similar levels of both proteins between samples. **(B)** GST Co-AP pull-down experiments between Myc-hAtaxin-2 and GST-ATXN1<sup>82Q</sup> or GST-ATXN1<sup>82Q</sup>S776A. **Lane-6**, GST control. **Lane-7**, GST-ATXN1<sup>82Q</sup> pulls down Myc-hAtaxin2. **Lane-8**, similar amount of GST-ATXN1<sup>82Q</sup>S776A to the GST-ATXN1<sup>82Q</sup> on lane-7 pulls down less Myc-hAtaxin-2, indicating a weaker interaction of GST-ATXN1<sup>82Q</sup>S776A with Myc-hAtaxin-2.

**Figure 4** Expanded Ataxin-1 induces nuclear accumulation of Ataxin-2 in *Drosophila* and human neurons. **(A-C)** Longitudinal paraffin Sections through adult fly retinas stained simultaneously with anti-dAtx2 antiserum (green). Nuclei are visualized with anti-Lamin (white). Controls expressing only *gmr-GAL4* driver (**A**) or *gmr-GAL4* driver plus UAS-*dAtx2* (**C**) show no detectable nuclear dAtx2 staining; arrowhead in (**C**) points to cytoplasmic accumulation of dAtx2. **(B)** dAtx2 localizes to the nucleus and accumulates in NIs (arrows) in retinal cells of *SCA1*<sup>82Q</sup> animals. Also notice additional diffuse dAtx2 signal in the nuclei. **(D)** Pattern of *ok107-GAL4* in the VNC, showing the area we analyzed (white square). **(E- E'')** Confocal images of control *Drosophila* neurons in the larval ventral ganglion, expressing CD8:GFP from the *ok107-GAL4* neuronal driver and stained with anti-dAtx2 antibody. **(E)** Notice that no nuclear dAtx2 staining (red) is detected in the neuronal nucleus. Nuclear Lamin is shown in white. **(E')** Same neurons as **E** showing CD8:GFP to reveal the neuronal cytoplasm. Images are merged in **E''**. **(F-F'')** Confocal images of *ok107-GAL4* neurons expressing Ataxin-1[82Q] (*SCA1*<sup>82Q</sup>) stained in parallel to **E-E''**. **(F)** Shows dAtx2 signal (red) inside the nucleus (white) in the form of NIs (arrows), in addition to the cytoplasmic dAtx2 signal.

**(F')** Shows the same neurons visualized with CD8:GFP showing neuronal cytoplasm (green). Images are merged in **F''**. **(G-G'')** Triple immunofluorescence for Ubiquitin (blue), dAtx2 (red) and CD8:GFP (green) in *ok107-GAL4* neurons expressing Ataxin-1[82Q]. Notice the overlapping of the dAtx2 (**G**) and Ubiquitin (**G'**) signals in the merged image in **G''** (arrows point to nuclear inclusions). **(H and I)** Human pontine neurons stained with anti human Ataxin-2 antibody (brown). Hematoxylin (blue) was used for counterstaining. **(H)** No staining is detected in neuronal nuclei of non SCA1 postmortem tissue. **(I)** Ataxin-2 accumulates in NI (arrowhead) in a SCA1 neuron. Genotypes: **(A)** *gmr-GAL4/+*. **(B)** *UAS-SCA1<sup>82Q</sup>[F7]/+; gmr-GAL4/+*. **(C)** *gmr-GAL4/UAS-dAtx2[4]*. **(D, E-E'')** *UAS-CD8:GFP/+; +; ok107-GAL4/+*. **(F-F'' and G-G'')** *UAS-CD8:GFP/+; UAS-SCA1<sup>82Q</sup>[M6]/+; ok107-GAL4/+*.

**Figure 5** Pathogenic Ataxin-1[82Q], but not unexpanded Ataxin-1, induces nuclear accumulation of dAtx2 *in vivo*. **(A-D)** Anti-dAtx2 immunofluorescence (red) in ventral ganglion neurons expressing different Ataxin-1 constructs and CD8-GFP (green) with the *ok107-GAL4* driver. Nuclear Lamin (white) is also shown. **(A)** Control neurons show no nuclear dAtx2. **(B)** Neurons expressing Ataxin-1 with only 2Q (*SCA1<sup>2Q</sup>*) also present no nuclear dAtx2. **(C)** Neurons expressing wild type human Ataxin-1 with 30Q (*SCA1<sup>30Q</sup>*) fail to show nuclear dAtx2 as well. **(D)** Neurons expressing expanded Ataxin-1[82Q] (*SCA1<sup>82Q</sup>*) present nuclear dAtx2. Genotypes: **(A)** *UAS-CD8:GFP/+; +; ok107-GAL4/+*. **(B)** *UAS-CD8:GFP/+; UAS-SCA1<sup>2Q</sup>[F14]/+; ok107-GAL4/+* **(C)** *UAS-SCA1<sup>30Q</sup>[F1]/yw; UAS-CD8:GFP/+; ok107-GAL4/+*. **(D)** *UAS-CD8:GFP/+; UAS-SCA1<sup>82Q</sup>[M6]/+; ok107-GAL4/+*.

**Figure 6** Nuclear accumulation of dAtx2 increases its toxicity *in vivo*. **(A-C)** Immunofluorescence staining to reveal the localization of dAtx2 in neurons overexpressing CD8:GFP together with wild type dAtx2 (dAtx2<sup>OE</sup>) or dAtx2 with a nuclear export or a nuclear localization signal (dAtx2<sup>NES</sup> or dAtx2<sup>NLS</sup>, respectively). **(A)**



**and A')** dAtx2 localizes to the cytoplasm even when overexpressed. **(B and B')** dAtx2<sup>NES</sup> distribution is similar to that of wild-type dAtx2. **(C)** nuclear localization of dAtx2<sup>NLS</sup> indicating that the NLS is working. **(D)** Anti-dAtx2 immunoblot revealing similar levels of expression of the different dAtx2 constructs used in our work. Constructs were driven by *gmr-GAL4*. Larval eye imaginal discs (ten per genotype) were used to avoid any artifact that might be caused by cell degeneration. dTubulin was blotted for loading control and larvae cultured at 25°C. Relative protein expression levels are indicated below normalized to the wild-type dAtx2 overexpressing line (dAtx2<sup>OE</sup>, underlined) **(E-H)** SEM images showing the eye phenotypes caused by the different dAtx2 constructs at 25°C. Constructs were expressed with *gmr-GAL4*. **(E)** Control eyes show no phenotype. **(F)** Wild-type dAtx2 (*dAtx2<sup>OE</sup>*) over-expression in the eye causes a mild phenotype with some ommatidial disorganization and little bristle loss. **(G)** Expression of dAtx2<sup>NES</sup> causes a similar phenotype to that induced by wild-type dAtx2. **(H)** Expression of dAtx2<sup>NLS</sup> at similar levels as wild-type dAtx2 causes severe eye degeneration, the structure of the ommatidia is lost and interommatidial bristles are absent. In addition there is a strong decrease in eye size. Genotypes: **(A, A')** *UAS-CD8-GFP/UAS-dAtx2[4]; ok107-GAL4/+*. **(B-B')** *UAS-CD8-GFP/+; UAS-dAtx2<sup>NES</sup>/+; ok107-GAL4/+*. **(C)** *UAS-CD8-GFP/UAS-dAtx2<sup>NLS</sup>; ok107-GAL4/+*. **(D-H)** Control: *gmr-GAL4/UAS-GFP*. dAtx2<sup>OE</sup>: *gmr-GAL4/UAS-dAtx2[4]*. dAtx2<sup>NLS</sup>: *gmr-GAL4/UAS-dAtx2<sup>NLS</sup>*. dAtx2<sup>NES</sup>: *gmr-GAL4/+; UAS-dAtx2<sup>NES</sup>/+*.

**Figure 7** Nuclear dAtx2 induces decreased levels of Senseless (Sens) and loss of mechanoreceptors. **(A-D')** immunofluorescence staining revealing Sens endogenous pattern in the wing margin SOPs on animals of genotypes indicated on top. **(A and A')** Distribution of Sens in wing discs expressing a neutral NLS-DsRed protein (RedStinger) in the *dpp* territory (red in **A')**. Sens is detected as two parallel rows of cells (SOPs of the dorsal and ventral wing margins) uninterrupted in the area where they cross the *dpp* territory (arrowhead). **(B and B')** Ataxin-1[82Q] suppresses Sens in the

wing discs in a cell autonomous manner. Notice the gap in Sens signal when it crosses the *dpp* territory (arrowhead) expressing expanded Ataxin-1[82Q] (red in **B'**). (**C and C'**) Expressing dAtx2<sup>NES</sup> (red in **C'**) in the *dpp* territory does not affect Sens levels (arrowhead). (**D and D'**) Expression of dAtx2<sup>NLS</sup> (red in **D'**) in the *dpp* territory reduces Sens levels in the SOPs, note the gap in Sens pattern (arrowhead). (**E-P**) Immunofluorescence staining revealing the levels of Sens (red, anti-Sens) and the dAtx2<sup>NES</sup> or dAtx2<sup>NLS</sup> proteins (green, anti-Flag), in salivary glands of the indicated genotypes. Nuclei are visualized using anti-Lamin (blue). (**E-H**) Control salivary gland cells showing robust Sens signal. Asterisks in **G** indicate the position of the nuclei. (**I-L**) dAtx2<sup>NES</sup>-expressing salivary gland cells have normal Sens levels when compared to controls. (**M-P**) Expression of dAtx2<sup>NLS</sup> in salivary gland cells causes a decrease of Sens protein. Sens signal (red) is dramatically decreased in dAtx2<sup>NLS</sup> expressing cells (compare **N** with **F** and **J**). Asterisks in **N** indicate the position of the nuclei. (**Q-S**) Effect of dAtx2<sup>NES</sup> or dAtx2<sup>NLS</sup> on adult thoracic macrochaetae formation after SOP specific expression. (**Q**) SOP specific expression of dAtx2<sup>NES</sup> causes no macrochaetae loss. (**R**) Expression of dAtx2<sup>NLS</sup> in the SOP cells causes significant macrochaetae loss in the same conditions as **Q**. Arrows point out missing macrochaetae. (**S**) Quantification of the percentage of lost macrochaetae in adult thoraxes of the same genotypes as **Q** and **R**. **Column-1** shows no decrease in the number of macrochaetae per thorax in flies expressing dAtx2<sup>NES</sup>. **Column-2** reveals increased loss of macrochaetae following SOP specific expression of Atx2<sup>NLS</sup> (p<0.0001). 20 animals were used per genotype; data was analyzed using Students t; error bars represent s.e.m. Experiments in **Q-S** were carried out at 25°C. Genotypes: (**A, A'**) *dpp-GAL4/ UAS-RedStinger*. (**B, B'**) *UAS-SCA1<sup>82Q</sup>[F7]/+; +; dpp-GAL4/+*. (**C, C', I-L**) *dpp-GAL4/UAS-dAtx2<sup>NES</sup>*. (**D, D', M-P**) *UAS-dAtx2<sup>NLS</sup> /+; dpp-GAL4/+* (**E-H**) *dpp-GAL4/+*. (**Q-S**) dAtx2<sup>NES</sup>: *sca<sup>109-68</sup>-GAL4/+*; *UAS-dAtx2<sup>NES</sup> /+*. dAtx2<sup>NLS</sup>: *sca<sup>109-68</sup>-GAL4/ UAS-dAtx2<sup>NLS</sup>*.

**Supplementary Figure 1.** As shown in **Figure 1M** decreased levels of dAtx2 suppress Ataxin-1[82Q] induced impairments in motor performance, here we show additional replicas carried out in identical conditions to **Figure 1M** that demonstrate the consistency of the result. Flies expressing Ataxin-1[82Q] with normal levels of dAtx2 ( $nrv2>SCA1^{82Q}(1)$  and  $nrv2>SCA1^{82Q}(2)$ ) display severe motor performance impairment with time (blue lines with circles). Decreasing the levels of dAtx2 with the allele  $dAtx2^{X1}$  improves the performance of Ataxin-1[82Q] expressing flies ( $nrv2>SCA1^{82Q}/dAtx2^{X1}(1)$  and  $nrv2>SCA1^{82Q}/dAtx2^{X1}(1)$ ). Notice that  $SCA1^{82Q}/dAtx2^{X1}$  animals are able to climb past day 30 while the  $SCA1^{82Q}$  have stopped around day 25 (repeated measures anova between genotypes  $p<0.0001$ ). The  $dAtx2^{X1}$  allele on its own ( $nrv2>GFP/dAtx2^{X1}$ , green line with rhomboids) does not show a significant difference when compared to controls (black line with triangles).

## References

1. Taroni F, DiDonato S (2004) Pathways to motor incoordination: the inherited ataxias. *Nat Rev Neurosci* 5: 641-655.
2. Koeppen AH (2005) The pathogenesis of spinocerebellar ataxia. *Cerebellum* 4: 62-73.
3. Lim J, Hao T, Shaw C, Patel AJ, Szabo G, et al. (2006) A protein-protein interaction network for human inherited ataxias and disorders of Purkinje cell degeneration. *Cell* 125: 801-814.
4. Orr HT, Zoghbi HY (2001) SCA1 molecular genetics: a history of a 13 year collaboration against glutamines. *Hum Mol Genet* 10: 2307-2311.
5. Okazawa H, Rich T, Chang A, Lin X, Waragai M, et al. (2002) Interaction between mutant ataxin-1 and PQBP-1 affects transcription and cell death. *Neuron* 34: 701-713.
6. Al-Ramahi I, Lam YC, Chen HK, de Gouyon B, Zhang M, et al. (2006) CHIP protects from the neurotoxicity of expanded and wild-type ataxin-1 and promotes their ubiquitination and degradation. *J Biol Chem* 281: 26714-26724.
7. Cummings CJ, Mancini MA, Antalfy B, DeFranco DB, Orr HT, et al. (1998) Chaperone suppression of aggregation and altered subcellular proteasome localization imply protein misfolding in SCA1. *Nat Genet* 19: 148-154.
8. Tsai CC, Kao HY, Mitzutani A, Banayo E, Rajan H, et al. (2004) Ataxin 1, a SCA1 neurodegenerative disorder protein, is functionally linked to the silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 4047-4052.
9. Uchihara T, Fujigasaki H, Koyano S, Nakamura A, Yagishita S, et al. (2001) Non-expanded polyglutamine proteins in intranuclear inclusions of hereditary ataxias-triple-labeling immunofluorescence study. *Acta Neuropathol (Berl)* 102: 149-152.
10. Warrick JM, Morabito LM, Bilen J, Gordesky-Gold B, Faust LZ, et al. (2005) Ataxin-3 suppresses polyglutamine neurodegeneration in *Drosophila* by a ubiquitin-associated mechanism. *Mol Cell* 18: 37-48.
11. Zoghbi HY, Orr HT (2000) Glutamine repeats and neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci* 23: 217-247.
12. Riley BE, Orr HT (2006) Polyglutamine neurodegenerative diseases and regulation of transcription: assembling the puzzle. *Genes Dev* 20: 2183-2192.
13. Duenas AM, Gould R, Giunti P (2006) Molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxias. *Brain* 129: 1357-1370.
14. Gatchel JR, Zoghbi HY (2005) Diseases of unstable repeat expansion: mechanisms and common principles. *Nat Rev Genet* 6: 743-755.
15. Klement IA, Skinner PJ, Kaytor MD, Yi H, Hersch SM, et al. (1998) Ataxin-1 nuclear localization and aggregation: role in polyglutamine-induced disease in SCA1 transgenic mice. *Cell* 95: 41-53.
16. Emamian ES, Kaytor MD, Duvick LA, Zu T, Tousey SK, et al. (2003) Serine 776 of ataxin-1 is critical for polyglutamine-induced disease in SCA1 transgenic mice. *Neuron* 38: 375-387.

17. Tsuda H, Jafar-Nejad H, Patel AJ, Sun Y, Chen HK, et al. (2005) The AXH domain of Ataxin-1 mediates neurodegeneration through its interaction with Gfi-1/Senseless proteins. *Cell* 122: 633-644.
18. Mizutani A, Wang L, Rajan H, Vig PJ, Alaynick WA, et al. (2005) Boat, an AXH domain protein, suppresses the cytotoxicity of mutant ataxin-1. *Embo J* 24: 3339-3351.
19. Nolo R, Abbott LA, Bellen HJ (2000) Senseless, a Zn finger transcription factor, is necessary and sufficient for sensory organ development in *Drosophila*. *Cell* 102: 349-362.
20. Li SH, Li XJ (2004) Huntingtin-protein interactions and the pathogenesis of Huntington's disease. *Trends Genet* 20: 146-154.
21. Bilen J, Bonini NM (2005) *Drosophila* as a model for human neurodegenerative disease. *Annu Rev Genet* 39: 153-171.
22. Zoghbi HY, Botas J (2002) Mouse and fly models of neurodegeneration. *Trends Genet* 18: 463-471.
23. Marsh JL, Thompson LM (2006) *Drosophila* in the study of neurodegenerative disease. *Neuron* 52: 169-178.
24. Fernandez-Funez P, Nino-Rosales ML, de Gouyon B, She WC, Luchak JM, et al. (2000) Identification of genes that modify ataxin-1-induced neurodegeneration. *Nature* 408: 101-106.
25. Nonhoff U, Ralser M, Welzel F, Piccini I, Balzereit D, et al. (2007) Ataxin-2 interacts with the DEAD/H-box RNA helicase DDX6 and interferes with P-bodies and stress granules. *Mol Biol Cell* 18: 1385-1396.
26. Dunn CD, Jensen RE (2003) Suppression of a defect in mitochondrial protein import identifies cytosolic proteins required for viability of yeast cells lacking mitochondrial DNA. *Genetics* 165: 35-45.
27. Mangus DA, Amrani N, Jacobson A (1998) Pbp1p, a factor interacting with *Saccharomyces cerevisiae* poly(A)-binding protein, regulates polyadenylation. *Mol Cell Biol* 18: 7383-7396.
28. Ciosk R, DePalma M, Priess JR (2004) ATX-2, the *C. elegans* ortholog of ataxin 2, functions in translational regulation in the germline. *Development* 131: 4831-4841.
29. Satterfield TF, Pallanck LJ (2006) Ataxin-2 and its *Drosophila* homolog, ATX2, physically assemble with polyribosomes. *Hum Mol Genet* 15: 2523-2532.
30. Satterfield TF, Jackson SM, Pallanck LJ (2002) A *Drosophila* homolog of the polyglutamine disease gene SCA2 is a dosage-sensitive regulator of actin filament formation. *Genetics* 162: 1687-1702.
31. Pulst SM, Nechiporuk A, Nechiporuk T, Gispert S, Chen XN, et al. (1996) Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2. *Nat Genet* 14: 269-276.
32. Sanpei K, Takano H, Igarashi S, Sato T, Oyake M, et al. (1996) Identification of the spinocerebellar ataxia type 2 gene using a direct identification of repeat expansion and cloning technique, DIRECT. *Nat Genet* 14: 277-284.
33. Imbert G, Saudou F, Yvert G, Devys D, Trottier Y, et al. (1996) Cloning of the gene for spinocerebellar ataxia 2 reveals a locus with high sensitivity to expanded CAG/glutamine repeats. *Nat Genet* 14: 285-291.
34. Rorth P, Szabo K, Bailey A, Lavery T, Rehm J, et al. (1998) Systematic gain-of-function genetics in *Drosophila*. *Development* 125: 1049-1057.

35. Ghosh S, Feany MB (2004) Comparison of pathways controlling toxicity in the eye and brain in *Drosophila* models of human neurodegenerative diseases. *Hum Mol Genet* 13: 2011-2018.
36. Shulman JM, Feany MB (2003) Genetic modifiers of tauopathy in *Drosophila*. *Genetics* 165: 1233-1242.
37. Ganetzky B, Flanagan JR (1978) On the relationship between senescence and age-related changes in two wild-type strains of *Drosophila melanogaster*. *Exp Gerontol* 13: 189-196.
38. Feany MB, Bender WW (2000) A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature* 404: 394-398.
39. Iijima K, Liu HP, Chiang AS, Hearn SA, Konsolaki M, et al. (2004) Dissecting the pathological effects of human A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 in *Drosophila*: a potential model for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 6623-6628.
40. Huynh DP, Figueroa K, Hoang N, Pulst SM (2000) Nuclear localization or inclusion body formation of ataxin-2 are not necessary for SCA2 pathogenesis in mouse or human. *Nat Genet* 26: 44-50.
41. Huynh DP, Yang HT, Vakharia H, Nguyen D, Pulst SM (2003) Expansion of the polyQ repeat in ataxin-2 alters its Golgi localization, disrupts the Golgi complex and causes cell death. *Hum Mol Genet* 12: 1485-1496.
42. Kiehl TR, Nechiporuk A, Figueroa KP, Keating MT, Huynh DP, et al. (2006) Generation and characterization of Sca2 (ataxin-2) knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 339: 17-24.
43. Koyano S, Uchihara T, Fujigasaki H, Nakamura A, Yagishita S, et al. (1999) Neuronal intranuclear inclusions in spinocerebellar ataxia type 2: triple-labeling immunofluorescent study. *Neurosci Lett* 273: 117-120.
44. Pang JT, Giunti P, Chamberlain S, An SF, Vitaliani R, et al. (2002) Neuronal intranuclear inclusions in SCA2: a genetic, morphological and immunohistochemical study of two cases. *Brain* 125: 656-663.
45. Armstrong J, Bonaventura I, Rojo A, Gonzalez G, Corral J, et al. (2005) Spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2) with white matter involvement. *Neurosci Lett* 381: 247-251.
46. Li SH, Li XJ (2004) Huntingtin and its role in neuronal degeneration. *Neuroscientist* 10: 467-475.
47. Hackam AS, Hodgson JG, Singaraja R, Zhang T, Gan L, et al. (1999) Evidence for both the nucleus and cytoplasm as subcellular sites of pathogenesis in Huntington's disease in cell culture and in transgenic mice expressing mutant huntingtin. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354: 1047-1055.
48. Gunawardena S, Her LS, Bruschi RG, Laymon RA, Niesman IR, et al. (2003) Disruption of axonal transport by loss of huntingtin or expression of pathogenic polyQ proteins in *Drosophila*. *Neuron* 40: 25-40.
49. Brand AH, Perrimon N (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118: 401-415.
50. Weihe U, Milan M, Cohen SM (2001) Regulation of Apterous activity in *Drosophila* wing development. *Development* 128: 4615-4622.
51. Rual JF, Venkatesan K, Hao T, Hirozane-Kishikawa T, Dricot A, et al. (2005) Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature* 437: 1173-1178.

Figure-1

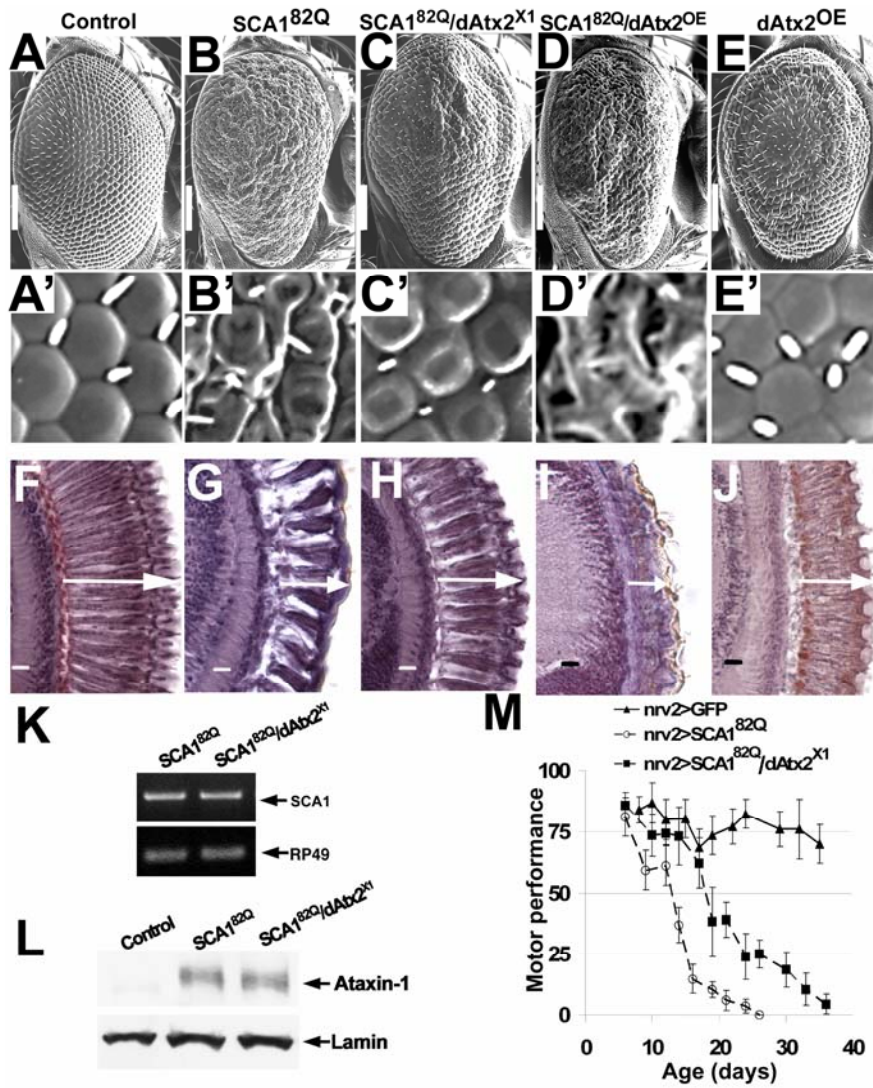


Figure-2

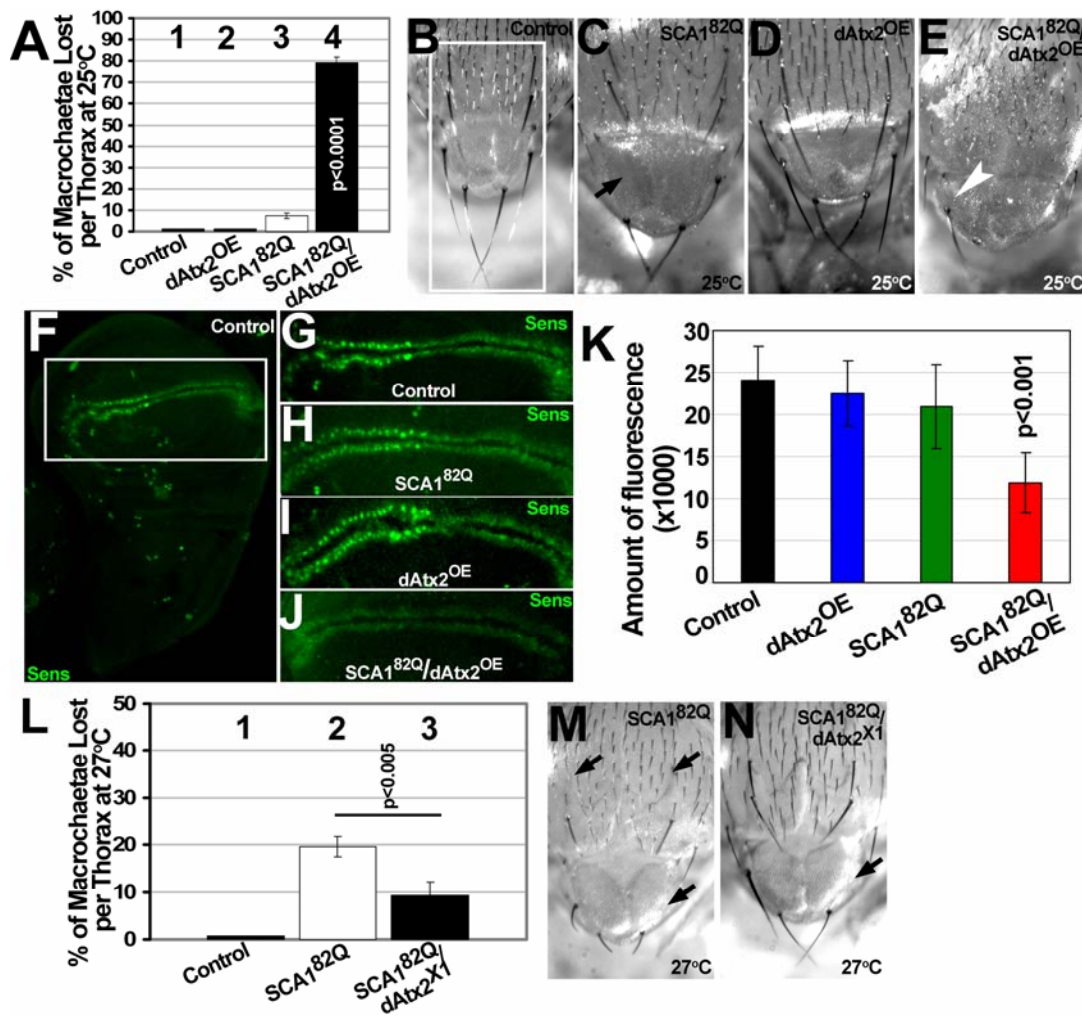




Figure-3

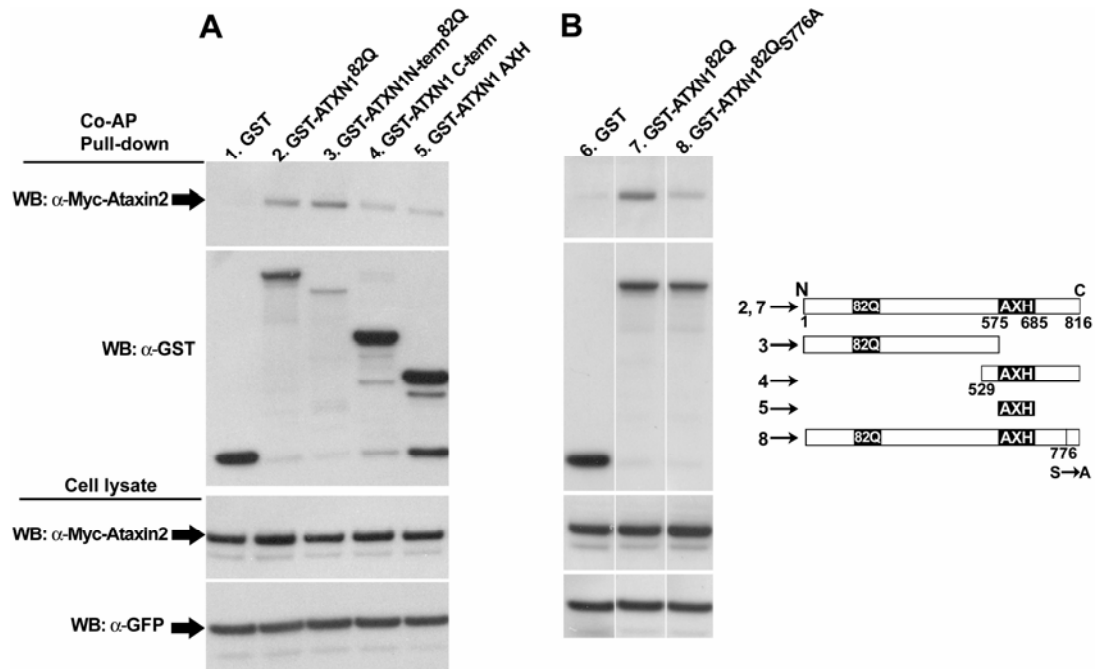


Figure-4

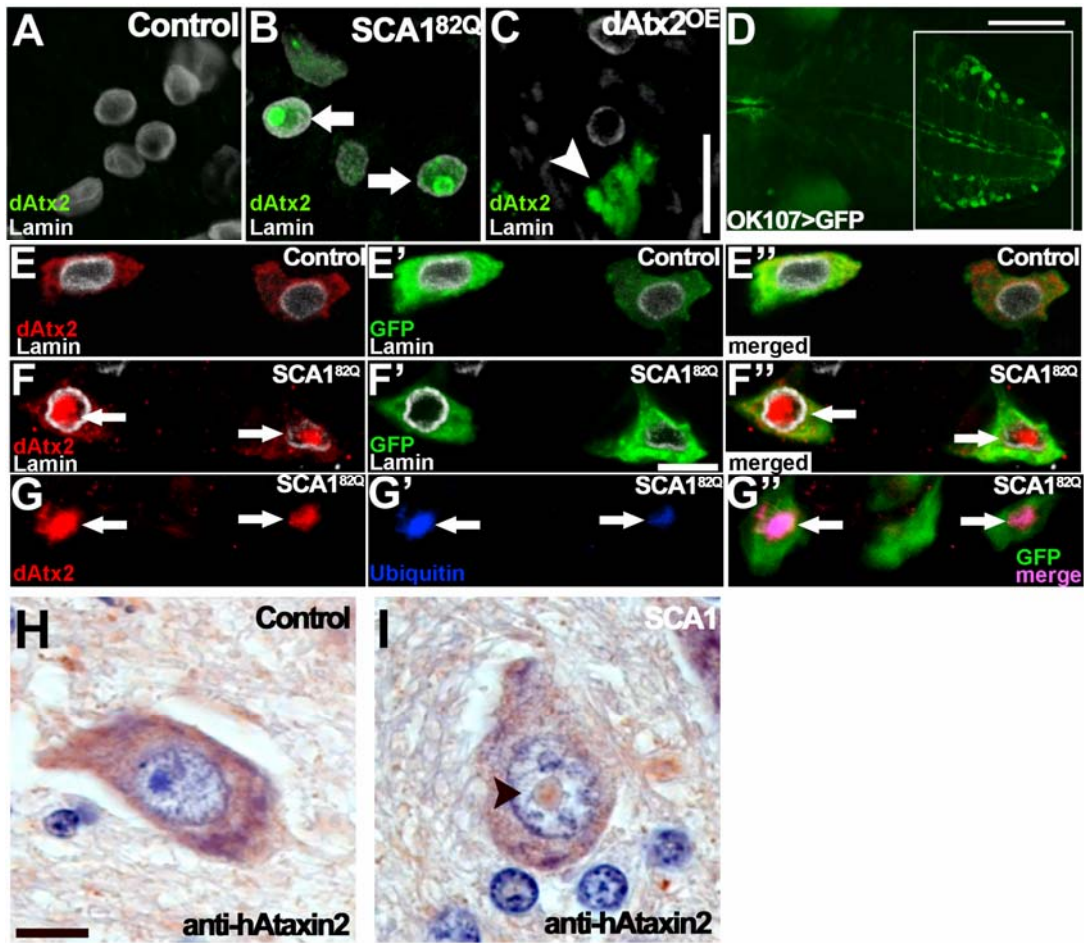


Figure-5

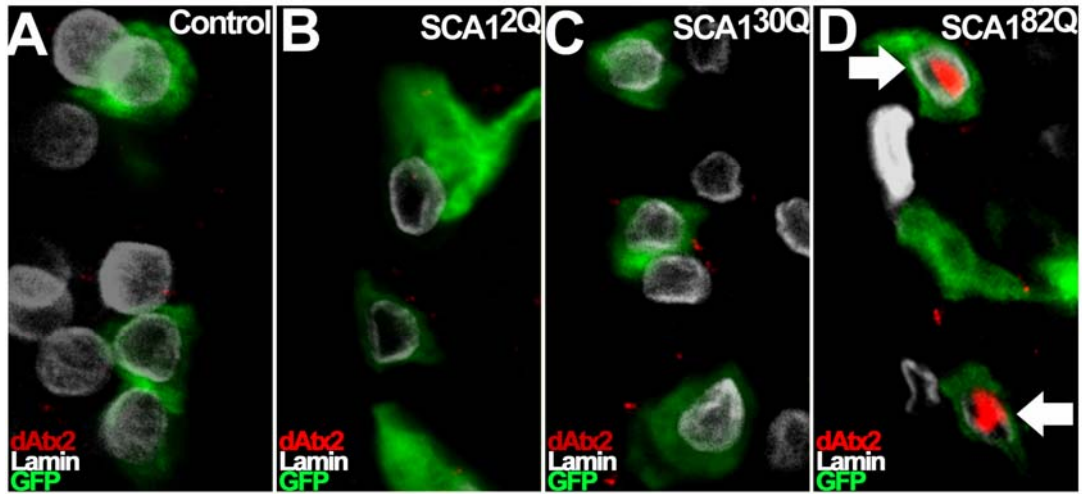


Figure-6

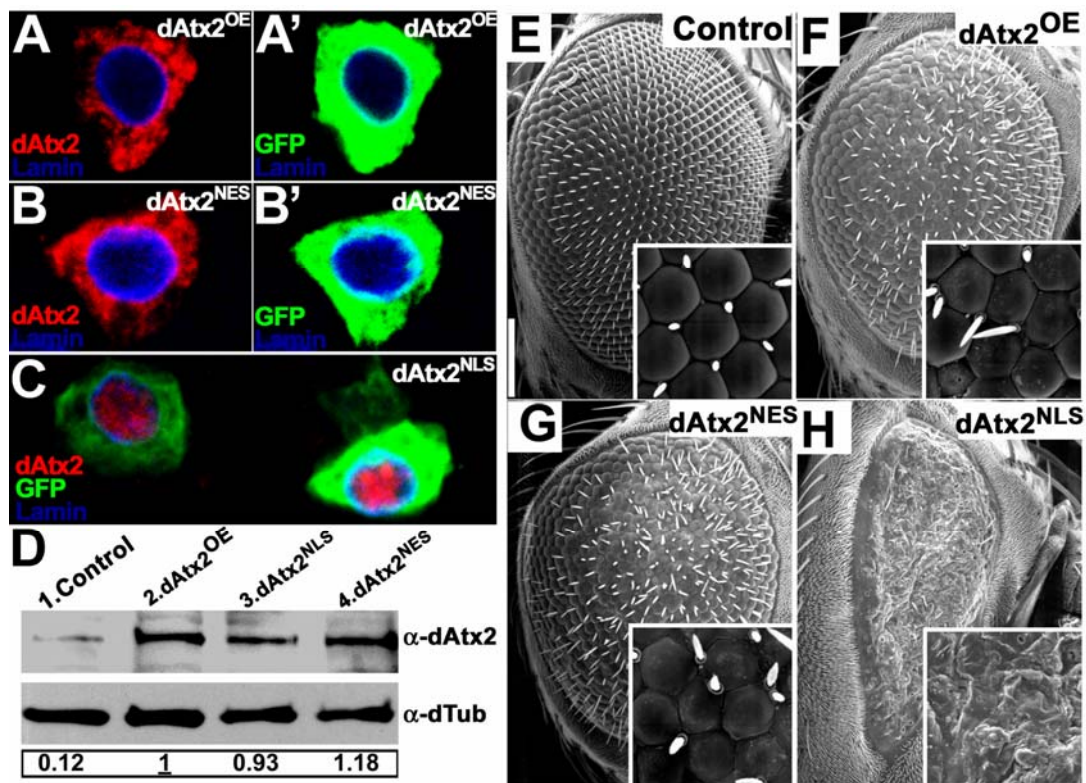
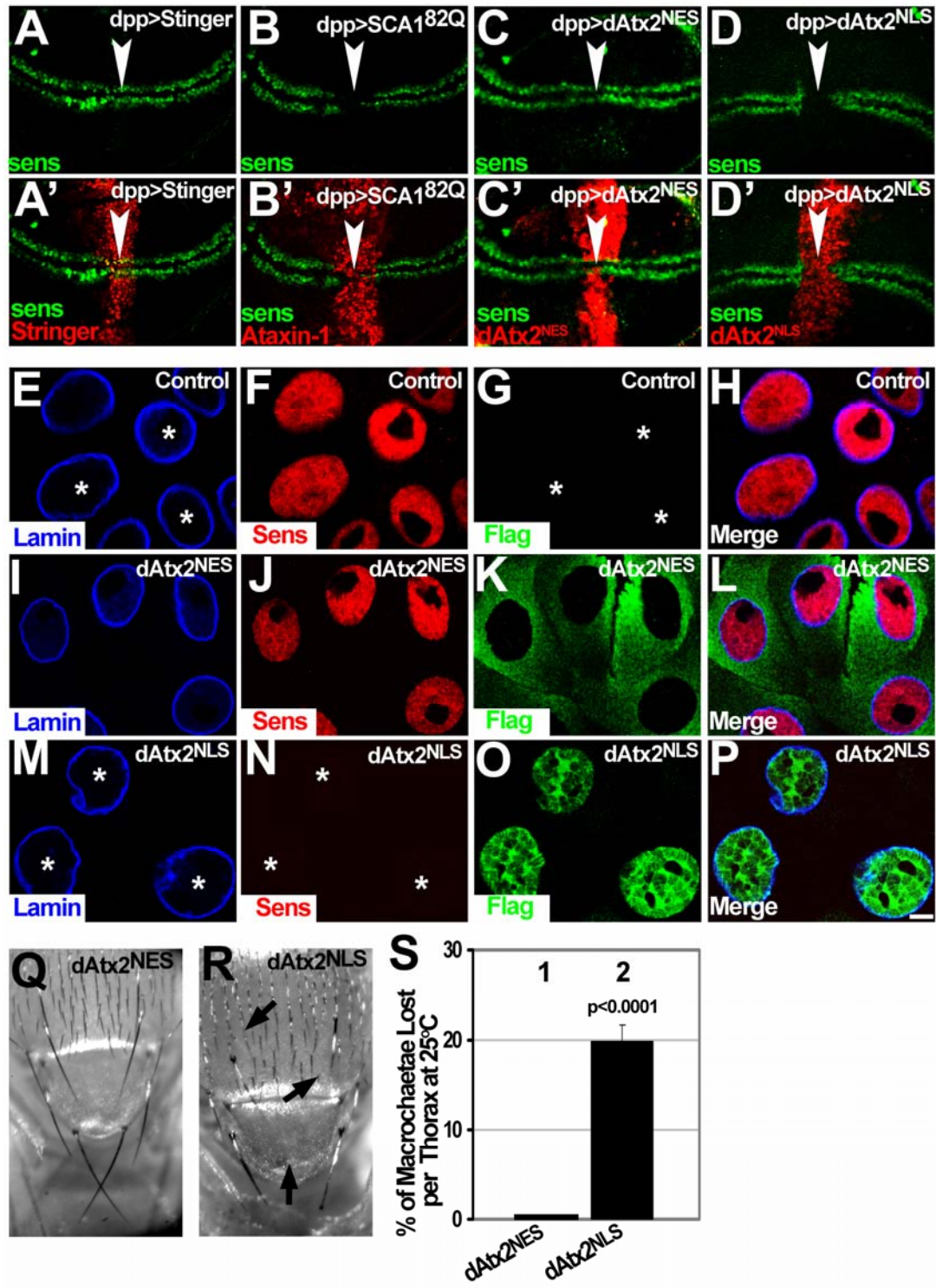


Figure-7



**Supplementary Figure-1**