



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)
FACULTAD DE PSICOLOGÍA

**ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE PROCESOS MOLECULARES INVOLUCRADOS
EN LA PARÁLISIS SUPRANUCLEAR PROGRESIVA Y SU REPLICACIÓN EN UN
MODELO CELULAR**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
JOSUÉ JARED RAFAEL RIVERA OSORIO

TUTOR PRINCIPAL
DRA. MARÍA DEL CARMEN CÁRDENAS AGUAYO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DR. VIJAYKUMAR YOGESH MULEY
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

DR. SIDDHARTHA MONDRAGÓN RODRIGUÉZ
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

CDMX, NOVIEMBRE DEL 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

En primer lugar, le agradezco al Posgrado en Neurobiología de la UNAM por proporcionar un programa que me brindo herramientas para mi desarrollo como científico. También a los apoyos económicos recibidos para poder realizar mis estudios e investigación: el apoyo de los proyectos DGAPA/PAPIIT/UNAM número IA208118 e IA210620 y CONACYT número 319578; y al CONACYT por la beca de Maestría. A los miembros de mi comité tutorial, en empezando por la directora de esta tesis, la Dra. María del Carmen Cárdenas Aguayo de la Facultad de Medicina de la UNAM, al Dr. Vijaykumar Muley Yogesh, y al Dr. Siddhartha Mondragón Rodríguez, del Instituto de Neurobiología de la UNAM. Por último, quiero agradecer a la Técnico Académico de nuestro laboratorio: M. en C. Mireya Velázquez Paniagua.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	3
ÍNDICE DE FIGURAS	5
RESUMEN	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1 Parálisis Supranuclear Progresiva	9
1.1.1 Subfenotipos de PSP	9
1.2 Aspectos clínicos de la PSP	11
1.2.1 Epidemiología	11
1.2.2 Histopatología y anatomía de PSP	12
1.3 Proteína tau	14
1.3.1 Aspectos moleculares patológicos de la proteína tau	15
1.3.2 Aspectos genéticos y epigenéticos	17
2. ANTECEDENTES	20
2.1 Modelos para el estudio de enfermedades neurodegenerativas	20
2.1.1 Modelos animales reportados para la PSP	22
2.1.2 Modelos celulares reportados para la PSP	23
2.2 iPSCs para el modelado de enfermedades neurodegenerativas	24
2.3 Análisis transcriptómico	25
2.4 Datos transcriptómicos reportados en PSP	27
3. JUSTIFICACIÓN	29
4. HIPÓTESIS	29
5. OBJETIVOS	30
5.1 Objetivo General	30
5.2 Objetivos Particulares	30
6. DISEÑO EXPERIMENTAL	31
7. MATERIALES Y MÉTODOS	33
7.1 Procesamiento de los Microarreglos	33
7.2 Análisis de Expresión Diferencial	34
7.3 Análisis de la Intersección con literatura previa	35
7.4 Análisis de red de correlación ponderada	35
7.5 Análisis de Enriquecimiento Funcional	36

7.6	<i>Análisis de enriquecimiento de motivos</i>	37
7.7	<i>Enriquecimiento de los genes blanco de los TF (TF-GT)</i>	37
7.8	<i>Búsqueda de genes de interés</i>	38
7.9	<i>Cultivo y Expansión de las Líneas Celulares</i>	38
7.10	<i>Preservación de ARNm</i>	39
7.11	<i>Secuenciación de ARN (RNA-seq)</i>	40
7.12	<i>Procesamiento del RNA-seq</i>	40
7.13	<i>Análisis del RNA-seq</i>	41
8.	RESULTADOS	42
8.1	<i>Diferencias en el perfil transcriptómico del LMT entre los individuos con PSP y los CNTRL</i>	42
8.2	<i>Módulos de genes asociados a PSP</i>	46
8.3	<i>Regulación transcripcional de los DEGs y los módulos de genes</i>	50
8.4	<i>Genes de interés para la PSP</i>	51
8.5	<i>Diferencias entre el perfil transcriptómico de la línea CPN del paciente con PSP y el CNTRL</i>	55
8.6	<i>Análisis de correlación entre el transcriptoma de las líneas CPN y del LMT de los individuos en el microarreglo</i>	58
9.	DISCUSIÓN	61
10.	CONCLUSIONES	66
11.	PERSPECTIVAS	66
12.	ANEXOS	67
12.1	<i>Material Suplementario</i>	67
13.	REFERENCIAS	70

ABREVIATURAS

CBS: Síndrome corticobasal

CPN: Células precursoras neurales

CTE: Células troncales embrionarias

CTN: Células troncales neurales

DEA: Análisis de expresión diferencial

DEGs: genes expresados diferencialmente

GWAS: Estudio de asociación del genoma completo

GOT: Término de ontología génica

iPSCs: Células pluripotentes inducidas

MEA: Análisis de enriquecimiento de motivos

LMT: Lóbulo medial temporal

MNF: Marañas neurofibrilares

PCA: Análisis de componentes principales

PSP-RS: Parálisis supranuclear progresiva, fenotipo síndrome de Richardson

SNP: Polimorfismo de nucleótido simple

TCX: Corteza temporal

TF: Factor de transcripción

TF-TG: Enriquecimiento de los genes blanco de los posibles factores de transcripción

TG: Genes blanco

TSS: Sitio de inicio de la transcripción

UPR: Respuesta a proteínas mal plegadas

WGCNA: Análisis de red de correlación ponderada

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. TIPOS DE AGREGADOS DE LA PROTEÍNA TAU EN LA PSP.....	12
FIGURA 2. ÁREAS CEREBRALES AFECTADAS EN LA PSP Y SUS SUBFENOTIPOS	13
FIGURA 3. ISOFORMAS DE LA PROTEÍNA TAU.....	15
FIGURA 4. MECANISMO DE FORMACIÓN DE AGREGADOS DE PROTEÍNA TAU	16
FIGURA 5. MUTACIONES ASOCIADAS AL GEN MAPT EN LA PSP.	18
FIGURA 6. TIPOS DE CÉLULAS SOMÁTICAS Y MÉTODOS UTILIZADOS PARA OBTENER CÉLULAS PLURIPOTENCIALES INDUCIDAS	21
FIGURA 7. MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE DATOS TRANSCRIPTÓMICOS	27
FIGURA 8. PRIMERA SECCIÓN DEL DISEÑO EXPERIMENTAL.....	31
FIGURA 9. SEGUNDA SECCIÓN DEL DISEÑO EXPERIMENTA	32
FIGURA 10. PROCESAMIENTO DE LOS DATOS DEL MICROARREGLO E-MEXP- 2280.	42
FIGURA 11. DEGS EN EL LMT DE LOS INDIVIDUOS PSP VS. CNTRL	43
FIGURA 12. GENES COMPARTIDOS ENTRE LOS LMT DEGS DE PACIENTES CON PSP, CON GENES REPORTADOS PARA PSP EN LA LITERATURA	44
FIGURA 13. GOT ENRIQUECIDOS EN LOS LMT DEGS DE LOS PACIENTES CON PSP	45
FIGURA 14. MÓDULOS DE GENES AGRUPADOS EN EL WGNCA.....	47
FIGURA 15. GOT ENRIQUECIDOS EN LOS GENES A LA ALTA DE LOS MÓDULOS AZUL, VERDE Y AMARILLO.....	48
FIGURA 16. GOT ENRIQUECIDOS EN LOS GENES A LA BAJA DE LOS MÓDULOS AZUL, VERDE Y AMARILLO.....	49
FIGURA 17. TFS ENRIQUECIDOS EN LMT DEGS+WGCNA	51
FIGURA 18. GENES COMPARTIDOS ENTRE LOS LMT DEGS+WGCNA DE PACIENTES CON PSP, CON GENES REPORTADOS PARA PSP EN LA LITERATURA.....	52
FIGURA 19. VISTA EN CONTRASTE DE FASES DE LAS LÍNEAS CPNS.....	56
FIGURA 20. PROCESAMIENTO DE LOS DATOS DEL RNASEQ DE LAS LÍNEAS CPNS	56
FIGURA 21. DEGS EN LAS LÍNEAS CPNS PSP VS. CNTRL.....	57
FIGURA 22. GOT ENRIQUECIDOS EN LA LÍNEA CPN DEL PACIENTE CON PSP.....	58

FIGURA 23.- MAPA DE CALOR DEL ÍNDICE DE CORRELACIÓN ENTRE LAS LÍNEAS CPN Y EL LMT.....	59
FIGURA 24.- GENES COMPARTIDOS ENTRE LOS CPN DEGS DE PACIENTES CON PSP, CON GENES REPORTADOS PARA PSP EN LA LITERATURA	60
FIGURA 25. RED DE INTERACCIÓN ENTRE LOS GENES DE RIESGO SLCO1A2 Y MOB.....	63

RESUMEN

La parálisis supranuclear progresiva (PSP) es una enfermedad neurodegenerativa esporádica poco común cuya etiología no está del todo clara y que carece de un modelo específico que facilite su estudio. Debido a lo antes mencionado, este trabajo tuvo como objetivo analizar datos transcriptómicos de libre acceso del lóbulo temporal medial (LMT) provenientes de pacientes con PSP, y encontrar posibles procesos desregulados o genes de interés. Posteriormente se buscó replicar estos resultados a nivel transcriptómico en líneas celulares precursoras neurales (CPNs) provenientes de pacientes con PSP, para evaluar su potencial para modelar la enfermedad a nivel transcriptómico. En el LMT de pacientes con PSP, se encontraron genes expresados diferencialmente (DEGs) y módulos de genes asociados al procesamiento del ARNm, mielinización, el sistema de endomembranas y de síntesis y catabolismo de proteínas, todos ellos con excepción del último, procesos que han sido previamente reportados como afectados a nivel transcriptómico para PSP. También se detectaron 7 posibles factores de transcripción que tienen como blanco los genes desregulados en PSP, resaltando *FOXO3*, como el único con una expresión significativa diferencial entre pacientes con PSP y sujetos sanos. Además, se hizo una comparación con DEGs reportados en la literatura provenientes de la corteza temporal de pacientes con PSP y con una lista de genes asociados a la enfermedad reportados en el NCBI y de GWAS, donde se encontró 54 genes de interés en común; entre ellos, detectamos la regulación a la baja de *SLCO1A2* y *MOBP*, conocidos como genes de riesgo para PSP. Estos resultados proponen a los genes de interés como posibles genes asociados a la patología de PSP, así como de *FOXO3* en la desregulación de genes en el LMT de pacientes con PSP. En cuanto a las CPNs, se logró establecer la línea GIH-131-C1 proveniente de un paciente diagnosticado con PSP esporádico y la línea F12436.3 de un paciente sano. Se detectó que los DEGs en la línea GIH-131-C1 estaban relacionados a la estructura sináptica, neurodesarrollo y sistema de endomembrana, pero mostró una baja correlación a nivel transcriptómico con el LMT de pacientes con PSP, lo que nos indica una baja similitud de este tipo celular, con lo ocurrido en el LMT de pacientes con PSP.

Palabras clave: parálisis supranuclear progresiva, tauopatías, transcriptoma, genes expresados diferencialmente, WGCNA, factores de transcripción, células precursoras neurales.

ABSTRACT

Progressive supranuclear palsy (PSP) is a rare sporadic neurodegenerative disease whose etiology is unclear and lacks a specific model to facilitate its study. For the reasons mentioned above, this work aimed to analyze open access transcriptomic data from the medial temporal lobe (MTL) of patients with PSP, hoping to find possible deregulated processes or genes of interest; then, we look to replicate these results at the transcriptomic level in neural precursor cell (NPCs) lines from patients with PSP, to assess their potential to replicate the disease at the transcriptomic level. In the MTL of patients with PSP, differentially expressed genes (DEGs) and gene modules associated with mRNA processing, myelination, the endomembrane system, and protein synthesis and catabolism, all of them except for the last one, are processes that have been previously reported as being affected at the transcriptome for PSP. Seven possible transcription factors that target genes deregulated in PSP were also detected, highlighting *FOXO3*, as the only one with a significant differential expression between PSP patients and healthy subjects. In addition, a comparison was made with DEGs reported in the literature from the temporal cortex of patients with PSP and with a list of genes associated with the disease reported in the NCBI and GWAS, where found 54 genes of interest in common; among them, we detected downregulation of *SLCO1A2* and *MOBP*, known as risk genes for PSP. These results suggest the possible association of genes of interest and *FOXO3* with PSP pathology. Regarding the NPCs lines, it was possible to establish the GIH-131-C1 CPN line from a patient diagnosed with sporadic PSP and the F12436.3 line from a healthy patient. We detected that DEGs in the GIH-131-C1 were associated with synaptic structure, neurodevelopment, and endomembrane system, and a low correlation in gene expression with the LMT of PSP patients. These results indicate a low similarity at the transcriptomic level for this cell line with what happened in the LMT of patients with PSP.

Keywords: Progressive supranuclear palsy, Tauopathies, Transcriptome, Differentially expressed genes, WGCNA, Transcription factors, Neural Precursor Cells.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Parálisis Supranuclear Progresiva

La Parálisis Supranuclear Progresiva (PSP), es una enfermedad neurodegenerativa esporádica poco común, considerada el segundo parkinsonismo atípico más frecuente. Los parkinsonismos atípicos son un conjunto de sinucleopatías y tauopatías, que se caracterizan por la deposición anormal de la proteína α -sinucleína y tau respectivamente (Levin et al., 2016). La PSP se define como una tauopatía primaria, que pertenece a un grupo de enfermedades neurodegenerativas en las que los depósitos de la proteína tau son el factor contribuyente más significativo del proceso neurodegenerativo (Josephs, 2017). En la PSP estos depósitos se encuentran principalmente en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos afectando principalmente a zonas subcorticales y al tallo encefálico (Josephs, 2017; Levin et al., 2016).

Este síndrome fue reconocido por primera vez por J. Clifford Richardson a mediados de la década de 1950, cuando fue consultado por un amigo que presentaba problemas motores para coordinar la marcha y movimientos oculares, así como problemas de memoria (Weiner, 2009). Durante los años siguientes, Richardson observó casos con sintomatología similar, por lo que, en 1963, junto con John Steel y Olszewski, realizaron una descripción detallada de esta enfermedad, a la que denominaron parálisis supranuclear progresiva (Armstrong, 2018; Long et al., 2015; Weiner, 2009). Hoy se sabe que el fenotipo descrito por ellos corresponde a lo que ahora es PSP Richardson (PSP-RS, por sus siglas en inglés).

1.1.1 Subfenotipos de PSP

En la PSP el cuadro clínico es heterogéneo, desde la descripción de la enfermedad, el espectro clínico se ha ampliado y se han identificado diferentes subfenotipos; la diferencia entre ellos radica en los primeros signos y síntomas que se presentan, así como el patrón de progresión de la enfermedad y el tiempo de supervivencia (Boxer et al., 2017). Sin embargo, en etapas más avanzadas de la enfermedad, la mayoría de los subfenotipos clínicos comparten una sintomatología más típica de PSP-RS (Boxer et al., 2017). Entre los subfenotipos más característicos se encuentran: 1) El PSP-parkinsoniano, donde predomina el parkinsonismo entre los síntomas de aparición temprana, se caracteriza por presentar respuesta a la levodopa, rigidez extrapiramidal asimétrica y temblor (Boxer et al., 2017; Parthimos & Schulpis, 2020); 2) el PSP-síndrome cortico basal, el cual se caracteriza por

presentar el fenotipo característico del síndrome corticobasal (CBS, por sus siglas en inglés), en el cual se ven afectadas la corteza parietal media y la parietal inferior. (Boxer et al., 2017; Parthimos & Schulpis, 2020); 3) mientras que el PSP-demenia frontotemporal, se refiere al fenotipo con características clínicas de la demencia frontotemporal, como un deterioro progresivo temprano de la personalidad, cambio en la conducta y deterioro cognitivo, afecta principalmente la corteza en el lóbulo frontal y el temporal (Boxer et al., 2017; Parthimos & Schulpis, 2020). La tabla 1 resume algunas de las características de los fenotipos reportados en la PSP.

Tabla 1. Tipos de fenotipos en la parálisis supranuclear progresiva (PSP). Modificada de (Armstrong, 2018).

Fenotipo	Abreviación	Características de la enfermedad
PSP-Síndrome de Richardson	PSP-RS	Disfunción motora ocular vertical, inestabilidad postural de inicio temprano y caídas
PSP-Motor ocular	PSP-OM	Disfunción motora ocular predominante
PSP-Inestabilidad postural	PSP-PI	Inestabilidad postural predominante
PSP-Parkinsoniano	PSP-P	Fenotipo clínico que se asemeja a la enfermedad de Parkinson
PSP-Frontal	PSP-F	Disfunción cognitiva frontal o conductual (similar a la demencia frontotemporal variable conductual)
PSP-Congelación progresiva de la marcha	PSP-PGF	Trastorno aislado de la marcha con vacilación inicial y congelación progresiva de la marcha
PSP-Síndrome Corticobasal	PSP-CBS	Síndrome corticobasal (1 signo de trastorno del movimiento y 1 signo cortical)

PSP-Desorden del lenguaje y habla	PSP-SL	Apraxia progresiva del habla y/ o afasia progresiva primaria no fluida /agramática
PSP-Esclerosis lateral primaria	PSP-PLS	Esclerosis lateral primaria
PSP- Ataxia cerebelar	PSP-C	Ataxia cerebelosa como síntoma inicial y predominante

1.2 Aspectos clínicos de la PSP

La PSP se caracteriza clínicamente por el enlentecimiento de movimientos sacádicos verticales, parálisis de la mirada vertical, inestabilidad postural, rigidez axial, disfagia, disartria, presencia de caídas dentro del primer año de aparición de los síntomas, así como alteraciones cognitivas y conductuales (Höglinger et al., 2017). El orden de aparición de los síntomas es muy variable, sin embargo, la mayoría de las veces, el déficit cognitivo y conductual se encuentran entre los primeros síntomas que se desarrollan (Golbe, 2014b); poco después, surge la afectación de los síntomas motores, las caídas comienzan a volverse frecuentes, el enlentecimiento de los movimientos sacádicos verticales se hace evidente y culmina con la parálisis supranuclear de la mirada (Golbe, 2014b). Sin embargo, el uso de este cuadro clínico para diagnóstico de PSP no es muy acertado debido a que solamente identifica el síndrome de PSP-RS, el principal fenotipo clínico de PSP. En un trabajo reciente realizado en pacientes confirmados por autopsia encontró que solo el 24% de los casos presentados como PSP eran PSP-RS, mientras que más de la mitad de los casos mostraban características sobrepuestas de varios subfenotipos o no podían catalogarse como uno de los ya descritos (Respondek et al., 2014).

1.2.1 Epidemiología

Se estima que la prevalencia de la enfermedad es de 5-7 casos por cada 100.000 personas y aumenta de 1.7 casos entre los 50-59 años a 14.7 casos por cada 100.000 habitantes entre los 80-99 años (Boxer et al., 2017; Parthimos & Schulpis, 2020). La edad promedio de aparición de los síntomas es a los 63 años, pero hay reportes de personas con 40 años que presentan sintomatología. Desde el momento de aparición de los síntomas la

expectativa de vida oscila entre 5 a 9. años (Baba et al., 2006; Parthimos & Schulpis, 2020). De lo reportado en México, solo existe un estudio en donde se documenta una incidencia de 1.5 % de casos confirmados de PSP dentro de una cohorte de 647 casos diagnosticados con distintos parkinsonismos, siendo la enfermedad de Parkinson (EP) la más recurrente ocupando el 92.9 % de los casos (Mayela et al., 2012).

1.2.2 Histopatología y anatomía de PSP

La PSP se caracteriza histopatológicamente por presentar depósitos de tau, principal característica de todas las tauopatías, la diferencia entre ellas radica en las zonas del cerebro y tipos celulares afectados, el tipo de morfología de estos depósitos de proteína tau, así como otras características que se mencionarán posteriormente (Kovacs, 2018). En la Figura 1, se pueden apreciar los tipos principales de lesiones observadas en PSP, como son los agregados de la proteína tau a manera de marañas neurofibrilares (MNFs) dentro de las neuronas, en las prolongaciones (Neuritas distróficas), en astrocitos (astrocitos en penacho) y en oligodendrocitos (cuerpos enrollados) (Boxer et al., 2017).

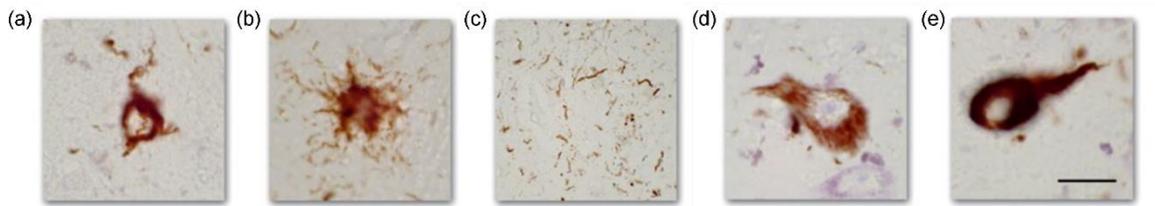


Figura 1. Tipos de agregados de la proteína tau en la PSP. Inmunohistoquímica que muestra los tipos agregados de proteína tau en PSP: (a) en oligodendrocitos (cuerpos enrollados); (b) en astrocitos (astrocitos con mechones, o en penacho); (c) hilos de neuropilo; (d) neuronas prefibrilares; (e) marañas neurofibrilares (Bruch et al., 2017) (-10 μ m).

Aunque a nivel anatómico la extensión patológica de tau en PSP es altamente variable, hay una tendencia hacia una mayor afectación de los núcleos subcorticales, principalmente los ganglios basales y el tronco del encéfalo (Weiner, 2009). Dentro de estos núcleos, el núcleo subtalámico, la *sustancia negra* y el globo pálido son las regiones más afectadas (Brown & Seeley, 2016), mientras que las regiones cerebrales donde la

afectación es muy variable son la corteza cerebral, protuberancia, núcleo caudado, núcleo dentado cerebeloso y sustancia blanca cerebelosa (Brown & Seeley, 2016; Weiner, 2009). Existe evidencia sustancial que indica que la afectación de las regiones subcorticales precede a las áreas corticales, de las cuales primero se ven afectadas las cortezas frontoparietales, luego las cortezas temporal y finalmente la occipital, tal y como se observan en la Figura 2 (Kovacs et al., 2020).

La distribución regional de la patología de tau y la pérdida neuronal varían entre los diferentes subfenotipos, por ejemplo, hay un daño más significativo en las regiones corticales en el caso de los subfenotipos PSP-CBS, PSP-SL y PSP-F (Parthimos & Schulpis, 2020), en comparación con el predominio del daño en los ganglios basales y el tronco encefálico para los subfenotipos PSP-P y PSP-PGF, tal y como se muestra en la Figura 2 (Parthimos & Schulpis, 2020).

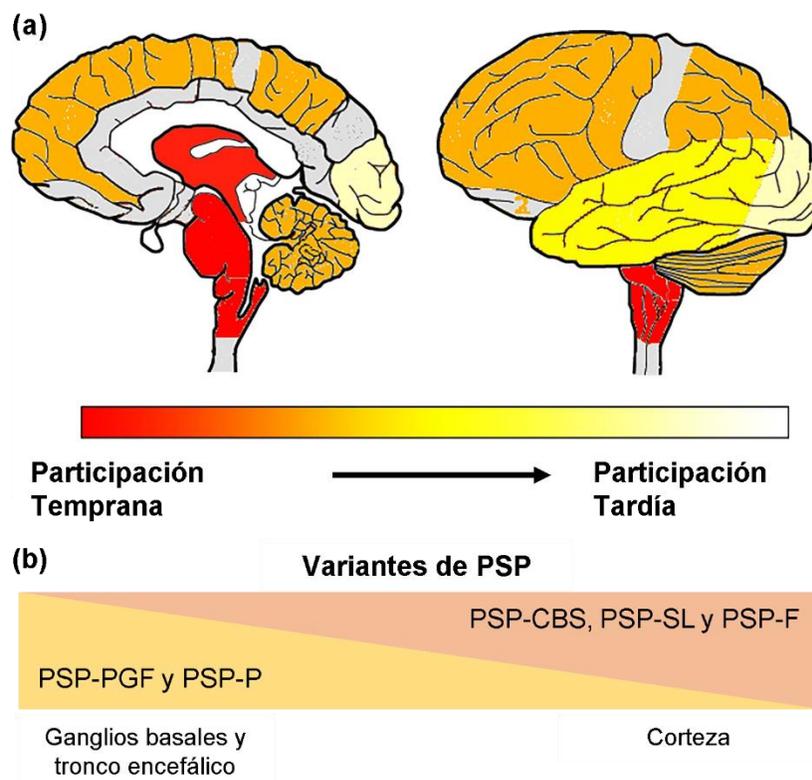


Figura 2. Áreas cerebrales afectadas en la PSP y sus subfenotipos. (a) Mapa de calor que esquematiza la afectación temporal de las diferentes áreas del cerebro en pacientes con PSP-Síndrome de Richardson; (b) cuadro que esquematiza los subfenotipos que presentan mayor alteración en los ganglios basales y tronco encefálico, así como aquellos

subfenotipos que presentan alteración en la corteza. Modificado de (Kovacs et al., 2020).
Abreviaciones: PSP-Síndrome Corticobasal (PSP-CBS); PSP-Desorden del lenguaje y habla (PSP-SL); PSP-Frontal (PSP-F); PSP-Congelación progresiva de la marcha (PSP-PGF); PSP-Parkinsoniano (PSP-P).

1.3 Proteína tau

Como se ha mencionado, las tauopatías primarias tienen como principal componente neurodegenerativo la acumulación de la proteína tau, por lo tanto, resulta importante conocer la función de esta proteína. Tau es una proteína de asociación de microtúbulos cuya función principal es regular su ensamblaje y su dinámica, desempeñando un papel fundamental en la morfología neuronal (Guo et al., 2017). En las neuronas, la proteína tau se encuentra en los axones como una proteína altamente soluble y fosforilada que estabiliza y promueve la polimerización de los microtúbulos a través de los dominios de unión a los mismos (Hanger et al., 2009). La proteína tau es codificada por el gen de la proteína asociada a los microtúbulos tau o *MAPT*, que se ubica en el cromosoma 17 y presenta dos principales haplotipos, el H1 y el H2, cuya única diferencia es una inversión cromosómica de 900 kb en el haplotipo H2 (Avila et al., 2016). Existen seis diferentes isoformas de tau, resumidas en la Figura 3, en donde se puede apreciar que se caracterizan por la presencia o ausencia de los exones 2, 3 y 10 (Long et al., 2015). La inclusión del exón 10 que codifica para el cuarto dominio de unión a microtúbulos caracteriza las isoformas 4R (0N4R, 1N4R y 2N4R); mientras que, las isoformas con procesamiento “*splicing*” alternativo que carecen del exón 10, son conocidas como las isoformas 3R (0N3R, 1N3R y 2N3R) (Avila et al., 2016).

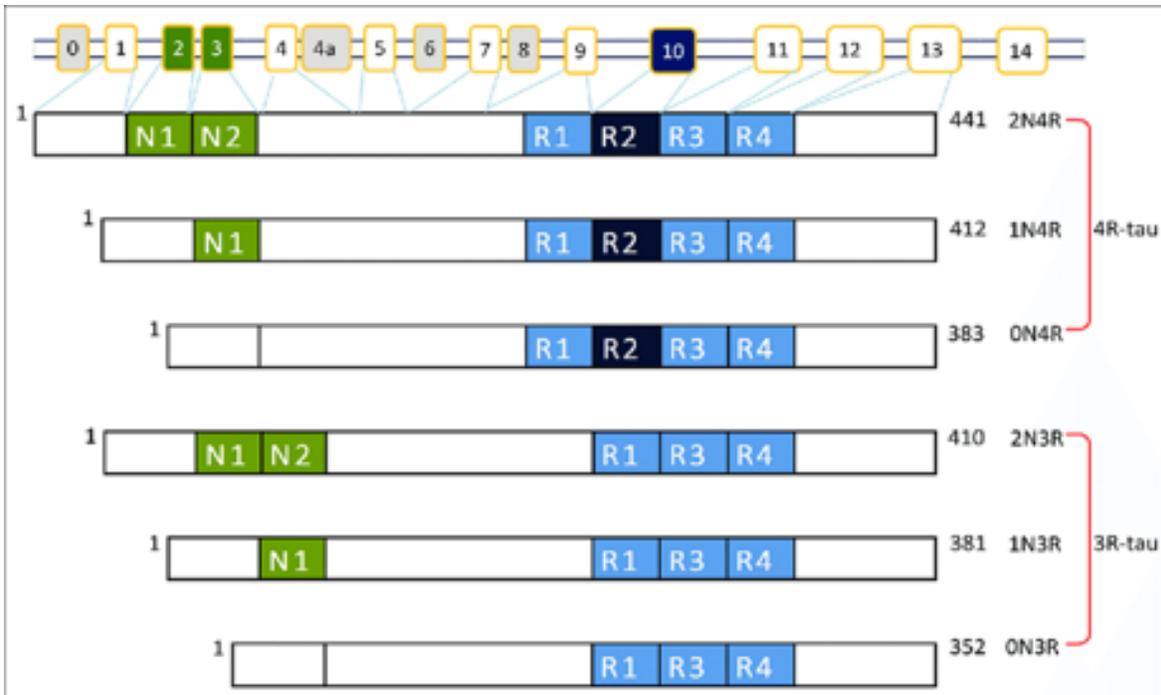


Figura 3. Isoformas de la proteína tau. Esquematación de las seis isoformas existentes de las diferentes isoformas. La inclusión o exclusión del exón 10 determina la diferencia entre la 4R-tau y la 3R-tau. Modificado de (Long et al., 2015).

1.3.1 Aspectos moleculares patológicos de la proteína tau

La proteína tau está regulada de manera alta a nivel postranscripcional, principalmente a través de su fosforilación en residuos que se ubican cerca de los dominios de unión a microtúbulos, modulando así su unión (Arendt et al., 2016). Se ha reportado que en condiciones patológicas esta proteína sufre un aumento en su fosforilación de 3 a 4 veces (hiperfosforilación), así como cortes proteolíticos en la región carboxilo y amino-terminal, lo que disminuye su afinidad por los microtúbulos y promueve una alteración en su conformación (Cárdenas-Aguayo Mdel et al., 2014; Golbe, 2014a; Šimić et al., 2016). El aumento de la proteína tau con conformación alterada promueve la formación de agregados, que posteriormente llegan a formar oligómeros, filamentos helicoidales apareados, marañas prefibrilares y neurofibrilares, o MNFs, conduciendo un aumento de la toxicidad y neurodegeneración; en la Figura 4 se puede observar la esquematización del proceso completo (Cárdenas-Aguayo Mdel et al., 2014; Golbe, 2014a; Noble et al., 2013; Šimić et al., 2016). El papel patológico de las estructuras fibrilares sigue siendo objeto de

debate, estudios recientes han propuesto la idea de que los oligómeros de tau son los que desempeñan el papel neuropatológico más crucial en mecanismos como la pérdida de la integridad de la membrana, la disfunción mitocondrial, sináptica, transporte axonal deficiente y la propagación patológica a manera de prion de la proteína tau (Ghag et al., 2018; Rösler et al., 2019).

La hiperfosforilación de la proteína tau está dada por diversas cinasas, en PSP se ha reportado la actividad de la quinasa glicógeno sintasa 3 β , o *GSK3 β* (Ferrer et al., 2002) y la ciclina dependiente de quinasa 5, o *CDK5* (Borghini et al., 2002), pero existe una gran variedad de cinasas que han sido asociadas a tauopatías en general, como la quinasa caseína 1, o *CK1* y la proteína quinasa A, o *PKA* (Hanger et al., 2009). Otro aspecto importante en PSP, es la prevalencia de las isoformas de tau 4R respecto a las 3R; 4R y 3R se expresan de manera similar en el cerebro humano adulto con un ratio de 1:1 (Long et al., 2015), pero en PSP, los agregados de la proteína tau se caracterizan por la presencia predominante de las isoformas 4R, alterando el ratio de expresión a 2:1 (4R/ 3R) (Long et al., 2015).



Figura 4. Mecanismo de formación de agregados de proteína tau. Esquema de los pasos en la patología de tau, desde su función como estabilizadores de los microtúbulos hasta la formación de las marañas neurofibrilares. Modificada de (Shirafuji et al., 2018).

Trabajos recientes apoyan la hipótesis de que la patología de tau se propaga a través de un mecanismo similar al de los priones (Demaegd et al., 2018a; Walker et al., 2013). El primer paso hipotético en el mecanismo de propagación sería la captación de semillas de tau patológica a través de macropinocitosis en neuronas y células gliales, aunque la entrada de tau patológica desde el endosoma al citosol se desconoce (Demaegd

et al., 2018b; Mudher et al., 2017). El paso siguiente es la agregación de tau utilizando las semillas de tau patológica como una plantilla para la replicación, esto está respaldado por experimentos que encontraron que las semillas recién formadas de tau patológicas asemejan a la semilla tau patológica inicial que fue transfectada (Demaegd et al., 2018b; Mudher et al., 2017). El último paso sería la transferencia intercelular de los agregados recién formados, para este paso se desconoce el mecanismo preciso, pero se proponen la difusión pasiva facilitada, la exocitosis activa, los exosomas, o las conexiones célula-célula (nanotubos) (Demaegd et al., 2018b; Mudher et al., 2017).

1.3.2 Aspectos genéticos y epigenéticos

La PSP tiene una etiología multifactorial, donde aspectos genéticos, epigenéticos y factores ambientales están asociados con la prevalencia de la enfermedad (Rösler et al., 2019). Aunque la mayoría de los casos reportados de PSP son esporádicos, existen casos de formas familiares, que representan el 7% de los casos (Im et al., 2015; Wen et al., 2021); en algunos de ellos se ha observado una herencia autosómica dominante, a los que se les ha detectado mutaciones relacionadas con el gen de la proteína tau de asociación a microtúbulos o *MAPT* (Rösler et al., 2019; Wen et al., 2021). La frecuencia de mutaciones en el gen de *MAPT* varía de 0.6% a 14.3% de los casos diagnosticados con PSP (Pittman et al., 2008; Wen et al., 2021). En total, se han reportado alrededor de 15 mutaciones diferentes dentro del gen *MAPT* asociadas con PSP, la mayoría se encuentran dentro o cerca del exón 10 (Wen et al., 2021), tal y como se puede apreciar en la Figura 5, con excepción de la mutación R5L en el exón 1, V363A en el exón 12 y R406W en el exón 13 (Pittman et al., 2008; Wen et al., 2021). Además de las mutaciones en *MAPT*, también se han detectado mutaciones poco frecuentes en el gen de la quinasa 2 repetida rica en leucina o *LRRK2* (Wen et al., 2021), una cinasa relacionada con la EP, miembro de la superfamilia Ras/GTPasa, que participa en distintos procesos celulares como el tráfico vesicular, función del citoesqueleto, autofagia, y la regulación del sistema endolisosomal (Eguchi et al., 2018).

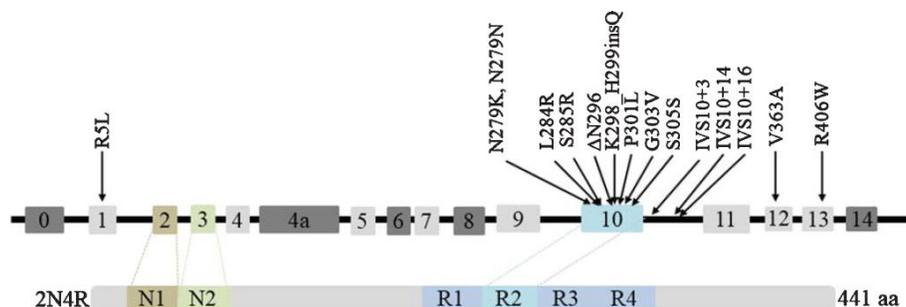


Figura 5. Mutaciones asociadas al gen MAPT en la PSP. Localización de las 15 mutaciones asociadas al gen de MAPT, a lo largo de la isoforma 2N4R (Wen et al., 2021).

Otros aspectos genéticos importantes son la prevalencia de variantes de genes que se encuentran sobrerrepresentados en la población de individuos afectados (Visscher et al., 2012), estas variantes, o polimorfismos de nucleótido simple (SNP, por sus siglas en inglés), son detectados a partir de escaneos en el genoma de la población de interés comparado con una población control, en un análisis conocido como estudio de asociación del genoma completo (GWAS por sus siglas en inglés) (Visscher et al., 2012). El primer GWAS realizado para un grupo de pacientes con PSP reveló la asociación de cuatro SNP asociados a los genes *MAPT*, proteína básica de la mielina de oligodendrocitos o *MOBP*, sintaxina 6 o *STX6*, y el factor de iniciación de la traducción eucariota 2-alfa quinasa 3 o *EIF2AK3*, en los que el haplotipo *MAPT* H1 era, con mucho, el haplotipo de susceptibilidad más fuerte para PSP (Höglinger et al., 2011). En este sentido, el haplotipo H1 está formado por diferentes subhaplotipos y estudios han mostrado la asociación de subhaplotipos H1 como H1c, H1d, H1g y H1o con un mayor riesgo de desarrollar PSP (Heckman et al., 2019); sumado a esto, el haplotipo H1 se ha asociado con una inclusión relativamente mayor del transcrito del exón 10 (Caffrey & Wade-Martins, 2007; Pittman et al., 2008). Otros SNP dentro de *MOBP*, *STX6*, *EIF2AK3*, transportador de aniones orgánicos portadores de solutos 1A2 o *SLCO1A2*, quinasa 2 repetida rica en leucina o *LRRK2*, fosfatasa dual específica 10 o *DUSP10*, y el factor de transcripción familiar RUNX 2 o *RUNX2* se apoyaron en análisis de GWAS adicionales de diferentes cohortes de PSP (Chen et al., 2018; Sanchez-Contreras et al., 2018; Zou et al., 2012).

Por otro lado, a través de varios estudios se ha observado que los factores ambientales y epigenéticos podrían estar contribuyendo al desarrollo de PSP. Uno de los primeros reportes sobre una modificación epigenética asociada a esta enfermedad, es el

descubrimiento de la hipometilación en un CpG, regiones con gran concentración de citocinas y guaninas, del gen *MAPT* en la corteza frontal de los pacientes afectados por PSP (Huin et al., 2016). Otro estudio replicó las mismas diferencias y, además, encontró que estas metilaciones estaban asociadas a 375 genes implicados en el desarrollo neuronal, regulación de la señalización celular, así como en la transcripción (Weber et al., 2018). Otros estudios han reportado cambios en la metilación en CpGs de los genes *MOBP*, y del factor de ribosilación a ADP GTPase 17A y 17B, o *ARL17A* y *ARL17B* (Allen et al., 2016; Heckman et al., 2019). El estudio que reportó cambios de metilación en PSP se centra en los cambios de metilación en la mitocondria, donde se descubrió la hipermetilación en la novena posición de los mt-ARNt, la cual es esencial para el correcto plegamiento de los ARNt, su estabilidad y capacidad de decodificación (T. K. Silzer et al., 2020).

Aunado a esto, se ha detectado que existen factores geográficos ambientales que pueden estar jugando un papel fundamental en el desarrollo de PSP (Champy et al., 2004). Uno de los casos más documentados es la alta frecuencia de parkinsonismos atípicos en una isla francesa del Caribe llamada Guadalupe (Champy et al., 2004). Los investigadores encontraron un posible vínculo entre el consumo de té de frutas y hierbas de la familia *Annonaceae*, el cual contiene un inhibidor del complejo mitocondrial 1 o *CM1* (Champy et al., 2004) el cual está altamente relacionado con la patología de PSP. Los datos histopatológicos mostraron una gran consistencia en el diagnóstico de PSP en un gran número de los cerebros de estos pacientes (Champy et al., 2004; Escobar-Khondiker et al., 2007). Otro caso reportado fue en la aldea de Watterlo en el norte de Francia, donde 92 pacientes fueron diagnosticados con PSP, todos ellos relacionados con alta exposición a metales pesados debido a que residían cerca de un área de desechos industriales (Caparros-Lefebvre et al., 2015).

2. ANTECEDENTES

2.1 Modelos para el estudio de enfermedades neurodegenerativas

Una de las formas de estudiar las enfermedades neurodegenerativas es a través del desarrollo de modelos que recapitulen las principales características de dichas patologías (Gitler et al., 2017). Para lo anterior se han utilizado una gran variedad de modelos animales, entre los que podemos encontrar el uso de roedores, moscas de la fruta, pez cebra y nemátodos (Gitler et al., 2017); así como también de modelos *in vitro*, como el uso de cultivos celulares, co-cultivos, y el desarrollo de organoides (Gitler et al., 2017).

A pesar de que los modelos animales nos han permitido entender los mecanismos celulares y moleculares que llevan a la disfunción de las neuronas así como la degeneración, estos no suelen recapitular completamente todos los eventos fisiopatológicos que se observan en las patologías de los humanos (Dawson et al., 2018); lo que ha llevado a que los estudios de fármacos realizados en ellos suelen fallar cuando son probados en humanos (Dawson et al., 2018). Por ejemplo, el modelo murino, siendo el más utilizado para estudiar distintas enfermedades neurodegenerativas, no recapitulan la relación humana 1:1 de las isoformas de tau 4R y 3R, ya que el cerebro murino adulto no expresa la isoforma 3R (Hernández et al., 2020) además, se ha observado que existe una menor cantidad de aminoácidos en la proteína tau de ratones, aminoácidos que marcan una diferencia en la conformación que adopta la proteína en condiciones patológicas (Hernández et al., 2020).

Los modelos celulares derivados de tejidos humanos surgen como una alternativa a las complicaciones traslacionales de los modelos animales; estos facilitan la manipulación, reducen el tiempo y los costos de los experimentos, además de que ayudan a identificar vías y procesos básicos de la enfermedad para la detección de nuevos blancos farmacológicos (Korhonen et al., 2018). Sin embargo, presentan desventajas, entre ellas encontramos que en su mayoría son cultivos en monocapa (estos tienen fenotipos muy diferentes y una expresión génica alterada), suelen ser de un solo tipo celular (solamente neuronas o astrocitos) y que la mayoría de las líneas utilizadas son células inmortalizadas que provienen de neuroblastomas (Korhonen et al., 2018). A pesar de las dificultades antes mencionadas, el desarrollo de nuevas técnicas y descubrimientos han permitido resolver y expandir el alcance de estos modelos, abriendo todo un campo para la investigación biomédica.

Uno de estos descubrimientos fue el uso de las células troncales embrionarias (CTE) y de las células pluripotenciales inducidas (iPSCs, por sus siglas en inglés) (Slanzi et al., 2020). Las iPSCs, tienen menos implicaciones éticas, ya que son células pluripotentes obtenidas de células somáticas mediante una técnica llamada reprogramación; la cual consiste en la transfección del factor de transcripción 4 de unión a octámero o *OCT-4*, el protooncogén *c-Myc*, el factor 4 Kruppel-like o *KLF4*, y el factor de transcripción SRY-Box 2 o *SOX2*, genes relevantes para el estado pluripotente (Takahashi & Yamanaka, 2006), estas células posteriormente son utilizadas para generar células de cualquiera de los 3 linajes embrionarios, tal y como se presenta en la Figura 6 (Sohn et al., 2012). Con estas células se pueden generar múltiples fenotipos con un mismo genotipo, lo que permite estudiar aspectos como la biología celular de la enfermedad, fenotípicos, aspectos genéticos y la prueba de nuevos fármacos que puede avanzar hacia terapias paciente específicas (Chang et al., 2020; Slanzi et al., 2020).

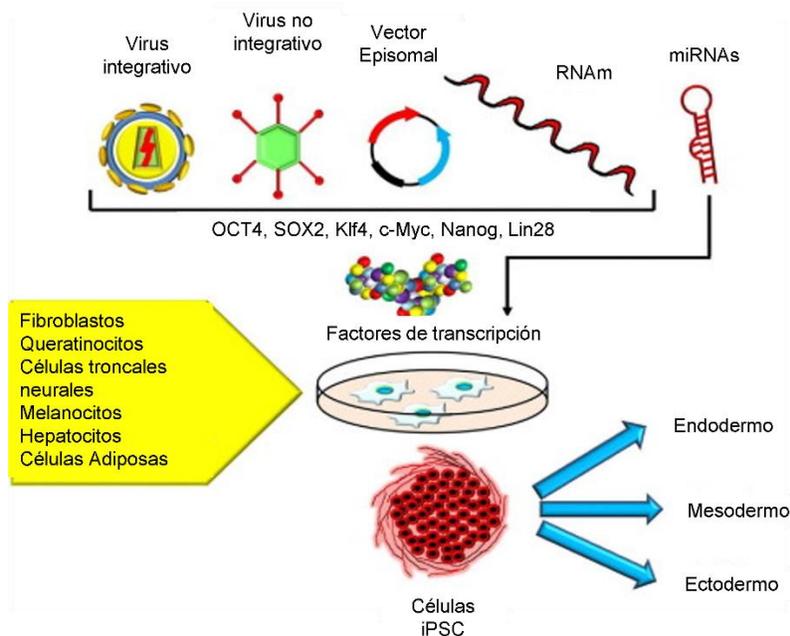


Figura 6. Tipos de células somáticas y métodos utilizados para obtener células pluripotenciales inducidas (iPSCs). Esquema que resume los distintos tipos de células somáticas utilizadas para la obtención de iPSCs; los distintos mecanismos para expresar los factores de transcripción; y los linajes embrionarios a los que pueden ser diferenciadas

(Sohn et al., 2012). Factor de transcripción 4 de unión a octámero (*OCT-4*), el protooncogén *c-Myc* (*c-Myc*), el factor 4 Kruppel-like (*KLF4*), factor de transcripción SRY-Box 2 (*SOX2*).

2.1.1 Modelos animales reportados para la PSP

Los modelos animales reportados para estudiar la PSP son pocos, entre ellos se han utilizado ratones transgénicos que sobreexpresan la proteína tau silvestre de humano o con alguna mutación asociada. Kambe et al., en 2011, reportaron el uso de ratones (Tg601) que fueron transformados para expresar la isoforma 2N4R de la proteína tau humana con el fin de modelar tauopatías 4R esporádicas, su modelo presentó disminución en el aprendizaje espacial, así como un aumento en la hiperfosforilación de tau y pérdida sináptica en edades avanzadas (Kambe et al., 2011).

También Jada Lewis y Astrid Sydow et al., generaron ratones transgénicos con mutaciones asociadas a PSP (Lewis et al., 2000; Sydow et al., 2016b). Jada Lewis reportó el uso de ratones que expresaba la mutación P301L, observando un déficit conductual y motor desde los 6 meses, así como la presencia de MNF y marañas prefibrilares en el tallo cerebral y áreas subcorticales (Lewis et al., 2000). Posteriormente, Lucas Carvalho observó similitudes en la afectación a nivel transcriptómico al comparar el transcriptoma de la corteza cerebral del ratón transgénico TauD35 (Tau-4R/ 2N) con corteza temporal de humanos postmortem (Iohan et al., 2022). Astrid Sydow, generó ratones transgénicos pero con la mutación A152T, encontrando que replicaba las características patológicas de las tauopatías, incluido el fenotipo cognitivo y una neuroinflamación pronunciada (Sydow et al., 2016a).

Por otro lado, Bruch et al. en 2017, reportó el uso del ratón con la mutación P301S para correlacionar datos obtenidos en cerebro de pacientes con PSP, mostrando que el activar la vía de PERK reducía efectivamente las especies patológicas de tau, sugiriendo que podría ser un blanco viable para tratar tauopatías (Bruch et al., 2017). Por último, otro modelo reportado en la literatura es el uso de ratones no transgénicos inyectados por vía intracerebral con proteína tau patológica extraída del cerebro de pacientes con PSP (Narasimhan et al., 2017), lo anterior ayudó a demostrar que los diferentes tipos de cepas patológicas de tau definen la distribución del daño entre las diferentes tauopatías (Goedert & Spillantini, 2017).

2.1.2 Modelos celulares reportados para la PSP

Son pocos los artículos en la literatura que reportan el uso de modelos celulares para estudiar la PSP. Por ejemplo, Bruch et al. 2017 desarrolló dos modelos celulares para estudiar la activación de la proteína quinasa de retículo endoplásmico similar a ARN o *PERK*; un modelo toxicológico con la administración de dosis bajas de annonacina, un inhibidor del *CM1*, y otro modelo celular con una modificación para la sobreexpresión de la isoforma 2N4R de tau, ambos sobre cultivo de células neurales humanas (Bruch et al., 2017). En ambos modelos, se observó la regulación a la baja del factor de iniciación de la traducción eucariota 2A o *EIF2A* y su forma fosforilada que es característica en la PSP, pero ninguno de ellos mostró una activación de la respuesta a las proteínas mal plegadas (UPR, por sus siglas en inglés), que se caracteriza por un incremento de *PERK*, el cual ha sido reportado en la PSP (Bruch et al., 2017).

Con respecto al uso de las iPSC, en la literatura hay tres reportes del uso de este modelo celular para estudiar la PSP, el de Shan Jiang et al. en 2018 (Jiang et al., 2018), y Carolina Alquezar et al. en 2020 (C. Alquezar et al., 2020), ambos reportaron el uso de neuronas obtenidas a través de iPSCs provenientes de un donante portador de la mutación p.R406W (Carolina Alquezar et al., 2020; Jiang et al., 2018). Jiang demostró la existencia de una gran correlación entre los genes expresados de manera diferencial en cerebros de pacientes con PSP, con los expresados diferencialmente en este modelo celular, por lo que propuso que el uso de estas neuronas inducidas podría ser utilizado para estudiar los mecanismos de esta enfermedad (Jiang et al., 2018). Por otro lado, Carolina Alquezar desarrolló un modelo toxicológico con la administración de dosis repetidas de Cromo y Níquel a estas células, donde encontró que estos metales incrementaron la muerte celular en las líneas con la mutación en comparación con controles isogénicos, así mismo, las líneas con la mutación tratadas con los metales también mostraron una gran afectación (en ambos casos incrementando la expresión y fosforilación de la proteína tau, y la actividad de la caspasa 3), sugiriendo que estos metales podrían estar altamente relacionados con el desarrollo de la PSP esporádica (C. Alquezar et al., 2020). Por otro lado, Angel Dizon en el 2016, estudió el uso posible de neuronas inducidas a partir de iPSCs con el SNP, rs242557 de *MAPT* asociado al subhaplotipo H1c, con el objetivo de proponer un modelo para el estudio de la PSP esporádica (Dizon, 2016). En dicho modelo se observó un aumento en los niveles de fosforilación de la proteína tau y se descubrió que la acumulación de esta

proteína podría estar relacionado con eventos postraduccionales y no como un aumento en su nivel de transcripción (Dizon, 2016).

2.2 iPSCs para el modelado de enfermedades neurodegenerativas

En la última década, las iPSCs han jugado un papel importante en el estudio y desarrollo de fármacos dirigidos contra enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (EA), la EP, y la enfermedad de Huntington (EH) (Schöndorf et al., 2014; Tcw, 2019; Zhang et al., 2016). Esto se debe a que, al ser obtenidas de pacientes con estas enfermedades, las iPSCs proporcionan una fuente de neuronas y células gliales que portan las mismas variantes genéticas o las mismas mutaciones asociadas con las patologías (Slanzi et al., 2020). El protocolo de obtención de neuronas y células gliales a partir de iPSCs más utilizado es el de la inhibición dual de la proteína supresora de las madres contra la decapentaplejia o *SMAD* (Chambers et al., 2009), el cual consiste en usar los inhibidores antagonista de la proteína morfogénica ósea o *Noggin*, y el fármaco inhibidor de TGF- β *SB431542*, lo que conduce a una rápida diferenciación de las iPSCs (más del 80%) a una población de células troncales neurales (CTN). Estas células pueden ser inducidas a neurogénesis o gliogénesis dependiendo lo que se requiera (Chang et al., 2020).

De acuerdo con lo reportado en los modelos celulares de PSP, el uso de neuronas diferenciadas con la mutación R406W replican la patología de tau observada en los cerebros de pacientes con PSP (C. Alquezar et al., 2020; Jiang et al., 2018). Tomando como ejemplo otras enfermedades, se ha reportado que las iPSCs que presentan mutaciones asociadas a la EA, generalmente exhiben una producción elevada del péptido Amiloide- β (A β) y agregados de la proteína tau (Israel et al., 2012; Penney et al., 2020); mientras que las iPSCs que presentan mutaciones asociadas a la EP, se les ha observado acumulación de la proteína α -sinucleína (Ke et al., 2019).

En el caso de enfermedades esporádicas, el poder generar el fenotipo asociado a la enfermedad sigue siendo todo un reto. Esto se debe en gran parte a que las causas son variadas, entre ellas encontramos el riesgo genético, mecanismos epigenéticos, envejecimiento y factores ambientales, lo que dificulta su recapitulación en cultivo celular (Chang et al., 2020). A pesar de esto, existen trabajos que han replicado con éxito algunos

de los fenotipos de las patologías esporádicas. Por ejemplo, hasta el día de hoy solo Dizon ha reportado el uso de neuronas y células gliales diferenciadas de iPSCs de pacientes con diagnóstico de PSP esporádico, observando un aumento en la fosforilación y acumulación de la proteína tau dentro de ellas (Dizon, 2016). Esto también ha sido posible en otras enfermedades neurodegenerativas esporádicas, como por ejemplo en la EA, donde se ha observado que las neuronas diferenciadas de algunos pacientes muestran niveles significativamente altos de péptido A β , fosforilación de tau y actividad de la GSK3 β (Israel et al., 2012); y también en casos esporádicos de la EP, donde las neuronas diferenciadas muestran un aumento en la acumulación de la α -sinucleína (Laperle et al., 2020). Esto implica que el uso de neuronas inducidas de iPSCs provenientes de pacientes con enfermedades esporádicas pueden replicar algunos aspectos de la patología de dichas enfermedades.

Se ha reportado que el uso de células precursoras neurales (CPNs), células con linaje neural, capaces de diferenciarse hacia los tres linajes del SNC (neuronas, astrocitos u oligodendrocitos), pueden reflejar estadios tempranos de la enfermedad (Sproul et al., 2014). Esto no se ha descrito todavía para la PSP, pero sí para otras enfermedades neurodegenerativas; por ejemplo, Ivan Vlasov en un análisis transcriptómico descubrió que en CPNs provenientes de gemelos monocigóticos con la EP esporádica, había diferencias en la expresión de genes asociados a la neurogénesis y diferenciación con respecto a gemelos monocigóticos no afectados (Vlasov et al., 2021). Además, Katharina Meyer encontró la desregulación de genes asociados a la neurogénesis y la diferenciación neural en las CPNs de pacientes con la EA esporádica (Meyer et al., 2019). En ambos casos, se sugiere que perturbaciones en el desarrollo, como la afectación en la formación de circuitos, ocurren en estadios tempranos causando una predisposición a la enfermedad (Meyer et al., 2019; Sproul et al., 2014; Vlasov et al., 2021).

2.3 Análisis transcriptómico

El transcriptoma es definido como el conjunto de moléculas de ARN mensajero (ARNm) generado por una célula o población de células (Ham & Lee, 2020), el cual brinda información representativa del estado celular o de la población de células. Debido a esto, se asume que los cambios en los perfiles de expresión génica dentro de las neuronas o células gliales afectadas, pueden proporcionar información relevante acerca de las posibles

causas y consecuencias del inicio y progresión de una enfermedad neurodegenerativa, así como también ser utilizado para clasificarlas (Courtney et al., 2010). Actualmente, existen dos maneras de obtener la información del transcriptoma, la de mayor uso es la secuenciación masiva de transcriptomas completos (RNA-seq) mientras que la de menor uso son los microarreglos (Blumenberg, 2019), ambos representados en la Figura 7.

El RNA-seq, consiste en la extracción del ARN total, el cual será copiado a ADN complementario (ADNc) para la creación de una librería. La librería de ADNc es fragmentada y ligada a adaptadores, los que de manera subsecuente serán amplificados y secuenciados para obtener las lecturas de estas secuencias cortas después. Estas secuencias cortas serán alineadas a un genoma de referencia para identificar que genes están siendo transcritos (Blumenberg, 2019; Daniel et al., 2015). Por otro lado, el microarreglo consiste en el uso sondas de oligonucleótidos complementarios las cuales se hibridarán con secuencias blanco en un sustrato sólido. Previamente los transcritos de ARN son convertidos a ADNc y luego etiquetados de manera fluorescentemente para finalmente hibridarse a los microarreglos y luego ser escaneados con un láser (Courtney et al., 2010), la intensidad de la señal es usada para determinar la abundancia de los transcritos, lo que al final permite obtener el perfil de expresión génica (Courtney et al., 2010; Daniel et al., 2015). El RNA-seq presenta ciertas ventajas sobre el microarreglo, entre ellas encontramos que tiene una mayor sensibilidad para los genes expresados a niveles muy bajos o altos; así como también puede revelar información sobre cortes y empalmes alternativos y expresión alélica específica, así como la posible detección de un mayor número de transcritos, pues no está limitado a la presencia de las sondas preseleccionadas de transcritos conocidos utilizadas en los microarreglos. (Daniel et al., 2015).

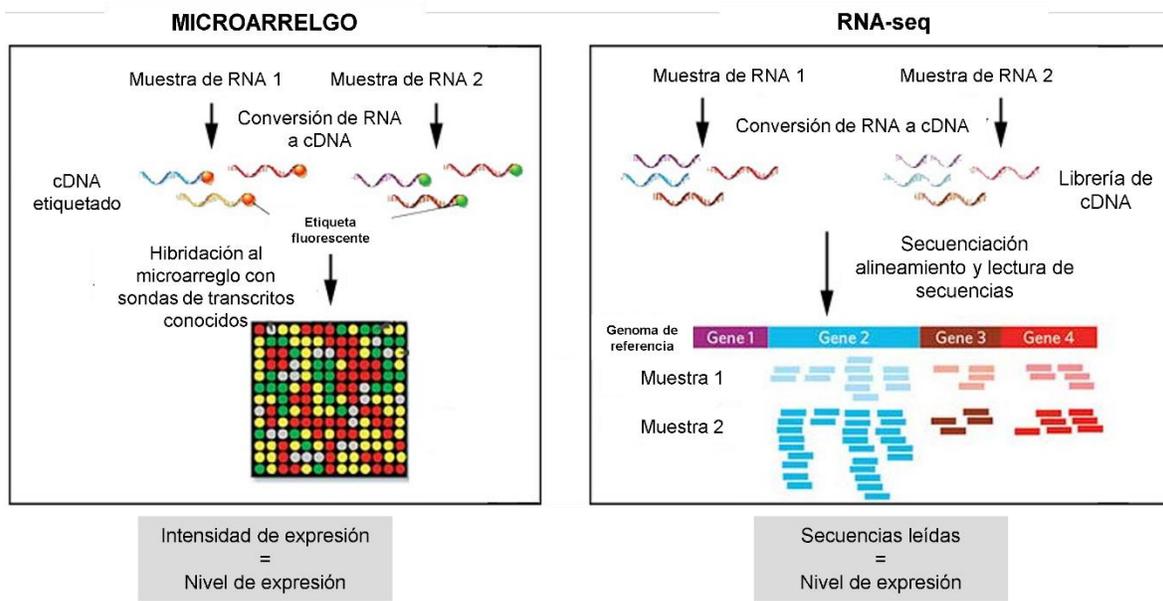


Figura 7. Métodos de obtención de datos transcriptómicos. Esquematación de los dos principales métodos de obtener un perfil transcriptómico, a la izquierda el microarreglo y a la derecha la secuenciación masiva de transcriptomas completos (RNA-seq). Modificado de: [https:// www.otogenetics.com/ rna-sequencing-vs-microarray/](https://www.otogenetics.com/rna-sequencing-vs-microarray/).

2.4 Datos transcriptómicos reportados en PSP

En la PSP se han realizado distintos análisis transcriptómicos, la mayoría de ellos a partir de tejido de cerebro postmortem. El uso de este tejido conlleva ciertas limitaciones, dado que solo nos permite observar cambios transcriptómicos en estadios avanzados de la enfermedad, y que el ARNm puede sufrir procesos de degradación (Bonadio et al., 2021). Sin embargo, en la literatura, podemos encontrar algunos análisis, como el que se llevó a cabo con microarreglos por parte del grupo de Iraad Bronner, en dicho análisis se encontró que el perfil de expresión génica en el lóbulo medial temporal (LMT), es diferente al de individuos control respecto al de pacientes con enfermedades neurodegenerativas; además, se mostró una expresión a la alta de la proteína Forkhead Box O3 y la O1, o *FOXO3* y *FOXO1*, como un factor común en distintas enfermedades neurodegenerativas (Bronner et al., 2009). Por otro lado, el uso de RNA-seq ha sido más amplio, entre los reportes que señalan el uso de esta técnica se encuentra el trabajo de Xue Wang, y el de Lucas Carvalho, cuyos resultados mostraron una alteración en los transcritos de la red de mielinización y de procesos de transmisión sináptica en corteza temporal y en cerebelo (Iohan et al., 2022;

Wang et al., 2021). El trabajo de Marriet Allen, también reportó una correlación entre la patología de tau y la desregulación de genes implicados en la sinapsis en la corteza temporal (M. Allen, X. Wang, D. J. Serie, et al., 2018); mientras que Jennifer Yokoyama y colaboradores, encontraron genes relacionados a las vías del neurodesarrollo que se veían afectados en diferentes regiones del cerebro de pacientes con PSP (Yokoyama et al., 2017). En este sentido, el grupo de Talisa Silzer evaluó el tejido cerebelar proveniente de pacientes con PSP cuyos resultados revelaron cambios en la metilación afectando la expresión de genes de daño y reparación del ADN y procesos relacionados con ARN (T. K. Silzer et al., 2020). Finalmente, la información obtenida del modelo de iPSCs con la mutación R406W, mostró una desregulación de genes involucrados en la función sináptica, así como de receptores GABA (Jiang et al., 2018).

El presente trabajo tuvo como objetivo analizar datos transcriptómicos de libre acceso del LMT provenientes de pacientes con PSP, y encontrar posibles procesos desregulados o genes de interés. Posteriormente, se buscó replicar estos resultados a nivel transcriptómico en líneas CPNs provenientes de pacientes con PSP, para evaluar su potencial para replicar la enfermedad a nivel transcriptómico. Los resultados encontrados proponen 54 genes de interés asociados al procesamiento del ARNm, mielinización, el sistema de endomembranas, y procesos metabólicos de proteínas como posibles genes asociados a la patología de PSP, así como de la implicación de *FOXO3* en la desregulación de genes en el LMT de pacientes con PSP. En cuanto a las líneas de CPNs, se logró establecer la línea GIH-131-C1 proveniente de un paciente diagnosticado con PSP esporádico y la línea F12436.3 de un paciente sano. Se detectó que los DEGs en la línea GIH-131-C1 estaban relacionados a la estructura sináptica, neurodesarrollo y sistema de endomembrana, pero mostró una baja correlación a nivel transcriptómico con el LMT de pacientes con PSP, lo que nos indica una baja similitud de este tipo celular, con lo ocurrido en el LMT de pacientes con PSP.

3. JUSTIFICACIÓN

La PSP es una enfermedad neurodegenerativa esporádica poco común que a pesar de que algunos estudios se han centrado en la identificación de variantes genómicas como factores de riesgo y en los mecanismos patológicos asociados a la PSP, la información generada no ha sido la suficiente para entender dicha enfermedad. Además, hasta el momento existen pocos modelos que permiten estudiarla, lo que dificulta un diagnóstico oportuno y un tratamiento efectivo. Por este motivo, se propone realizar un análisis *in-silico*, a nivel transcriptómico, de las bases de datos de libre acceso obtenidas a partir de muestras de cerebro postmortem de pacientes con PSP, esperando encontrar genes de interés o procesos desregulados implicados en la patología. Una vez identificados aquellos genes o procesos asociados a la enfermedad, se buscarán replicar, a partir del análisis de datos transcriptómicos generados como parte del presente trabajo y el uso de tecnología RNA-seq, en una línea de CPN derivadas de pacientes con PSP esporádico y así evaluar su potencial uso como modelo de la enfermedad.

4. HIPÓTESIS

Se identificarán procesos desregulados y genes de interés asociados a PSP, a partir del análisis *in-silico* de bases de datos de libre acceso, y se podrán replicar en un modelo de CPNs derivadas de pacientes con PSP esporádico.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Encontrar procesos moleculares y genes de interés involucrados en la PSP a través de un análisis transcriptómico *in-silico*, y su replicación en un modelo celular de la enfermedad.

5.2 Objetivos Particulares

- Identificar los genes expresados de manera diferencial y los módulos de genes en el cerebro de pacientes con la PSP utilizando datos transcriptómicos.
- Identificar la regulación transcripcional de genes desregulados en PSP y encontrar posibles genes de interés asociados a la patología.
- Buscar los procesos moleculares desregulados y los genes de interés en datos transcriptómicos generados a partir de CPN obtenidas de pacientes con PSP.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL

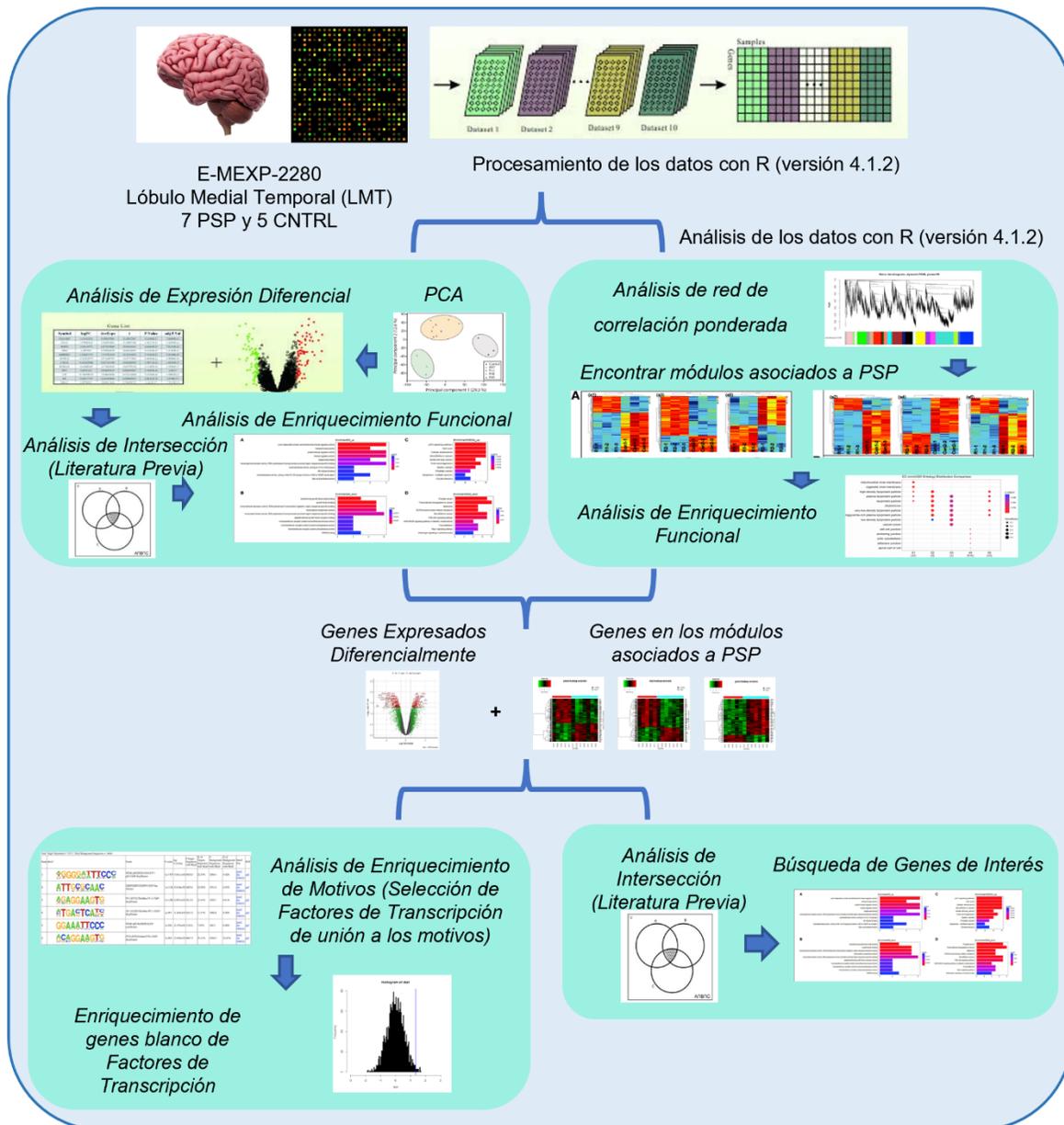


Figura 8. Primera sección del diseño experimental. En esta parte se utilizaron datos transcriptómicos de libre acceso provenientes del LMT pacientes confirmados con PSP. Los datos fueron procesados y analizados con el lenguaje de programación en R (versión 4.1.2) para detectar genes de interés y/o procesos desregulados asociados a la patología.

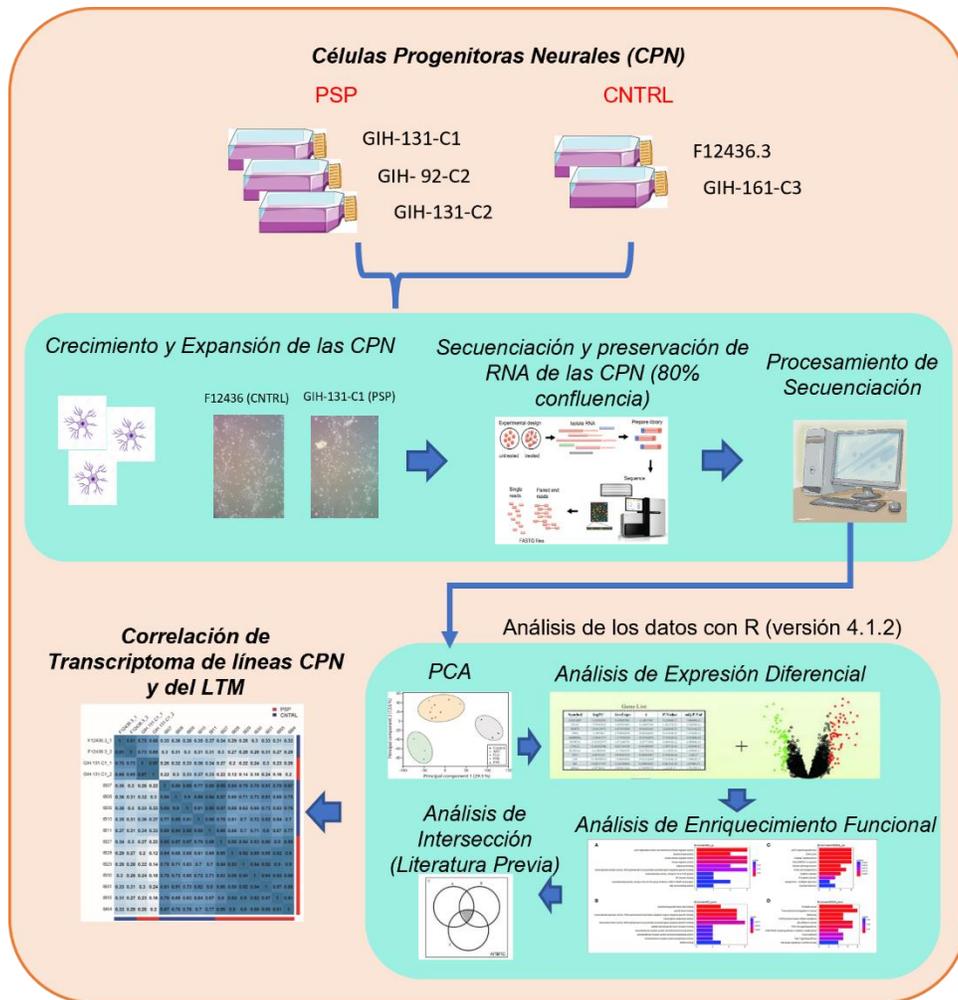


Figura 9. Segunda sección del diseño experimental. En esta parte se utilizaron líneas CPNs provenientes de pacientes confirmados con PSP. Las líneas que se expandieron y establecieron de manera exitosa en el laboratorio fueron secuenciadas. Posteriormente los datos transcriptómicos fueron analizados para detectar genes y/o procesos desregulados. Finalmente se evaluó la similitud de este modelo celular con lo observado en el LMT.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Procesamiento de los Microarreglos

Para el procesamiento de los microarreglos, así como los análisis *in silico* correspondientes al transcriptoma de cerebro, se utilizó el entorno y lenguaje de programación R (versión 4.1.2), el cual es uno de los lenguajes más utilizados para realizar bioinformática que se puede usar de forma libre y gratuita.

Se buscó una base de libre acceso en Gene Expression Omnibus (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) y Array Express (<https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>) que contuviera datos transcriptómicos de tejido de cerebro de pacientes con diagnóstico de PSP esporádico. Se escogió la base de datos E-MEXP-2280, que contiene datos del LMT de 7 sujetos confirmados con PSP y 5 controles sanos (CNTRL), características resumidas en la tabla 2, y que fueron leídos con un microarreglo Affymetrix y una plataforma hg-u133 plus 2.0 (Bronner et al., 2009).

Tabla 2. Descripción de las características de los donadores de tejido presentes en el microarreglo E-MEXP-2280 (todos los Individuos del estudio portaban la tau wt, sin mutaciones, tanto controles como pacientes PSP).

ID	Enfermedad	Haplotipo MAPT	Sexo	Edad	Duración de enfermedad
IB07	Sano	H1/ H1	Femenino	82 años	-
IB08	Sano	H1/ H1	Masculino	72 años	-
IB09	Sano	H1/ H1	Femenino	78 años	-
IB10	Sano	H1/ H1	Masculino	78 años	-
IB11	Sano	H1/ H2	Masculino	82 años	-
IB27	PSP	H1/ H1	Masculino	73 años	2 años
IB28	PSP	H1/ H1	Masculino	57 años	6 años
IB29	PSP	H1/ H1	Masculino	72 años	9 años
IB30	PSP	H1/ H1	Femenino	93 años	3 años
IB31	PSP	H1/ H1	Femenino	72 años	7 años
IB55	PSP	H1/ H1	Femenino	57 años	4 años
IB64	PSP	H1/ H1	Masculino	73 años	3 años

Se descargaron los datos crudos, y se procesaron con el paquete *affy*. Se utilizó el algoritmo *mas5* para la corrección de ruido de fondo, los datos se escalaron a 200 y se llevó a cabo un filtro para eliminar sondas ausentes con la función *mas5calls.AffyBatch*. Los datos se normalizaron por cuantiles y se transformaron a una escala logarítmica de base 2 para obtener los datos de expresión finales. Al final del procesamiento se evaluó que los datos presentaran una distribución Sano y una mediana similar entre todos los sujetos, para esto los datos se graficaron en un histograma y en cajas y bigotes.

7.2 Análisis de Expresión Diferencial

Antes de evaluar la presencia de genes expresados diferencialmente entre ambos grupos, se llevó a cabo un análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) con los datos procesados y usando la función *prcomp* del paquete *stats*. Este análisis dimensiona en dos componentes principales (PC1 y PC2) datos multivariados para poder visualizarlos gráficamente, y permite observar patrones de distribución de similitud y disimilitud entre las muestras de los grupos CNTRL y PSP.

Posteriormente se realizó el análisis de expresión diferencial (DEA, por sus siglas en inglés) a partir de los datos procesados usando el paquete *limma* de R. Este paquete ajusta un modelo de regresión lineal para cada gen presente en el microarreglo, obtiene la diferencia para cada gen entre los grupos, o cambio de expresión logarítmico ($\log_{2}FC$), contrastando los modelos lineales ajustados, y utiliza el enfoque empírico de bayes para obtener inferencias más estables (Smyth, 2004). El paquete *limma* también integra un análisis de Benjamini-Hochberg para corrección de múltiples pruebas (*adj.pval*), lo que reduce el número de falsos positivos significativos.

Los genes con un $\log_{2}FC > 0.5$ y una *adj.pval* < 0.05 , fueron considerados genes expresados diferencialmente (DEGs) a la alta; mientras tanto, los genes con un $\log_{2}FC < -0.5$ y un *adj.pval* < 0.05 se consideraron DEGs regulados a la baja. El corte de selección de los DEGs se graficó con un gráfico de volcano, y la expresión relativa de los DEGs se graficó con un mapa de calor.

7.3 Análisis de la Intersección con literatura previa

Con el fin de determinar si el DEA con los parámetros de selección de los DEGs (logFC) estaba proporcionándonos información relevante para la enfermedad, comparamos los DEGs del LMT de los pacientes con PSP (LMT DEGs) con información reportada en la literatura. Se buscó genes en común con el mismo patrón de expresión con la lista de DEGs publicados por Mariet Allen et al. en 2018 (TCX DEGs), datos provenientes de un análisis de secuenciación de ARN de la corteza temporal de sujetos confirmados con PSP (M. Allen, X. Wang, J. D. Burgess, et al., 2018). También genes en común con la lista PSP literatura, la cual contiene genes mapeados con SNP asociados a PSP, obtenida del catálogo GWAS ([http:// www.genome.gov/ gwastudies/](http://www.genome.gov/gwastudies/)) que se complementó con literatura sobre GWAS detectando posibles variantes genéticas no incluidas en este catálogo (Jabbari et al., 2021; Sanchez-Contreras et al., 2018; Zou et al., 2012), y que además contiene la lista de genes reportados asociados a esta patología en NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Para saber si el número de genes que se encontró en la intersección no era resultado del azar, se llevó a cabo un análisis de intersección de genes utilizando el paquete GeneOverlap R, el cual realiza la prueba exacta de Fisher para obtener la significancia de la intersección de genes en común, calculando cual frecuencia de determinados genes en común en ambas listas es mayor de lo que se esperaría por azar.

7.4 Análisis de red de correlación ponderada

Con el fin de enriquecer la búsqueda de procesos desregulados se procedió a realizar un análisis de red de correlación ponderada (WGCNA, por sus siglas en inglés), este es un análisis de redes basado en coeficientes de correlación ampliamente utilizado para encontrar módulos o *clústeres* de genes (Langfelder & Horvath, 2008). Este análisis agrupa los genes de manera jerárquica con base en la correlación ponderada, y de acuerdo con los parámetros preestablecidos, como el tipo de escala topológica, la potencia beta de la correlación y el número mínimo de genes por modulo.

Para este análisis agregamos un paso en el procesamiento de los datos crudos. Los datos preprocesados se filtraron eliminando sondas cuya expresión estaban por debajo de 200 en al menos 5 sujetos, luego, se seleccionaron la mitad de los genes con el coeficiente de variación más alto, y finalmente se seleccionó la mitad de los genes más interconectados usando la función *softConnectivity* del paquete WGCNA.

Estos genes se utilizaron para encontrar módulos de genes con el paquete WGCNA R mediante la construcción de una red topológica de escala libre sin signo (correlaciones positivas y negativas), con una potencia beta de 9 y un número mínimo de 150 genes por módulo. Para seleccionar los módulos de interés, se observó la expresión génica en las muestras dentro de cada módulo con mapas de calor y se seleccionaron los módulos que mostraban un patrón de expresión diferencial entre PSP y CNTRL.

7.5 Análisis de Enriquecimiento Funcional

Con el objetivo de observar si los LMT DEGs o los genes dentro de los módulos están asociados a alguna función biológica, se llevó a cabo un análisis de enriquecimiento funcional (FEA). Este análisis evalúa, a través de una prueba exacta de Fisher, si un conjunto de genes de interés, en comparación con un fondo o universo, está enriqueciendo o sobrerrepresentando algún término de ontología génica (GOt, por sus siglas en inglés), genes manualmente curados que están asociados a procesos biológicos (BP, por sus siglas en inglés), componente celular (CC) y función molecular (MF, por sus siglas en inglés). Por enriquecido, se hace referencia a que la frecuencia de presencia de un grupo de genes asociados a un GOt es mayor de lo que se esperaría por azar.

Para analizar el FEA de los DEGs expresados a la alta o a la baja, se usó el paquete topGO de R con el algoritmo weight01 y la prueba exacta de Fisher, usando como fondo la suma de todos los DEGs encontrados en el DEA. Además, se utilizó un filtro donde solo se consideró a los procesos enriquecidos, cuyos genes asociados fueran más del 60% de los genes anotados en el fondo asociados a ese mismo proceso; después los primeros 10 GOt que cumplieran esta condición para los BP, CC y MF fueron graficados.

En el caso del FEA de los genes agrupados en los módulos, primero separamos el grupo de genes regulados a la alta de los regulados a la baja de cada módulo usando la función *cutree* del paquete stats de R. Posteriormente, se utilizó la función *compareCluster* del paquete clusterProfiler de R con parámetros estándar y se eliminó los GOt enriquecidos con 5 o menos genes; después se compararon los 5 términos de GO más enriquecidos, para los BP, CC y MF en los genes regulados a la alta, y lo mismo para los regulados a la baja.

7.6 Análisis de enriquecimiento de motivos

Con el propósito de detectar TF que pudieran estar regulando la expresión de los genes en los módulos y en los DEGs detectados, se procedió a realizar un análisis de enriquecimiento de motivos (MEA, por sus siglas en inglés). Este análisis consiste en buscar el enriquecimiento de motivos de unión conocidos, en las regiones reguladores de un grupo de genes al ser comparado con un fondo genómico (Stojnić, 2020). El algoritmo del paquete PWMenrich de R calcula una afinidad promedio en un conjunto de secuencias de interés, y se compara con la afinidad promedio de las secuencias de longitud coincidente del fondo genómico (Stojnić, 2020).

Para esto se extrajo el grupo de genes regulados de manera positiva en cada módulo y se unieron a los DEGs regulados positivamente (DEGs+WGCNAup), los mismos se hizo para los genes regulados negativamente en módulos y los DEGs (DEGs+WGCNAdown). Posteriormente se obtuvo las 2kb río arriba del sitio de inicio de la transcripción (TSS, por sus siglas en inglés), estas secuencias fueron utilizadas para el MEA. Se construyó un fondo genómico utilizando la función *makeBackground* del paquete PWMenrich de R, usando los motivos de unión a TF presentes para el humano en el paquete JASPAR2020 de R y las 2kb río arriba del TSS de todos los genes presentes en el microarreglo procesado usando el paquete biomaRt de R.

Por separado se realizó el MEA para DEGs+WGCNAup y DEGs+WGCNAdown con la función *motifenrichment* del paquete PWMenrich de R, después se llevó a cabo un análisis de Benjamini-Hochberg como corrección de múltiples pruebas, y se seleccionaron los motivos enriquecidos que tenían un adj.P-Value < 0.01, un puntaje de motivo > 1, y una amplitud de enriquecimiento > 5%. Los TF que se unen a estos motivos enriquecidos fueron considerados posibles TF implicados en PSP.

7.7 Enriquecimiento de los genes blanco de los TF (TF-GT)

Con el fin de reducir aún más los posibles falsos positivos obtenidos del MEA, se decidió realizar un enriquecimiento de los genes blanco de los posibles TF (TF-TG, por sus siglas en inglés). Para esto se utilizó de datos proporcionados por Muley, V.Y. y König, R., quienes construyeron una red de regulación transcripcional basada en todas las regulaciones transcripcionales dispersa en la literatura, base de datos únicamente disponibles a petición

(Muley & König, 2022). Seleccionamos aquellos genes blancos (TG, por sus siglas en inglés) con un puntaje de confianza integradora (integrative confidence score en inglés) superior a 0,2 como se recomienda en ese trabajo.

Para el enriquecimiento de TF-TG, contamos la intersección (tamaño n) entre los TG de los posibles TF, y DEGs+WGCNAup o DEGs+WGCNAdown (tamaño N), dependiendo de si el TF estaba enriquecido en genes regulados a la alta o a la baja. Para cada posible TF, se generó una permutación aleatoria de tamaño N a partir de los genes del microarreglo y después se contó la intersección con los TG del posible TF; este paso fue repetido 99 999 veces para cada uno de los posibles TF, y con estos datos se creó una distribución nula del tamaño de la intersección de cada posible TF. Se calculó el valor p de una sola cola dividiendo el número de veces que la superposición fue mayor o igual a n y dividido por el número de repeticiones; y finalmente, se consideró que un TF-TG estaba enriquecido si el valor de $p < 0.01$.

7.8 Búsqueda de genes de interés

El siguiente paso es la búsqueda de genes de interés para la PSP. Con este propósito, se realizó nuevamente un análisis de intersección con literatura previa, donde se comparó la suma total de genes resultantes de ambos análisis (LMT DEGs+WGCNA), contra la lista de TCX DEGs y PSP literatura mencionadas en el punto 10.3, utilizando el paquete GeneOverlap R.

Después, se procedió a evaluar si los genes compartidos encontrados en los análisis de intersección están relacionados con algún proceso enriquecido encontrado con el FEA del punto 10.5 de los LMT DEGs y los módulos de genes. Los genes que formaban parte de algún GOt enriquecido fueron considerados como genes de interés para la patología.

7.9 Cultivo y Expansión de las Líneas Celulares

Se obtuvieron las CPNs a través del Tau Consortium del Neural Stem Cell Institute (www.neuralsci.org/tau), las líneas celulares recibidas se encuentran resumidas en la tabla 3. Las células fueron recibidas congeladas en medio de cultivo con 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), se descongelaron y sembraron sobre cajas T25 (TPP, Trasadingen, Suiza) preparadas con Geltrex (1:100 dilution) (Gibco, Waltham, Massachusetts, US), con medio

Neurobasal ([-]L-glutamina) (Gibco, Waltham, Massachusetts, US), suplementado con B-27 (50X) (Gibco, Waltham, Massachusetts, US), AAS (100X) (Gibco, Waltham, Massachusetts, US) y Glutamax (100X) (Gibco, Waltham, Massachusetts, US). Se adicionaron los factores de crecimiento bFGF (20 ng/ ml) (Peprotech, Waltham, Massachusetts, US), EGF (20 ng/ ml) (Peprotech, Waltham, Massachusetts, US) y LIF (10ng/ ml) (Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, US), para promover el crecimiento y la división celular. Una vez alcanzada la confluencia (80-100 %) se expandieron a una caja T75 y a otra T25. Para esto se utilizó Trypsin-Hank's Based (0.05 %) (PhoenixSongs Biologicals, Branford, United States) por 1 minuto y medio a 37°C. La actividad de la Tripsina se detuvo con Soybean Trypsin Inhibitor (0.025 %) (PhoenixSongs Biologicals, Branford, United States). Posteriormente se centrifugaron a 1 000 rpm, se retiró el sobrenadante y se sembraron para expandir en una caja de cultivo T25 y a otra T75 tratadas con Geltrex (TPP, Trasadingen, Suiza).

Tabla 3. Líneas celulares de CPN obtenidas del Tau Consortium (Todas estas líneas celulares portan la tau wt).

ID	Tau isoform	Fenotipo	Sexo
F12436.3	3R/ 4R	Sano	Masculino
GIH-161-C3	3R/ 4R	Sano	Femenino
GIH-131-C1	4R	PSP	Masculino
GIH-131-C2	4R	PSP	Masculino
GIH-92-C2	4R	PSP	Femenino

7.10 Preservación de ARNm

Una vez que se alcanzó la confluencia (80-100 %) en las cajas T25 y T75, se procedió a la preservación del ARNm. Para esto, la caja T75 se lavó una vez con buffer salino con glucosa (GBS), posteriormente se colocaron 7 ml de GBS y con un raspador de células se despegaron mecánicamente de la caja, recogieron y centrifugaron a 1000 rpm, se retiró el sobrenadante y resuspendió en RNAlater (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, United States). Finalmente, se almacenaron en crioviales con un enfriamiento escalonado de 4°C, después a -20°C y finalmente a -80°C.

7.11 *Secuenciación de ARN (RNA-seq)*

Una vez preservadas las muestras de ARNm, éstas fueron enviadas en hielo seco al Centro de Biotecnología FEMSA, Laboratorio TEC-Base del Tecnológico de Monterrey para el aislamiento del ARN, preparación de la librería y su secuenciación. A su llegada al laboratorio, las células se centrifugaron a 3000xg y resuspendieron en un amortiguador de lisis suplementado con 1% beta-mercaptoethanol (BME) y se extrajo el ARN usando RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). La concentración de ARN se midió con un kit de ensayo Qubit ARN HS (Invitrogen, Carlsbad, CA, United States), mientras que su pureza se midió con un NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE). Para evaluar la integridad del ARN, todas las muestras se analizaron con el Kit Agilent ARN 6000 Pico en un Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Las librerías se prepararon con TruSeq Stranded Total ARN Library Prep en un Ribo-Zero Gold (Illumina, San Diego CA, United States), se cuantificaron con kit de ensayo Qubit dsDNA HS (Invitrogen, Carlsbad, CA, United States), el tamaño de las librerías se analizó en un QSep 400 (BioOptic, New Taipei City, Taiwan), y la secuenciación se llevó a cabo en un NovaSeq 6000 usando una celda de flujo S1 en una configuración de lecturas pareadas a 110 pb.

7.12 *Procesamiento del RNA-seq*

Después de la secuenciación, se llevó a cabo la remoción de adaptadores y de bases de baja calidad de secuenciación (calidad 30) con el programa Trimmomatic, una herramienta utilizada en línea de comando. Posteriormente se llevó a cabo la alineación de las lecturas con el genoma hg36 como referencia usando el programa STAR, una herramienta de línea de comando. La cuantificación de las lecturas de los genes se realizó con SALMON, un programa de lenguaje de Python.

Una vez obtenido la lectura de los genes, los siguientes pasos se realizaron en el lenguaje de programación R (versión 4.1.2). Para realizar la normalización de los datos se utilizó el paquete DeSeq2 de R. Al final del procesamiento se evaluó que los datos presentaran una distribución Sano y una media similar entre todos los sujetos, para esto los datos se graficaron en un histograma y en cajas y bigotes.

7.13 Análisis del RNA-seq

Para los datos de RNA-seq, fue empleado el mismo flujo de análisis que se realizó en el microarreglo de cerebro, pero con unas ligeras diferencias. Se llevó a cabo un PCA con los datos procesados usando la función *prcomp* del paquete *stats*. En el DEA, a diferencia de los datos del microarreglo, se realizó utilizando el paquete *DeSeq2* de R; los genes con un $\log_{2}FC > 1.5$ y una $adj.pval < 0.05$, fueron considerados DEGs a la alta; mientras tanto, los genes con un $\log_{2}FC < -1.5$ y un $adj.pval < 0.05$ se consideraron DEGs regulados a la baja, y para determinar la funcionalidad de estos genes se realizó un FEA con los mismos parámetros reportados en el inciso 9.5.

Para evaluar si existía algún grado de similitud entre el transcriptoma del LMT de los sujetos con PSP y las líneas CPN, se llevó a cabo un análisis de correlación de Pearson. Para esto se utilizó la función *corr.test* del paquete *psych* de R, y la expresión de los DEGs obtenidos en las líneas CPNs (CPN DEGs) y los LMT DEGs+WGCNA, los resultados fueron graficados en un mapa de calor con el valor de R para cada una de las combinaciones entre líneas CPNs e individuos.

Por último, con el objetivo de buscar otra posible relación con la patología, se decidió buscar la desregulación de genes asociados a la patología. Para esto se evaluó la intersección de los CPN DEGs con la lista de genes PSP literatura, reportada en el inciso 10.3.

8. RESULTADOS

8.1 Diferencias en el perfil transcriptómico del LMT entre los individuos con PSP y los CNTRL

Para analizar si existían diferencias a nivel transcriptómico en la PSP con respecto a los sujetos sanos, descargamos y procesamos datos crudos de un análisis de microarreglos de libre acceso. Los datos procesados mostraron una distribución Sano en su nivel de expresión y una mediana similar en todas las muestras, esto indica que los datos son adecuados para su posterior análisis estadístico como podemos observar en el histograma, y el diagrama de cajas y bigotes, Figura 10 inciso (a) y (b). Posteriormente, se realizó un PCA, este nos permite entender patrones de similitud entre las muestras usando múltiples variables. En el resultado del PCA, presente en la Figura 10 inciso (c), podemos observar que en el eje del componente principal 1 (PC1) los sujetos con PSP se agrupan a la izquierda de los sujetos CNTRL; y que, además, este componente explica (representa) el 23.96% de la varianza total de los genes en el microarreglo, lo que nos indican que ambos grupos si presentan una diferencia entre sus perfiles transcripcionales.

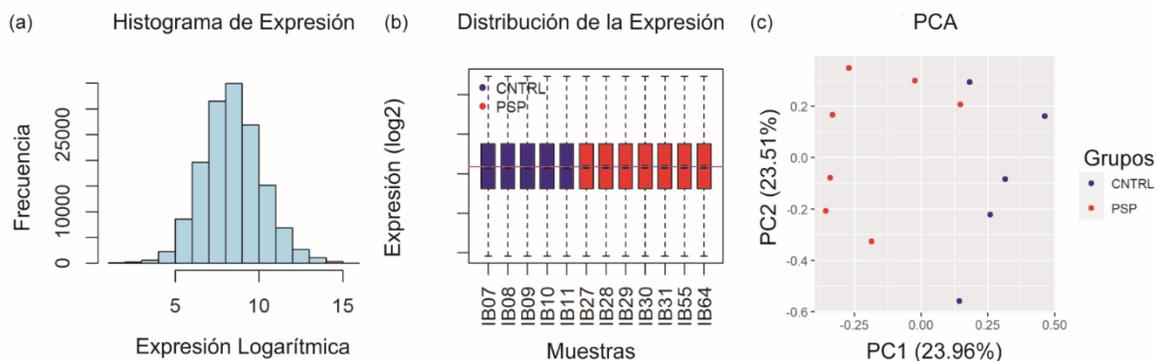


Figura 10. Procesamiento de los datos del microarreglo E-MEXP-2280. (a) Histograma de distribución de la expresión en escala de logarítmica de los datos procesados; (b) Diagrama de Tukey con distribución de los valores de expresión en escala logarítmica de cada sujeto de ambos grupos; (c) Análisis de componentes principales (PCA) de los datos procesados; Muestras Control (CNTRL) y de Parálisis Supranuclear Progresiva (PSP); CNTRL (azul) y PSP (rojo); Componente principal 1 (PC1); componente principal 2 (PC2).

Para evaluar las diferencias en el perfil transcripcional de los grupos, se hizo un DEA. Este análisis, el cual se puede visualizar en la Figura 11 inciso (a), reveló la presencia

de 640 DEGs en el fenotipo de los sujetos con PSP al ser comparado con los sujetos CNTRL, con 258 DEG regulados a la alta y 382 regulados a la baja (puntos color rojo). La expresión de los 640 LMT DEGs en cada uno de los individuos se puede observar en el mapa de calor, Figura 11 inciso (b), donde claramente se pueden distinguir cómo los genes expresados a la alta en un grupo se encuentran a la baja en el otro, y viceversa.

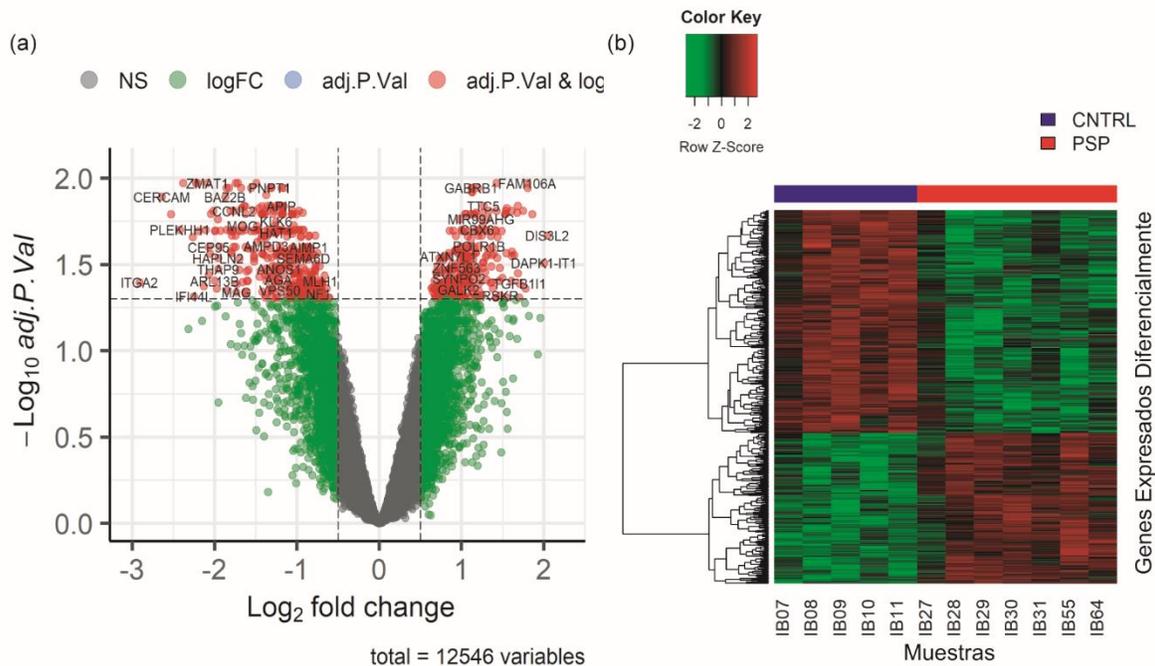


Figura 11. DEGs en el LMT de los individuos PSP vs. CNTRL. (a) Gráfico de volcán de la dispersión de los genes expresados diferencialmente (DEG) a la alta y a la baja en los pacientes confirmados con PSP. No significativo (NS); (b) mapa de calor con la expresión en escala logarítmica de los DEGs, genes expresados a la alta en color rojo, y a la baja en color verde; sujetos CNTRL (azul) y PSP (rojo).

Posteriormente, se procedió a evaluar si los LMT DEGs reflejados en el microarreglo (Microarray) para el fenotipo PSP, presentaba similitudes con la literatura publicada. Para eso se buscaron los genes en común con la lista de TCX DEGs publicada por Mariet Allen et al. en 2018 (TCX DEGs) (M. Allen, X. Wang, J. D. Burgess, et al., 2018), y con PSP literatura, la lista de genes con SNP asociados a PSP y los reportados en el NCBI para la patología. En este análisis de intersección, que podemos observar en la Figura 12,

encontramos una superposición significativa de 59 genes (valor de $p = 5.6e-13$) con el mismo patrón de expresión en ambos transcriptomas, y también se encontraron 4 genes en común con los reportados asociados a PSP en la literatura. Se puede observar a *SLCO1A2* como el único gen presente tanto en las tres listas con una expresión a la baja. La presencia de genes compartidos en ambos transcriptomas de PSP, y de la expresión alterada de *SLCO1A2*, nos sugiere que las diferencias que estamos observando a nivel transcriptómico pueden estar reflejando algunos aspectos patológicos asociados a PSP; además, nos ayuda a justificar el corte realizado con el logFC de 0.5.

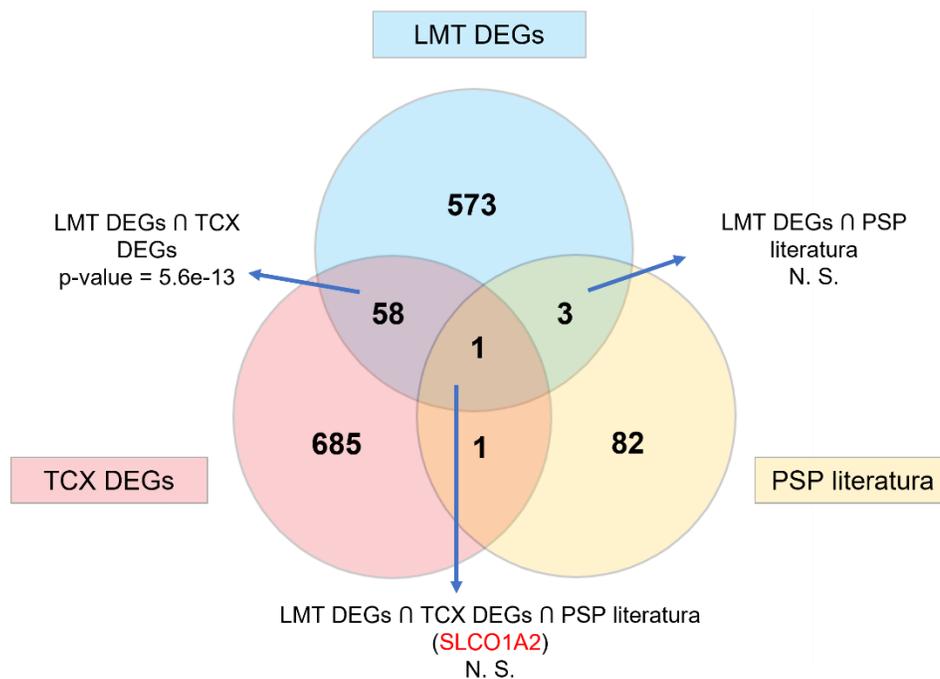


Figura 12. Genes compartidos entre los LMT DEGs de pacientes con PSP, con genes reportados para PSP en la literatura. Diagrama de Venn que muestra la intersección entre genes expresados diferencialmente (DEGs) que obtuvimos del análisis de expresión diferencial del lóbulo medial temporal para el fenotipo PSP (LMT DEGs); los genes expresados diferencialmente reportados anteriormente en corteza temporal para PSP (TCX DEGs); así como la lista de genes asociados a PSP (PSP literatura); Intersección (\cap). No significativo (N.S.).

A continuación, buscamos determinar si los 640 LMT DEGs están sobrerrepresentando alguna vía o función biológica específica y para ello llevamos a cabo

un FEA. En este análisis se observó que los LMT DEGs regulados a la alta, Figura 13 inciso (a), (b), (c), estaban enriquecidos para los procesos de regulación de la transcripción y estructura de la sinapsis. Mientras que los regulados a la baja, Figura 13 inciso (d), (e), (f), están enriquecidos para el sistema de endomembranas, procesos catabólicos y síntesis de proteínas, así como procesamiento de ARNm y migración de leucocitos.

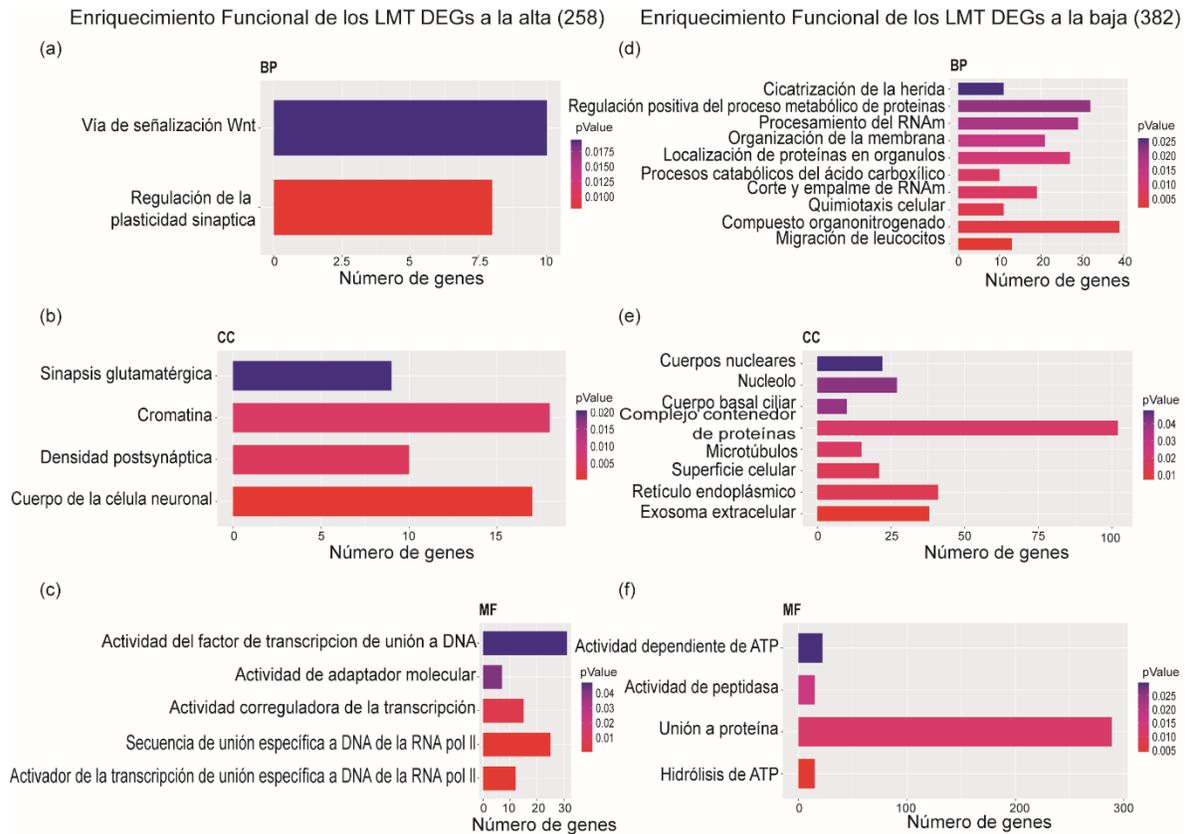


Figura 13. GOt enriquecidos en los LMT DEGs de los pacientes con PSP. Procesos Biológicos (BP), Componente Celular (CC), y Función Molecular (MF) con un p-value<0.05 enriquecidos en los 258 DEGs a la alta (a-c), y enriquecidos en los 382 DEGs a la baja (c-d). Escala de color represente el p-value; eje x muestra el número de genes en cada uno de los GOt.

8.2 Módulos de genes asociados a PSP

Para enriquecer la búsqueda de genes y procesos desregulados en PSP realizamos el WGCNA. El dendrograma, que se puede apreciar en la Figura 14 inciso (a), agrupó seis módulos de genes con una distancia entre los módulos (*altura*) que varía de 0,9 a 0,6. Entre ellos, tres módulos, el módulo azul con 419 genes, el módulo amarillo con 355 y el módulo verde con 162, mostraron un patrón de expresión distintivo en el que los genes con una expresión a la baja en sujetos con PSP estaban a la alta en sujetos CNTRL y viceversa, esto se puede apreciar en los mapas de calor, Figura 14 inciso (b), (c) y (d), que contiene la expresión de los genes de cada uno de los módulos.

Como se mencionó, cada módulo puede estar reflejando genes involucrados a algún proceso celular en común, por lo que se procedió a determinar si los genes de cada módulo estaban enriquecidos para algún proceso biológico específico. Con este fin, se decidió extraer los genes regulados a la alta y a la baja para para cada módulo y luego comparar su FEA.

Para los genes regulados a la alta, que se pueden observar en la Figura 15 inciso (a), (b) y (c); en el módulo azul no se encontró algún tipo de proceso enriquecido en lo particular. El módulo amarillo se observó asociado a la estructura, actividad y regulación de la sinapsis. Mientras que el módulo verde muestra genes asociados a dos procesos de la regulación de la traducción. En el FEA de los genes regulados a la baja, que se pueden observar en la Figura 16 inciso (a), (b) y (c); en el módulo azul, se encontró asociado con la mielinización; en el módulo amarillo se observó enriquecido con el citoesqueleto y estructuras de adhesión; mientras que el módulo verde no mostró ningún proceso enriquecido. Hasta este punto, los genes agrupados en el módulo azul a la alta parecen estar enriquecidos en procesos como los observados en los DEGs a la alta, mientras que los genes agrupados en los módulos a la baja están enriqueciendo procesos diferentes observados en los DEGs a la baja.

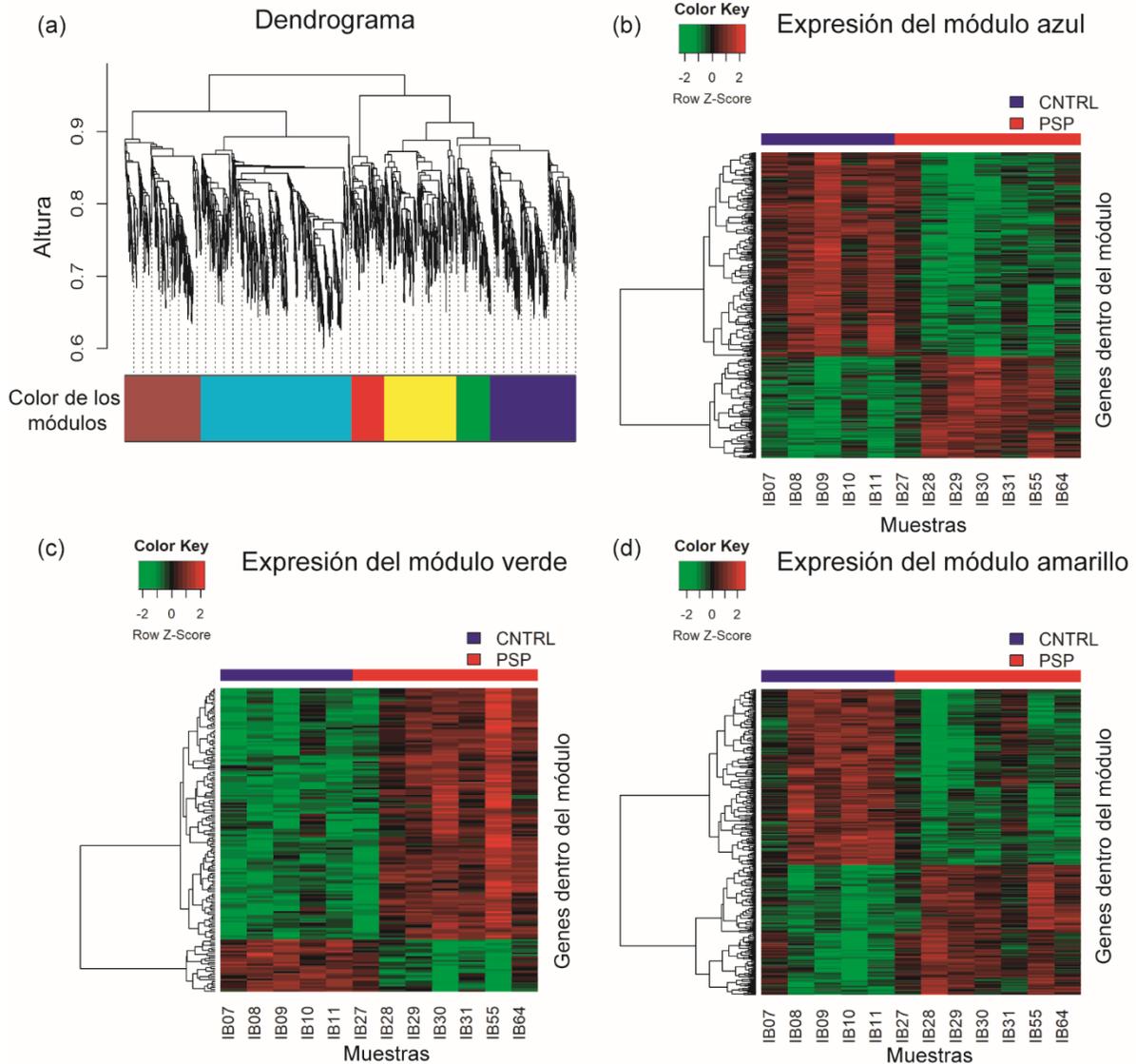


Figura 14. Módulos de genes agrupados en el WGNCA. (a) Dendrograma de los seis módulos construidos por la red de topología de escala libre. (b) Mapa de calor de la expresión de los genes agrupados en el módulo azul; (c) Mapa de calor de expresión de los genes agrupados en el módulo amarillo; (d) Mapa de calor de expresión de los genes agrupados en el módulo verde; Parálisis supranuclear progresiva (PSP); Control (CNTRL); Muestras CNTRL en azul y muestras PSP en rojo; distancia entre los módulos (altura).

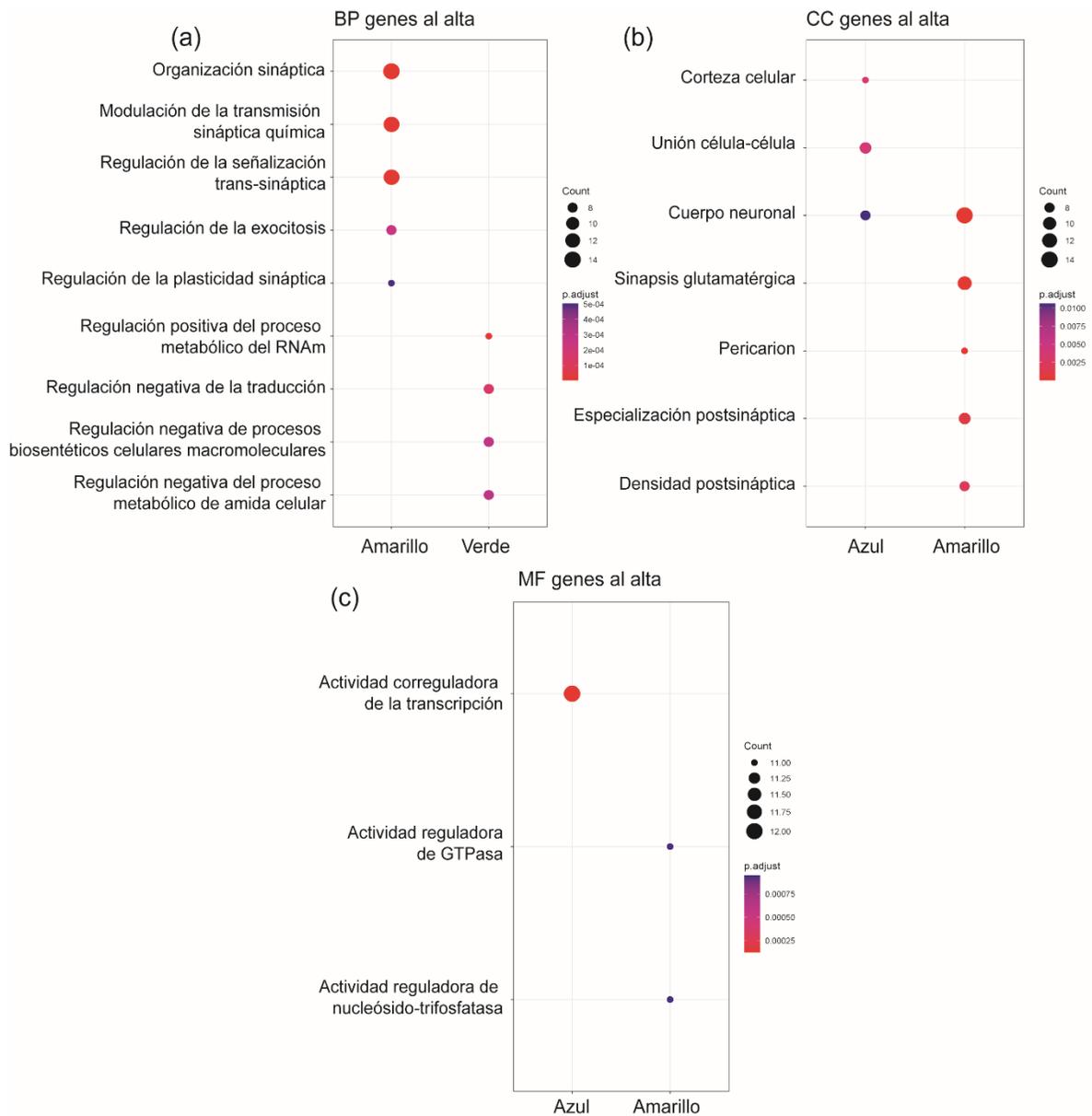


Figura 15. GOt enriquecidos en los genes a la alta de los módulos Azul, Verde y Amarillo. Gráficos de puntos de los términos de ontología genética (GO) enriquecidos y con un p-value < 0,05 para procesos biológicos (BP), componente celular (CC) y función molecular (MF) en los genes regulados a la alta dentro de los módulos azul, amarillo y verde (a-c). Porcentaje total de genes en cada término GO (GeneRatio); la escala de colores representa el p-value.

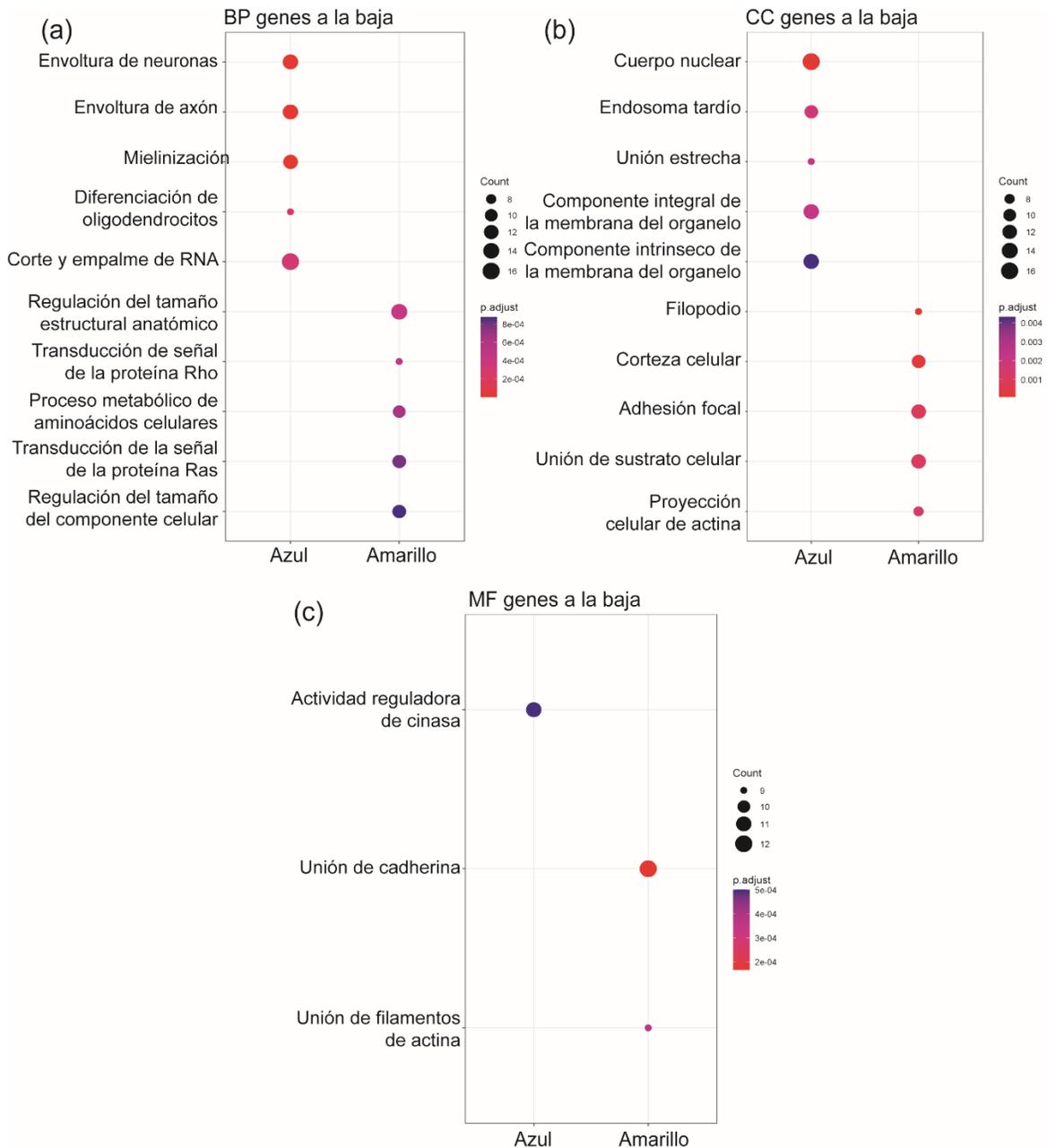


Figura 16. GOt enriquecidos en los genes a la baja de los módulos Azul, Verde y Amarillo. Gráficos de puntos de los términos de ontología genética (GO) enriquecidos y con un p-value < 0,05 para procesos biológicos (BP), componente celular (CC) y función molecular (MF) en los genes regulados a la baja dentro de los módulos azul, amarillo y verde (a-c). Porcentaje total de genes en cada término GO (GeneRatio); la escala de colores representa el p-value.

8.3 Regulación transcripcional de los DEGs y los módulos de genes

Dado que los TF regulan la expresión génica, decidimos encontrar aquellos posibles TF clave que causen la desregulación de los DEGs y módulos genéticos en el LMT de los pacientes con PSP; para ello, fusionamos los LMT DEGs y WGCNA (LMT DEGs+WGCNA). Después de la fusión, obtuvimos 1167 genes, con 513 regulados positivamente (DEGs+WGCNAup), y 654 genes regulados negativamente (DEGs+WGCNA down).

Para descubrir posibles TF (pTF) asociados a los genes desregulados llevamos a cabo un MEA para la región de 2 kb río arriba de LMT DEGs+WGCNAup, y de igual manera para los LMT DEGs+WGCNA down. Como resultado, encontramos 53 motivos de unión enriquecidos en los genes regulados a la alza y 159 motivos de unión enriquecidos en los genes regulados a la baja, a todos los TF con unión a estos motivos enriquecidos los consideramos como pTF. El top 15 de motivos enriquecidos en ambos MEA se puede observar en la tabla 1 y la tabla 2 del material suplementario, sección de anexos.

Posteriormente, con el fin de determinar si algunos de ellos realmente regulan la expresión génica en PSP, buscamos el enriquecimiento de sus TG en DEGs+WGCNAup, y de igual manera para los DEGs+WGCNA down. De todos los pTF, siete mostraron un enriquecimiento significativo de sus TG; dos de ellos la proteína caudal homeobox *CDX4* y el gen conmutador del sexo *SRY* están enriquecidos en los DEGs+WGCNAup; mientras que la proteína caudal homeobox *CDX2*, forkhead box O3 o *FOXO3*, proteína P3 de la Forkhead box *FOXP3*, POU Class 3 Homeobox 2 *POU3F2* y Factor de transcripción de dominio TEA 4 o *TEAD4* están enriquecidos en DEGs+WGCNA down (Figura 17 a y b). Más aún, considerando que la expresión de novo de TF es uno de los posibles mecanismos reguladores de la expresión génica, se buscó la expresión diferencial de los 7 TF. Se encontró que *FOXO3*, estaba regulado a la alza en el LMT de pacientes con PSP (valor de $p = 0,004$) (Figura 17 c), lo que el incremento de su expresión podría estar asociado a la patología.

(a) TF-TG enriquecidos en DEGs+WGCNAup

TF	IQ	IQ prom.	P-value
CDX4	23	12.8	0.00519
SRY	110	84.6	0.00189

(b) TF-TG enriquecidos en DEGs+WGCNAdown

TF	IQ	IQ prom.	P-value
CDX2	122	99	0.00705
FOXO3	165	122.4	0.00001
FOXP3	251	207.3	0.00014
POU3F2	83	55.7	0.00028
TEAD4	106	79.2	0.00081

(c)

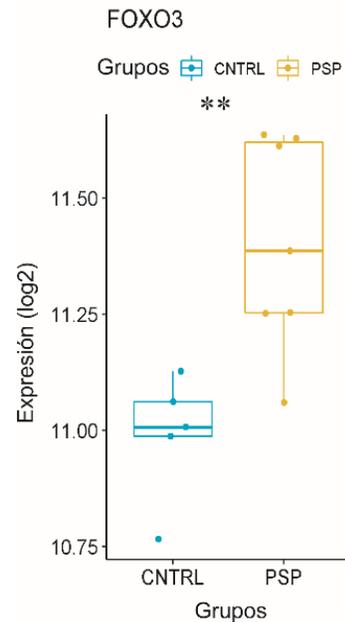


Figura 17. TFs enriquecidos en LMT DEGs+WGCNA. (a) Tabla de genes blanco de factores de transcripción (TF-TG) enriquecidos significativamente en DEGs+WGCNAup; (b) Tabla de TF-TG enriquecidos significativamente en DEGs+WGCNAdown; (c) diagrama de caja de la expresión de *FOXO3* (escala logarítmica 2) en muestras controles (CNTRL) y con parálisis supranuclear progresiva (PSP). Factores de transcripción (TF); Cuantificación de intersección (IQ); promedio de la IQ en las permutaciones aleatorias (IQ prom) p-valor < 0,01 (**).

8.4 Genes de interés para la PSP

Para encontrar posibles genes de interés asociados con la PSP, decidimos utilizar la lista de genes LMT DEGs+WGCNA y realizar otro análisis de superposición con TCX DEGs y los PSP literatura. En comparación con el análisis de superposición anterior, detectamos 91 genes en la intersección con TCX DEGs (valor $p = 8e-12$) y 5 genes en común con la lista PSP literatura, con *SLCO1A2* y *MOBP* siendo los únicos GWAS asociados con la enfermedad (Figura 18). Posteriormente evaluamos si algunos de estos 91 genes están asociados con alguno de los procesos enriquecidos en los análisis previos (FEA de los DEGs, y DEA de los genes en los módulos). Encontramos que 54 genes participaban en procesos encontrados enriquecidos previamente, los cuales se considerarán genes de interés (tabla 4). De entre ellos, podemos resaltar la presencia de 5 genes implicados en el corte y empalme del ARNm (*SF3B1*, *RBM5*, *DDX17*, *METTL3*, y *PPWD1*), 4 implicados en

la mielinización (*ASPA*, *KLK6*, *MAG*, y *TMEM98*), otros asociados con el catabolismo y síntesis de proteínas: 3 genes asociados a procesos catabólicos del ácido carboxílico (*ASPA*, *ENOSF1*, y *CSAD*), 6 genes con regulación positiva del proceso catabólico y síntesis de proteínas celulares (*CAPN3*, *ERBB3*, *PSME4*, *CDK5RAP3*, *METTL3*, y *RPS6KB1*), y 3 genes con actividad de peptidasa (*CAPN3*, *KLK6*, y *CNDP1*); por último también encontramos genes asociados al sistema de endomembranas: endosoma tardío (*TF*, *BACE1*, y *ABCA5*) y retículo endoplásmico (*CERCAM*, *COL4A5*, y *KLK6*).

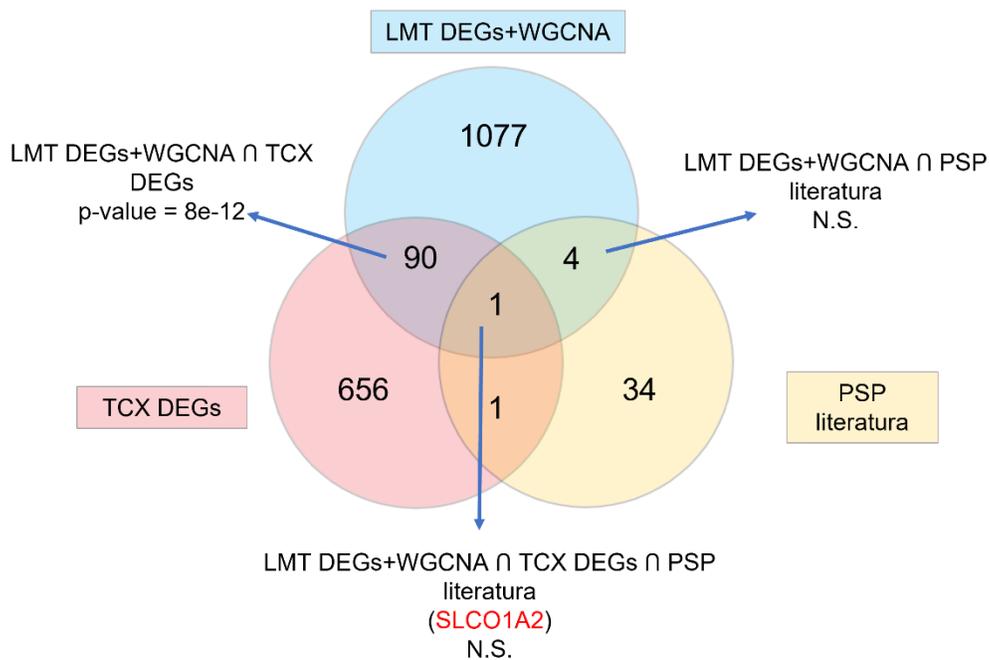


Figura 18. Genes compartidos entre los LMT DEGs+WGCNA de pacientes con PSP, con genes reportados para PSP en la literatura. Diagrama de Venn que muestra la intersección entre los DEGs y los WGCNA del LMT (LMT DEGs+WGCNA) y los genes expresados diferencialmente reportados en la literatura (TCX DEGs), así como la lista de genes de riesgo y previamente asociados a PSP (PSP literatura); Intersección (\cap). No significativo (N.S).

Tabla 4.- Genes relacionados con algún termino de ontología génica (GOt) enriquecidos en el DEA y en el WGCNA

GOt	Genes
Vía de señalización wnt	<i>DAB2IP</i>
Cuerpo neuronal	<i>DAB2IP</i>
Región cis-reguladora de la ARN pol II	<i>ZNF160</i>
Actividad de adaptador molecular	<i>DAB2IP</i>
Actividad de factor de transcripción de unión a ADN	<i>ZNF160</i>
Migración de leucocitos	<i>ROCK1</i>
Procesos catabólicos de compuestos organonitrogenados	<i>AMPD3/ CAPN3/ ASPA/ PSME4/ CDK5RAP3/ NUDT9/ ENOSF1/ CSAD/ ROCK1</i>
Corte y empalme de ARNm, via spliceosoma	<i>SF3B1/ RBM5/ DDX17/ METTL3/ PPWD1</i>
Procesos catabólicos del ácido carboxílico	<i>ASPA/ ENOSF1/ CSAD</i>
Localización de proteínas a organelos	<i>CDK5RAP3/ CCDC66/ CEP192/ RPAIN/ TARDBP</i>
Organización de la membrana	<i>TARDBP</i>
Procesamiento de ARNm	<i>SF3B1/ RBM5/ DDX17/ METTL3/ PPWD1/ TARDBP</i>
Regulación positiva del proceso metabólico de proteínas celulares	<i>CAPN3/ ERBB3/ PSME4/ CDK5RAP3/ METTL3/ RPS6KB1</i>
Cicatrización de la herida	<i>ERBB3</i>
Exosoma extracelular	<i>MON2/ NUDT9</i>
Retículo endoplásmico	<i>CERCAM/ COL4A5/ KLK6</i>
Superficie celular	<i>MOG/ RPS6KB1</i>
Microtúbulos	<i>CDK5RAP3/ CCDC66</i>
Complejo contenedor de proteínas	<i>CAPN3/ SF3B1/ ERBB3/ COL4A5/ UTP6/ PSME4/ RBM5/ MAT2A/ CDK5RAP3/ DDX17/ CCNL1/ METTL3/ PPWD1/ CEP192</i>
Cuerpo basal ciliar	<i>CCDC66</i>
Nucleolo	<i>CAPN3/ SF3B1/ ZNF655/ UTP6/ KLK6/</i>

	<i>CDK5RAP3/ DDX17/ RPAIN</i>
Cuerpo nuclear	<i>SF3B1/ PSME4/ DDX17/ CCNL1/ METTL3/ FNBP4</i>
Actividad de hidrólisis de ATP	<i>DDX17</i>
Unión a proteína	<i>MOG/ AMPD3/ CAPN3/ SF3B1/ DOCK5/ CERCAM/ ERBB3/ ZNF655/ ASPA/ UTP6/ PSME4/ RBM5/ KLK6/ MAG/ MON2/ PHF11/ SEMA6D/ MAT2A/ CDK5RAP3/ DDX17/ HAPLN2/ FAR1/ CCNL1/ SH3GL3/ METTL3/ FNBP4/ NUDT9/ WDR27/ TRPM6/ CCDC66/ TFAP2E/ CEP192/ PTPDC1/ RPAIN/ PAIP2/ LENG8/ SHC4/ RPS6KB1/ ROCK1/ TARDBP</i>
Actividad peptidasa	<i>CAPN3/ KLK6/ CNDP1</i>
Actividad dependiente de ATP	<i>DDX17</i>
Cuerpo celular neuronal	<i>DAB2IP</i>
Revestimiento de neuronas	<i>ASPA/ KLK6/ MAG/ TMEM98</i>
Revestimiento del axón	<i>ASPA/ KLK6/ MAG/ TMEM98</i>
Mielinización	<i>ASPA/ KLK6/ MAG/ TMEM98</i>
Diferenciación de oligodendrocitos	<i>ASPA/ MAG/ TMEM98</i>
Corte y empalme de ARN	<i>SF3B1/ METTL3</i>
Regulación del tamaño de la estructura anatómica	<i>SEMA6D/ ROCK1</i>
Transducción de la señal de la proteína Rho	<i>ROCK1</i>
Transducción de la señal de la proteína Ras	<i>ROCK1</i>
Regulación del tamaño del componente celular	<i>SEMA6D</i>
Cuerpo nuclear	<i>SF3B1/ PSME4/ METTL3/ FNBP4/ EP400</i>
Endosoma tardío	<i>TF/ BACE1/ ABCA5</i>
Componente integral de la membrana del organelo	<i>FAR1</i>

Componente intrínseco de la membrana del organelo	<i>FAR1</i>
Corteza celular	<i>MOBP</i>
Adhesión focal	<i>EFS</i>
Unión célula-sustrato	<i>EFS</i>
Actividad reguladora de cinasa	<i>ERBB3</i>

8.5 Diferencias entre el perfil transcriptómico de la línea CPN del paciente con PSP y el CNTRL

Después de haber encontrado genes de interés en el LMT de sujetos con PSP. Se continuó con la evaluación del transcriptoma de las CPN de individuos con PSP comparado contra CPN de individuos CNTRL. De las 4 líneas celulares conseguidas a través del Tau Consortium, hasta este momento se han logrado establecer dos líneas de ellas, la GIH-131-C1 (PSP) y la F12436.3 (CNTRL). En la Figura 19 se muestran dos micrografías en contraste de fases en las cuales se puede apreciar su morfología, núcleos pequeños, así como estructuras bipolares y alargadas, y algunas conectadas entre sí. Cuando las CPN alcanzaron una confluencia superior al 80% su ARNm fue preservado para posteriormente realizar la secuenciación correspondiente. Cabe señalar que cada una de las dos líneas descritas previamente tuvo un duplicado técnico en la realización del ensayo de secuenciación. Una vez realizada la secuenciación y después de normalizar el conteo de las lecturas, se procedió a evaluar los datos. Dichos datos, como se observa en la Figura 20 inciso (a) y (b), mostraron una distribución normal en su nivel expresión y una mediana similar en todas las muestras, indicando que son adecuados para su posterior análisis estadístico. En el PCA, presente en la Figura 20 inciso (c), podemos observar que en el PC1 las CPN CNTRL se agrupan a la izquierda de las CPN PSP; y que, además, este componente explica el 71% de la varianza total de los genes en el ARN seq, lo que nos indica que las líneas CNTRL y PSP son diferentes entre sus perfiles transcripcionales.

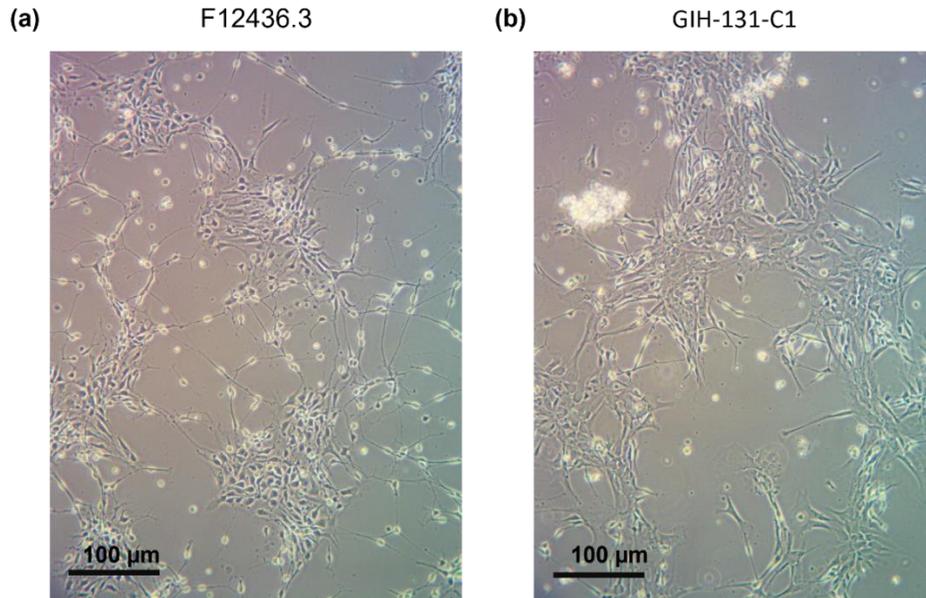


Figura 19. Vista en contraste de fases de las CPN. F12436.3 del grupo CNTRL (a) y GIH-131-C1 del grupo PSP (b) durante el proceso de expansión y crecimiento. Imágenes obtenidas con el microscopio invertido OLYMPUS CK40 con el objetivo de 40x. Barra de escala = 100 μm.

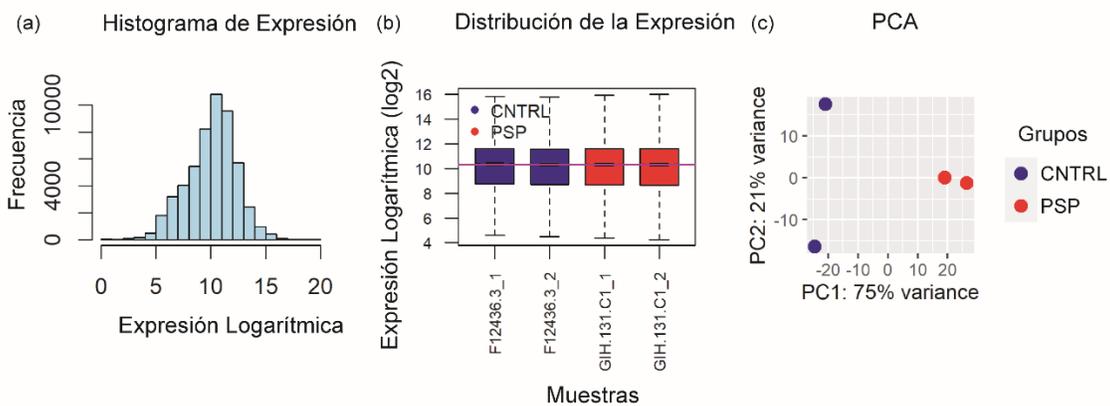


Figura 20. Procesamiento de los datos del RNAseq de las CPN. (a) Histograma de distribución de la expresión en escala de logarítmica de los datos procesados; (b) Diagrama de Tukey con distribución de los valores de expresión en escala logarítmica de cada las muestras de ambos grupos; (c) Análisis de componentes principales (PCA) de los datos procesados; Muestra Control (CNTRL) y con Parálisis Supranuclear Progresiva (PSP); CNTRL (azul) y PSP (rojo); Componente principal 1 (PC1); componente principal 2 (PC2).

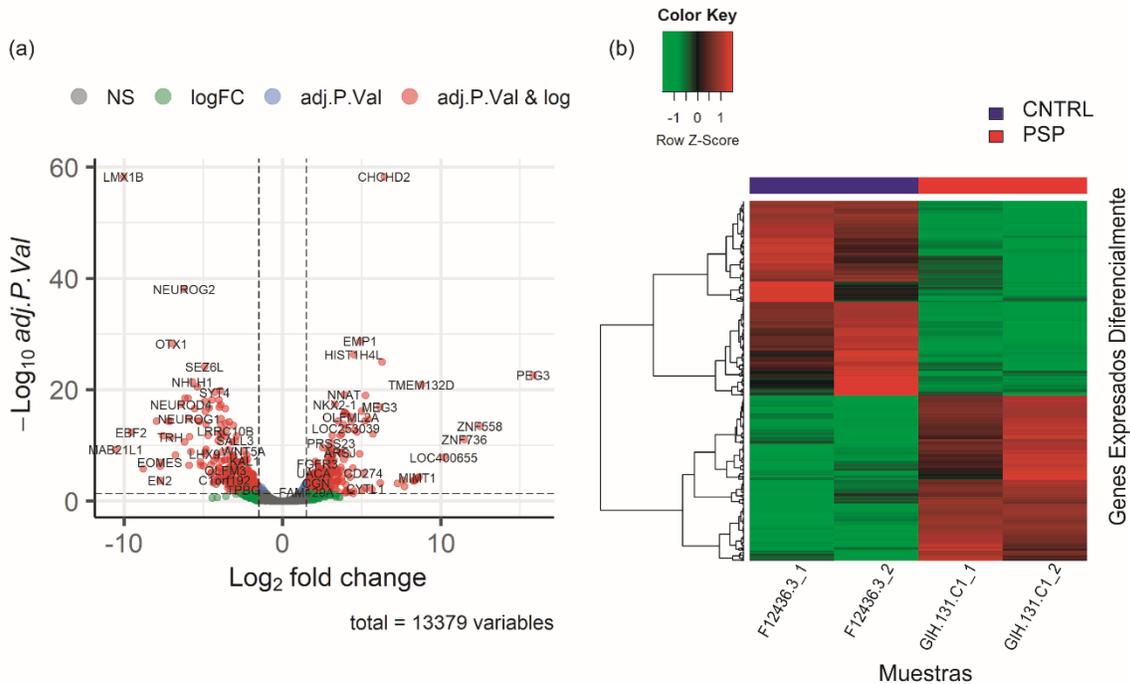


Figura 21. DEGs en las líneas CPN PSP vs. CNTRL. (a) Gráfico de volcán de la dispersión de los genes expresados diferencialmente (DEG) a la alta y a la baja, al comparar las CPNs de la muestra con Parálisis Supranuclear Progresiva (PSP) contra las Control (CNTRL), No significativo (NS); (b) mapa de calor con la expresión en escala logarítmica de los DEGs, genes expresados a la alta en color rojo, y a la baja en color verde, muestra CNTRL (azul) y PSP (rojo).

Para detectar los genes causantes de las diferencias en el perfil transcripcional entre los grupos, se hizo un DEA. Este análisis, el cual se puede visualizar en la Figura 21 de volcán inciso (a), encontró la presencia de 627 DEGs en las CPNs (CPN DEGs) de la muestra con PSP al ser comparado con la muestra CNTRL, con 288 DEG regulados a la alta y regulados a la baja. La expresión de los CPN DEGs se puede observar en el mapa de calor, Figura 21 inciso (b), donde claramente se aprecia cómo los genes expresados a la alta en un grupo se encuentran a la baja en el otro, y viceversa. Posteriormente, se buscó determinar si los 627 DEGs están sobrerrepresentando alguna vía o función biológica específica y para ello llevamos a cabo un FEA. En este análisis se observó que los DEGs a la alta, Figura 22 inciso (a), (b), (c), estaban mayormente asociados al sistema de endomembranas, como endosoma temprano, lisosomas y exosomas, así como

citoesqueleto. Mientras que los genes a la baja, Figura 22 inciso (d), (e), (f), están enriquecidos para procesos relacionados con el desarrollo del sistema nervioso y estructura, actividad y regulación de la sinapsis.

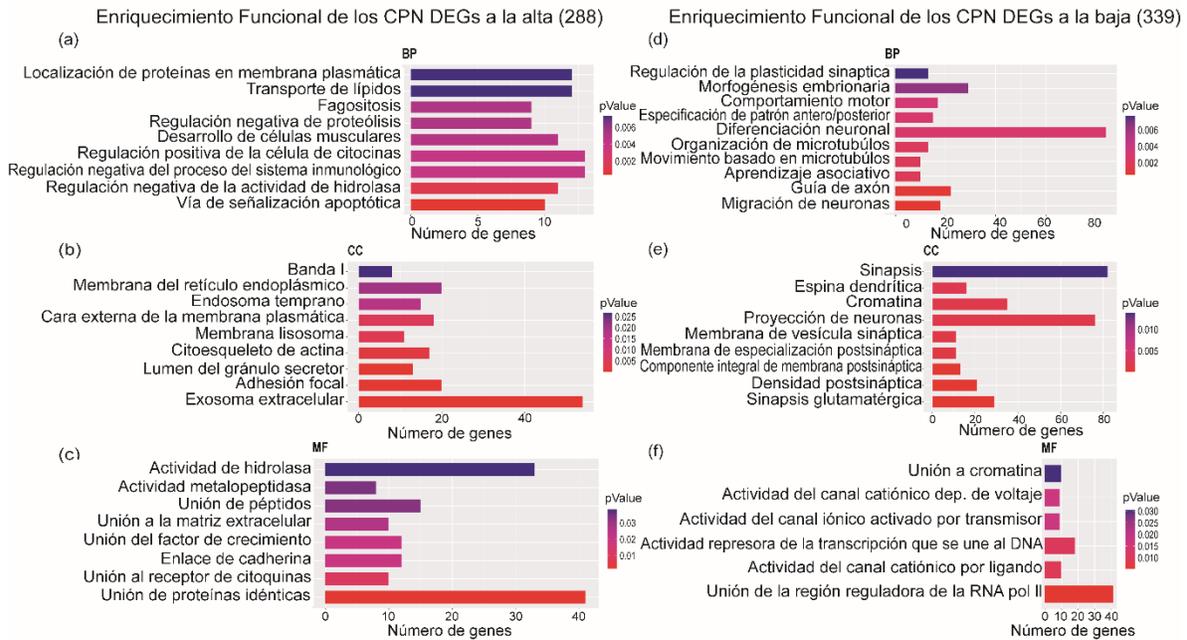


Figura 22. GOt enriquecidos en la línea CPN del paciente con PSP. Procesos Biológicos (BP), Componente Celular (CC), y Función Molecular (MF) con un p-value<0.05 enriquecidos en los 288 DEGs a la alta (a-c), y enriquecidos en los 332 DEGs a la baja (c-d). Escala de color represente el p-value; eje x muestra el número de genes en cada uno de los GOt.

8.6 Análisis de correlación entre el transcriptoma de las líneas CPN y del LMT de los individuos en el microarreglo

Con la finalidad de evaluar si existe algún grado de correlación entre la línea GIH-131-C1_1 y su clona GIH-131-C1_2 de un individuo confirmado con PSP, con los individuos catalogados como PSP (IB27, IB28, IB29, IB30, IB31, IB55 e IB64), se realizó un análisis de correlación de Pearson entre cada una de las muestras. En la figura 23, podemos observar cómo ambas líneas GIH-131-C1, muestran índices de correlación (R) de entre 0.12 y el 0.3, al ser comparadas contra el transcriptoma de los individuos con PSP, indicado una correlación baja entre ellos. Por el otro lado también podemos observar valores R muy

cercanos al 0.34 entre las líneas F12436.3 de un individuo sano, al ser comparadas contra los individuos catalogados como sanos (IB07, IB08, IB09, IB10 e IB11).

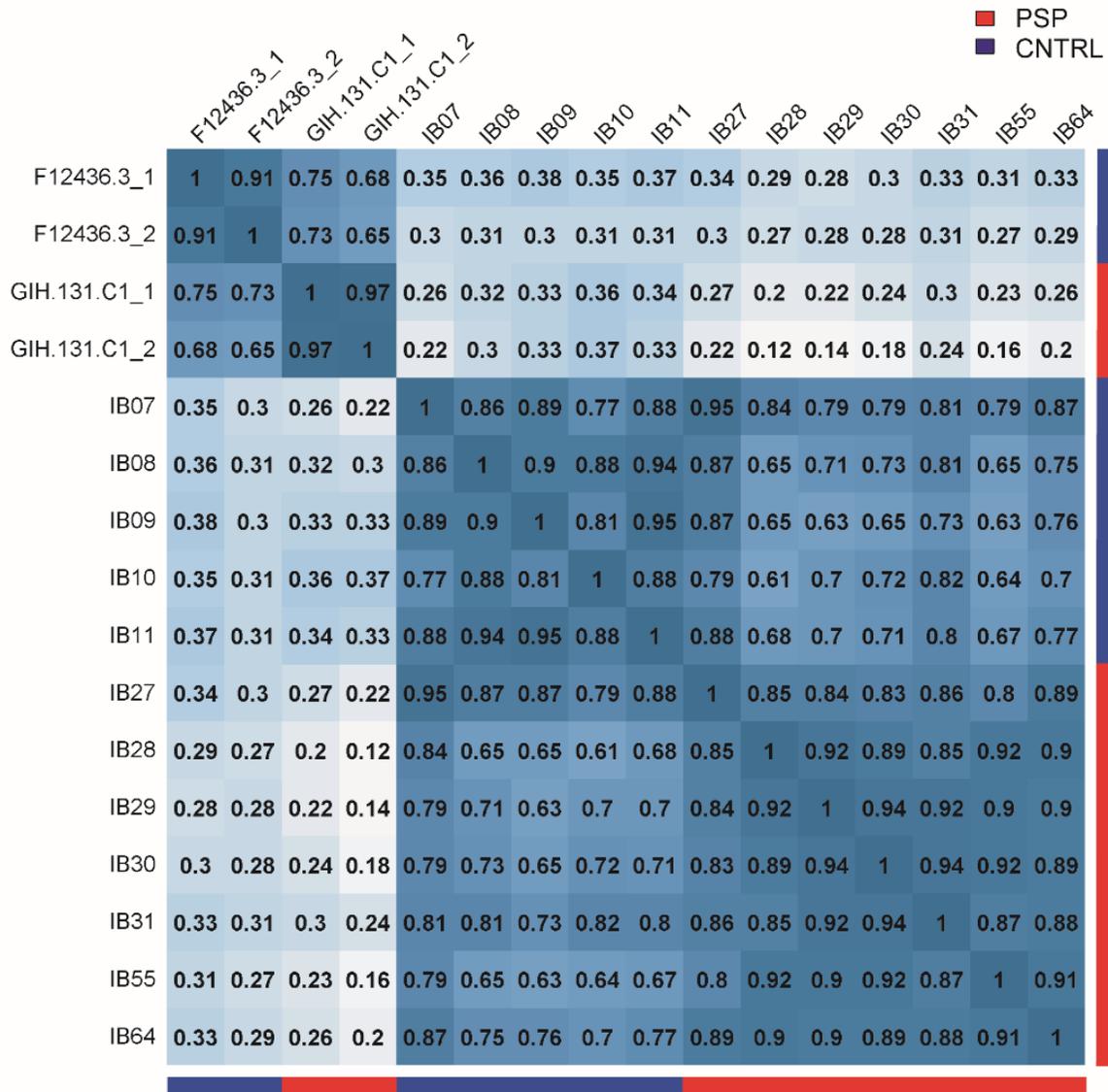


Figura 23.- Mapa de calor del índice de correlación entre las líneas CPN y el LMT. Índice de correlación entre las clonas de las líneas CPN GIH-131-C1 y F12436.3, con los individuos controles (IB07, IB08, IB09, IB10 e IB11) (CNTRL, color azul) y los afectados con parálisis supranuclear progresiva (IB27, IB28, IB29, IB30, IB31, IB55 e IB64) (PSP, color rojo) analizados en el microarreglo del lóbulo temporal medial. El valor presente en las intersecciones es el índice de correlación de Pearson (R). El color azul oscuro indica correlaciones altas mientras que los blancos indica una correlación nula.

Por último, para evaluar cualquier otra posible asociación con la patología se procedió a buscar la presencia de algún gen en común entre los DEGs de la línea GIH-131-C1 y de los genes asociados a la patología en la literatura. En este análisis de intersección, figura 21, observamos solo un gen presente en la lista PSP literatura, el gen corresponde con BSN, mejor conocido como Basson, un gen cuya proteína codificante es un andamio involucrado en la estructura presináptica. La presencia de solo un gen nos confirma la poca relación entre línea GIH-131-C1 con la patología de PSP, a diferencia de lo que se observó con los genes desregulados en el LMT.

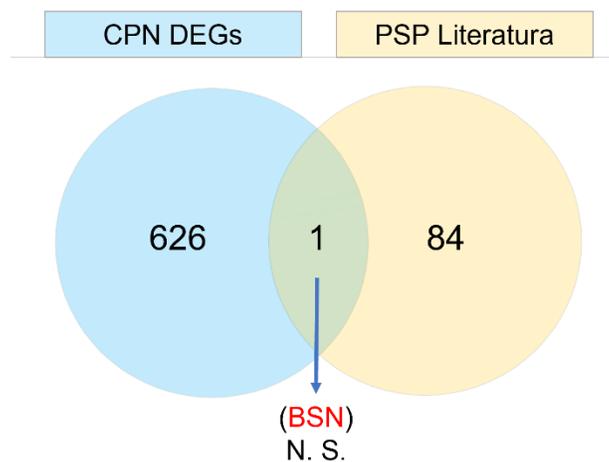


Figura 24.- Genes compartidos entre los CPN DEGs de pacientes con PSP, con genes reportados para PSP en la literatura. Diagrama de Venn que muestra la intersección entre genes expresados diferencialmente (DEGs) que obtuvimos del análisis de expresión diferencial de la línea GIH-131-C1 con PSP confirmado (CPN DEGs); y la lista de genes de riesgo asociados con PSP y de genes reportados involucrados en la patología (PSP literatura). No significativo (N. S.).

9. DISCUSIÓN

En este trabajo se encontró una clara diferencia entre el perfil transcripcional del LMT de sujetos con diagnóstico de PSP y sujetos sanos. Esto ya se ha reportado en distintos trabajos (M. Allen, X. Wang, J. D. Burgess, et al., 2018; Wang et al., 2021); en este caso, resaltamos que las diferencias observadas concuerdan con lo observado en la corteza temporal de cerebros de pacientes con PSP por Marrie Allen et. al en 2018 (M. Allen, X. Wang, J. D. Burgess, et al., 2018), incrementando la posibilidad de que lo que se observó en el LMT esté relacionado con la patología de PSP. Aunque la atrofia del mesencéfalo es el sello más distintivo en PSP (Kovacs et al., 2020); las áreas del LMT como el hipocampo y las cortezas perirrinial, entorrinal y parahipocampal adyacentes han sido reportadas con pérdida de volumen en estudios de morfometría basada en vóxeles (VBM) (Pan et al., 2017; Stezin et al., 2017). Además, en estadios avanzados de la enfermedad, existe una mayor acumulación de tau patológica en el lóbulo temporal (Kovacs et al., 2020). Lo que sugiere que el transcriptoma del LMT esté probablemente reflejando aspectos de la patología de la PSP.

En el LMT de pacientes con PSP encontramos la desregulación de genes asociados con la estructura, actividad y regulación de la sinapsis, el sistema de endomembranas, regulación de la transcripción, procesamiento del ARNm, mielinización, procesos catabólicos y síntesis de proteínas, adhesión celular y citoesqueleto. De entre ellos, los últimos 3 no han sido reportados afectados a nivel transcriptómico en PSP, por lo que estudiar las posibles implicaciones de estos genes en la patología puede ser relevante (M. Allen, X. Wang, J. D. Burgess, et al., 2018; Wang et al., 2021; Weber et al., 2018; Yokoyama et al., 2017). Enfocándonos en los 54 genes de interés en común encontrados en el LMT y en el transcriptoma de TCX de pacientes con PSP obtenido de la literatura, observamos que se encuentran principalmente asociados el procesamiento del ARNm, mielinización, el sistema de endomembranas, y procesos catabólicos y síntesis de proteínas.

Adentrándonos un poco más en los genes relacionados con el procesamiento del ARNm, encontramos la expresión de *SF3B1*, *DDX17* y *RBM5* a la baja, proteínas importantes en la estructura y actividad del spliceosoma (Jackson & Kochanek, 2020; Wongpalee et al., 2016; Zhang et al., 2019); así como también de *METTL3*, esencial para maduración del ARNm (Wu et al., 2021). La disfunción del proceso de corte y empalme (mejor conocido como *splicing*) ha sido reportada en distintos modelos de tauopatías, causando desregulación en el splicing alternativo de genes (Apicco et al., 2019; Cruz et al.,

2019); la disfunción de este proceso también está altamente relacionada con el proceso de envejecimiento en condiciones patológicas (Li et al., 2017). En PSP, la desregulación de genes asociados a este proceso ha sido reportada en los trabajos de Silzer en 2020 y de Allen en 2018 (Mariet Allen et al., 2018; Talisa K. Silzer et al., 2020), por lo que evaluar a nivel funcional los genes encontrados a la baja de este proceso podría ser relevante para la enfermedad.

Otros procesos que encontramos desregulados son el sistema de endomembranas, esto concuerda con reportes previos de variantes de riesgo de PSP en *STX6* y en *LRRK2*, genes involucrados en vías endolisosomales y transporte mediado por vesículas (Jabbari et al., 2021; Yokoyama et al., 2017). Aunque observamos que genes de interés estaban relacionados con GOt como retículo endoplásmico y el endosoma, los genes agrupados dentro de estos no mostraron estar relacionados con algún mecanismo biológico en particular, sino más bien estaban relacionados con su ubicación celular.

En cuanto a la mielinización, se detectó la regulación a la baja de *MAG*, *MOG* y *TF*, proteínas expresadas en mielina que juegan un papel esencial en su formación, estructura y función (Espinosa de los Monteros et al., 1999; Ferrer et al., 2019; Johns & Bernard, 1999; Quarles, 2007; Reindl & Waters, 2019); también se observó la regulación a la baja de genes de interés relacionados con la diferenciación de oligodendrocitos como *TMEM98*, *KLK6* y *ASPA* (Elsesser et al., 2019; Huang et al., 2018; Mattan et al., 2010; Murakami et al., 2013). La afectación de genes asociados a la mielinización podría ser el resultado del papel que desempeñan oligodendrocitos en la dispersión de la tau patológica tal y como reporta Isidro Ferrer (Ferrer et al., 2019). Además, se encontró la desregulación de *MOBP* y *SLCO1A2*, dos genes de riesgo asociados a PSP (Höglinger et al., 2011; Sanchez-Contreras et al., 2018).

Se ha encontrado con un nivel de expresión reducido a *SLCO1A2* en las áreas cerebrales afectadas por PSP (Sanchez-Contreras et al., 2018; Zou et al., 2012), aunque su papel en la patología no está del todo claro, se ha relacionado con la regulación de la expresión de genes de mielina (Iohan et al., 2022). Mientras tanto *MOBP*, importante en la compactación y estabilización de la mielina (Montague et al., 2006), no ha sido observado con cambios en su nivel de expresión en PSP, aunque si se ha encontrado enriquecido en áreas afectadas (Höglinger et al., 2011). Este es el primer trabajo donde *MOBP* se reporta a la baja en el tejido cerebral de PSP, junto con *SLCO1A2*, y tomando en cuenta lo

reportado por Lucas Carvalho, cabe la posibilidad de que ambos genes estén participando en la desregulación de genes asociados a este proceso, Figura 25 (Iohan et al., 2022).

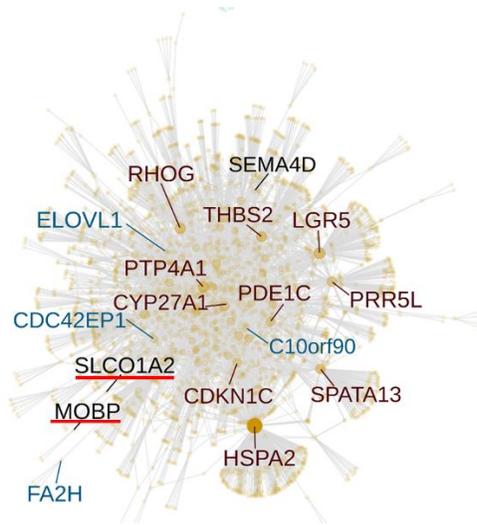


Figura 25. Red de interacción entre los genes de riesgo *SLCO1A2* y *MOBP*. Cluster de interacción de los genes *SLCO1A2* y *MOBP* con un módulo de coexpresión de genes enriquecido para procesos de mielinización encontrado en tejido de corteza temporal de pacientes con PSP (Iohan et al., 2022).

Con respecto a los procesos de síntesis y catabolismo de proteínas, encontramos que a la baja se presentan dos peptidasas extracelulares, *CNDP1* y *KLK6*, siendo la segunda altamente relacionada con la EA y la EP, donde se le ha encontrado a la baja en zonas afectadas y juega un papel en la degradación de α -sinucleína extracelular (Mella et al., 2020; Pampalakis et al., 2017). Considerando que la proteína tau patológica es liberada y luego recapturada, se ha hipotetizado que componentes de la matriz extracelular como las peptidasas y proteasas extracelulares podrían interaccionar o procesar los agregados de proteína tau, cambiando sus propiedades y regulando su capacidad de dispersión (Moretto et al., 2022).

Otros genes de interés asociados a la síntesis y catabolismo de proteínas son *CAPN3*, *PSME4*, y *RPS6KB1*. La *CAPN3*, o calpaína 3, forma parte de la familia proteasas activadas por calcio que participan en la señalización neuronal (calpaína 1 y 2) y cuya hiperactivación reportada en varias enfermedades neurodegenerativas promueve la muerte neuronal; en este caso *CAPN3* se encuentra expresada a la baja, y aunque su función

exacta en el cerebro no está descrita, se ha observado que presenta una estructura similar por lo que podría participar en los mismos procesos (Baburuna et al., 2021; Liu et al., 2008). *PSME4* es una subunidad del proteasoma que juega un papel importante en su actividad y la estabilidad del ADN, se le ha encontrado expresado a la baja en pacientes con la EP (Yuan et al., 2020), tal y como lo encontramos para PSP, por lo que podría estar asociado al incremento en el daño al ADN reportado en taupatías (Colnaghi et al., 2020). Por último encontramos regulada a la baja la proteína ribosómica S6 quinasa beta-1, o *RPS6KB1*, proteína ribosomal que se ha reportado que fosforila a la proteína tau en 3 sitios distintos, y que está directamente relacionada con la regulación de la transcripción de la proteína tau, lo que puede ser interesante para la PSP (Pei et al., 2008).

Por otro lado, se encontró que 7 TF (*TEAD4*, *POU3F2*, *FOXP3*, *FOXO3*, *CDX2*, *CDX4* y *SRY*) están involucrados en la desregulación de los genes en el LMT; además, de acuerdo con la literatura, los 7 están asociados al neurodesarrollo (Arasappan et al., 2021; Ding et al., 2021; Joshi et al., 2019; Lee et al., 2019; Li et al., 2021; Taylor et al., 2020; Zhao et al., 2014). Es importante mencionar que se encontró únicamente a *FOXO3* significativamente regulado a la alta; esto ya había sido reportado para este microarreglo (Bronner et al., 2009). En este trabajo se replicó su asociación a la enfermedad realizando otros análisis totalmente diferentes, reforzando la idea de su posible asociación con la patología. *FOXO3*, codifica un factor de transcripción implicado en el envejecimiento y la longevidad (Morris et al., 2015; Sanese et al., 2019); regulando la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Morris et al., 2015; Sanese et al., 2019).

Hasta la fecha solamente hemos logrado establecer el cultivo de una línea de CPNs de un individuo con PSP y otra de un individuo CNTRL, por lo que se decidió utilizar duplicados técnicos de las líneas establecidas. Debido a esta complicación solo se pudo comparar el transcriptoma de las CPNs de un individuo diagnosticado con PSP esporádico, sin relación familiar aparente con las CPNs de un individuo sano. Esto implica que las diferencias observadas a nivel transcripcional puedan deberse a la variabilidad inter-individuo, y no tal cual a la patología *per se*. A pesar de este inconveniente, de igual manera se procedió a evaluar el perfil transcriptómico y analizar si la línea GIH-131-C1, replicaba lo observado en el LMT de pacientes con PSP.

Al ahondar en la diferencia en el perfil transcriptómico entre ambos individuos, se encontró que la línea GIH-131-C1, presentaba diferencias en la expresión de genes asociados al sistema de endomembranas, el desarrollo del sistema nervioso y estructura y

actividad de la sinapsis, procesos a los que estaban asociados genes desregulados en el transcriptoma del cerebro de pacientes con PSP. Desafortunadamente al llevar a cabo el análisis de correlación entre los individuos, se detectó que la expresión de genes en las líneas celulares GIH-131-C1 no correlacionaba a la observada en el cerebro de individuos con PSP, y de igual manera se observó que las líneas celulares F12436.3 tampoco se parecían a lo observado en el cerebro de individuos sanos. Esto nos sugiere que ambas líneas CPN no parece replicar completamente lo ocurrido en el cerebro, probablemente debido a que son CPN y no neuronas maduras, por lo que podría ser de utilidad diferenciar estas líneas de CPN a neuronas para poder hacer el análisis transcriptómico de forma más comparable al tejido cerebral.

En la literatura, no hay trabajo que hable del uso de CPNs para el modelado de la patología de PSP esporádica, pero en otras enfermedades neurodegenerativas esporádicas (EA y EP), se descubrió que las CPNs mostraban una afectación principal de genes asociados a la neurogénesis y a la diferenciación, tal y como observamos en algunos genes desregulados en la línea GIH-131-C1 (Meyer et al., 2019; Vlasov et al., 2021), sugiriendo la teoría de que perturbaciones en el desarrollo, como lo es la afectación de genes asociados el desarrollo, podrían estar asociados a una predisposición a la enfermedad (Meyer et al., 2019; Sproul et al., 2014; Vlasov et al., 2021). Esta teoría podría tener relación con lo observado en los genes expresados diferencialmente en líneas celulares GIH-131-C1, ya que genes relacionados a la estructura y actividad de la sinapsis, se encuentran enriquecidos en los genes a la baja en esta línea celular de NPC.

10. CONCLUSIONES

Este trabajo propone 54 genes de interés cuya expresión alterada pueden estar asociada con la patología de PSP. También observamos que los genes de interés se encuentran principalmente asociados a el procesamiento del ARNm, mielinización, el sistema de endomembranas, y la síntesis y catabolismo de proteínas, todos ellos con excepción del último proceso, han sido reportados alterados a nivel transcriptómico para PSP. Además, se detectaron 7 factores de transcripción, especialmente FOXO3, como posibles impulsores de cambio en la expresión génica en PSP. Por otro lado, se generaron datos transcriptómicos de la línea CPN GIH-131-C1 de un individuo con PSP esporádico, que presentó la desregulación de genes asociados el neurodesarrollo, sinapsis y sistema de endomembranas, pero se encontró un bajo grado de similitud con el LMT de pacientes con PSP, por lo que se sugiere su diferenciación hacia neuronas y aumentar el número de CPN para poder buscar la correlación con el tejido cerebral.

11. PERSPECTIVAS

Para poder seguir evaluando el posible uso de las CPN, consideramos necesario, establecer la otra línea CPN de PSP restante, posteriormente se deberá analizar los cambios transcriptómicos después de un proceso de inducción neuronal, lo que ayudaría evaluar si las neuronas maduras están replicando las características de las neuronas en el cerebro de pacientes con PSP; además, se podría utilizar un cultivo prolongado, esto permitiría valorar una variable más importante de las enfermedades esporádicas, el envejecimiento. Una vez alcanzada la madurez neuronal se podría comparar el transcriptoma de estas con los resultados obtenidos de los DEGs de tejido cerebral obtenidos en este proyecto. También sería interesante evaluar a nivel proteico la expresión de los 54 genes en las neuronas inducidas, así como también en algún modelo murino, como lo sería el ratón con la mutación de tau P301L o A152T, usado en la literatura, para evaluar similitudes y diferencias. Este estudio abre el camino para investigar la implicación en la desregulación de estos genes en la patología de la PSP, y el establecimiento de un modelo celular para el estudio de la PSP.

12. ANEXOS

12.1 Material Suplementario

Rank	Target	PWM	Motif ID	Raw score	P-value	In top motifs
1	RHOXF1		MA0719.1	1.17	2.17e-11	13 %
2	TBX1		MA0805.1	2.35	8.08e-05	13 %
3	TBX15		MA0803.1	2.67	0.00788	13 %
4	MGA		MA0801.1	1.77	0.0045	12 %
6	TBX4		MA0806.1	1.5	0.000486	11 %
6	PITX2		MA1547.1	1.96	3.63e-07	11 %
8	SOX2		MA0143.4	1.18	3.03e-08	10 %
11	SRY		MA0084.1	1.52	6.6e-06	10 %
11	TBX5		MA0807.1	1.47	0.000104	10 %
13	PITX1		MA0682.2	1.43	0.000108	9 %
14.5	VDR		MA0693.2	1.14	1.64e-05	9 %
14.5	NR4A1		MA1112.2	1.71	0.00257	9 %
20	RORA		MA0071.1	1.14	1.34e-05	9 %
20	ZNF410		MA0752.1	2.19	0.00122	9 %
20	BARX2		MA1471.1	1.81	0.00129	9 %

Tabla suplementaria 1.- Principales 15 motivos enriquecidos en los genes regulados a la alta; proteína de unión al motivo (Target); matriz de peso posicional (PWM); ID de motivo enriquecido (Motif ID); puntuación de probabilidad media de toda la secuencia (Raw score).

Rank	Target	PWM	Motif ID	Raw score	P-value	In top motifs
1	SRY		MA0084.1	1.89	3.37e-40	11 %
2	SOX2		MA0143.4	1.36	1.36e-26	11 %
3	GSX1		MA0892.1	1.24	3.06e-47	10 %
5	RHOXF1		MA0719.1	1.17	1.17e-14	10 %
6	NKX6-2		MA0675.1	1.31	1.31e-42	10 %
9	FOXP3		MA0850.1	1.39	3.98e-31	10 %
9	HOXD9		MA0913.2	2	1.08e-16	10 %
13	SOX9		MA0077.1	1.06	3.21e-22	9 %
13	ISL2		MA0914.1	1.13	2.68e-32	9 %
13	PRDM4		MA1647.1	1.94	6.72e-11	9 %
17	FOXB1		MA0845.1	3.96	3.92e-20	9 %
17	SOX15		MA1152.1	2.32	1.08e-27	9 %
20.5	TBX1		MA0805.1	2.08	6.18e-06	9 %
20.5	DMRTA2		MA1478.1	1.27	2.98e-30	9 %
24	FOXL1		MA0033.2	1.64	2.47e-23	9 %

Tabla suplementaria 2.- Principales 15 motivos enriquecidos en los genes regulados a la baja; proteína de unión al motivo (Target); matriz de peso posicional (PWM); ID de motivo enriquecido (Motif ID); puntuación de probabilidad media de toda la secuencia (Raw score).

Gene symbol	logFC	Gene symbol	logFC
<i>PPWD1</i>	-1.74673	<i>FAR1</i>	-1.18089
<i>ASPA</i>	-2.38374	<i>CDK5RAP3</i>	-1.2682
<i>CERCAM</i>	-2.64305	<i>CEP192</i>	-1.24569
<i>CAPN3</i>	-1.6414	<i>DAB2IP</i>	0.867488
<i>CCNL1</i>	-1.22533	<i>ENOSF1</i>	-1.37294
<i>SF3B1</i>	-1.04891	<i>PTPDC1</i>	-0.85951
<i>KLK6</i>	-1.25203	<i>RPAIN</i>	-0.69746
<i>MOG</i>	-1.66031	<i>SH3GL3</i>	-0.88992
<i>DOCK5</i>	-1.4859	<i>ZNF160</i>	1.004679
<i>ZNF655</i>	-0.92153	<i>TARDBP</i>	-0.74884
<i>TRPM6</i>	-1.77946	<i>MAT2A</i>	-0.88305
<i>COL4A5</i>	-1.80606	<i>PAIP2</i>	-0.63903
<i>WDR27</i>	-1.11066	<i>LENG8</i>	-1.84767
<i>DDX17</i>	-1.15123	<i>SHC4</i>	-1.2934
<i>RBM5</i>	-1.13209	<i>MAG</i>	-1.7351
<i>CNDP1</i>	-1.48373	<i>RPS6KB1</i>	-0.92281
<i>AMPD3</i>	-1.37171	<i>CSAD</i>	-1.38553
<i>MON2</i>	-0.91273	<i>METTL3</i>	-0.91425

<i>NUDT9</i>	-0.90822	<i>FNBP4</i>	-1.38006
<i>ERBB3</i>	-1.80742	<i>ROCK1</i>	-1.23578
<i>CCDC66</i>	-1.13418	<i>TF</i>	-1.48793
<i>PSME4</i>	-0.99298	<i>BACE1</i>	-0.66799
<i>PHF11</i>	-1.24958	<i>MOBP</i>	-1.19541
<i>SEMA6D</i>	-0.92121	<i>TMEM98</i>	-1.2169
<i>HAPLN2</i>	-1.95375	<i>ABCA5</i>	-0.88096
<i>UTP6</i>	-1.03125	<i>EP400</i>	-0.55188
<i>TFAP2E</i>	-1.1159	<i>EFS</i>	-0.81367

Tabla suplementaria 3.- Lista de los 54 genes de interés seleccionados con su respectivo nivel de cambio de expresión (Fold Change)

13. REFERENCIAS

- Allen, M., Carrasquillo, M. M., Funk, C., Heavner, B. D., Zou, F., Younkin, C. S., Burgess, J. D., Chai, H. S., Crook, J., Eddy, J. A., Li, H., Logsdon, B., Peters, M. A., Dang, K. K., Wang, X., Serie, D., Wang, C., Nguyen, T., Lincoln, S., . . . Ertekin-Taner, N. (2016). Human whole genome genotype and transcriptome data for Alzheimer's and other neurodegenerative diseases. *Sci Data*, 3, 160089. <https://doi.org/10.1038/sdata.2016.89>
- Allen, M., Wang, X., Burgess, J. D., Watzlawik, J., Serie, D. J., Younkin, C. S., Nguyen, T., Malphrus, K. G., Lincoln, S., Carrasquillo, M. M., Ho, C., Chakrabarty, P., Strickland, S., Murray, M. E., Swarup, V., Geschwind, D. H., Seyfried, N. T., Dammer, E. B., Lah, J. J., . . . Ertekin-Taner, N. (2018). Conserved brain myelination networks are altered in Alzheimer's and other neurodegenerative diseases. *Alzheimers Dement*, 14(3), 352-366. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2017.09.012>
- Allen, M., Wang, X., Serie, D. J., Strickland, S. L., Burgess, J. D., Koga, S., Younkin, C. S., Nguyen, T. T., Malphrus, K. G., Lincoln, S. J., Alamprese, M., Zhu, K., Chang, R., Carrasquillo, M. M., Kouri, N., Murray, M. E., Reddy, J. S., Funk, C., Price, N. D., . . . Ertekin-Taner, N. (2018). Divergent brain gene expression patterns associate with distinct cell-specific tau neuropathology traits in progressive supranuclear palsy. *Acta Neuropathol*, 136(5), 709-727. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1900-5>
- Allen, M., Wang, X., Serie, D. J., Strickland, S. L., Burgess, J. D., Koga, S., Younkin, C. S., Nguyen, T. T., Malphrus, K. G., Lincoln, S. J., Alamprese, M., Zhu, K., Chang, R., Carrasquillo, M. M., Kouri, N., Murray, M. E., Reddy, J. S., Funk, C., Price, N. D., . . . Ertekin-Taner, N. (2018). Divergent brain gene expression patterns associate with distinct cell-specific tau neuropathology traits in progressive supranuclear palsy. *Acta Neuropathologica*, 136(5), 709-727. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1900-5>
- Alquezar, C., Felix, J. B., McCandlish, E., Buckley, B. T., Caparros-Lefebvre, D., Karch, C. M., Golbe, L. I., & Kao, A. W. (2020). Heavy metals contaminating the environment of a progressive supranuclear palsy cluster induce tau accumulation and cell death in cultured neurons. *Scientific Reports*, 10(1), 569. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56930-w>
- Alquezar, C., Felix, J. B., McCandlish, E., Buckley, B. T., Caparros-Lefebvre, D., Karch, C. M., Golbe, L. I., & Kao, A. W. (2020). Heavy metals contaminating the environment of a progressive supranuclear palsy cluster induce tau accumulation and cell death in cultured neurons. *Sci Rep*, 10(1), 569. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56930-w>
- Apicco, D. J., Zhang, C., Maziuk, B., Jiang, L., Ballance, H. I., Boudeau, S., Ung, C., Li, H., & Wolozin, B. (2019). Dysregulation of RNA Splicing in Tauopathies. *Cell Reports*, 29(13), 4377-4388.e4374. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.11.093>
- Arasappan, D., Eickhoff, S. B., Nemeroff, C. B., Hofmann, H. A., & Jabbi, M. (2021). Transcription Factor Motifs Associated with Anterior Insula Gene Expression Underlying Mood Disorder Phenotypes. *Molecular Neurobiology*, 58(5), 1978-1989. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-02195-8>
- Arendt, T., Stieler, J. T., & Holzer, M. (2016). Tau and tauopathies. *Brain Res Bull*, 126(Pt 3), 238-292. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.08.018>
- Armstrong, M. J. (2018). Progressive Supranuclear Palsy: an Update. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 18(3), 12. <https://doi.org/10.1007/s11910-018-0819-5>
- Avila, J., Jiménez, J. S., Sayas, C. L., Bolós, M., Zabala, J. C., Rivas, G., & Hernández, F. (2016). Tau structures. *Frontiers in aging neuroscience*, 8, 262.

- Baba, Y., Putzke, J. D., Whaley, N. R., Wszolek, Z. K., & Uitti, R. J. (2006). Progressive supranuclear palsy: phenotypic sex differences in a clinical cohort. *Mov Disord*, *21*(5), 689-692. <https://doi.org/10.1002/mds.20769>
- Baburuna, Y., Sotnikova, L., & Krestinina, O. (2021). Identification of Phosphorylated Calpain 3 in Rat Brain Mitochondria under mPTP Opening. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(19), 10613. <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/19/10613>
- Blumenberg, M. (2019). Introductory chapter: transcriptome analysis. *Transcriptome Analysis*, *370*, 1-5.
- Bonadio, R. S., Nunes, L. B., Moretti, P. N. S., Mazzeu, J. F., Cagnin, S., Pic-Taylor, A., & de Oliveira, S. F. (2021). Insights into how environment shapes post-mortem RNA transcription in mouse brain. *Scientific Reports*, *11*(1), 13008. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92268-y>
- Borghì, R., Giliberto, L., Assini, A., Delacourte, A., Perry, G., Smith, M. A., Strocchi, P., Zaccheo, D., & Tabaton, M. (2002). Increase of cdk5 is related to neurofibrillary pathology in progressive supranuclear palsy. *Neurology*, *58*(4), 589-592. <https://doi.org/10.1212/wnl.58.4.589>
- Boxer, A. L., Yu, J. T., Golbe, L. I., Litvan, I., Lang, A. E., & Höglinger, G. U. (2017). Advances in progressive supranuclear palsy: new diagnostic criteria, biomarkers, and therapeutic approaches. *Lancet Neurol*, *16*(7), 552-563. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(17\)30157-6](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(17)30157-6)
- Bronner, I. F., Bochdanovits, Z., Rizzu, P., Kamphorst, W., Ravid, R., van Swieten, J. C., & Heutink, P. (2009). Comprehensive mRNA expression profiling distinguishes tauopathies and identifies shared molecular pathways. *PLoS One*, *4*(8), e6826. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006826>
- Brown, J. A., & Seeley, W. W. (2016). Progressive supranuclear palsy and related parkinsonian disorders. In *Genomics, Circuits, and Pathways in Clinical Neuropsychiatry* (pp. 283-300). Elsevier.
- Bruch, J., Xu, H., Rösler, T. W., De Andrade, A., Kuhn, P. H., Lichtenthaler, S. F., Arzberger, T., Winklhofer, K. F., Müller, U., & Höglinger, G. U. (2017). PERK activation mitigates tau pathology in vitro and in vivo. *EMBO Mol Med*, *9*(3), 371-384. <https://doi.org/10.15252/emmm.201606664>
- Caffrey, T. M., & Wade-Martins, R. (2007). Functional MAPT haplotypes: bridging the gap between genotype and neuropathology. *Neurobiol Dis*, *27*(1), 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2007.04.006>
- Caparros-Lefebvre, D., Golbe, L. I., Deramecourt, V., Maurage, C. A., Huin, V., Buée-Scherrer, V., Obriot, H., Sablonnière, B., Caparros, F., Buée, L., & Lees, A. J. (2015). A geographical cluster of progressive supranuclear palsy in northern France. *Neurology*, *85*(15), 1293-1300. <https://doi.org/10.1212/wnl.0000000000001997>
- Cárdenas-Aguayo Mdel, C., Gómez-Virgilio, L., DeRosa, S., & Meraz-Ríos, M. A. (2014). The role of tau oligomers in the onset of Alzheimer's disease neuropathology. *ACS Chem Neurosci*, *5*(12), 1178-1191. <https://doi.org/10.1021/cn500148z>
- Chambers, S. M., Fasano, C. A., Papapetrou, E. P., Tomishima, M., Sadelain, M., & Studer, L. (2009). Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nature Biotechnology*, *27*(3), 275-280. <https://doi.org/10.1038/nbt.1529>
- Champy, P., Höglinger, G. U., Féger, J., Gleye, C., Hocquemiller, R., Laurens, A., Guérineau, V., Laprévotte, O., Medja, F., & Lombès, A. (2004). Annonacin, a lipophilic inhibitor of mitochondrial complex I, induces nigral and striatal neurodegeneration in rats: possible relevance for atypical parkinsonism in Guadeloupe. *Journal of Neurochemistry*, *88*(1), 63-69.

- Chang, C.-Y., Ting, H.-C., Liu, C.-A., Su, H.-L., Chiou, T.-W., Lin, S.-Z., Harn, H.-J., & Ho, T.-J. (2020). Induced Pluripotent Stem Cell (iPSC)-Based Neurodegenerative Disease Models for Phenotype Recapitulation and Drug Screening. *Molecules*, 25(8), 2000. <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/8/2000>
- Chen, J. A., Chen, Z., Won, H., Huang, A. Y., Lowe, J. K., Wojta, K., Yokoyama, J. S., Bensimon, G., Leigh, P. N., Payan, C., Shatunov, A., Jones, A. R., Lewis, C. M., Deloukas, P., Amouyel, P., Tzourio, C., Dartigues, J. F., Ludolph, A., Boxer, A. L., . . . Coppola, G. (2018). Joint genome-wide association study of progressive supranuclear palsy identifies novel susceptibility loci and genetic correlation to neurodegenerative diseases. *Mol Neurodegener*, 13(1), 41. <https://doi.org/10.1186/s13024-018-0270-8>
- Colnaghi, L., Rondelli, D., Muzi-Falconi, M., & Sertic, S. (2020). Tau and DNA Damage in Neurodegeneration. *Brain Sciences*, 10(12), 946. <https://www.mdpi.com/2076-3425/10/12/946>
- Courtney, E., Kornfeld, S., Janitz, K., & Janitz, M. (2010). Transcriptome profiling in neurodegenerative disease. *Journal of Neuroscience Methods*, 193(2), 189-202. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2010.08.018>
- Cruz, A., Verma, M., & Wolozin, B. (2019). The Pathophysiology of Tau and Stress Granules in Disease. In A. Takashima, B. Wolozin, & L. Buee (Eds.), *Tau Biology* (pp. 359-372). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-32-9358-8_26
- Daniel, S., Paniz-Mondolfi, A., & Monzon, F. A. (2015). Transcriptome Sequencing (RNA-Seq). In G. J. Netto & I. Schrijver (Eds.), *Genomic Applications in Pathology* (pp. 31-43). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0727-4_3
- Dawson, T. M., Golde, T. E., & Lagier-Tourenne, C. (2018). Animal models of neurodegenerative diseases. *Nature Neuroscience*, 21(10), 1370-1379. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0236-8>
- Demaegd, K., Schymkowitz, J., & Rousseau, F. (2018a). Transcellular Spreading of Tau in Tauopathies. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*, 19(23), 2424-2432. <https://doi.org/10.1002/cbic.201800288>
- Demaegd, K., Schymkowitz, J., & Rousseau, F. (2018b). Transcellular spreading of tau in tauopathies. *Chembiochem*, 19(23), 2424.
- Ding, C., Zhang, C., Kopp, R., Kuney, L., Meng, Q., Wang, L., Xia, Y., Jiang, Y., Dai, R., Min, S., Yao, W.-D., Wong, M.-L., Ruan, H., Liu, C., & Chen, C. (2021). Transcription factor POU3F2 regulates TRIM8 expression contributing to cellular functions implicated in schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, 26(7), 3444-3460. <https://doi.org/10.1038/s41380-020-00877-2>
- Dizon, J. A. (2016). *Elucidating progressive supranuclear palsy genotype-phenotype relationships using human isogenic induced pluripotent stem cells* [San Diego State University].
- Eguchi, T., Kuwahara, T., Sakurai, M., Komori, T., Fujimoto, T., Ito, G., Yoshimura, S.-i., Harada, A., Fukuda, M., Koike, M., & Iwatsubo, T. (2018). LRRK2 and its substrate Rab GTPases are sequentially targeted onto stressed lysosomes and maintain their homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(39), E9115-E9124. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.1812196115>
- Elsesser, O., Fröb, F., Küspert, M., Tamm, E. R., Fujii, T., Fukunaga, R., & Wegner, M. (2019). Chromatin remodeler Ep400 ensures oligodendrocyte survival and is required for myelination in the vertebrate central nervous system. *Nucleic Acids Res*, 47(12), 6208-6224. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz376>
- Escobar-Khondiker, M., Höllerhage, M., Muriel, M.-P., Champy, P., Bach, A., Depienne, C., Respondek, G., Yamada, E. S., Lannuzel, A., & Yagi, T. (2007). Annonacin, a natural

- mitochondrial complex I inhibitor, causes tau pathology in cultured neurons. *Journal of Neuroscience*, 27(29), 7827-7837.
- Espinosa de los Monteros, A., Kumar, S., Zhao, P., Huang, C. J., Nazarian, R., Pan, T., Scully, S., Chang, R., & de Vellis, J. (1999). Transferrin is an essential factor for myelination. *Neurochem Res*, 24(2), 235-248. <https://doi.org/10.1007/s11064-004-1826-2>
- Ferrer, I., Aguiló García, M., Carmona, M., Andrés-Benito, P., Torrejón-Escribano, B., Garcia-Esparcia, P., & Del Rio, J. A. (2019). Involvement of Oligodendrocytes in Tau Seeding and Spreading in Tauopathies. *Front Aging Neurosci*, 11, 112. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00112>
- Ferrer, I., Barrachina, M., & Puig, B. (2002). Glycogen synthase kinase-3 is associated with neuronal and glial hyperphosphorylated tau deposits in Alzheimer's disease, Pick's disease, progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. *Acta Neuropathol*, 104(6), 583-591. <https://doi.org/10.1007/s00401-002-0587-8>
- Ghag, G., Bhatt, N., Cantu, D. V., Guerrero-Munoz, M. J., Ellsworth, A., Sengupta, U., & Kaye, R. (2018). Soluble tau aggregates, not large fibrils, are the toxic species that display seeding and cross-seeding behavior. *Protein Science*, 27(11), 1901-1909. <https://doi.org/10.1002/pro.3499>
- Gitler, A. D., Dhillon, P., & Shorter, J. (2017). Neurodegenerative disease: models, mechanisms, and a new hope. *Disease Models & Mechanisms*, 10(5), 499-502. <https://doi.org/10.1242/dmm.030205>
- Goedert, M., & Spillantini, M. G. (2017). Propagation of Tau aggregates. *Molecular Brain*, 10(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s13041-017-0298-7>
- Golbe, L. I. (2014a). Progressive supranuclear palsy. *Semin Neurol*, 34(2), 151-159. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1381736>
- Golbe, L. I. (2014b). The tau of PSP: a long road to treatment. *Mov Disord*, 29(4), 431-434. <https://doi.org/10.1002/mds.25855>
- Guo, T., Noble, W., & Hanger, D. P. (2017). Roles of tau protein in health and disease. *Acta Neuropathol*, 133(5), 665-704. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1707-9>
- Ham, S., & Lee, S.-J. V. (2020). Advances in transcriptome analysis of human brain aging. *Experimental & Molecular Medicine*, 52(11), 1787-1797. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-00522-6>
- Hanger, D. P., Anderton, B. H., & Noble, W. (2009). Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends in Molecular Medicine*, 15(3), 112-119. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2009.01.003>
- Heckman, M. G., Brennan, R. R., Labbé, C., Soto, A. I., Koga, S., DeTure, M. A., Murray, M. E., Petersen, R. C., Boeve, B. F., van Gerpen, J. A., Uitti, R. J., Wszolek, Z. K., Rademakers, R., Dickson, D. W., & Ross, O. A. (2019). Association of MAPT Subhaplotypes With Risk of Progressive Supranuclear Palsy and Severity of Tau Pathology. *JAMA Neurol*, 76(6), 710-717. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2019.0250>
- Hernández, F., Merchán-Rubira, J., Vallés-Saiz, L., Rodríguez-Matellán, A., & Avila, J. (2020). Differences Between Human and Murine Tau at the N-terminal End [Mini Review]. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 12. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.00011>
- Höglinger, G. U., Melhem, N. M., Dickson, D. W., Sleiman, P. M., Wang, L. S., Klei, L., Rademakers, R., de Silva, R., Litvan, I., Riley, D. E., van Swieten, J. C., Heutink, P., Wszolek, Z. K., Uitti, R. J., Vandrovicova, J., Hurtig, H. I., Gross, R. G., Maetzler, W., Goldwurm, S., . . . Schellenberg, G. D. (2011). Identification of common variants influencing risk of the tauopathy progressive supranuclear palsy. *Nat Genet*, 43(7), 699-705. <https://doi.org/10.1038/ng.859>
- Höglinger, G. U., Respondek, G., Stamelou, M., Kurz, C., Josephs, K. A., Lang, A. E., Mollenhauer, B., Müller, U., Nilsson, C., Whitwell, J. L., Arzberger, T., Englund, E., Gelpi, E., Giese, A., Irwin, D.

- J., Meissner, W. G., Pantelyat, A., Rajput, A., van Swieten, J. C., . . . Litvan, I. (2017). Clinical diagnosis of progressive supranuclear palsy: The movement disorder society criteria. *Mov Disord*, 32(6), 853-864. <https://doi.org/10.1002/mds.26987>
- Huang, H., Teng, P., Du, J., Meng, J., Hu, X., Tang, T., Zhang, Z., Qi, Y. B., & Qiu, M. (2018). Interactive Repression of MYRF Self-Cleavage and Activity in Oligodendrocyte Differentiation by TMEM98 Protein. *The Journal of Neuroscience*, 38(46), 9829-9839. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0154-18.2018>
- Huin, V., Deramecourt, V., Caparros-Lefebvre, D., Maurage, C. A., Duyckaerts, C., Kovari, E., Pasquier, F., Buée-Scherrer, V., Labreuche, J., Behal, H., Buée, L., Dhaenens, C. M., & Sablonnière, B. (2016). The MAPT gene is differentially methylated in the progressive supranuclear palsy brain. *Mov Disord*, 31(12), 1883-1890. <https://doi.org/10.1002/mds.26820>
- Im, S. Y., Kim, Y. E., & Kim, Y. J. (2015). Genetics of Progressive Supranuclear Palsy. *J Mov Disord*, 8(3), 122-129. <https://doi.org/10.14802/jmd.15033>
- Iohan, L. d. C. C., Lambert, J.-C., & Costa, M. R. (2022). Analysis of modular gene co-expression networks reveals molecular pathways underlying Alzheimer's disease and progressive supranuclear palsy. *PLOS ONE*, 17(4), e0266405. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0266405>
- Israel, M. A., Yuan, S. H., Bardy, C., Reyna, S. M., Mu, Y., Herrera, C., Hefferan, M. P., Van Gorp, S., Nazor, K. L., Boscolo, F. S., Carson, C. T., Laurent, L. C., Marsala, M., Gage, F. H., Remes, A. M., Koo, E. H., & Goldstein, L. S. B. (2012). Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. *Nature*, 482(7384), 216-220. <https://doi.org/10.1038/nature10821>
- Jabbari, E., Koga, S., Valentino, R. R., Reynolds, R. H., Ferrari, R., Tan, M. M. X., Rowe, J. B., Dalgard, C. L., Scholz, S. W., Dickson, D. W., Warner, T. T., Revesz, T., Höglinger, G. U., Ross, O. A., Ryten, M., Hardy, J., Shoai, M., & Morris, H. R. (2021). Genetic determinants of survival in progressive supranuclear palsy: a genome-wide association study. *Lancet Neurol*, 20(2), 107-116. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(20\)30394-x](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(20)30394-x)
- Jackson, T. C., & Kochanek, P. M. (2020). RNA Binding Motif 5 (RBM5) in the CNS—Moving Beyond Cancer to Harness RNA Splicing to Mitigate the Consequences of Brain Injury [Review]. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.00126>
- Jiang, S., Wen, N., Li, Z., Dube, U., Del Aguila, J., Budde, J., Martinez, R., Hsu, S., Fernandez, M. V., Cairns, N. J., Harari, O., Cruchaga, C., & Karch, C. M. (2018). Integrative system biology analyses of CRISPR-edited iPSC-derived neurons and human brains reveal deficiencies of presynaptic signaling in FTL and PSP. *Transl Psychiatry*, 8(1), 265. <https://doi.org/10.1038/s41398-018-0319-z>
- Johns, T. G., & Bernard, C. C. (1999). The structure and function of myelin oligodendrocyte glycoprotein. *J Neurochem*, 72(1), 1-9. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.0720001.x>
- Josephs, K. A. (2017). Current Understanding of Neurodegenerative Diseases Associated With the Protein Tau. *Mayo Clin Proc*, 92(8), 1291-1303. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2017.04.016>
- Joshi, P., Darr, A. J., & Skromne, I. (2019). CDX4 regulates the progression of neural maturation in the spinal cord. *Developmental Biology*, 449(2), 132-142. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2019.02.014>
- Kambe, T., Motoi, Y., Inoue, R., Kojima, N., Tada, N., Kimura, T., Sahara, N., Yamashita, S., Mizoroki, T., & Takashima, A. (2011). Differential regional distribution of phosphorylated tau and synapse loss in the nucleus accumbens in tauopathy model mice. *Neurobiology of Disease*, 42(3), 404-414.

- Ke, M., Chong, C.-M., & Su, H. (2019). Using induced pluripotent stem cells for modeling Parkinson's disease. *World journal of stem cells*, 11(9), 634-649. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v11.i9.634>
- Korhonen, P., Malm, T., & White, A. R. (2018). 3D human brain cell models: New frontiers in disease understanding and drug discovery for neurodegenerative diseases. *Neurochemistry International*, 120, 191-199. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neuint.2018.08.012>
- Kovacs, G. G. (2018). Chapter 25 - Tauopathies. In G. G. Kovacs & I. Alafuzoff (Eds.), *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 145, pp. 355-368). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802395-2.00025-0>
- Kovacs, G. G., Lukic, M. J., Irwin, D. J., Arzberger, T., Respondek, G., Lee, E. B., Coughlin, D., Giese, A., Grossman, M., Kurz, C., McMillan, C. T., Gelpi, E., Compta, Y., van Swieten, J. C., Laatsch, L. D., Troakes, C., Al-Sarraj, S., Robinson, J. L., Roeber, S., . . . Höglinger, G. U. (2020). Distribution patterns of tau pathology in progressive supranuclear palsy. *Acta Neuropathol*, 140(2), 99-119. <https://doi.org/10.1007/s00401-020-02158-2>
- Langfelder, P., & Horvath, S. (2008). WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics*, 9(1), 559. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-559>
- Laperle, A. H., Sances, S., Yucer, N., Dardov, V. J., Garcia, V. J., Ho, R., Fulton, A. N., Jones, M. R., Roxas, K. M., Avalos, P., West, D., Banuelos, M. G., Shu, Z., Murali, R., Maidment, N. T., Van Eyk, J. E., Tagliati, M., & Svendsen, C. N. (2020). iPSC modeling of young-onset Parkinson's disease reveals a molecular signature of disease and novel therapeutic candidates. *Nature Medicine*, 26(2), 289-299. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0739-1>
- Lee, J., Pinares-Garcia, P., Loke, H., Ham, S., Vilain, E., & Harley, V. R. (2019). Sex-specific neuroprotection by inhibition of the Y-chromosome gene, *SRY*, in experimental Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(33), 16577-16582. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.1900406116>
- Levin, J., Kurz, A., Arzberger, T., Giese, A., & Höglinger, G. U. (2016). The Differential Diagnosis and Treatment of Atypical Parkinsonism. *Dtsch Arztebl Int*, 113(5), 61-69. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2016.0061>
- Lewis, J., McGowan, E., Rockwood, J., Melrose, H., Nacharaju, P., Van Slegtenhorst, M., Gwinn-Hardy, K., Murphy, M. P., Baker, M., & Yu, X. (2000). Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. *Nature genetics*, 25(4), 402-405.
- Li, H., Wang, Z., Ma, T., Wei, G., & Ni, T. (2017). Alternative splicing in aging and age-related diseases. *Translational Medicine of Aging*, 1, 32-40. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tma.2017.09.005>
- Li, X., Jiang, X., Gao, Q., & Zhao, P. (2021). FOXO3 Regulates Sevoflurane-Induced Neural Stem Cell Differentiation in Fetal Rats. *Cellular and Molecular Neurobiology*. <https://doi.org/10.1007/s10571-021-01055-w>
- Liu, J., Liu, M. C., & Wang, K. K. W. (2008). Calpain in the CNS: From Synaptic Function to Neurotoxicity. *Science Signaling*, 1(14), re1-re1. <https://doi.org/doi:10.1126/stke.114re1>
- Long, L., Cai, X. D., Wei, X. B., Liao, J. C., Xu, Y. Q., Gao, H. M., Chen, X. H., & Wang, Q. (2015). Progressive supranuclear palsy: what do we know about it? *Curr Med Chem*, 22(10), 1182-1193. <https://doi.org/10.2174/0929867322666150302170552>
- Mattan, N. S., Ghiani, C. A., Lloyd, M., Matalon, R., Bok, D., Casaccia, P., & de Vellis, J. (2010). Aspartoacylase deficiency affects early postnatal development of oligodendrocytes and myelination. *Neurobiology of Disease*, 40(2), 432-443. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nbd.2010.07.003>

- Mayela, R.-V., Amin, C.-A., Hugo, M.-B., Daniel, M.-R., Fernanda, M.-B., & Teresa, C. (2012). Prevalencia de parkinsonismos atípicos en la clínica de trastornos del movimiento de un hospital de referencia de la Ciudad de México. *Rev Mex Neuroci*, *13*(6), 296-300.
- Mella, C., Figueroa, C. D., Otth, C., & Ehrenfeld, P. (2020). Involvement of Kallikrein-Related Peptidases in Nervous System Disorders. *Front Cell Neurosci*, *14*, 166. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00166>
- Meyer, K., Feldman, H. M., Lu, T., Drake, D., Lim, E. T., Ling, K.-H., Bishop, N. A., Pan, Y., Seo, J., Lin, Y.-T., Su, S. C., Church, G. M., Tsai, L.-H., & Yankner, B. A. (2019). REST and Neural Gene Network Dysregulation in iPSC Models of Alzheimer's Disease. *Cell reports*, *26*(5), 1112-1127.e1119. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.023>
- Montague, P., McCallion, A. S., Davies, R. W., & Griffiths, I. R. (2006). Myelin-associated oligodendrocytic basic protein: a family of abundant CNS myelin proteins in search of a function. *Dev Neurosci*, *28*(6), 479-487. <https://doi.org/10.1159/000095110>
- Moretto, E., Stuart, S., Surana, S., Vargas, J. N. S., & Schiavo, G. (2022). The Role of Extracellular Matrix Components in the Spreading of Pathological Protein Aggregates [Review]. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *16*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2022.844211>
- Morris, B. J., Willcox, D. C., Donlon, T. A., & Willcox, B. J. (2015). FOXO3: a major gene for human longevity-a mini-review. *Gerontology*, *61*(6), 515-525.
- Mudher, A., Colin, M., Dujardin, S., Medina, M., Dewachter, I., Naini, S. M. A., Mandelkow, E.-M., Mandelkow, E., Buée, L., & Goedert, M. (2017). What is the evidence that tau pathology spreads through prion-like propagation? *Acta neuropathologica communications*, *5*(1), 1-20.
- Muley, V. Y., & König, R. (2022). Human transcriptional gene regulatory network compiled from 14 data resources. *Biochimie*, *193*, 115-125. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2021.10.016>
- Murakami, K., Jiang, Y. P., Tanaka, T., Bando, Y., Mitrovic, B., & Yoshida, S. (2013). In vivo analysis of kallikrein-related peptidase 6 (KLK6) function in oligodendrocyte development and the expression of myelin proteins. *Neuroscience*, *236*, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.12.073>
- Narasimhan, S., Guo, J. L., Changolkar, L., Stieber, A., McBride, J. D., Silva, L. V., He, Z., Zhang, B., Gathagan, R. J., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. Y. (2017). Pathological Tau Strains from Human Brains Recapitulate the Diversity of Tauopathies in Nontransgenic Mouse Brain. *J Neurosci*, *37*(47), 11406-11423. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.1230-17.2017>
- Noble, W., Hanger, D., Miller, C., & Lovestone, S. (2013). The Importance of Tau Phosphorylation for Neurodegenerative Diseases [Review]. *Frontiers in Neurology*, *4*. <https://doi.org/10.3389/fneur.2013.00083>
- Pampalakis, G., Sykioti, V. S., Ximerakis, M., Stefanakou-Kalakou, I., Melki, R., Vekrellis, K., & Sotiropoulou, G. (2017). KLK6 proteolysis is implicated in the turnover and uptake of extracellular alpha-synuclein species. *Oncotarget*, *8*(9), 14502-14515. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13264>
- Pan, P., Liu, Y., Zhang, Y., Zhao, H., Ye, X., & Xu, Y. (2017). Brain gray matter abnormalities in progressive supranuclear palsy revisited. *Oncotarget*, *8*(46), 80941-80955. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20895>
- Parthimos, T. P., & Schulpis, K. H. (2020). The Progressive Supranuclear Palsy: Past and Present Aspects. *Clin Gerontol*, *43*(2), 155-180. <https://doi.org/10.1080/07317115.2019.1694115>
- Pei, J.-J., Björkdahl, C., Zhang, H., Zhou, X., & Winblad, B. (2008). p70 S6 Kinase and Tau in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, *14*, 385-392. <https://doi.org/10.3233/JAD-2008-14405>

- Penney, J., Ralvenius, W. T., & Tsai, L.-H. (2020). Modeling Alzheimer's disease with iPSC-derived brain cells. *Molecular Psychiatry*, 25(1), 148-167. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0468-3>
- Pittman, A., de Silva, R., Lees, A. J., & Wood, N. W. (2008). Genetics of progressive supranuclear palsy. *Handb Clin Neurol*, 89, 475-485. [https://doi.org/10.1016/s0072-9752\(07\)01244-4](https://doi.org/10.1016/s0072-9752(07)01244-4)
- Quarles, R. H. (2007). Myelin-associated glycoprotein (MAG): past, present and beyond. *J Neurochem*, 100(6), 1431-1448. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04319.x>
- Reindl, M., & Waters, P. (2019). Myelin oligodendrocyte glycoprotein antibodies in neurological disease. *Nat Rev Neurol*, 15(2), 89-102. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0112-x>
- Respondek, G., Stamelou, M., Kurz, C., Ferguson, L. W., Rajput, A., Chiu, W. Z., van Swieten, J. C., Troakes, C., Al Sarraj, S., Gelpi, E., Gaig, C., Tolosa, E., Oertel, W. H., Giese, A., Roeber, S., Arzberger, T., Wagenpfeil, S., & Höglinger, G. U. (2014). The phenotypic spectrum of progressive supranuclear palsy: a retrospective multicenter study of 100 definite cases. *Mov Disord*, 29(14), 1758-1766. <https://doi.org/10.1002/mds.26054>
- Rösler, T. W., Tayanian Marvian, A., Brendel, M., Nykänen, N. P., Höllerhage, M., Schwarz, S. C., Hopfner, F., Koeglsperger, T., Respondek, G., Schweyer, K., Levin, J., Villemagne, V. L., Barthel, H., Sabri, O., Müller, U., Meissner, W. G., Kovacs, G. G., & Höglinger, G. U. (2019). Four-repeat tauopathies. *Prog Neurobiol*, 180, 101644. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2019.101644>
- Sanchez-Contreras, M. Y., Kouri, N., Cook, C. N., Serie, D. J., Heckman, M. G., Finch, N. A., Caselli, R. J., Uitti, R. J., Wszolek, Z. K., Graff-Radford, N., Petrucelli, L., Wang, L. S., Schellenberg, G. D., Dickson, D. W., Rademakers, R., & Ross, O. A. (2018). Replication of progressive supranuclear palsy genome-wide association study identifies SLCO1A2 and DUSP10 as new susceptibility loci. *Mol Neurodegener*, 13(1), 37. <https://doi.org/10.1186/s13024-018-0267-3>
- Sanese, P., Forte, G., Disciglio, V., Grossi, V., & Simone, C. (2019). FOXO3 on the Road to Longevity: Lessons From SNPs and Chromatin Hubs. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 17, 737-745. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.06.011>
- Schöndorf, D. C., Aureli, M., McAllister, F. E., Hindley, C. J., Mayer, F., Schmid, B., Sardi, S. P., Valsecchi, M., Hoffmann, S., Schwarz, L. K., Hedrich, U., Berg, D., Shihabuddin, L. S., Hu, J., Pruszek, J., Gygi, S. P., Sonnino, S., Gasser, T., & Deleidi, M. (2014). iPSC-derived neurons from GBA1-associated Parkinson's disease patients show autophagic defects and impaired calcium homeostasis. *Nature Communications*, 5(1), 4028. <https://doi.org/10.1038/ncomms5028>
- Shirafuji, N., Hamano, T., Yen, S.-H., Kanaan, N. M., Yoshida, H., Hayashi, K., Ikawa, M., Yamamura, O., Kuriyama, M., & Nakamoto, Y. (2018). Homocysteine Increases Tau Phosphorylation, Truncation and Oligomerization. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 891. <https://www.mdpi.com/1422-0067/19/3/891>
- Silzer, T. K., Pathak, G. A., & Phillips, N. R. (2020). Mitochondrial tRNA methylation in Alzheimer's disease and progressive supranuclear palsy. *BMC Med Genomics*, 13(1), 71. <https://doi.org/10.1186/s12920-020-0727-9>
- Silzer, T. K., Pathak, G. A., & Phillips, N. R. (2020). Mitochondrial tRNA methylation in Alzheimer's disease and progressive supranuclear palsy. *BMC Medical Genomics*, 13(1), 71. <https://doi.org/10.1186/s12920-020-0727-9>
- Šimić, G., Babić Leko, M., Wray, S., Harrington, C., Delalle, I., Jovanov-Milošević, N., Bažadona, D., Buée, L., De Silva, R., & Di Giovanni, G. (2016). Tau protein hyperphosphorylation and aggregation in Alzheimer's disease and other tauopathies, and possible neuroprotective strategies. *Biomolecules*, 6(1), 6.

- Slanzi, A., Iannoto, G., Rossi, B., Zenaro, E., & Constantin, G. (2020). In vitro Models of Neurodegenerative Diseases [Review]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00328>
- Smyth, G. K. (2004). Linear Models and Empirical Bayes Methods for Assessing Differential Expression in Microarray Experiments. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology*, 3(1). <https://doi.org/doi:10.2202/1544-6115.1027>
- Sohn, Y.-D., Han, J. W., & Yoon, Y.-s. (2012). Chapter 1 - Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Somatic Cells. In Y. Tang (Ed.), *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 111, pp. 1-26). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398459-3.00001-0>
- Sproul, A. A., Jacob, S., Pre, D., Kim, S. H., Nestor, M. W., Navarro-Sobrinho, M., Santa-Maria, I., Zimmer, M., Aubry, S., Steele, J. W., Kahler, D. J., Dranovsky, A., Arancio, O., Crary, J. F., Gandy, S., & Noggle, S. A. (2014). Characterization and Molecular Profiling of PSEN1 Familial Alzheimer's Disease iPSC-Derived Neural Progenitors. *PLOS ONE*, 9(1), e84547. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084547>
- Stezin, A., Lenka, A., Jhunjhunwala, K., Saini, J., & Pal, P. K. (2017). Advanced structural neuroimaging in progressive supranuclear palsy: Where do we stand? *Parkinsonism Relat Disord*, 36, 19-32. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2016.12.023>
- Stojnić, R. (2020). Overview of the PWMEnrich package.
- Sydow, A., Hochgräfe, K., Könen, S., Cadinu, D., Matenia, D., Petrova, O., Joseph, M., Dennissen, F. J., & Mandelkow, E.-M. (2016a). Age-dependent neuroinflammation and cognitive decline in a novel Ala152Thr-Tau transgenic mouse model of PSP and AD. *Acta neuropathologica communications*, 4(1), 1-21.
- Sydow, A., Hochgräfe, K., Könen, S., Cadinu, D., Matenia, D., Petrova, O., Joseph, M., Dennissen, F. J., & Mandelkow, E.-M. (2016b). Age-dependent neuroinflammation and cognitive decline in a novel Ala152Thr-Tau transgenic mouse model of PSP and AD. *Acta Neuropathologica Communications*, 4(1), 17. <https://doi.org/10.1186/s40478-016-0281-z>
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126(4), 663-676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Taylor, M. R., Roby, C. R., Elziny, S., Duricy, E., Taylor, T. M., & Bowers, J. M. (2020). Age, but Not Sex, Modulates Foxp3 Expression in the Rat Brain across Development. *Neuroscience*, 442, 87-99. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.06.032>
- Tcw, J. (2019). Human iPSC application in Alzheimer's disease and Tau-related neurodegenerative diseases. *Neuroscience Letters*, 699, 31-40. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.01.043>
- Visscher, Peter M., Brown, Matthew A., McCarthy, Mark I., & Yang, J. (2012). Five Years of GWAS Discovery. *The American Journal of Human Genetics*, 90(1), 7-24. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.11.029>
- Vlasov, I. N., Alieva, A. K., Novosadova, E. V., Arsenyeva, E. L., Rosinskaya, A. V., Partevian, S. A., Grivennikov, I. A., & Shadrina, M. I. (2021). Transcriptome Analysis of Induced Pluripotent Stem Cells and Neuronal Progenitor Cells, Derived from Discordant Monozygotic Twins with Parkinson's Disease. *Cells*, 10(12), 3478. <https://www.mdpi.com/2073-4409/10/12/3478>
- Walker, L. C., Diamond, M. I., Duff, K. E., & Hyman, B. T. (2013). Mechanisms of Protein Seeding in Neurodegenerative Diseases. *JAMA Neurology*, 70(3), 304-310. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2013.1453>

- Wang, X., Allen, M., Reddy, J. S., Carrasquillo, M. M., Asmann, Y. W., Funk, C., Nguyen, T. T., Malphrus, K. G., Younkin, S. G., Dickson, D. W., Price, N. D., Golde, T. E., & Ertekin-Taner, N. (2021). Conserved Architecture of Brain Transcriptome Changes between Alzheimer's Disease and Progressive Supranuclear Palsy in Pathologically Affected and Unaffected Regions. *bioRxiv*, 2021.2001.2018.426999. <https://doi.org/10.1101/2021.01.18.426999>
- Weber, A., Schwarz, S. C., Tost, J., Trümbach, D., Winter, P., Busato, F., Tacik, P., Windhorst, A. C., Fagny, M., Arzberger, T., McLean, C., van Swieten, J. C., Schwarz, J., Vogt Weisenhorn, D., Wurst, W., Adhikary, T., Dickson, D. W., Höglinger, G. U., & Müller, U. (2018). Epigenome-wide DNA methylation profiling in Progressive Supranuclear Palsy reveals major changes at DLX1. *Nat Commun*, 9(1), 2929. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05325-y>
- Weiner, W. J. (2009). Re: J. Clifford Richardson and 50 years of progressive supranuclear palsy. *Neurology*, 72(2), 199; author reply 199-200. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000344240.27414.6d>
- Wen, Y., Zhou, Y., Jiao, B., & Shen, L. (2021). Genetics of Progressive Supranuclear Palsy: A Review. *J Parkinsons Dis*, 11(1), 93-105. <https://doi.org/10.3233/jpd-202302>
- Wongpalee, S. P., Vashisht, A., Sharma, S., Chui, D., Wohlschlegel, J. A., & Black, D. L. (2016). Large-scale remodeling of a repressed exon ribonucleoprotein to an exon definition complex active for splicing. *eLife*, 5, e19743. <https://doi.org/10.7554/eLife.19743>
- Wu, Y., Jin, M., Fernandez, M., Hart, K., Liao, A., Fernandes, S. M., McDonald, T., Ghoda, L., Roeth, D., Kalkum, M., Pillai, R., Chen, J., Brown, J. R., Danilov, A. V., Rosen, S. T., Siddiqi, T., & Wang, L. (2021). METTL3 Dysregulates RNA Splicing by Translational Control of Splicing Factors via m6A Modification in CLL. *Blood*, 138, 499. <https://doi.org/https://doi.org/10.1182/blood-2021-149691>
- Yokoyama, J. S., Karch, C. M., Fan, C. C., Bonham, L. W., Kouri, N., Ross, O. A., Rademakers, R., Kim, J., Wang, Y., Höglinger, G. U., Müller, U., Ferrari, R., Hardy, J., Momeni, P., Sugrue, L. P., Hess, C. P., James Barkovich, A., Boxer, A. L., Seeley, W. W., . . . Desikan, R. S. (2017). Shared genetic risk between corticobasal degeneration, progressive supranuclear palsy, and frontotemporal dementia. *Acta Neuropathol*, 133(5), 825-837. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1693-y>
- Yuan, Q., Zhang, S., Li, J., Xiao, J., Li, X., Yang, J., Lu, D., & Wang, Y. (2020). Comprehensive analysis of core genes and key pathways in Parkinson's disease. *Am J Transl Res*, 12(9), 5630-5639.
- Zhang, J., Ali, A. M., Lieu, Y. K., Liu, Z., Gao, J., Rabadan, R., Raza, A., Mukherjee, S., & Manley, J. L. (2019). Disease-Causing Mutations in SF3B1 Alter Splicing by Disrupting Interaction with SUGP1. *Molecular Cell*, 76(1), 82-95.e87. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.07.017>
- Zhang, N., Bailus, B. J., Ring, K. L., & Ellerby, L. M. (2016). iPSC-based drug screening for Huntington's disease. *Brain Research*, 1638, 42-56. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.09.020>
- Zhao, T., Gan, Q., Stokes, A., Lassiter, R. N. T., Wang, Y., Chan, J., Han, J. X., Pleasure, D. E., Epstein, J. A., & Zhou, C. J. (2014). β -catenin regulates Pax3 and Cdx2 for caudal neural tube closure and elongation. *Development*, 141(1), 148-157. <https://doi.org/10.1242/dev.101550>
- Zou, F., Chai, H. S., Younkin, C. S., Allen, M., Crook, J., Pankratz, V. S., Carrasquillo, M. M., Rowley, C. N., Nair, A. A., Middha, S., Maharjan, S., Nguyen, T., Ma, L., Malphrus, K. G., Palusak, R., Lincoln, S., Bisceglia, G., Georgescu, C., Kouri, N., . . . Ertekin-Taner, N. (2012). Brain expression genome-wide association study (eGWAS) identifies human disease-associated variants. *PLoS Genet*, 8(6), e1002707. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002707>