

**Departament de Biologia cel.lular  
i Anatomia Patològica  
Universitat de Barcelona**

Estudi de les sinucleïnopaties:  
L 'α-sinucleïna a la sinapsi i  
efectes de l'estrès oxidatiu

Esther Dalfó Capella  
2004

**Departament de Biologia cel.lular  
i Anatomia Patològica  
Universitat de Barcelona**

Memòria que presenta Esther Dalfó Capella per a optar al grau de Doctor en Ciències Biològiques.

El treball que aquí es presenta ha estat realitzat sota la direcció del Dr. Isidre Ferrer Abizanda, professor titular d'Anatomia Patològica de la Universitat de Barcelona, en el departament de Biologia Cel.lular i Anatomia Patològica de la Facultat de Medicina, campus de Bellvitge

Dr. Isidre Ferrer Abizanda

Esther Dalfó Capella

**Nuestras horas son minutos  
Cuando esperamos saber,  
Y siglos cuando sabemos  
Lo que se puede aprender.**

**Bueno es saber que los vasos  
Nos sirven para beber;  
Lo malo es que no sabemos  
Para qué sirve la sed.**

(...)

**A.Machado, de Consejos, Coplas, Apuntes**

### **Agraïments (I)**

*Els agraïments són aquell apartat de les tesis que tothom es sol mirar primer i que presenten especial interès, potser perquè és l'únic espai on els autors poden expressar com han viscut personalment els anys de treball professional. Els agraïments són, de fet, la part més subjectiva, no per això menys interessant, perquè llegint-los a vegades un es pot fer la idea de com ha estat la vivència de fer una tesi. De fet, en el meu cas necessitaria fer un altre llibre que contingés la meva experiència personal, i és per això que m'he permès el luxe d'incloure aquest petit apartat, perquè són molts els que han fet que tot el treball que aquí es presenta sigui possible, tan a nivell de laboratori com fora, perquè sense el suport i la paciència d'alguns pocs i les opinions i vivències d'uns quants, tot aquest treball quedaria buit.*

*Gràcies a tots!*

## **Agraïments (II)**

*La primera persona responsable que hagi aconseguit acabar aquesta etapa és el Dr. Isidre Ferrer Abizanda, que m'ha donat molt més que suport i coneixements en el món de la ciència i molt més del que ser director-de-tesi comporta. Gràcies per ajudar-me a créixer i espero haver estat al nivell...*

*També voldria donar les gràcies als Drs Santi Ambrosio i José Luis Rosa, del departament de bioquímica de Bellvitge, perquè l'atzar juntament amb ells mateixos, literalment, van fer que comencés la tesi amb l'Isidre i gràcies a la seva col.laboració i ajuda he conegut l' $\alpha$ -sinucleïna, les proteïnes rab i tot el què de la tesi se'n desprèn. Gràcies pels coneixements, paciència i bons consells.*

*Tal com vaig dir moltes vegades a la gent del laboratori del costat, els poso als agraïments de la tesi per tot el què m'han deixat, pel què m'han ajudat, per suportar la contaminació acústica de la centrifuga, a part de fer la feina molt més portable compartint quelcom més que l'espai per treballar: L'Imma, la Mireia, en Benja, la Laura, en Marc, L'Àlex, la Laia, l'Adriana, la Neus, l'Artur, l'Ashraf, i en Joan Blasi, pels seus consells bioquímics i ajudar-me sempre que ho he necessitat.*

*Les persones, però, que han fet que realment valgués la pena el treball al laboratori han estat les compis, les nenes, la Rosi i la Marga o la Marga i la Rosi, o Rosi-Marga-Marga-Rosi, que a part de ser imprescindibles en la manera de funcionar del lab, també han estat per mi com unes germanes grans en molts sentits... a la Loli, un tot-terreny increïble, tan professional com personalment,... a la Marta Barrachina, per la seva infinita paciència i per haver-me ensenyat a treballar, no només amb les cèl.lules, sinó en general de forma pràctica i amb rigor científic, per ser generosa amb el seu temps i no tenir mai un no alhora d'ajudar-me... a la Berta Puig, per el seu saber estar en cada moment i les discussions científiques que hem tingut, que a part d'haver-me divertit molt, m'han fet veure la llum tantes vegades!!, a la Meri i la Laura, perquè la barrera de la feina no la vam ni notar des d'un principi, per la seva amistat, la confiança, les ganes de riure i de plorar, per viure una etapa nova cada una de nosaltres i estar sempre allà on calgui.... a la resta de gent del grup que, sobretot per qüestió d'ubicació del laboratori, no he tingut la oportunitat de conèixer en profunditat però que també fan que el grup sigui com és i sempre m'han fet sentir una més: la Montse, l'Avelina, la Noemi la Judith, la Sole i l'únic noi, l'Agustí, que ho porta perfectament això d'estar envoltat de dones com nosaltres, o almenys això sembla...*

*També li voldria donar les gràcies a la Maria Nieto, perquè crec que he viscut les 2 setmanes més intenses en aquest laboratori gràcies a ella i m'ho vaig passar bomba formant un equip pro-sinucleïna.*

*Deixant de banda ara la gent que m'envolta professionalment, per mi han estat igual d'importants aquells que m'han aguantat, m'han suportat i han esta amb mi tot aquest temps, alguns sense adonar-se'n i d'altres de forma més clara, han compartit i fins hi tot alguns han arribat a entendre, què era per mi fer la tesi: a la gent de Sant Feliu, a la Raki, per aguantar-ho TOT incondicionalment des de fa tant de temps...*

*Als meus pares, els últims i primers responsables, que m'han acompanyat sempre tot i no saber cap a on anava, no només en el petit camí científic que he iniciat sinó en l'aventura que ja fa uns anys que continua i que espero, com a mínim, viure-la al màxim. A ells els hi dedico tot l'esforç, totes les meves vivències, experiències, experiments, amics, enrabiades, alegries, "subidons", articles, cursos, hores, en fi, tot el pack-tesi, perquè és el mínim que es mereixen, perquè no sé com podré estar mai a la seva alçada, de veritat... moltes gràcies!!!*

*I finalment de tots els finals a en Santi Buscarons, per aguantar lo inaguantable, entendre lo incompresnsible i fer-me viure dia a dia el **don't stop me now**.*

<b>INTRODUCCIÓ .....</b>	<b>11</b>
<b>1. LA FAMÍLIA DE LES SINUCLEÏNES.....</b>	<b>12</b>
<b>2. L'α-SINUCLEÏNA .....</b>	<b>14</b>
2.1 ESTRUCTURA DE LA SINUCLEÏNA .....	14
2.2 GENÈTICA DE L'α- SINUCLEÏNA .....	17
2.3 MODELS AMB ANIMALS TRANSGÈNICS. ....	18
2.3.1 Ratolins nuls per a l'α-sinucleïna: pèrdua de funció.....	18
2.3.2 Ratolins transgènics per l'α-sinucleïna: models genètics de guany de funció. ....	19
2.3.3 MODEL GENÈTIC A <i>DROSOPHILA</i> . ....	20
2.4. ELS COSSOS DE LEWY .....	22
2.5. INCLUSIONS CITOPLASMÀTIQUES GLIALS (GCI) .....	28
2.6. FOSFORILACIÓ DE L'α-SINUCLEÏNA.....	29
2.7. L'α-SINUCLEÏNA I LES VESÍCULES SINÀPTIQUES.....	30
<b>3. ELS RECEPTORS GLUTAMATÈRGICS I LA TRANSMISSIÓ SINÀPTICA.....</b>	<b>32</b>
<b>4. ESTRÈS OXIDATIU .....</b>	<b>34</b>
4.1. L'MPTP I L'α-SINUCLEÏNA .....	35
4.2 ROTENONA I PESTICIDES .....	37
4.3 RAGE I L'ESTRÈS OXIDATIU. ....	37
<b>5. EL PERQUÈ DE L'ESTUDI DE L'α-SINUCLEÏNA: LES α-SINUCLEÏNOPATIES ...</b>	<b>38</b>
5.1. MALALTIA DE PARKINSON.....	38
5.1.1 Genètica de la malaltia de Parkinson .....	39
5.1.2 Patogènesi de la malaltia de Parkinson.....	41
5.1.3 Clínica de la malaltia de Parkinson.....	42
5.1.4 Neuropatologia de la malaltia de Parkinson .....	43
5.2 DEMÈNCIA AMB COSSOS DE LEWY (DLB).....	43
5.2.1. Clínica de la DLB.....	44
5.2.2 Neuropatologia de la DLB.....	45
5.2.3. L' AβPP i DLBs .....	46
5.3 ATRÒFIA MULTISISTÈMICA (MSA).....	47
5.3.1 Clínica de l'MSA .....	47
<b>OBJECTIUS .....</b>	<b>49</b>
<b>RESULTATS.....</b>	<b>53</b>
<b>I. ESTUDI DE LES INTERACCIONS DE L' α-SINUCLEÏNA .....</b>	<b>54</b>
I.I. DALFÓ E, BARRACHINA M, ROSA JL, AMBROSIO S, FERRER I <i>ABNORMAL A-SYNUCLEIN INTERACTIONS WITH RAB3A AND RABPHILIN IN DIFFUSE LEWY BODY DISEASE. NEUROBIOL DISEASE 16 (2004) 92-97.</i> ....	54

I.II. DALFÓ E, BARRACHINA M, ROSA JL, AMBROSIO S, FERRER I <i>ABNORMAL <math>\alpha</math>-SYNUCLEIN INTERACTIONS WITH RAB PROTEINS IN <math>\alpha</math>-SYNUCLEIN A30P TRANSGENIC MICE. J NEUROPATHOL EXP NEUROL. 2004 APR;63(4):302-13.</i>	62
I.III DALFÓ E, FERRER I (2004) <i><math>\alpha</math>-SYNUCLEIN BINDING TO RAB3A IN MULTIPLE SYSTEM ATROPHY: IMMUNOPRECIPITATION STUDIES INDICATE GENERALIZED ABNORMAL INTERACTIONS.(ENVIAT A JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY).</i>	78
<b>II ALTERACIONS DELS RECEPTORS METABOTRÒPICS DEL GLUTAMAT EN LA DEMÈNCIA AMB COSSOS DE LEWY</b>	<b>101</b>
II.I. DALFÓ E, ALBASANZ JL, MARTIN M, FERRER I <i>ABNORMAL METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR EXPRESSION AND SIGNALLING IN THE CEREBRAL CORTEX IN DIFFUSE LEWY BODY DISEASE IS ASSOCIATED WITH IRREGULAR <math>\alpha</math>-SYNUCLEIN/PHOSPHOLIPASE C (PLC<math>\beta</math>1) INTERACTIONS. BRAIN PATHOL 2004;14:388-398.</i>	101
<b>III. L'ESTRÈS OXIDATIU</b>	<b>114</b>
III.I. PORTERO-OTÍN M, DALFÓ E, AYALA MV, PAMPLONA R, FERRER I (2004) <i>EVIDENCE OF OXIDATIVE STRESS IN THE CEREBRAL CORTEX IN ASYMPTOMATIC PARKINSON'S DISEASE (INCIDENTAL LEWY BODY DISEASE WITH BRAIN STEM INVOLVEMENT). (ENVIAT A JOURNAL OF NEUROPATHOLOGY AND EXPERIMENTAL NEUROLOGY).</i>	114
III. II. PAMPLONA R, DALFÓ E, AYALA MV, BELLMUNT MJ, FERRER I, PORTERO-OTÍN M, (2004) <i>MARKERS OF PROTEIN OXIDATIVE DAMAGE, AGES AND RAGES IN BRAIN CORTEX FROM ALZHEIMER'S DISEASE PATIENTS. (ENVIAT A JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY).</i>	144
<b>IV. L'A<math>\beta</math>PP EN LES DLBS</b>	<b>175</b>
IV. I. BARRACHINA M, DALFÓ E, PUIG B, VIDAL N, FREIXES M, CASTAÑO E, FERRER I (2004) <i>AMYLOID-<math>\beta</math> DEPOSITION IN THE CEREBRAL CORTEX IN DEMENTIA WITH LEWY BODIES IS ACOMPAINED BY A RELATIVE INCREASE IN A<math>\beta</math>PP mRNA ISOFORMS CONTAINING THE KUNITZ PROTEASE INHIBITOR. (ACCEPTAT A NEUROCHEMISTRY INTERNATIONAL)</i>	175
<b>DISCUSSIÓ</b>	<b>219</b>
<b>I. ESTUDI DE LES INTERACCIONS DE L'<math>\alpha</math>-SINUCLÈINA</b>	<b>200</b>
<b>II. ALTERACIONS DELS RECEPTORS METABOTRÒPICS DEL GLUTAMAT EN LA DEMÈNCIA AMB COSSOS DE LEWY</b>	<b>204</b>
<b>III. L'ESTRÈS OXIDATIU EN LES SINUCLEÏNOPATIES</b>	<b>206</b>
LA PROTEÏNA $\beta$ -AMILOIDE EN DLBDS	211

<b>CONCLUSIONS</b> .....	<b>211</b>
<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>215</b>
<b>I. ARRAY PER <math>\alpha</math>-SINUCLÈÏNA EN DEMÈNCIA AMB COSSOS DE LEWY (DLB). ...</b>	<b>218</b>
<b>II. PROTOCOL D'IMMUNOPRECIPITACIÓ (IP) DE L'<math>\alpha</math>-SINUCLÈÏNA EN TEIXIT HUMÀ</b> .....	<b>219</b>
<b>III. PROTOCOL D'IMMUNOPRECIPITACIÓ (IP) DE RAB3A</b> .....	<b>220</b>
<b>IV. PROTOCOL DE PULL DOWN DE LES PROTEÏNES RAB3A, RAB5 I RAB8</b> .....	<b>221</b>
<b>V. AÏLLAMENT DE FRACCIONS INSOLUBLES D'<math>\alpha</math>-SINUCLÈÏNA EN CERVELL HUMÀ.</b> .....	<b>222</b>
<b>VI. PROTOCOL D'IMMUNOPRECIPITACIÓ DE PLC<math>\beta</math>1 EN CERVELL HUMÀ</b> .....	<b>223</b>
<b>VII. PROTOCOL D'AÏLLAMENT DE VESÍCULES PER GRADIENT DE SACAROSA EN CERVELL HUMÀ</b> .....	<b>223</b>
<b>VIII. PROTOCOL D'AÏLLAMENT DE MEMBRANA PLASMÀTICA</b> .....	<b>224</b>
<b>IX. PROTOCOL D'UNIÓ (<i>BINDING</i>) DEL RECEPTOR METABOTRÒPIC DEL GLUTAMAT A MEMBRANA PLASMÀTICA</b> .....	<b>224</b>
<b>X. PROTOCOLS DE BIOLOGIA MOL. LECULAR</b> .....	<b>225</b>
X.I. AÏLLAMENT D'ARN MISSATGER (MRNA).....	225
X.II SÍNTESI DE CDNA.....	225
X.III PCR TAQMAN .....	226
<b>REFERÈNCIES</b> .....	<b>225</b>
<b>APÈNDIX</b> .....	<b>253</b>

## ÍNDIX DE TAULES I FIGURES

<b>Taula 1.</b> Nomenclatura Dels Gens De La Sinucleïna I Proteïnes.....	14
<b>Taula 2.</b> Models Animals D' $\alpha$ -Sinucleïnopatia.....	22
<b>Taula 3.</b> Classificació De Les Sinucleïnopaties.....	23
<b>Fig. 1.</b> Seqüència I Dominis De L' $\alpha$ -Sinucleïna.....	15
<b>Fig. 2a</b> Cos De Lewy A La Malaltia De Parkinson.....	25
<b>Fig. 2b</b> Inclusions Glials Citoplasmàtiques.....	25
<b>Fig. 2c</b> Neurites Distròfiques En Còrtex .....	25
<b>Fig. 3</b> Proteïnes Que Interaccionen I/O Co-Localitzen Amb L' $\alpha$ -Sinucleïna.....	26
<b>Fig.4</b> L' $\alpha$ -Sinucleïna En La Sinapsi.....	32
<b>Fig.5</b> Esquema Dels Receptors Metabotròpics Del Glutamat.....	33
<b>Fig. 6</b> Esquema Representatiu De La Possible Ubicació De L' $\alpha$ -Sinucleïna, La Rab3a I La Rabfilina En El Pool Vesicular .....	199



## ABREVIATURES

6-OHDA:	6-hidroxi dopamina
$\beta$ A4:	Pèptid $\beta$ amiloid
AA:	Angiopatia Amiloidea
AASA:	Semialdehid aminoaldíc
AD:	Malaltia D'Alzheimer
ADNc:	ADN complementari
AGE:	Productes finals de glicosilació avançada
CEL:	N <sup>ε</sup> carboxietil lisina
CML:	N <sup>ε</sup> carboximetil lisina
DAG:	Diacilglicerol
DAT:	Transportador de dopamina
DLB:	Demència amb cossos de Lewy
DNP:	2,4-dinitrophenilhidracina
GIRKs:	Canals de potassi associats a proteïna G
GPCRs:	Receptors acoblats a proteïnes G
GRKs:	Receptors quinasa associats a proteïna G
GSA:	Semialdehid glutàmic
GSH:	Glutatió reduït
HE:	Hematoxilina-Eosina
IP:	Immunoprecipitació
IP3:	Inositol 3-fosfat
LB:	Cossos de Lewy
MCO:	Oxidació catalitzada per metalls
MDA:	Malondialdehid
MDAL:	N <sup>ε</sup> malondialdehid lisina
MPTP:	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
mGluR1:	Tipus 1 dels receptors metabotròpics del Glutamat
MSA:	Atròfia Multisistèmica
NACP:	Component no amiloide de les plaques
NFT:	Filaments del neuròpil
PD:	Malaltia de Parkinson
PHF:	Filaments aparellats del neuròpil
PI:	Fosfatidil inositol
PIP2:	Fosfatidil inositol 1-4,5-bifosfat
PKA:	Proteïna quinasa A

PKC:	Proteïna quinasa C
PLC $\beta$ :	Fosfolipasa C $\beta$
PLD	Fosfolipasa D
PSP:	Paràlisi Supranuclear Progressiva
PUFA:	Àcid gras poliinsaturat
RAGE:	Receptor dels Productes finals de glicosilació avançada
ROS:	Espècies reactives d'oxigen
SOD:	Superòxid dismutasa
UFA:	Àcid gras insaturat
UPS:	Complexe ubiquitina-proteosoma