



Universidad
Zaragoza



Estudio de factores genéticos que afectan a casos esporádicos de la Enfermedad de Parkinson

Trabajo Fin de Máster
Biología Molecular y Celular

Autor/es:

Sheila Sánchez García

Director/es:

Dr. M^a Pilar Bayona-Bafaluy

Dr. Nuria Garrido Pérez

Facultad de Ciencias

Septiembre 2014

ÍNDICE

1. Introducción	Pág. 3
1.1. La enfermedad de Parkinson	Pág. 3
1.2. La mitocondria y la enfermedad de Parkinson	Pág. 4
La mitocondria	Pág. 4
El sistema OXPHOS	Pág. 5
Fosforilación oxidativa en la EP	Pág. 6
DNA mitocondrial en la EP	Pág. 7
Tóxicos ambientales en la EP	Pág. 8
1.3. Mutaciones en genes asociados al Parkinson y su relación con la mitocondria	Pág. 8
α -sinucleína	Pág. 9
LRRK2	Pág. 10
PINK1	Pág. 11
Parkina	Pág. 13
DJ-1	Pág. 15
HTRA2	Pág. 16
1.4. Interacciones genes-ambiente en la EP	Pág. 16
2. Objetivo	Pág. 19
3. Material y métodos	Pág. 20
Material	Pág. 20
3.1. Kits y reactivos comerciales	Pág. 20
3.2. Líneas celulares eucariotas	Pág. 21
3.3. Cebadores	Pág. 21
3.4. Anticuerpos	Pág. 22
Métodos	Pág. 22
3.5. Cultivos celulares eucariotas	Pág. 22
3.5.1. Crecimiento de células SH-SY5Y	Pág. 22
3.5.2. Transfección celular	Pág. 22
3.6. Preparación de cebadores	Pág. 24
3.7. Técnicas de manipulación de RNA total	Pág. 24
3.7.1. Técnicas de extracción de RNA total	Pág. 24
3.7.2. Técnicas de cuantificación de RNA total	Pág. 25
3.7.3. Obtención de cDNA a partir de RNA (RT-PCR)	Pág. 26
3.7.4. RT-PCR a tiempo real	Pág. 26
3.8. Técnicas de manipulación de DNA	Pág. 26
3.8.1. Reacción en cadena de la polimerasa	Pág. 26
3.8.1.1. Amplificación de DNA por PCR utilizando como molde cDNA	Pág. 26
3.8.2. Electroforesis horizontal de DNA en geles de agarosa	Pág. 28
3.8.3. Purificación de productos de PCR	Pág. 28
3.8.4. Secuenciación automática del DNA	Pág. 28
3.9. Técnicas de manipulación de proteínas	Pág. 29
3.9.1. Extracción de proteínas de cultivos	Pág. 29

celulares	
3.9.2. Determinación de la concentración de proteínas por el método Bradford	Pág. 29
3.9.3. Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE	Pág. 30
3.9.4. Western-blot	Pág. 32
3.9.4.1. Transferencia y fijación de proteínas a membrana	Pág. 32
3.9.4.2. Incubación de la membrana con los anticuerpos primario y secundario	Pág. 32
3.9.4.3. Revelado de la autorradiografía	Pág. 33
3.9.4.4. Cuantificación de las bandas y estadística	Pág. 33
4. Resultados	Pág. 35
4.1. Análisis de las secuencias de los genes relacionados con la EP	Pág. 35
4.2. Análisis de la expresión de proteínas mediante Western-blot	Pág. 39
4.3. Estudio de la sobreexpresión de Parkina	Pág. 43
4.3.1. Estudio de la sobreexpresión de Parkina mediante Western-blot	Pág. 43
4.3.2. Estudio de la expresión de Parkina mediante qRT-PCR	Pág. 47
5. Discusión	Pág. 50
6. Conclusiones	Pág. 55
7. Bibliografía	Pág. 56
Anexo I. Cebadores utilizados	Pág. 59
Anexo II. Abreviaturas	Pág. 61
Anexo III. Cuantificación de las bandas obtenidas por WB	Pág. 63

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) es un desorden neurodegenerativo que se caracteriza por la presencia de cuerpos de Lewy y la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra. Los cuerpos de Lewy son inclusiones proteicas intracitoplasmáticas compuestas principalmente de α -sinucleína y en las que se encuentran otras proteínas relacionadas con la EP. El papel que los cuerpos de Lewy desempeñan en la enfermedad es controvertido, ya que no está claro si causan la degeneración de la célula en la que se hayan o la protegen acumulando proteínas que de otra forma podrían ser dañinas.

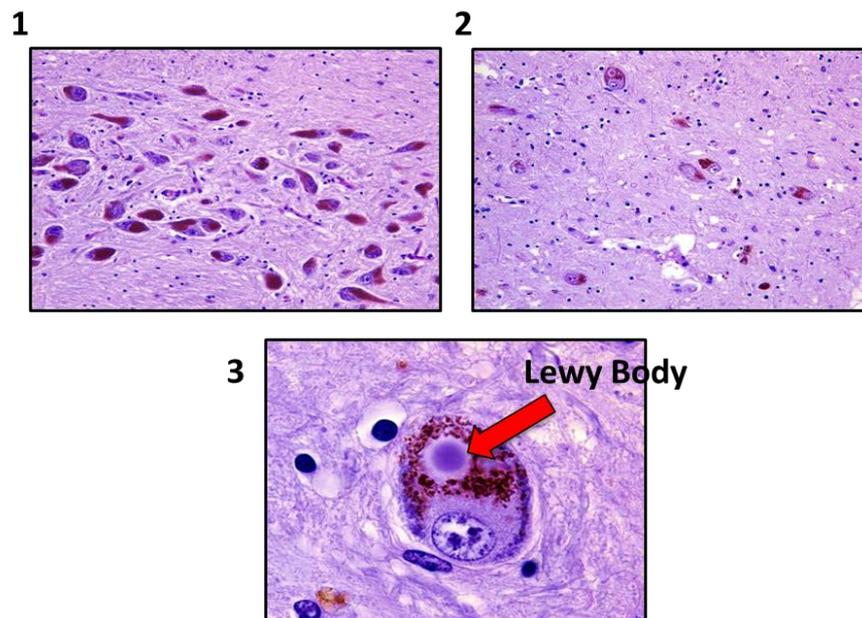


Figura 1. Imágenes obtenidas mediante tinción Hematoxilina-Eosina (H&E) de la sustancia negra de la zona compacta de un sujeto sano (1) y de un individuo con la EP (2) en las que se observa la pérdida de neuronas dopaminérgicas característica de la enfermedad. En la última imagen (3) observamos la aparición de un cuerpo de Lewy (Lewy body) en el interior de una neurona dopaminérgica. Imagen tomada de Gasser T, Hardy J, Mizuno Y. *Milestones in PD Genetics*.

Hoy en día se reconoce a la EP como una enfermedad neurodegenerativa multisistémica que afecta a diversas vías neuronales y sistemas de neurotransmisores [1], y cuyos síntomas característicos son: temblor, bradiquinesia (lentitud de

movimientos), rigidez articular e inestabilidad postural. Debido a la afectación de otras poblaciones celulares y otros circuitos dentro del sistema nervioso, otros síntomas aparecen asociados a la enfermedad de Parkinson: depresión, ansiedad, trastornos del sueño, apatía, demencia,... que a menudo no se consideran como propios de la enfermedad.

La enfermedad de Parkinson es una de las enfermedades neurodegenerativas con más prevalencia en la sociedad (se trata de la segunda causa de trastorno neurológico, por detrás de la enfermedad de Alzheimer) y con gran repercusión, tanto en las actividades de la vida diaria, como en la calidad de vida del paciente, lo que supone una carga social y económica. Su prevalencia aumenta con la edad: desde un 1% en la población por encima de 60 años hasta un 4% por encima de los 85 años [2]. Debido a los cambios demográficos y al aumento de la esperanza de vida en los países desarrollados la prevalencia de la EP seguirá creciendo en las próximas décadas debido a la falta de tratamientos preventivos o cura. Además de la edad, factores ambientales como los pesticidas, el tabaco o la cafeína podrían tener influencia en el riesgo de un individuo a padecer la EP. [3]

La gravedad del fenotipo, la alta prevalencia de la enfermedad, su impacto económico y la inhabilidad para prevenirla, junto con el hecho de que hoy en día la EP es incurable, hacen que encontrar sus causas sea uno de los puntos clave para el desarrollo de futuras terapias o tratamientos.

1.2 La mitocondria y la enfermedad de Parkinson

La mitocondria

Las mitocondrias son unos orgánulos celulares que se encuentran en prácticamente todas las células eucariotas, su principal función es la oxidación de metabolitos (ciclo de Krebs, beta-oxidación de ácidos grasos) y la obtención de ATP mediante la fosforilación oxidativa (sistema OXPHOS), que es dependiente de la cadena transportadora de electrones (CTE). El ATP producido en la mitocondria supone un porcentaje muy alto del ATP sintetizado por la célula.



Figura 2. Imagen de una mitocondria obtenida mediante microscopio electrónico de barrido (SEM). (P. Motta & T. Naguro , Science Photo Library)

Aparte de su importante papel como la fábrica de energía de las células, las mitocondrias también están altamente involucradas en muchos otros procesos celulares, incluyendo la homeostasis del calcio, la respuesta al estrés y la inducción de la muerte celular. Las mitocondrias son orgánulos altamente dinámicos con una amplia gama de morfologías dependiendo del tipo, la salud y la actividad de determinadas células. La morfología mitocondrial está regulada por el equilibrio de eventos altamente coordinados de fisión y fusión. Estos cambios dinámicos en la morfología mitocondrial son necesarios para mantenerlas saludables y son cuidadosamente regulados ya que un desequilibrio entre los procesos de fusión y fisión podría acarrear la fragmentación o la elongación inapropiada de las mitocondrias [4]. Es evidente que las mitocondrias son vitales para el buen funcionamiento de las células neuronales, que son particularmente sensibles a la disfunción mitocondrial debido a sus altos requerimientos de energía para el mantenimiento y la transmisión sináptica [5].

El sistema OXPHOS

El sistema de fosforilación oxidativa es el encargado de producir ATP en las mitocondrias y está compuesto por la ATP sintasa (complejo V) y la cadena de transporte de electrones (complejos respiratorios I, III, y IV, citocromo c o coenzima Q). Siete polipéptidos del CI, uno del CIII, tres del CIV y dos del CV están codificados en el mtDNA, el cual también codifica los RNAs (2 rRNAs y 22 tRNAs) que se necesitan para la expresión de estos polipéptidos. Además de la generación de ATP, en este sistema también se generan otros productos como las especies reactivas de oxígeno (ROS).

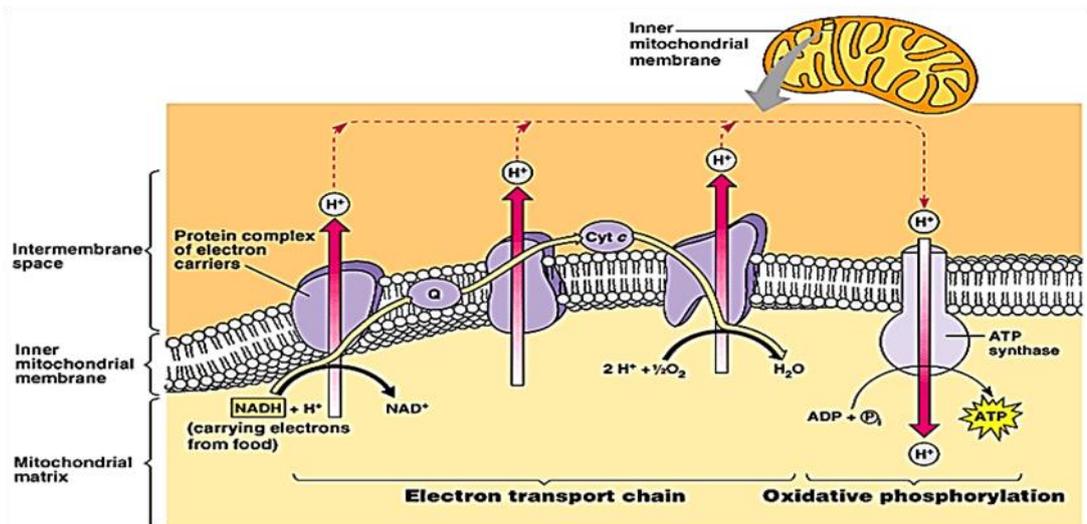


Figura 3. Representación gráfica del sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS). (Pearson Education).

Fosforilación oxidativa en la enfermedad de Parkinson

El sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) es el principal proveedor de ATP en las neuronas, y a partir de este ATP se genera la fosfocreatina (PCr), que se produce mediante la fosforilación de la creatina. El sistema OXPHOS también reoxida el NADH glucolítico, pero en ausencia de éste, el NADH es oxidado por fermentación produciéndose ácido láctico.

En estudios mediante espectroscopía de resonancia magnética en cerebros de pacientes con la EP se han encontrado niveles disminuidos de ATP y PCr además de concentraciones altas de lactato [6, 7]. Estos resultados son consistentes con una disfunción del sistema OXPHOS.

La idea de que el sistema OXPHOS tiene un papel importante en la patología de la EP es respaldada por los estudios postmortem en tejidos humanos en los que se observa que la actividad del complejo I mitocondrial disminuye en la sustancia negra y en la corteza frontal [8]. Esta disminución podría además ser sistémica ya que también se ha encontrado en músculo [9], linfocitos [10], leucocitos [11] y en las plaquetas procedentes de pacientes con la EP [12].

Por lo tanto, a pesar de la heterogeneidad aparente de la EP, una alteración del sistema OXPHOS podría ser un evento patogénico sistémico en muchos casos de la enfermedad.

DNA mitocondrial en la enfermedad de Parkinson

El mtDNA se localiza en la matriz mitocondrial, unido a la membrana interna donde se encuentra la cadena de transporte de electrones, principal productor de especies reactivas de oxígeno (que son mutagénicas). Por esta y otras características particulares del mtDNA, la proporción de mutaciones es mucho más alta en este genoma que en el nDNA [13].

Las deleciones de fragmentos largos de mtDNA (que incluyen tRNAs y genes que codifican proteínas) son mutaciones somáticas relativamente frecuentes. Dado que existen varias copias de mtDNA en cada mitocondria y varias mitocondrias por célula, dependiendo del porcentaje de mtDNA que se vea afectado por estas mutaciones los efectos pueden ser graves.

Se ha observado que la cantidad de deleciones en el mtDNA aumenta en las neuronas de la sustancia negra en individuos de avanzada edad (lo que concuerda con el hecho de que la edad sea el mayor factor de riesgo) y en pacientes con EP [14].

Se sospecha, por tanto, que la disfunción mitocondrial en la EP podría provenir de mutaciones adquiridas o heredadas en el mtDNA.

Varios estudios han proporcionado evidencias genéticas de que una mutación heredada del mtDNA (p.ej: m.117786 > A:MT-ND4 ó m.1095T < C:MT-RNR1) podría contribuir a la patogénesis de la EP [15, 16]. Estas mutaciones no son muy frecuentes en la población, pero otros polimorfismos mitocondriales mucho más comunes y que presentarían unos efectos fenotípicos menos acusados, han sido propuestos como factores de susceptibilidad [17] o de protección frente a la EP en distintos estudios epidemiológicos.

Una de las evidencias que más sustentan esta teoría es el hecho de que defectos en el complejo I mitocondrial de pacientes con EP pueden transferirse a diferentes líneas celulares. Si fusionamos las plaquetas (que contienen mitocondrias

con su mtDNA pero no poseen núcleo) procedentes de pacientes con EP con células en cultivo sin mtDNA (células rho0), se obtienen **híbridos citoplasmáticos** con deficiencias en el complejo I [18]. Dado que solo el mtDNA de las plaquetas es capaz de mantenerse durante sucesivas generaciones de células (no así las proteínas o los lípidos), el defecto debe estar codificado en el genotipo mitocondrial.

Tóxicos ambientales en la enfermedad de Parkinson

La primera evidencia de que la mitocondria podría jugar un papel en la patogénesis del Parkinson surgió a partir del descubrimiento de que un inhibidor del complejo I, el 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), podía causar graves e irreversibles síntomas parkinsonianos en humanos [19]. Se propone que es el metabolito activo del MPTP, MPP⁺, el que se concentra en las neuronas dopaminérgicas dada su gran afinidad por el transportador de dopamina e inhibe el complejo I de la cadena de transporte de electrones. Esta inhibición, y la obstrucción de la transferencia normal de los electrones, pueden llevar a la generación de especies reactivas de oxígeno y a la reducción de la cantidad de ATP generado.

Otras toxinas mitocondriales como, por ejemplo, la rotenona o el paraquat han sido descritas como inductores de la pérdida selectiva de neuronas y la agregación de proteínas similares a las encontradas en el caso del MPTP [20, 21]. Por tanto, algunos xenobióticos que inhiben los complejos del sistema OXPHOS parecen causar Parkinsonismo.

1.3 Mutaciones en genes asociados al Parkinson y su relación con la mitocondria

La mayoría de los casos de EP parecen ocurrir de forma esporádica aunque durante las últimas dos décadas varias mutaciones genéticas han demostrado causar formas familiares de la enfermedad con clínica y rasgos patológicos similares a la EP idiopática [22, 23]. Estudiar las proteínas codificadas por estos genes y sus correspondientes mutaciones ha proporcionado una visión importante sobre las vías moleculares y los mecanismos que pueden subyacer en la neurodegeneración producida en la EP.

Una observación interesante que derivó de la caracterización de estas proteínas relacionadas con la EP es que se encuentran asociadas directa o indirectamente con las mitocondrias, participando en funciones importantes dentro de estos orgánulos.

Los genes en los que se han encontrado mutaciones asociadas con el Parkinson son:

α -sinucleína (SNCA): es una pequeña proteína citosólica de 140 aminoácidos que se expresa a lo largo del sistema nervioso central, de manera predominante en las neuronas donde se encuentra en mayor cantidad en las terminaciones nerviosas, presinápticas cerca de las vesículas sinápticas. La función fisiológica de la α -sinucleína sigue sin estar clara, aunque su localización en las terminaciones nerviosas junto con la evidencia de que puede asociarse con estructuras vesiculares y membranosas, sugiere un papel en la regulación de la liberación y el reciclaje de las vesículas sinápticas [24].

Esta proteína ha acaparado mucha atención por parte de los investigadores tras el descubrimiento de que mutaciones (A53T, A30P y E46K) en el gen de la SNCA pueden causar la EP con una herencia autosómica dominante [22]. La α -sinucleína fue el primer gen identificado como causante de Parkinson familiar, y su proteína fue identificada como el principal constituyente de los cuerpos de Lewy en las neuronas supervivientes de casos de Parkinson esporádico y en algunas formas concretas de Parkinson familiar. Estas observaciones proporcionaron evidencias de que la α -sinucleína tiene un papel importante en la patogénesis del Parkinson idiopático (EP).

La sobreexpresión de la proteína en modelos celulares provoca la despolarización mitocondrial y compromete la actividad de las mitocondrias. El resultado de la disfunción mitocondrial causada bien por la expresión de la proteína salvaje (WT) o bien por la proteína con la mutación A53T, es la inducción de estrés oxidativo, observado por la oxidación de las proteínas mitocondriales, el aumento de los niveles de calcio y de óxido nítrico, y la apoptosis dependiente de mitocondria [25].

Los descubrimientos llevados a cabo gracias a los modelos celulares indican que un mecanismo para explicar la toxicidad inducida por esta proteína sería mediante la alteración de las funciones normales de la mitocondria. En un modelo de ratón

transgénico expresando la proteína con la mutación A53T, el animal desarrolló degeneración mitocondrial, además de presentar una reducción en la actividad del complejo IV y daños en el mtDNA [26].

De manera combinada, los resultados obtenidos por los estudios *in vitro* y los estudios con animales transgénicos sugieren que las agregaciones de α -sinucleína y la disfunción mitocondrial pueden ser dos eventos relacionados, de tal forma que uno provoca el otro y viceversa, dando lugar a un círculo vicioso que podría precipitar la degeneración neuronal.

LRRK2: Las mutaciones con cambio de sentido en el gen LRRK2 son la causa más común de Parkinson familiar y se han encontrado a frecuencias variables en casos de Parkinson idiopático indicando que LRRK2 juega un importante papel en la patogénesis del Parkinson. Los mecanismos patológicos a través de los cuales las mutaciones autosómicas dominantes de LRRK2 llevan a la neurodegeneración siguen sin dilucidarse. LRRK2 codifica una proteína grande de aproximadamente 280 kDa constituida por varios dominios funcionales altamente conservados entre los que se incluyen un dominio serina/treonina, el dominio Roc, el dominio GTPasa, el dominio C-terminal de ROC (COR), y dominios de repetición específicos de LRRK2 (anquirina, ricos en leucina y WD40), lo que sugiere que esta proteína tiene un papel importante en la señalización celular [27, 28].

Las mutaciones asociadas a la EP tienden a agruparse dentro de los dominios GTPasa, COR, y kinasa de la proteína, no se han identificado deleciones ni truncamientos. Estos datos, junto con la herencia dominante de las mutaciones en LRRK2, sugieren un mecanismo tóxico de ganancia de función. La mutación G2019S en el domino kinasa, que corresponde a la variante con mayor prevalencia de las encontradas hasta el momento, aumenta la actividad kinasa de la proteína [29].

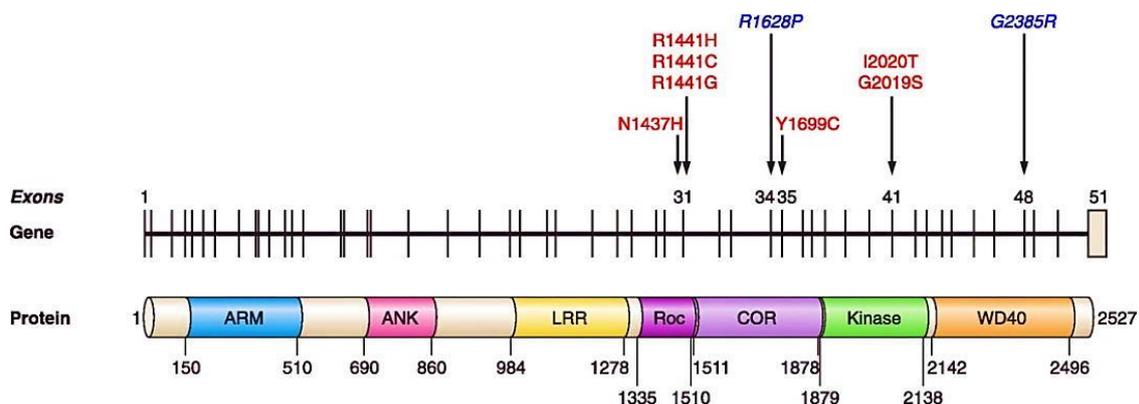


Figura 4. Representación gráfica de los dominios que conforman la proteína LRRK2. (Physiological Reviews, October 2011 Vol. 91 no. 1161-1218)

A pesar de la estructura de dominios definida que presenta la proteína, su función biológica no es aún conocida. Desvelar el papel fisiológico de LRRK2 en condiciones normales es crítico para entender los mecanismos moleculares que se perturban a causa de las mutaciones.

Estudios recientes sugieren un papel en la regulación de la dinámica del citoesqueleto y del crecimiento de las neuritas. La sobreexpresión de la LRRK2 humana en ratones transgénicos aumenta la polimerización de la tubulina e impide el ensamblaje de los microtúbulos [30]. Alteraciones en la red de microtúbulos podrían afectar al transporte intracelular e incluso al transporte de la mitocondria basado en los microtúbulos, y esto podría contribuir a los mecanismos patogénicos que llevan a la EP.

Por el momento, la participación de LRRK2 en la función mitocondrial, y de la mitocondria en la neurodegeneración dependiente de LRRK2, sigue sin estar clara.

PINK1: las mutaciones en el gen PINK1 (PARK6, OMIM 605909) representan la segunda causa genética más común de EP autosómica recesiva de inicio temprano (184 art intro). PINK1 codifica una proteína de 581 aminoácidos con un dominio catalítico C-terminal serina/treonina kinasa y una secuencia señal de importe a la mitocondria en el extremo amino terminal. El dominio kinasa está orientado hacia el citosol lo que sugiere que los sustratos de PINK1 son citosólicos o asociados a la mitocondria.

Fibroblastos aislados de pacientes con EP que portaban mutaciones en el gen PINK1 mostraron dificultades respiratorias, aumento de la peroxidación lipídica y también aumento de la sensibilidad frente al estrés oxidativo [31], lo que sugiere una función protectora antioxidante para PINK1. La mayoría de las mutaciones ligadas al Parkinson se encuentran localizadas en el dominio kinasa y provocan una disminución de la actividad kinasa y de la función neuroprotectora de PINK1.

Para investigar la función fisiológica de PINK1 y su posible papel como neuroprotector, se generaron varias líneas de *Drosophila* deficientes en PINK1. Las moscas exhibían esterilidad en los machos, degeneración muscular apoptótica y degeneración neuronal dopaminérgica. A nivel de la mitocondria, todas las líneas mostraron defectos prominentes como la elongación de las mitocondrias, la disminución en la producción de ATP, el aumento de la vulnerabilidad frente al estrés oxidativo e inhibición de los complejos respiratorios [32].

Del mismo modo, ratones con el gen PINK1 delecionado mostraron importantes defectos en la función mitocondrial y alteraciones en su morfología, elevada producción de especies reactivas de oxígeno, y un incremento de la sensibilidad frente al estrés oxidativo [33].

Complementando los estudios *in vivo*, se cultivaron neuronas dopaminérgicas humanas y de ratón con defecto en el gen PINK1 y se encontraron cambios morfológicos y defectos funcionales en las mitocondrias, además de una disminución de la viabilidad celular a largo plazo y un aumento de la activación de la caspasa 3 y la apoptosis. También se ha encontrado una disminución de la actividad del complejo I en fibroblastos procedentes de pacientes con mutaciones homocigóticas de PINK1 [31].

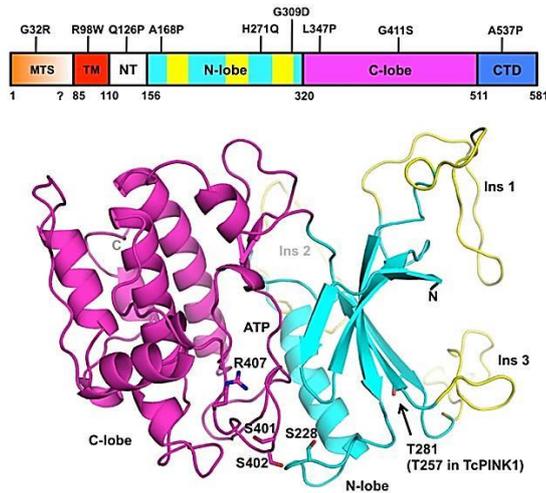


Figura 5. Representación tridimensional de PINK1 en la que están señaladas algunas de las mutaciones que se han relacionado con la EP. (*Front. Neurol.*, 18 April 2013).

Parkina: Parkina fue el primer gen identificado como causa genética de Parkinsonismo juvenil temprano autosómico recesivo (PARK2, OMIM 600116). Desde la primera observación, más de 100 mutaciones homocigóticas o heterocigóticas han sido identificadas en pacientes de EP lo que representa aproximadamente un 50% de los casos de Parkinson familiar recesivo y cerca de un 20% de Parkinson de inicio temprano [34].

El gen Parkina codifica una proteína de 465 aminoácidos que se localiza predominantemente en el citoplasma. Contiene un dominio N-terminal de tipo ubiquitina y un dominio catalítico caja RING C-terminal. La proteína funciona como una proteína E3 ubiquitin ligasa mediando la unión covalente de los monómeros de ubiquitina, lo cual podría servir para marcar proteínas para su posterior degradación por el proteasoma o para modular su función. Una hipótesis temprana proponía que la pérdida de función causada por mutaciones en parkina se debía a un impedimento de la ubiquitinación y de la degradación proteosomal de sus sustratos, lo que llevaría a una acumulación anormal de los mismos y neurotoxicidad, habiendo algunas evidencias experimentales que apoyan esta teoría [35].

A la parkina se le suponen efectos neuroprotectores a través de la regulación de una serie de procesos celulares o rutas, incluyendo la transcripción y replicación del mtDNA, y la actividad, morfología y biogénesis mitocondriales.

La transcripción y la replicación del mtDNA se encontraron aumentadas en células en crecimiento, mediante la sobreexpresión de parkina y reducidas cuando no se expresa la proteína. Se vio que la parkina se asociaba al factor de transcripción A mitocondrial (TFAM) y aumentaba su actividad transcripcional [36].

El papel de la parkina en la función mitocondrial se demostró también en estudios de leucocitos y fibroblastos derivados de pacientes con la EP, que presentaban alteraciones en la morfología mitocondrial y reducción de la actividad respiratoria ligada a una disminución en la producción de ATP y el descenso del potencial de membrana mitocondrial [37]. La parkina se localiza en el citoplasma pero puede translocarse a las mitocondrias despolarizadas o dañadas para mediar su eliminación por mitofagia en colaboración con PINK1 y otros posibles factores.

En ratones se ha visto que la deficiencia de parkina provoca una reducción en la abundancia de proteínas relacionadas con la función mitocondrial y la capacidad antioxidante de las células (varias subunidades de los complejos I y IV) [38].

Las evidencias indican un amplio papel neuroprotector por parte de esta proteína, y su requerimiento para el mantenimiento de la función y la dinámica mitocondrial, aunque el mecanismo molecular que lleva de la inactivación de la parkina a la neurodegeneración no está todavía dilucidado.

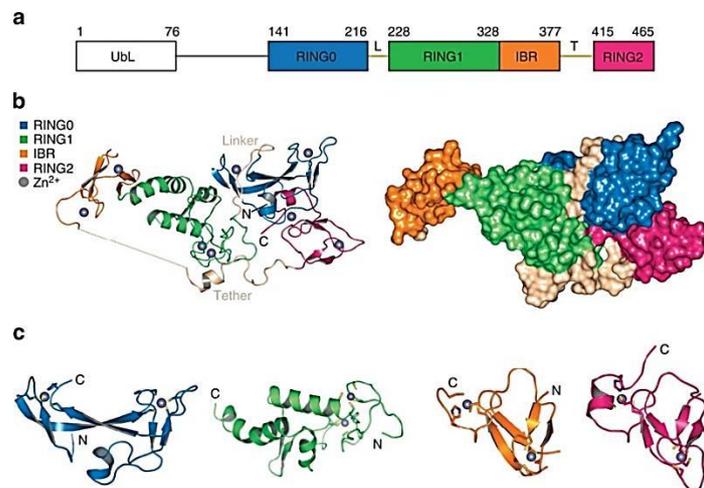


Figura 6. Representación tridimensional de la proteína parkina con sus diferentes dominios (Nature Communications 4, Article number: 1982)

PARK7 (DJ-1): se han descrito mutaciones de cambio de aminoácido, deleciones o truncamientos en el gen DJ-1 (PARK7, OMIM 606324) en casos raros de Parkinson de inicio temprano autosómico recesivo.

DJ-1 codifica una proteína de 189 aminoácidos, que pertenece a la superfamilia ThiJ/Pfpl. DJ-1 existe como una proteína homodimérica en la que las mutaciones de cambio de sentido impiden la dimerización y/o la estabilidad de la proteína lo que conlleva una mayor degradación por parte del proteasoma.

La función fisiológica de DJ-1 sigue sin estar clara, aunque los datos actuales apuntan a un papel como chaperona redox, una proteína de unión a RNA o una peroxirredoxina antioxidante tipo peroxidasa [39].

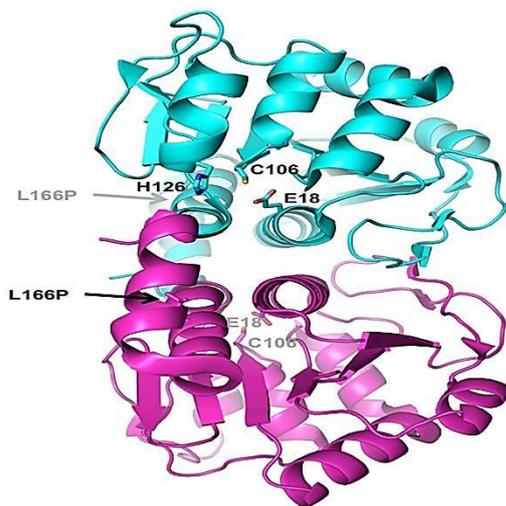


Figura 7. Representación tridimensional del dímero biológicamente activo que presenta DJ-1, con la mutación asociada al Parkinson (L166P) señalada con una flecha. (Front. Neurol., 18 April 2013)

En condiciones normales, DJ-1 se localiza en el citoplasma de las neuronas con una pequeña proporción localizada en la matriz y el espacio intermembrana mitocondriales.

La inactivación de DJ-1 en ratón lleva al aumento del estrés oxidativo que tiene como resultado la oxidación de las proteínas de la matriz mitocondrial de forma específica en las neuronas dopaminérgicas. Estas observaciones llevan a pensar que DJ-1 podría tener una función neuroprotectora en situaciones de estrés de la mitocondria.

HTRA2: el gen HTRA2 codifica una proteína de 458 aminoácidos, que forma un homotrímero. Es una proteasa que muestra actividad proteolítica frente a sustratos beta-caseína no específicos. Se localiza principalmente en el espacio intermembrana de la mitocondria aunque puede pasar al citosol si se estimulan procesos de apoptosis.

Se había descrito inicialmente una función como factor proapoptótico para HTRA2 por varios grupos de investigación. Sin embargo, estudios *in vivo* llevados a cabo más recientemente con ratones que tenían una mutación en el gen HTRA2 o que no expresaban la proteína, mostraron que los ratones presentaban un desorden neurodegenerativo letal con una acumulación de proteínas desplegadas en la mitocondria. Esto parece indicar que la actividad de la proteasa HTRA2 mitocondrial podría ser importante para controlar los niveles de proteínas mal plegadas en la mitocondria. Como en otras muchas proteasas, la actividad proteolítica de HTRA2 está altamente regulada para prevenir proteólisis no requeridas.

1.4 Interacciones genes-ambiente en la enfermedad de Parkinson.

A pesar de que se hayan encontrado casos en los que la enfermedad es causada por una mutación o un xenobiótico, estos casos no son muy frecuentes. Normalmente es una combinación de estos dos factores lo que aumenta el riesgo de padecer la EP.

Se ha observado que la unión de unos antecedentes genéticos nucleares concretos junto con algunos xenobióticos pueden interaccionar para aumentar la disfunción celular [40]. Esto puede ocurrir también con los antecedentes genéticos mitocondriales y su interacción con xenobióticos.

Pero aún más complicado de descifrar que estos efectos aditivos, es la posibilidad de que determinados polimorfismos, que no son factores de riesgo por sí mismos, determinen directamente la susceptibilidad a algunos xenobióticos que sin el componente genético, tampoco serían factores de riesgo. Por lo tanto, sería necesaria la combinación de ambos factores para aumentar el riesgo a padecer la enfermedad.

Para más complicación, un mtDNA determinado podría albergar dos variantes genéticas que determinen de manera distinta la susceptibilidad de un individuo frente a la EP. Por ejemplo, la interacción entre un polimorfismo en el rRNA que aumente la

susceptibilidad frente a determinados antibióticos junto con un polimorfismo en el sitio Q del citocromo b que disminuya la susceptibilidad a ciertos pesticidas.

Estos hechos podrían explicar los diferentes resultados obtenidos en estudios epidemiológicos de asociación entre haplogrupos de mtDNA y la EP, ya que los resultados dependerían de la distinta exposición de la población, lo que no suele ser tenido en cuenta.

La obtención de pruebas directas de la interacción entre los tóxicos que afectan al sistema OXPHOS y las distintas variantes genéticas de mtDNA precisan modelos experimentales adecuados para su estudio. Los modelos animales permitirían el estudio de la enfermedad considerando al individuo completo, sin embargo, si la mayor parte de los casos de la EP se deben a combinaciones de distintos factores de susceptibilidad con efectos fenotípicos individuales suaves o moderados, los modelos animales no serían convenientes porque el ambiente genético de los posibles polimorfismos en el mtDNA sería muy diferente al que se encuentran expuestos los seres humanos. Por lo tanto, se necesitan modelos basados en genomas humanos.

Afortunadamente, existen modelos celulares con condiciones ambientales y antecedentes genéticos muy bien controlados, que son los denominados como híbridos citoplasmáticos (véase pag. 7 introducción) que permitirían, una vez caracterizados los genes anteriormente descritos, estudiar la influencia de los haplogrupos del mtDNA en la EP.

Para desarrollar estos modelos celulares, lo mejor sería utilizar neuronas diferenciadas, sin embargo. Hasta el momento sin embargo, no ha sido posible cultivarlas, por lo que una alternativa ha sido crecer células madre (NSC) y diferenciarlas posteriormente a neuronas, o bien utilizar células tumorales inmortalizadas, como la línea celular SK-N-(BE)2-C. Dentro de estas últimas, la más ampliamente utilizada es la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y que se ha convertido en un modelo celular popular para la investigación sobre la EP dado que esta línea celular posee muchas características de las neuronas dopaminérgicas. Por ejemplo, estas células expresan la tirosina hidroxilasa y la dopamina- β -Hidroxilasa, así

como el transportador de dopamina. Por otra parte, esta línea celular se puede diferenciar a neurona en presencia de diversos reactivos.

En estos modelos falta, sin embargo, la caracterización de los genes implicados en casos de Parkinson familiar (SNCA, PARK2, PINK1, DJ-1, LRRK2 y HTRA2) que sería un paso previo necesario para la utilización de estas líneas celulares como modelos de estudio de las variantes polimórficas del mtDNA que pudieran tener relación con el riesgo de padecer la EP.

Homogeneizando los factores genéticos nucleares, estas líneas celulares permitirían, en un primer paso, entender más profundamente las complejas relaciones que existen entre los factores genéticos y ambientales que afectan al mtDNA y, posteriormente, mediante introducción de genes cromosómicos con mutaciones, se podría añadir complejidad nuclear al modelo.

2. OBJETIVOS

- Caracterizar el genotipo de los genes que han sido previamente asociados a casos de Parkinson familiar (SNCA, PARK2, PINK1, DJ-1, LRRK2 y HTRA2) en las tres líneas celulares a estudio (hNSC, SH-SY5Y y SK-N-(BE)2-C).
- Analizar el patrón de expresión de las proteínas codificadas por estos genes en células sin diferenciar y en células diferenciadas a neuronas a modo de estudio comparativo entre ambos estados.
- Estudiar la sobreexpresión del gen de la Parkina salvaje (PARK2) y de la Parkina con dos mutaciones distintas (K161N y G430D) en estas líneas celulares.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Material

3.1. Kits y reactivos comerciales

Todos los reactivos químicos usados en este trabajo fueron de grado analítico o de grado apto para biología molecular y en su caso, aptos para cultivo celular. La mayoría fueron adquiridos en las siguientes casas comerciales: Bio-Rad, Bioron, Invitrogen, Panreac, Promega Biotech Ibérica, Roche y SIGMA-ALDRICH.

Las enzimas de restricción, así como otras enzimas modificadoras del DNA (fosfatasa alcalina, ligasa, retrotranscriptasa, DNAsa) se obtuvieron de las casas comerciales: New England Biolabs, Roche, Fermentas, Stratagene e Invitrogen. La enzima Taq polimerasa empleada para la reacción de PCR fue la DFS Taq DNA polimerasa de Bioron.

Los medios empleados en el cultivo celular, así como el suero fetal bovino fueron de la marca GIBCO® suministrados por Invitrogen.

Los kits comerciales y reactivos empleados en la realización de este trabajo de fin de máster, han sido recogidos en la siguiente tabla:

Tabla 1. *Reactivos y kits comerciales utilizados durante la realización del trabajo de fin de máster.*

Nombre	Utilidad	Casa comercial
EZ-ECL	Detección de quimioluminiscencia	BI Biological Industries
iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-PCR kit	Síntesis de cDNA	Bio-Rad
Low Mass Ladder	Marcador de pesos moleculares de DNA	Life technologies
Material de cultivos celulares (Medio DMEN, SFB...)		GIBCO™ de Life technologies
Precision Plus dual Color	Marcador de pesos moleculares de proteínas	Bio-Rad
Reactivo de Bradford	Cuantificación de proteínas	Bio-Rad

Reactivo TRIZOL®	Extracción de DNA	Life technologies
Revelador Kodak® y fijador Kodak®	Revelado de autorradiografías	Sigma
Rojo Ponceau	Tinción reversible de proteínas en membranas	Sigma
Tampón completo de PCR y enzima DFS Taq DNA polimerasa	Amplificación de DNA	Bioron
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Síntesis de cDNA	Roche Applied Science
UltraClean® PCR Clean-Up Kit	Purificación de productos de PCR	MO BIO Laboratories

3.2. Líneas celulares eucariotas

- Células madre neurales humanas (**hNSC**) derivadas de H9 hESC obtenidas en la casa comercial *Life Technologies*.
- Línea aneuploide **SH-SY5Y**, derivada de neuroblastoma, (ATCC® CRL-2266™) obtenidas en *Sigma*.
- Células de neuroblastoma **SK-N-BE(2)-C** cedidas por Anne Chomyn del Laboratorio de Giuseppe Attardi, California Institute of Technology, Division of Biology, Caltech.

3.3. Cebadores

Los oligonucleótidos empleados en este trabajo de fin de máster se diseñaron de manera manual a partir de las secuencias consenso de interés obtenidas de Ensembl, comprobándolos a posteriori con la herramienta Oligo analyzer proporcionada por la página web www.idtdna.com para garantizar su especificidad y tratar de optimizar las reacciones en cadena de la polimerasa; esto es, equiparar las temperaturas de hibridación en las parejas de oligonucleótidos y tratar de minimizar las formaciones de estructura secundaria o de dímeros en los oligonucleótidos. En el anexo I se recoge una tabla con las secuencias de los cebadores para cada fragmento de cada gen, así como la Tm teórica.

3.4. Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados en la caracterización molecular de las células que sobreexpresaban la parkina salvaje o la parkina con alguna mutación fueron los recogidos en la tabla 2.

Tabla 2. Relación de anticuerpos utilizados en este trabajo.

	PM prot (kDa)	PM detectado (kDa)	Dilución de trabajo	Origen	Casa comercial	#
Anti-PINK1	63	63	1/500	Mouse	abcam	75487
Anti-a-synuclein (SNCA)	18	18	1/1000	Rabbit	Life technologies	710110
Anti-Parkin PRK8	51,6	51,6	1/1000	Rabbit	abcam	75487
Anti-PRK7/DJ-1	20	24	1/2000	Rabbit	abcam	18257
Anti-HtrA2/Omi	49	37	1/3000	Rabbit	abcam	75982
Anti-Vim	54	54	1/500	Rabbit	abcam	92547
Anti-LRRK2	286	286	1/1000	Rabbit	abcam	133518
Anti-actin	42	42	1/1000	Rabbit	Sigma	A2066

Métodos

3.5. Cultivos celulares eucariotas

3.5.1. Crecimiento de células SH-SY5Y

Las células SH-SY5Y se crecieron en medio de cultivo preparado a partir de medio comercial DMEM rico en glucosa (4.5 g/l), con piruvato de sodio (0.11 g/l) y glutamina (584 mg/l), suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, el cual aporta proteínas y factores de crecimiento. Las células se mantuvieron durante su crecimiento en un incubador a 37°C, en una atmósfera húmeda conteniendo un 5% de CO₂, cambiándoles el medio periódicamente cada 2 ó 3 días.

3.5.2. Transfección celular

La generación de distintas líneas celulares que expresan una determinada proteína de manera estable o transitoria, se llevó a cabo mediante la técnica de transfección celular. Para ello, se utilizó un reactivo comercial XtremeGENE[®] HP (Invitrogen).

El proceso consta de varias etapas que se llevaron a cabo en distintos días, tal y como se detalla a continuación:

- Día 1:

El primer día del ensayo se llevó a cabo la transfección de la línea celular empaquetadora, 293T, con tres vectores plasmídicos distintos. Dos de ellos portan información para la generación de la envuelta (pMD2G), la cápside y la polimerasa (psPAX2) del virus y el tercero (pWXLd Ires^{Puro} o pWPXLD-Ires^{Neo}) contiene clonado el gen que deseamos expresar, mediante el sistema de infección lentiviral, en la línea celular de elección.

La transfección química de la línea 293T se realizó utilizando el sistema XtremeGENE[®] 6, (Roche), formado por una mezcla de lípidos y otros componentes disueltos en etanol al 80%. Este reactivo forma un complejo con el DNA y lo transportan al interior de las células animales.

El día anterior a la transfección, se sembraron las células 293T en placa de 6 pocillos a una densidad adecuada para alcanzar entre el 60 y el 80% de confluencia, y se procedió tal y como se indica en las instrucciones del fabricante.

Se utilizan tres vectores; 0,6 µg de plásmido de envuelta, 1,2 µg de gag-pol y 1,8 µg del que contiene el gen que se desea expresar (10,8 µl de XtremeGENE[®] para 3,6 µg de DNA total).

- Día 2:

Este segundo día se sembraron también las células que iban a ser infectadas con los virus producidos por 293T en las 48-72 h posteriores a la transfección inicial. Para ello, se sembraron en placas de 100 mm de diámetro ó de 6 pocillos (en función del experimento) a una densidad celular adecuada para tener una confluencia del 70% el día de la infección.

- Día 3:

Transcurridas 24 horas tras la transfección de la línea celular 293T con los vectores lentivirales, se pueden recoger los lentivirus empaquetados que se encuentran en el medio de cultivo. A las 48 horas se puede recoger de nuevo el medio, que contendrá una menor cantidad de lentivirus.

El medio de las células 293T se centrifugó a 1500 – 2000 rpm durante 5 minutos y se filtró a través de un filtro de 0.45 μm de tamaño de poro para evitar la contaminación de las células a infectar con células productoras de virus. A continuación, se añadió polibreno a una concentración final de 8 $\mu\text{g/ml}$, para aumentar la eficiencia de la infección, y se vertió la mezcla sobre la placa de células a transfectar.

La cantidad de virus se optimizó (1,5 $\mu\text{L/mL}$ de medio de cultivo) para lograr un porcentaje de infección mínimo, y con ello limitar, en lo posible, el número de inserciones del constructo en el genoma y evitar procesos de expresión aberrantes.

- *Día 5:*

El medio de las células infectadas durante dos días consecutivos, se cambió a medio de selección. Esto además permite eliminar los restos de polibreno, que pueden resultar tóxicos.

3.6. Preparación de cebadores

Los cebadores se reciben de la casa comercial IDT liofilizados por lo que es necesario preparar la disolución adecuada para su uso posterior. Todos los cebadores se resuspenden para obtener una concentración final de 250 μM . Posteriormente, se preparan alícuotas de una concentración 10 μM , con 100 μL de volumen, que son las que serán empleadas de forma continuada para las PCRs. De esta forma se asegura el mantenimiento de la disolución original y se evita su deterioro por sucesivas descongelaciones y congelaciones.

3.7. Técnicas de manipulación de RNA total

3.7.1. Técnicas de extracción de RNA total

Para la extracción del RNA de un pellet celular se ha empleado el método basado en el reactivo TRIZOL[®] de Invitrogen.

En primer lugar, se lisan las células del pellet celular con 1 ml de TRIZOL[®] por cada $5-10 \times 10^6$ células y se homogeneiza pipeteando arriba y abajo. El homogeneizado se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente, se lleva a cabo la separación del RNA del resto de componentes celulares mediante la adición de 0,2 ml de cloroformo por mililitro de

TRIZOL[®] añadido que da lugar a un sistema bifásico. Se incuba la muestra durante 2-3 min a 15-30°C y se centrifuga a 12000 g durante 15 min a 4°C, de esta forma se obtiene el RNA en la fase acuosa.

Para precipitar el RNA, se transfiere la fase acuosa a un nuevo tubo y se adicionan 0,5 ml de isopropanol por mililitro de TRIZOL[®]. Se vuelve a incubar durante 10 min a 15-30°C y se centrifuga a 12000 g durante 15 min a 4°C.

Se retira el sobrenadante y el pellet se lava con 1 ml de etanol al 75% en agua DEPC (dietilpirocarbonato) para evitar la posible degradación del RNA por RNAsas, intentando romper el pellet, bien con la pipeta o con el vortex, y se centrifuga a 7500 g durante 5 min a 4°C.

Retiramos el sobrenadante y el tubo se deja secar al aire durante unos minutos para que se evapore el etanol que haya podido quedar, comprobando que el pellet no se seque completamente. Finalmente, se redisuelve el RNA en 100µl de agua libre de RNAsas y se incuba 10 min a 55-60°C para asegurar la correcta disolución.

3.7.2. Técnicas de cuantificación de RNA mediante espectrofotometría

Para determinar la concentración y pureza del RNA total extraído, se emplea el espectrofotómetro NanoVue™. La relación de las absorbancias obtenida a 260 nm y a 280 nm (A_{260}/A_{280}) da idea del grado de pureza de la preparación, considerándose una buena pureza cuando se obtienen relaciones de $A_{260}/A_{280} \approx 2$ para RNA. Para realizar las medidas, se depositaron 2 µl de la disolución de DNA en el pedestal del aparato y tras la medida, se obtuvo directamente tanto la concentración como la relación de absorbancias.

Posteriormente, las muestras de RNA se almacenan hasta su utilización a -80°C para evitar su degradación.



Figura 8. Espectrofotómetro NanoVue™.

3.7.3. Obtención de cDNA a partir de RNA (RT-PCR)

Para obtener cDNA desde RNA se usaron los kits comerciales *iScriptTM Reverse Transcription Supermix for RT-PCR* (Bio-Rad) y *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante.

En el primero de los kits el buffer de reacción ya contiene un oligonucleótido con cola poli-T y primers degenerados, mientras que el segundo kit te permite, aparte de la posibilidad de utilizar también un oligo (dT), de añadir un primer específico que te permita sintetizar el RNA que te interese en lugar de todos los RNAs presentes en la muestra.

La cantidad de RNA de partida añadido a la reacción para obtener cDNA fue 1,5µg en ambos kits. El proceso se desarrolló en el *T3000 Thermocycler* de Biometra.

3.7.4. RT-PCR a tiempo real

El método de *real time* PCR o PCR cuantitativa permite la detección y cuantificación de una sonda fluorescente cuya señal aumenta en proporción directa a la cantidad de producto de PCR generado durante la reacción. El análisis se realiza mediante el empleo de un termociclador que tiene acoplado un sistema de detección que es capaz de adquirir y cuantificar la señal emitida por la sonda al final de cada ciclo para cada muestra. De forma que se puede obtener gran cantidad de información de manera rápida, específica y muy sensible, es decir, con pequeñas cantidades de muestra.

Durante el desarrollo de este trabajo fin de máster hemos realizado una variante de esta técnica que cuantifica genes partiendo de cDNA. Para ello, se sintetizó los cDNA de las muestras de interés con el Kit First Strand cDNA Synthesis (Roche) y, posteriormente, se preparó el mix de reacción siguiendo las instrucciones del fabricante (Applied biosystems), en el que se añadió la sonda TaqMan específica para el gen Parkina (TaqMan Gene Expression Assay, Hs01038325, Applied biosystems). La reacción se llevó a cabo en un Viia 7 (Bio-Rad).

3.8. Técnicas de manipulación de DNA

3.8.1. Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa se utilizó con el fin de obtener múltiples copias de un fragmento de DNA determinado, utilizando como molde muestras de cDNA o DNA genómico.

3.8.1.1. Amplificación de DNA por PCR utilizando como molde cDNA

En las reacciones de PCR en las que se utilizó DNA complementario (cDNA) como molde, se añadieron 2-4 μl de cDNA total obtenido a partir del RNA extraído según se detalla en el apartado 3.7.1, a una mezcla de reacción de 25 μl de volumen final. Los componentes de la mezcla de reacción de PCR y las cantidades estándar de cada uno de ellos, se recogen en la tabla 3.

Tabla 3. Reactivos necesarios para llevar a cabo la PCR.

Reactivo	Concentración inicial	Volumen (μl)	Concentración final
Tampón de reacción	10 x	2,5	1 x
Mix dNTPs	10 mM/cada uno	0,5	0.05 mM /cada uno
Cebador- 5'	10 μM	0,75	0.4 μM
Cebador-3'	10 μM	0,75	0.4 μM
DSF Taq	5 U/ μl	0,3	0,05 U
cDNA molde	-	2-4	-
Agua	-	hasta 25	-

El programa de PCR empleado para amplificar los fragmentos deseados de DNA se recoge en la siguiente tabla:

Tabla 4. Programa utilizado para la realización de la PCR.

Paso	Tiempo	Temperatura
1. Desnaturalización previa	2 min	95°C
2. Desnaturalización	45 s	95°C
3. Hibridación	45 s	Tm correspondiente para cada pareja de cebadores
4. Extensión	30s - 1min	72°C
5. Final de la reacción	5 min	72°C

30 ciclos

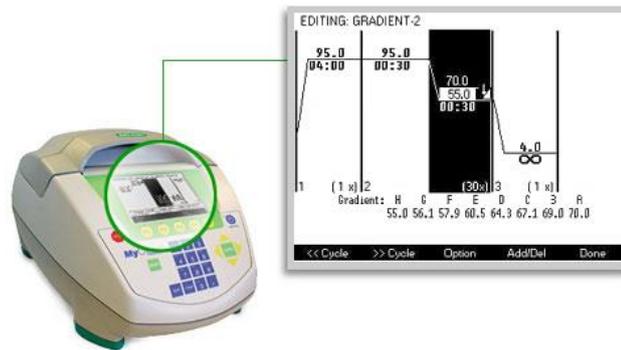


Figura 9. Termociclador MyCycler™ Thermal Cycling (Bio-Rad)

3.8.2. Electroforesis horizontal de DNA en geles de agarosa

Los geles de agarosa se prepararon entre el 0.8 y el 1% (p/v) según el tamaño de los fragmentos que se quisieran separar. Para ello, se disolvió la cantidad correspondiente de agarosa en tampón de electroforesis TAE (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM), a unos 60–70° C. Posteriormente, se dejó enfriar brevemente la disolución antes de añadir bromuro de etidio (a una concentración final de 0,70 µg/ml), para evitar la posible formación de vapores tóxicos, y se vertió sobre el molde del gel, con el peine puesto. Finalmente, se dejó enfriar hasta su completa polimerización.

Las muestras se mezclaron con 1/2 del volumen de colorante (Ficoll 400 al 30% y azul de bromofenol al 0,1 % (p/v) en TAE) para facilitar su carga en el gel y controlar el transcurso de la electroforesis. Como marcador de pesos moleculares se utilizaron 4 µl, de una disolución 1:1 en colorante, de Low Mass Ladder (Invitrogen) La electroforesis se desarrolló en tampón TAE 1x, aplicando un voltaje de entre 80–100 V, durante aproximadamente media hora.

3.8.3. Purificación de productos de PCR

Previamente a la secuenciación de los productos amplificados los restos de cebadores, dNTPs, enzimas y demás compuestos utilizados durante la PCR deben ser eliminados. Para ello se utilizó el kit *UltraClean® PCR Clean-Up Kit* que se aplica

siguiendo las instrucciones del fabricante. En el paso final, se eluye el DNA en 25-50 μ l de tampón de elución.

3.8.4. Secuenciación automática del DNA

La secuenciación de los fragmentos de DNA amplificados por PCR se realizó en el Servicio de Secuenciación de DNA de la empresa Secugen S.L.

Para cada reacción de secuenciación se requieren 15 μ L de DNA, a una concentración de 25-30 ng/ μ L. Como cebadores para las reacciones de secuenciación se utilizaron cebadores específicos de cada fragmento de DNA que se quería secuenciar (1,5 μ L de cebador con una concentración de 5 μ M).

Dependiendo del fragmento secuenciado se utilizaron los cebadores directos o reversos específicos de cada fragmento. Los resultados de la secuenciación se analizaron con el programa *Codoncode Aligner v3.7.1*.

3.9. Técnicas de manipulación de proteínas

3.9.1. Extracción de proteínas de cultivos celulares

La extracción de proteínas totales de células en cultivo se llevó a cabo a partir de placas de 100 mm de diámetro, al 80% de confluencia.

Tras eliminar el medio de cultivo, las células se recogieron por tripsinización y posterior centrifugación. El pellet celular resultante se lavó 2 veces con PBS frío y, o bien, se almacenó a -20°C hasta su uso, o se procedió directamente al lisado celular añadiendo 200 μ l de tampón RIPA a 4°C (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 50 mM, Triton X-100 1%, deoxicolato de sodio 0.5 %, EDTA 5 mM, esterilizado mediante autoclave), que contenía una mezcla de inhibidores de proteasas (pepstatina 1 μ g/ml, leupeptina 1 μ g/ml, aprotinina 1 μ g/ml, PMSF 1 mM), añadidas al tampón de extracción en el momento de su utilización. Los inhibidores de proteasas, a excepción del PMSF, se prepararon en etanol 1000 veces concentrados y se guardaron a -20°C. El PMSF se preparó en isopropanol a una concentración de 200 mM y se conservó a 4°C,

Las células se resuspendieron en tampón RIPA y fueron recogidas en tubos eppendorf. A continuación, se incubaron 15 minutos a 4°C en una rueda giratoria, y se centrifugaron a 12000 g durante otros 15 minutos a 4°C. Finalmente, se recuperó el

sobrenadante y se procedió a la medida de la concentración de proteínas en las muestras. Finalmente se guardaron a -80°C hasta su uso.

3.9.2. Determinación de la concentración de proteínas por el método Bradford

La cuantificación de la concentración proteica de extractos celulares totales se llevó a cabo por espectrofotometría, utilizando el método de Bradford.

Para ello, se construyó una curva de calibrado formada por 6 diluciones patrón con diferente concentración (1, 3, 5, 10, 15 y 20 μg) de seroalbúmina bovina (BSA). Las muestras, diluidas o no, se midieron por triplicado. Tanto las muestras, como los patrones y blancos, se llevaron hasta un volumen final de 800 μl en agua mili-Q y se les añadieron 200 μl del reactivo de Bradford concentrado. Se dejó desarrollar el color durante al menos 5 minutos a temperatura ambiente y, finalmente, se procedió a la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm.

Con los valores de absorbancia de las diluciones patrón, se construyó una recta de calibrado en la que se interpolaron las absorbancias obtenidas en las medidas de las muestras, para calcular la concentración proteica presente en las mismas.

3.9.3. Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE

La separación de proteínas presentes en los extractos celulares se llevó a cabo en geles desnaturizantes de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE).

Para esta electroforesis, se requieren dos tipos de geles con diferentes composiciones: gel separador, para la separación de las proteínas, y gel concentrador, para la concentración de las muestras. Los geles separadores preparados para separar proteínas de las distintas líneas celulares han sido de entre el 7 y el 14% en acrilamida/bisacrilamida.

Para la preparación de ambos geles se requieren las siguientes disoluciones:

- **Disolución stock de acrilamida-bisacrilamida:** acrilamida 30%: bisacrilamida 0.8% (p/v), se filtró y almacenó protegida de la luz a 4°C .
- **Tampón de electroforesis 10x:** Tris-HCl 250 mM, glicina 1.92 M, SDS 1 % (p/v).

- **Tampón del gel separador 4x:** Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, SDS 0.4%, EDTA 8 mM.
- **Tampón del gel concentrador 4x:** Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, SDS 0.4%, EDTA 8 mM.
- **Tampón de carga 4x:** Glicerol 10 %, Tris- HCl 50mM pH 6.8, SDS 2 % (p/v), azul de bromofenol 0.02 % (p/v), β -mercaptoetanol 1 % (v/v).

Los componentes para ambos geles (en el separador cambiarían las cantidades en los casos en los que se cambie el porcentaje acrilamida/bisacrilamida requerido) y el volumen necesario de cada uno para cubrir el volumen entre los cristales del soporte, se recogen en la siguiente tabla:

Tabla 5. Composición de los dos tipos de geles empleados en la electroforesis SDS-PAGE.

Componente	Gel separador (10%)	Gel concentrador
Acrilamida:bisacrilamida 30:0.8	1,7 ml	0,33 ml
Tampón 4x	1,25 ml	0,5 ml
Agua destilada	2 ml	1,1 ml
APS 10%	30 μ L	20 μ L
TEMED	5 μ L	5 μ L

El gel separador se vertió entre los cristales del soporte dejando aproximadamente 2 cm de espacio restante para la adición posterior del gel concentrador.

Sobre el gel separador se añadió una fina capa de isopropanol para favorecer la formación de un frente uniforme y evitar la entrada de oxígeno que podría ralentizar la polimerización. Una vez polimerizado el gel separador, se retiró el isopropanol, se lavó con agua destilada su superficie y se retiró el exceso de agua con un papel secante.

Para terminar, se incorporó el gel concentrador y se insertó el peine con cuidado. Una vez polimerizado el gel, se retiraron los peines y se colocó el gel en el interior de la cubeta llena de tampón de electroforesis 1x. Antes de cargar las muestras, se lavan los pocillos con tampón de electroforesis 1x con ayuda de una jeringuilla para retirar restos de acrilamida que hayan podido quedar.

Las muestras se mezclaron con tampón de carga 4x que posee β -mercaptoetanol, (un agente reductor de los puentes disulfuro de las proteínas) antes de cargarlas. Se cargaron 30 μ g de proteína total por calle.

La electroforesis se desarrolló a una intensidad de corriente constante de 10 mA por gel hasta que las muestras llegaron al gel separador, momento en el que se incrementó la intensidad a 20 mA por gel hasta el fin de la electroforesis.

Como marcador de peso molecular de proteínas se emplearon 5-8 μ l del *Precision Plus dual Color*.

3.9.4. Western-Blot

3.9.4.1. Transferencia y fijación de proteínas a membrana

Con el fin de identificar las proteínas de interés, se procedió a la transferencia de las proteínas a membranas de PVDF (Fluoruro de polivinilideno) dado que este proceso no se puede llevar a cabo directamente sobre el gel. El método empleado fue el de transferencia húmeda utilizando el sistema *Mini Trans-Blot Cell* de Bio-Rad.

Para ello, se cortó un fragmento de membrana de PVDF (*Hybond-P de Amersham*) adecuado al tamaño del gel que queríamos transferir. Para activar la membrana, se incubó durante 10 segundos en metanol y posteriormente, se lavó durante 5 minutos en agua destilada. Seguidamente, se equilibró la membrana con el tampón de transferencia BSN (Tris 48 mM glicina 39 mM y metanol 20% (v/v)) durante 10 minutos. De manera simultánea, el gel se incubó durante 15-20 minutos en BSN antes de iniciar la transferencia.

Una vez que están todas las partes preparadas, se montó el sistema sándwich de transferencia húmeda sumergiendo todos los elementos en el tampón de transferencia. La transferencia se realizó a 4°C a 100 V durante 1-2 h o a 30 V durante toda la noche.

La eficiencia del proceso se comprobó mediante la tinción reversible con Rojo Ponceau de las proteínas de la membrana durante unos segundos. Posteriormente, el agente de tinción se eliminó lavando la membrana con PBS-T (Tween20 al 0,1% en PBS) varias veces. Para conocer la correcta orientación de la membrana, una vez la sacamos del sándwich de transferencia cortamos o marcamos una de las esquinas.

3.9.4.2. Incubación de la membrana con los anticuerpos primario y secundario

Para la inmunodetección de proteínas se suceden distintos periodos de incubación con anticuerpos y de lavados con PBS-T, todos ellos llevados a cabo en cubetas con agitación.

Antes de proceder a las incubaciones con los anticuerpos, la membrana es bloqueada con leche para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos a la misma. Para ello se incubó la membrana con una disolución de PBS-T con un 5% de leche desnatada en polvo durante al menos 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. Tras este tiempo, se eliminó el exceso de disolución bloqueante y se lavó la membrana mediante dos lavados cortos con PBS-T.

El anticuerpo primario, específico para la proteína de interés, se diluyó a la proporción adecuada para conseguir la concentración recomendada por las casas comerciales (ver tabla 2). Esta dilución se hizo en PBS-T con un 0,25% en leche desnatada en polvo. La incubación de la membrana con el anticuerpo primario se prolonga durante 2 horas a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C. Tras este tiempo, se recogió el anticuerpo y se hicieron tres lavados de 5 minutos de la membrana con PBS-T.

El anticuerpo secundario es una IgG de ratón o conejo (según el origen del anticuerpo primario) conjugada con peroxidasa de rábano que reacciona al entrar en contacto con el luminol como sustrato quimioluminiscente. Se diluyó a una proporción de 1:3000 en PBS-T con 0,25% en leche desnatada en polvo. La membrana se incubó con esta dilución durante 1 hora. Tras este tiempo, se retiró la disolución y se lavó la membrana de nuevo 3 veces con PBS-T, 5 minutos cada vez.

3.9.4.3. Revelado de la autorradiografía

Para el revelado es necesario trabajar sin luz ya que ésta quema las autorradiografías, por lo que se trabaja solo con luz roja. Para el proceso se emplea el kit EZ-ECL (Biological Industries). La membrana se incubó durante 1 minuto con este

reactivo para que se lleve a cabo la reacción. La luz emitida en esta reacción se detecta mediante el contacto de la membrana cubierta con plástico transparente en una placa de autoradiografía. Posteriormente, el film se revela mediante el revelador Kodak® (SIGMA) y se fija la señal mediante el fijador Kodak® (SIGMA).

3.9.4.4. Cuantificación de las bandas y estadística

La cuantificación de las bandas obtenidas mediante Western Blot se llevó a cabo mediante el programa informático *Image J*, mientras que el posterior tratamiento estadístico de los datos se realizó con el programa *Microsoft Excel*. Para comprobar si los datos eran o no significativos, primero utilizando la Prueba F, se determinó si las varianzas eran o no iguales, para después mediante la prueba t de Student calcular la significación. Si el valor de p es menor de 0,05 se considera que la diferencia entre las medias es significativa.

4. RESULTADOS

Los resultados se van a presentar en tres apartados: un primer apartado en el que se expondrán los resultados obtenidos en el análisis de la secuencia de los genes de interés, un segundo apartado que tratará sobre el análisis del perfil proteico y una última parte dividida en dos subapartados que hablarán sobre el estudio de la sobreexpresión de la proteína Parkina, en su forma salvaje o mutada, mediante inmunodetección y qRT-PCR.

4.1. Análisis de las secuencias de los genes relacionados con la EP.

Con el objetivo de caracterizar los genes que previamente se habían relacionado con casos de Parkinson familiar en estas líneas celulares (hNSC, SH-SY5Y y SK-N-(BE)2-C) que pretendemos utilizar como modelo de estudio para la EP, se amplificaron y secuenciaron los siguientes genes: SNCA, PARK2, PINK1, DJ-1, LRRK2 y HTRA2. Para ello se sintetizaron los cDNA correspondientes y a partir de ellos se amplificaron los genes con los cebadores específicos diseñados para tal propósito.

PARK2 (Parkina)

El gen Parkina (localizado en 6q25.2-q27) está constituido por 12 exones y se han descrito 8 isoformas distintas producidas por procesamiento alternativo. El gen codifica una proteína (cuyo código en la base de datos *UniProt* es O60260) de 465 aminoácidos que se localiza predominantemente en el citoplasma. La secuencia de cDNA que se ha utilizado como base en el estudio es la secuencia canónica identificada por el código ENST00000366898 (obtenido de *Ensembl*).

Se ha podido secuenciar el gen en las tres líneas celulares, coincidiendo la secuencia de nucleótidos con la canónica. En la línea celular hNSC se ha encontrado un polimorfismo correspondiente a un cambio de G/C en el nucleótido 1241 del transcrito (rs1801582). En la línea celular SH-SY5Y se han encontrado otros dos polimorfismos (rs1801334 y rs1801474) que corresponden a un cambio de C/T y que dan lugar a variaciones de cambio de sentido en ambos casos.

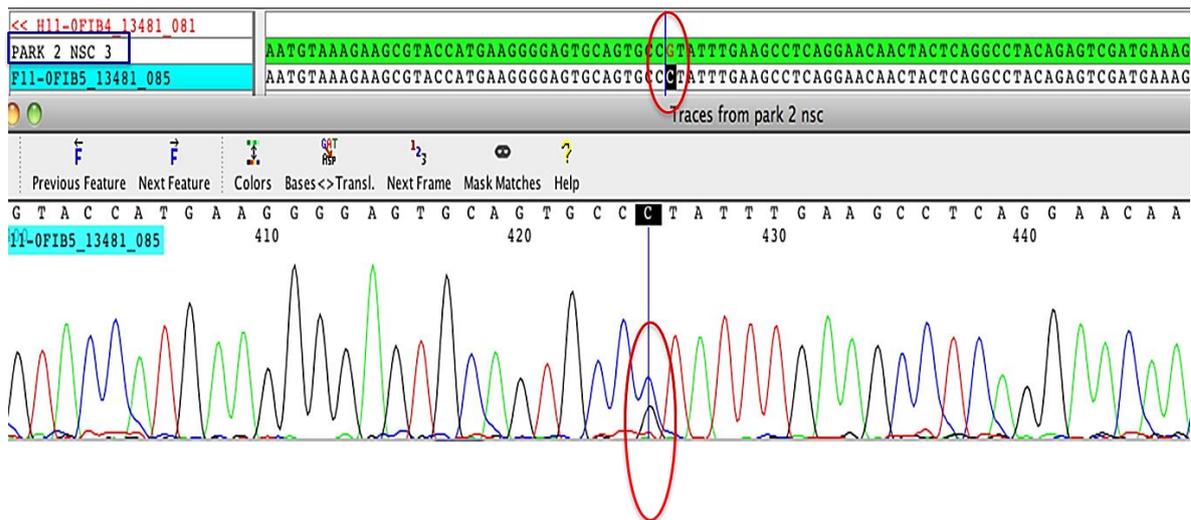


Figura 10. Electroferograma obtenido en la secuenciación del gen Parkina. En la parte superior se muestra el alineamiento de la secuencia consenso (recuadrada en azul oscuro) con la secuencia obtenida en la secuenciación (fondo azul claro) y en la parte inferior se muestran remarcados los picos del electroferograma (nucleótido 1241) en los que se observa un polimorfismo que presenta un cambio de G/C en uno de sus alelos.

PARK7 (DJ-1)

El gen PARK7 (1p36.23) tiene 8 exones y codifica una proteína de 189 aminoácidos (Q99497).

A partir de la secuencia consenso de cDNA (ENST00000493678) se ha llevado a cabo la secuenciación del gen en las tres líneas celulares obteniéndose en los tres casos los 1088 nucleótidos correspondientes a esta secuencia. En esta ocasión no se han encontrado polimorfismos en ninguna de las líneas celulares.

SNCA

El gen de la α -sinucleína (4q21) presenta 6 exones y codifica una proteína (P37840) de 140 aminoácidos de la que se han descrito 3 isoformas alternativas. Teniendo como base la secuencia consenso de cDNA (ENST00000394991) se leyeron las 1290 bases del gen en las tres líneas celulares sin encontrarse polimorfismos en ninguna de ellas.

LRRK2

El gen LRRK2 (12q12) está constituido por 51 exones y codifica una proteína (Q5S007) de 2527 aminoácidos perteneciente a la superfamilia de las proteínas kinasas. Aunque existen varios transcritos, solo se ha descrito una isoforma hasta el momento.

Tras varios intentos fallidos de conseguir un cDNA completo a partir del RNA total extraído de las células con el que poder amplificar los 14 fragmentos correspondientes del gen, determinamos que el gen era demasiado largo para obtener un cDNA completo del mismo.

Por ello, intentamos a continuación amplificar el gen en dos fragmentos de cDNA mediante dos cebadores específicos, uno que se unía en la mitad del gen (LRRK2-004 7R) y otro al final del mismo (LRRK2-004 14R), consiguiendo bandas del tamaño adecuado en la mayoría de los fragmentos amplificados pero de baja concentración y muchas bandas inespecíficas en la mayoría de los casos. Especialmente, en aquellos fragmentos más alejados de la posición en la que se unían los cebadores reversos utilizados, es decir, el fragmento 7 (cuyo cebador reverso se había utilizado en la síntesis del cDNA) presentaba una concentración adecuada, mientras que en el fragmento 1 apenas había producto amplificado.

Teniendo esto en cuenta decidimos fraccionar en más trozos el cDNA para obtener un mejor resultado en todos los fragmentos, sintetizando 6 fragmentos de cDNA distintos utilizando los siguientes cebadores específicos: LRRK2-004 3R, LRRK2-004 6R, LRRK2-004 9R, LRRK2-004 12R, LRRK2-004 13R, LRRK2-004 14R. Conseguimos así secuenciar los 7584 nucleótidos del gen en la línea celular SH-SY5Y. En las otras dos líneas celulares se han secuenciado alguno de los fragmentos pero, dada la cantidad de tiempo que supone la síntesis de todos los cDNA específicos y después amplificar cada fragmento del gen, no se llegó a secuenciar el gen completo en ninguna de las dos líneas.

En las secuencias obtenidas se encontraron varios polimorfismos que se resumen en la tabla siguiente:

Tabla 6. Polimorfismos encontrados en la secuenciación del gen LRRK2.

	SNPs	Cambio	Alelos	Tipo de variación
SH-SY5Y	rs3761863	T/C	Uno T y otro C	Cambio de sentido
	rs10878245	T/C	Uno T y otro C	Sinónima
	rs7966550	T/C	Uno T y otro C	Sinónima
	rs11176013	A/C	Uno A y otro C	Sinónima
	rs10878371	T/C	Uno T y otro C	Sinónima
SK-N-(BE)2-C	rs199557665	C/A	Uno C y otro A	Cambio de sentido

PINK1

El gen PINK1 (1p36) codifica una proteína (Q9BXM7) de 581 aminoácidos que se localiza en la mitocondria y que se ha visto que protege frente a la disfunción mitocondrial en situaciones de estrés celular. Se han descrito dos isoformas de la misma como resultado de procesamientos alternativos: la elegida como secuencia canónica y otra isoforma que se diferencia de la primera en la pérdida de los 307 primeros aminoácidos. En estas tres líneas celulares la isoforma encontrada ha sido la canónica (Q9BXM7-1).

Se ha podido secuenciar el gen a partir del nucleótido 589 en las tres líneas celulares, obteniéndose la secuencia canónica y sin detectarse polimorfismos en ninguna de las secuencias leídas.

HTRA2

El gen HTRA2 (2p12) cuenta con 8 exones que codifican una serina proteasa (O43464) de 458 aminoácidos que será sometida a procesos de proteólisis post-traduccionales. Se han descrito hasta 4 isoformas alternativas de esta proteína como resultado de procesamientos alternativos, la canónica y otras tres isoformas distintas de menor tamaño.

La secuencia canónica de cDNA que ha servido de base para el análisis del gen en las líneas celulares corresponde a ENST00000258080. A partir de ella se han diseñado los cebadores específicos adecuados y se ha secuenciado el gen

amplificándolo en dos fragmentos, obteniendo así la secuencia de 2367 nucleótidos que coinciden con la secuencia canónica arriba descrita. No se ha encontrado ningún polimorfismo en la lectura de las secuencias, aunque solo se han podido secuenciar los dos fragmentos en la línea celular SH-SY5Y.

4.2. Análisis de la expresión de proteínas mediante Western-Blot

El objetivo del análisis de la expresión de las proteínas de interés a través de Western-Blot era determinar posibles diferencias en el perfil proteico de las células sin diferenciar (SD) y diferenciadas a neuronas (D) en la línea SH-SY5Y.

Para ello, trabajamos con varias membranas obtenidas a partir de geles de poliacrilamida verticales con distinto porcentaje de acrilamida en función del tamaño de la proteína objeto de estudio.

La primera membrana (Figura 11), que se obtuvo a partir de un gel del 14% de acrilamida, se hibridó secuencialmente con SNCA, Parkina, DJ-1 y, por último, con Actina, que se eligió como proteína de expresión constitutiva para normalizar la cantidad de proteína presente en las tres membranas.

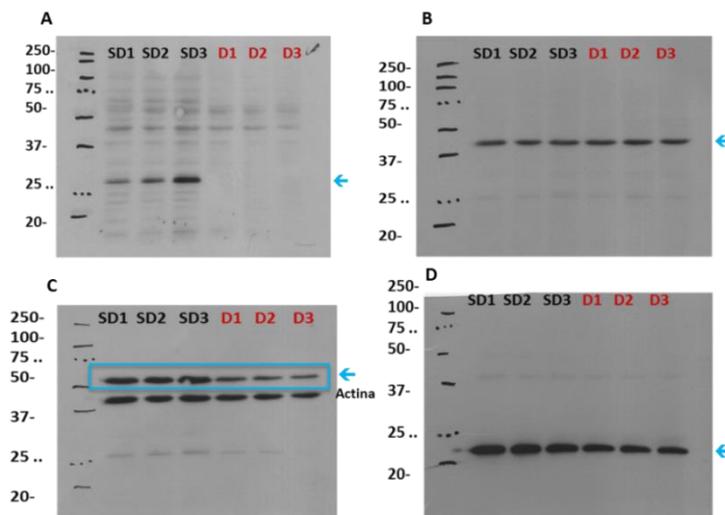


Figura 11. Membrana 1 (gel del 14% de acrilamida), cargada con tres poblaciones distintas de células sin diferenciar (SD) y otras tres poblaciones distintas de células diferenciadas a neuronas (D). Hibridada secuencialmente: **A)** SNCA; **B)** Actina, como control de carga del gel, banda a 42 kDa; **C)** Parkina, banda a 51,6 kDa, al hibridar secuencialmente la membrana aparece la banda correspondiente a la actina y **D)** DJ-1, banda de 24 kDa.

La α -sinucleína (**SNCA**) es una proteína cuyas alteraciones genéticas pueden conllevar su polimerización anormal en forma de fibrillas. Estos agregados fibrilares de SNCA representan el principal componente de los cuerpos de Lewy, que aparecen habitualmente en la EP. En la inmunodetección de la proteína se detectó una banda cuya expresión desaparece tras la diferenciación. Sin embargo, el tamaño de la banda es mayor del esperado (18 kDa) por lo que no podemos concluir que la banda corresponda a la SNCA y sería necesario repetir el experimento con otro anticuerpo.

La **Parkina** da una banda con un tamaño de 51,6 kDa, y como se puede observar, disminuye su expresión en las células diferenciadas. En la imagen aparece además la banda correspondiente a la Actina debido a la hibridación secuencial de la membrana.

En el caso de **DJ-1**, se detecta la banda esperada a 24 kDa y los resultados parecen apuntar a una menor expresión de la proteína una vez diferenciadas las células.

La membrana 2, obtenida a partir de un gel del 8% de acrilamida, se hibridó secuencialmente con LRRK2, Actina y Vimentina.

La proteína **LRRK2** da una banda de \approx 286 kDa que parece incrementar su expresión tras la diferenciación a neuronas. Sin embargo, el anticuerpo no es lo suficientemente específico y observamos la aparición de varias bandas inespecíficas.

Para la **Vimentina** se detecta una banda de 54 kDa y, además de la banda esperada, en el caso de las células diferenciadas aparecen más bandas de menor tamaño que podrían deberse a proteólisis asociada al proceso de diferenciación.

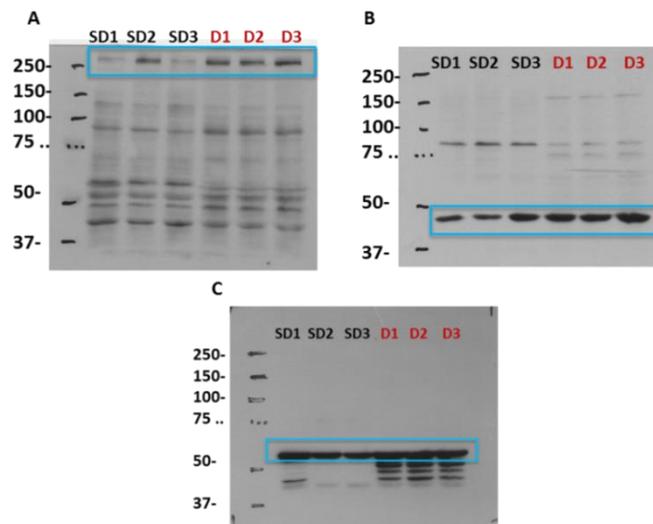


Figura 12. Membrana 2 (gel del 8% de acrilamida), cargada con tres poblaciones distintas de células sin diferenciar (**SD**) y otras tres poblaciones distintas de células diferenciadas a neuronas (**D**). Hibridada secuencialmente con: **A)** LRRK2, banda a ≈ 286 kDa; **B)** Actina, como control de carga, banda a 42 kD y **C)** Vimentina, banda a 54 kDa.

Por último, en la membrana 3, que se obtuvo a partir de un gel del 10% de acrilamida, se hibridó secuencialmente con PINK1, Actina y HTRA2.

En el caso de la hibridación con el anticuerpo que detecta **PINK1**, las bandas obtenidas no son de mucha intensidad, aun así, es posible observar la banda correspondiente a la proteína completa, y las dos bandas que corresponden a dos formas procesadas proteolíticamente en el extremo N-terminal de la proteína (63, 54, 45 kDa respectivamente)[41]. Dada la poca intensidad de las bandas, es difícil determinar si existen o no diferencias entre su expresión en células sin diferenciar y células diferenciadas. Lo que si se observa claramente es la aparición de una cuarta banda en el perfil proteico de las células diferenciadas con un tamaño cercano a los 100 kDa que podría estar asociada a procesos de autofosforilación de PINK1 tal, y como han sido descritos con anterioridad [42].

Para la proteína **HTRA2** se detectan dos bandas, una a 49 kDa y otra a ≈ 37 kDa, que corresponderían a la forma precursora y la forma madura de la proteína, respectivamente. Sin embargo, en nuestro caso la banda que correspondería a la forma madura de la proteína (37 kDa) tiene un tamaño menor del esperado lo que se

debe a procesos de autoproteólisis, dada la actividad autoproteolítica que posee la proteína.

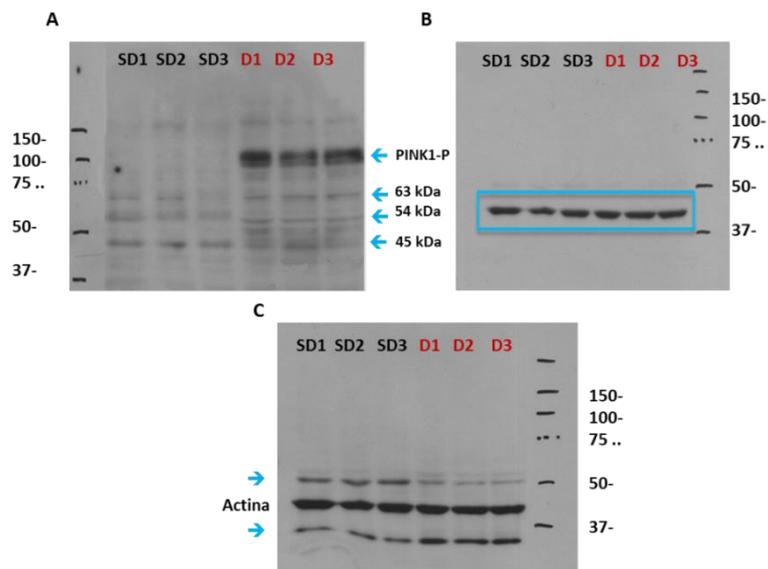


Figura 13. Membrana 3 (gel del 10% de acrilamida), cargada con tres poblaciones distintas de células sin diferenciar (**SD**) y otras tres poblaciones distintas de células diferenciadas a neuronas (**D**). Hibridada secuencialmente con: **A)** PINK1, aparecen 3 bandas que corresponden a la proteína completa (63 kDa) y dos formas procesadas proteolíticamente (54 y 45 kDa). Además en las células diferenciadas aparece otra banda a >100 kDa que podría deberse a procesos de autofosforilación; **B)** Actina, banda a 42 kDa y **C)** HTRA2, bandas a 49 y 37 kDa que corresponden a la forma precursora y a la forma madura de la proteína respectivamente.

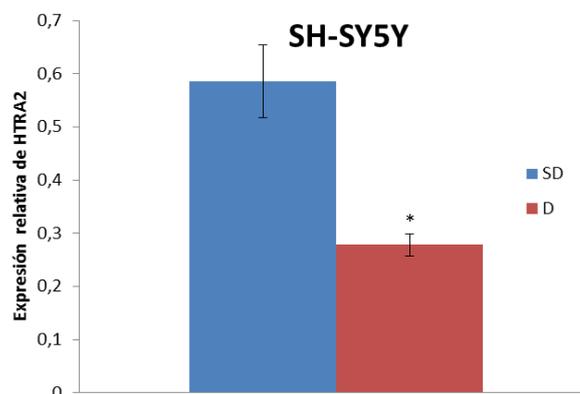


Figura 14. Ejemplo de análisis densitométrico de la banda de 49 kDa del gel correspondiente a la proteína HTRA2, expresado como la media \pm la desviación estándar (* $p < 0,05$).

4.3. Estudio de la sobreexpresión de Parkina.

4.3.1. Estudio de la sobreexpresión de Parkina mediante Western-Blot.

Una vez iniciada la caracterización genética de las tres líneas celulares a estudio (NSC, SH-SY5Y y SK-N-(BE)2-C), pasamos a analizar la sobreexpresión de la Parkina salvaje (WT) y mutada (mediante mutagénesis dirigida).

La Parkina es una proteína predominantemente citosólica, aunque también se localiza en la mitocondria donde forma un complejo con el factor de transcripción mitocondrial A (TFAM) y se une al mtDNA aumentando su replicación, su transcripción y también la expresión de los complejos del sistema OXPHOS.

La elección de la Parkina como proteína a estudiar se debe a las observaciones obtenidas en varios estudios que sugieren que la Parkina no solo tiene un papel importante en el mantenimiento de la función y la biogénesis mitocondrial, sino que además protege la integridad del mtDNA frente al estrés oxidativo [43] y participa en la señalización de las mitocondrias dañadas para inducir su eliminación mediante autofagia (función, que se ha visto, realiza de forma defectuosa la proteína cuando contiene mutaciones asociadas con la EP).

Las dos mutaciones sometidas a estudio en este trabajo han sido descritas como mutaciones causantes de enfermedad y encontradas en varios pacientes con la EP. La mutación G430D corresponde a un cambio gGc/gAc y se localiza en la región denominada anillo2 (RING2) de la proteína donde reside su actividad E3 ubiquitin ligasa, mientras que la mutación K161N presenta un cambio de aaT/aaA y se localiza a bastante distancia de la anterior en el denominado anillo 0 (RING0) de la proteína.

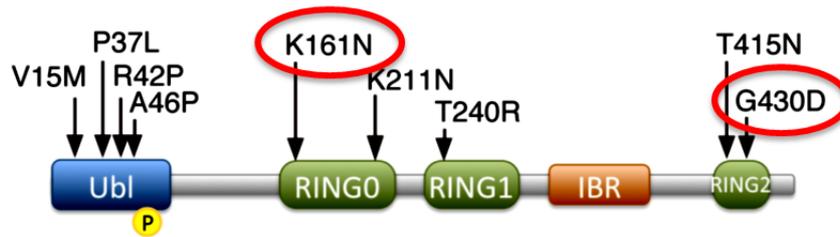


Figura 15. Representación gráfica de los dominios que conforman la Parkina en la que se encuentran señaladas algunas de las mutaciones que han sido asociadas al Parkinson en este gen y quedan resaltadas en rojo las dos mutaciones estudiadas en este trabajo.

El mantenimiento y la expresión del mtDNA y el correcto funcionamiento del sistema OXPHOS parecen factores importantes para prevenir la aparición de la enfermedad, por lo que es interesante estudiar una proteína que afecta de forma significativa a todos estos procesos.

De este modo, analizamos la expresión de las proteínas de interés a través de Western-Blot con el fin de determinar si existían diferencias en el perfil proteico entre las células que sobreexpresan la cepa salvaje y las que sobreexpresan la Parkina portadora de alguna de las dos mutaciones (K161N y G430D).

Para ello, se han realizado varios geles verticales de poliacrilamida con un porcentaje del 10% y una proporción acrilamida/bisacrilamida de 30/0,8. Una vez llevadas a cabo las electroforesis, se transfirieron las proteínas a las membranas correspondientes y éstas se sometieron a hibridaciones secuenciales con los anticuerpos específicos (ver tabla 2).

En la primera membrana, correspondiente a un gel cargado con muestras de la línea celular SK-N-(BE)2-C (Figura 16) se hibridó con Anti-Parkina como anticuerpo primario, para comprobar la expresión de la proteína en las células que no habían sido transfectadas con parkina y las que sí.

En la membrana podemos observar que la expresión de la Parkina aumenta en las muestras donde ha sido sobreexpresada, en relación a la muestra control, y dentro de éstas, se distingue un nivel de expresión algo superior en la muestra en la que se

sobreexpresa la proteína salvaje con respecto a las que han sido transfectadas con la proteína portando alguna mutación. Asimismo, cabe destacar la aparición de dos bandas de menor tamaño que el de la proteína en todas las muestras en la que se ha llevado a cabo la sobreexpresión de la Parkina.

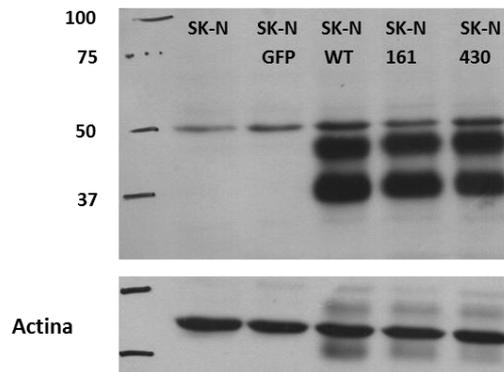


Figura 16. Membrana 1 hibridada con Anti-Parkina, se observan las bandas a ≈ 50 kDa (Parkina = 51, 6 kDa), y debajo el correspondiente control de actina. Las 5 muestras cargadas corresponden, respectivamente, a células SK que no han sido transfectadas (control) y células SK transfectadas con: GFP (control de la transfección), Parkina salvaje (WT), Parkina con la mutación K161N y Parkina con la mutación G430D.

Llevando a cabo el mismo experimento con una dilución del anticuerpo menor (1:500) pero siendo este reciclado, es decir, que ya había sido utilizado una vez antes, y con muestras de la línea celular hNSC obtuvimos la membrana 2 (Figura 17).

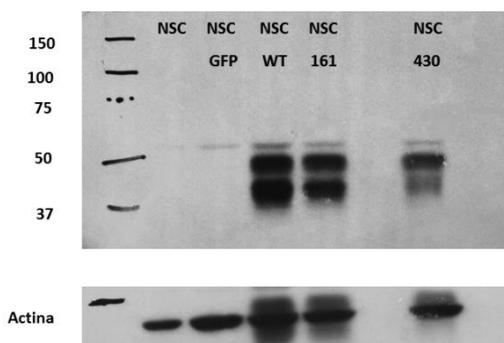


Figura 17. Membrana 2 hibridada con Anti-parkina, bandas a 50 kDa (Parkina = 51, 6 kDa) y el control de carga (actina). Las 5 muestras cargadas corresponden, respectivamente, a células hNSC que no han sido transfectadas (control) y células hNSC transfectadas con: GFP (control de la transfección), Parkina salvaje (WT), Parkina con la mutación K161N y Parkina con la mutación G430D.

El perfil proteico observado es bastante similar al encontrado en la membrana para las células SK-N-(BE)2-C. Por otro lado las diferencias entre las células que expresan la proteína salvaje (WT) y las que expresan la proteína mutada en una u otra posición son bastante más evidentes, encontrando un nivel de expresión mayor en las primeras, mientras que las que expresan la proteína que porta la mutación G430D presentan el nivel de expresión más bajo, especialmente en las bandas de menor tamaño.

Por último, analizamos el nivel de expresión en la línea celular SH-SY5Y utilizando de nuevo el anticuerpo Anti-Parkina. En esta ocasión, además de estudiar las diferencias entre las muestras que expresan la Parkina salvaje y las que expresan la Parkina mutada, también examinamos las posibles diferencias entre muestras que fueron transfectadas con un mayor número de copias del gen (muestras en **color negro**) y las que fueron transfectadas con un número menor de las mismas (muestras **color rojo**). Los resultados obtenidos parecen indicar que la expresión de la proteína aumenta de nuevo en las células transfectadas con la misma y también de nuevo se observan las dos bandas de menor tamaño en las células donde se induce la sobreexpresión tanto en las de alto número de copias como en las de menor número.

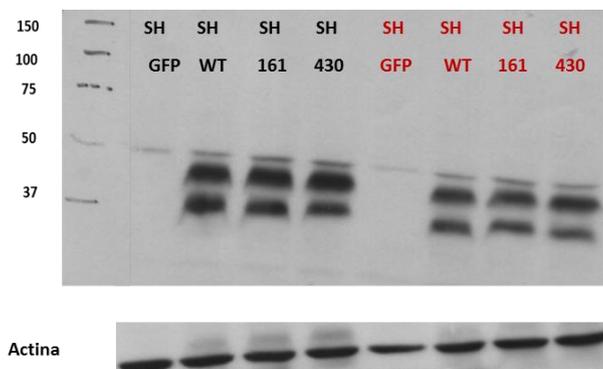


Figura 18. Membrana 3 hibridada con Anti-parkina, bandas a 50 kDa y la actina como control de carga. Las 8 muestras cargadas corresponden, respectivamente, a células SH-SY5Y que han sido transfectadas con: GFP (control de la transfección), Parkina salvaje (WT), Parkina con la mutación K161N y Parkina con la mutación G430D. Las cuatro primeras muestras (**color negro**) pertenecen a células transfectadas con una alta cantidad de virus mientras que las cuatro últimas (**color rojo**) han sido transfectadas con una menor concentración de virus.

4.3.2. Estudio de la expresión de Parkina mediante qRT-PCR.

Cuando la PCR a tiempo real se combina con una reacción de retro-transcripción o RT (RT-PCR), puede determinarse la cantidad de mRNA de una muestra mediante una cuantificación relativa. Dicha cuantificación se denomina así ya que se compara entre diferentes muestras la cantidad relativa o relación del mRNA de un gen específico respecto a la cantidad de mRNA de un gen constitutivo (control endógeno, en nuestro caso la actina).

En nuestro caso queremos determinar las expresiones relativas del gen Parkina, en función de que se trate de células transfectadas con el gen salvaje o células transfectadas con alguna de las dos mutaciones, con respecto a las células transfectadas solo con GFP (control).

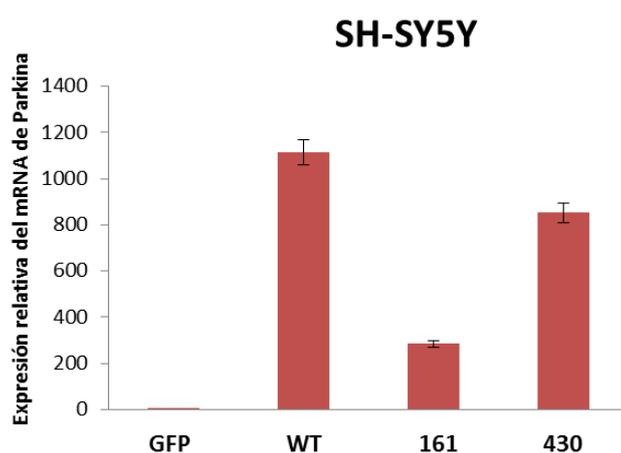


Figura 19. Representación gráfica de las expresiones relativas del gen Parkina entre muestras de células de la línea SH-SY5Y transfectadas con: **GFP** (control), el gen salvaje (**WT**), el gen con la mutación K161N (**161**) y el gen portando la mutación G430D (**430**).

Como se puede observar en la gráfica (Figura 19), en los tres casos en los que se transfectan las células con el gen de la Parkina, la expresión aumenta considerablemente con respecto al control, siendo mayor en la muestra de células transfectadas con el gen salvaje respecto a las células que expresan el gen con alguna de las dos mutaciones.

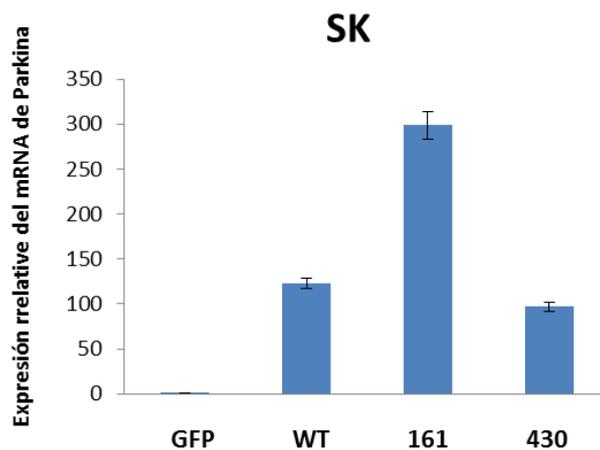


Figura 20. Representación gráfica de las expresiones relativas del gen Parkina entre muestras de células de la línea SK-N-(BE)2-C transfectadas con: **GFP** (control), el gen salvaje (**WT**), el gen con la mutación K161N (**161**) y el gen portando la mutación G430D (**430**).

En el caso de la línea celular SK-N-(BE)2-C las células que parecen tener mayor expresión del gen son en este caso las transfectadas con la Parkina que porta la mutación K161N.

También cabe destacar que la sobreexpresión generada es mayor en las muestras pertenecientes a la línea celular SH-SY5Y en relación a las de la línea SK-N-(BE)2-C.

5. DISCUSIÓN

5.1. Análisis de las secuencias y del perfil proteico de los genes de interés.

En el estudio de la secuencia del gen **Parkina** en las tres líneas celulares, se encontraron 3 polimorfismos, uno en la línea celular hNSC (rs1801582) y otros dos polimorfismos en la línea celular SH-SY5Y (rs1801334 y rs1801474). Los tres han sido descritos como no patogénicos y, por lo tanto, no suponen ninguna connotación a tener en cuenta en la aplicación de estas líneas celulares para el estudio de los polimorfismos de mtDNA relacionados con la EP.

En cuanto al estudio de la proteína mediante Western-Blot encontramos que la expresión decrece (con una significación $p=0,005$) en las células una vez se han diferenciado a neuronas. Este resultado es interesante dado que esta proteína desarrolla un importante papel neuroprotector y quizá su presencia sea incluso más relevante durante la diferenciación celular [44].

La caracterización genética de **DJ-1** ha permitido comprobar la ausencia de algún tipo de mutación que pueda afectar a su función. Esta proteína se sintetiza como una proenzima y sufre un procesamiento proteolítico que supone la pérdida de 15 aminoácidos del extremo C-terminal lo que la convierte en una proteasa activa [45]. Mediante el análisis por inmunodetección se ha observado que la expresión de la proteína decrece ($p=0,0003$) cuando las células se diferencian a neuronas. Resultado coherente con los estudios que proponen que DJ-1 tendría un papel como antioxidante y que solo aumenta su expresión en el caso de que las células se encuentren bajo estrés oxidativo [46].

La proteína **α -sinucleína**, codificada por el gen SNCA, es el componente principal de los cuerpos de Lewy. El papel celular de esta proteína es aún desconocido. Sin embargo, probablemente desempeña un papel en la función pre-sináptica de las neuronas dopaminérgicas, que puede incluir moderar la liberación de neurotransmisores. No se han encontrado polimorfismos en ninguna de las tres líneas celulares a la hora de su secuenciación en este estudio.

En cuanto al análisis de la expresión de la proteína, el anticuerpo utilizado ha resultado no ser el idóneo para su detección, ya que no encontramos la banda del tamaño que correspondería para esta proteína y por lo tanto sería necesario repetir el experimento con otro anticuerpo más específico.

El Parkinson asociado al gen **LRRK2** es en gran medida clínica y patológicamente indistinguible del Parkinson esporádico, lo que sugiere que entender la función de su proteína es importante para todas las formas de Parkinson. Sin embargo, alcanzar un consenso en cuanto a las funciones fisiológicas relevantes para la EP que lleva a cabo LRRK2 está siendo extremadamente difícil, especialmente por las dificultades encontradas a la hora de desarrollar anticuerpos específicos válidos para los diferentes tejidos o líneas celulares a estudio. En este trabajo se han probado de hecho dos anticuerpos para la detección de LRRK2 obteniéndose en ambos experimentos numerosas bandas inespecíficas. En esta memoria se recoge únicamente el anticuerpo que ha dado un mejor resultado.

La caracterización genética de este gen ha sido especialmente laboriosa debido a su gran tamaño. Aun así, se han encontrado numerosos polimorfismos en la línea celular SH-SY5Y: rs10878245, rs7966550, rs11176013 y rs10878371, (todos ellos asociados al Parkinson autosómico dominante, lo que habrá que tener presente al utilizar como modelo esta línea celular, aunque la relevancia clínica de estos polimorfismos permanece desconocida en todos los casos) y, por último, rs3761863, un polimorfismo que no afecta a la función de la proteína y está clasificado como benigno. El único polimorfismo encontrado en la línea celular SK-N-(BE)2-C (rs199557665) corresponde a un polimorfismo de cambio de sentido también sin consecuencias clínicas descritas.

En cuanto a la proteína LRRK2, los resultados obtenidos no son significativos aunque parecen indicar un ligero aumento de la expresión de la proteína una vez las células han sido diferenciadas a neuronas. La bibliografía sostiene que LRRK2 se expresa en mayor medida en los pulmones y el riñón que en el cerebro, y que dentro de éste los niveles de expresión en las neuronas dopaminérgicas son bajos [47]. Aun así, quizá su presencia sea más relevante en la célula diferenciada que durante su diferenciación y de ahí el incremento en su expresión.

La secuenciación del gen **PINK1** solo se pudo llevar a cabo a partir del nucleótido 589, a pesar de haber llevado a cabo numerosos intentos con diferentes condiciones en la PCR (cambios en la temperatura y el tiempo de elongación, aumento del número de ciclos, utilización de cDNA específico del fragmento), utilizado distintos cebadores e incluso cambiado la polimerasa utilizada en la PCR por una con mayor

fidelidad. La razón por la que no hemos conseguido secuenciar el fragmento podría deberse a la presencia de la proteína tan solo en pequeñas cantidades, que no facilitan la amplificación de este fragmento. Esta hipótesis se vería reforzada por los resultados obtenidos en el análisis del perfil proteico que muestran una intensidad muy baja para las bandas correspondientes a la proteína.

En estos estudios mediante Western-Blot se observan tres bandas correspondientes a la proteína completa (63 kDa), y dos bandas que corresponden a dos formas procesadas proteolíticamente en el extremo N-terminal de la proteína (54, 45 kDa respectivamente) [41]. A pesar de que dada la poca intensidad de las bandas es difícil determinar si existen o no diferencias entre la expresión en células sin diferenciar y células diferenciadas, la cuantificación de las bandas indica un aumento de la expresión ($p=0,03$) de la proteína completa en las células diferenciadas. Esto estaría de acuerdo con los estudios que proponen que PINK1 es una proteína tremendamente importante para el control del correcto funcionamiento de las mitocondrias, y que las neuronas que portan mutaciones en esta proteína no son capaces de reconocer ni eliminar las mitocondrias dañadas, y acaban teniendo un déficit energético que compromete su viabilidad [48]. También cabe destacar la aparición de una cuarta banda en el perfil proteico de las células diferenciadas con un tamaño cercano a los 100 kDa que podría estar asociada a procesos de autofosforilación de PINK1 que ya han sido descritos con anterioridad [42].

El gen **HTRA2** codifica una serina proteasa localizada en el espacio intermembrana mitocondrial cuyas mutaciones han sido asociadas a la EP, aunque su verdadera implicación en la patogénesis de la enfermedad sigue siendo un tema controvertido.

En la caracterización genética no se encontró ningún polimorfismo en las secuencias leídas. En cuanto a la proteína, en los resultados obtenidos mediante Western-Blot se observan dos bandas que corresponderían a la forma precursora y a la forma madura de la proteína, aunque esta última tiene un tamaño ligeramente inferior al esperado debido a que sufre procesos de autoproteólisis. También observamos que la banda que corresponde a la forma precursora de la proteína decrece

significativamente ($p=0,001$) tras la diferenciación a neuronas de las células, mientras que en el caso de la proteína madura la intensidad es mayor ($p=0,02$), lo que lleva a pensar que en las células diferenciadas a neuronas la proteína se encuentra mayoritariamente en su forma activa.

La **Vimentina** es un filamento intermedio (IF) de tipo III que se expresa en las células mesenquimales y juega un papel importante asegurado la posición y el anclaje de los orgánulos en el citosol. En los estudios de inmunodetección se observa la banda esperada de 54 kDa que corresponde a la proteína. Además de esta banda, en el caso de las células diferenciadas aparecen otras bandas de menor tamaño que podrían deberse a proteólisis mediada por una proteasa dependiente de Ca^{2+} que actuaría tras la diferenciación celular [49].

5.2. Estudio de la sobreexpresión de Parkina

En el estudio de la sobreexpresión de la Parkina, llevado a cabo mediante inmunodetección en las tres líneas celulares de interés, obtuvimos tres perfiles proteicos bastante parecidos donde se observa un aumento importante en la expresión de la proteína en aquellas células transfectadas con el gen con respecto a las células control (no transfectadas o transfectadas con GFP). Este aumento es, además, mayor en el caso de las células transfectadas con el gen salvaje (WT) que en las células transfectadas con el gen mutado.

También es importante destacar la aparición de dos bandas de menor tamaño y bastante intensidad en todas las muestras en las que se ha llevado a cabo la sobreexpresión de la Parkina, lo que parece indicar que la mayor parte de la proteína que se sobreexpresa acaba siendo degradada por la célula [50].

Además se ha llevado a cabo un segundo experimento disminuyendo el número de copias del gen transfectadas a las células, con el fin de obtener una menor sobreexpresión de la proteína que se acerque más a las condiciones fisiológicas de las mismas.

Aunque se comprobó la correcta transfección del gen (ya fuera salvaje o mutado) en las células mediante la amplificación por PCR del gen a partir del DNA de

las células, sería conveniente llevar a cabo otra comprobación realizando la amplificación del gen a partir de RNA (sintetizando el correspondiente cDNA) para asegurarnos de que la proteína expresada es la proteína mutada que queremos en cada caso.

En cuanto al estudio de la sobreexpresión mediante RT-PCR a tiempo real, los resultados obtenidos muestran, de nuevo, un gran aumento de la expresión del gen en las muestras transfectadas con el mismo (tanto en su forma salvaje como mutado) con respecto a las células control transfectadas con GFP.

Una vez comprobada la sobreexpresión de la proteína, habría que pasar a realizar experimentos (Polarografía, Microscopía confocal) para analizar cómo afecta esta sobreexpresión a las funciones de los complejos del sistema OXPHOS y a la morfología y biogénesis mitocondrial.

6. CONCLUSIONES

- Se han conseguido caracterizar los siguientes genes previamente asociados a casos de Parkinson familiar:
 - SNCA, PARK2 y DJ-1 en las tres líneas celulares a estudio (hNSC, SH-SY5Y y SK-N-(BE)2-C).
 - PINK1, a partir del aminoácido 589 en las tres líneas celulares.
 - LRRK2, solo se ha secuenciado completo en la línea celular SH-SY5Y
 - HTRA2, secuenciado por completo en la línea celular SH-SY5Y, en las otras dos líneas celulares solo se ha secuenciado el segundo fragmento.
- Se han observado los diferentes perfiles proteicos que presentan las células de la línea celular SH-SY5Y antes y después de ser diferenciadas a neuronas, obteniéndose resultados que ayudarán a optimizar esta diferenciación.
- Los estudios de la sobreexpresión de la Parkina mediante Western-Blot y RT-PCR a tiempo real han permitido comprobar el aumento de expresión (entre 100 y 300 veces más en la línea celular SK-N-(BE)2-C, y entre 250 y 1100 veces más en el caso de la línea celular SH-SY5Y) en las células transfectadas con el gen tanto en su forma salvaje como mutada.
- Se ha observado la disminución de la sobreexpresión de la Parkina al transfectar la línea celular SH-SY5Y con menor número de copias del gen con el objetivo de aproximarse a las condiciones fisiológicas de las células.

El estudio ha permitido, por tanto, avanzar en la caracterización exhaustiva de estas tres líneas celulares para la utilización de las mismas como modelos de estudio de las variantes polimórficas del mtDNA que pudieran tener relación con el riesgo de padecer la EP.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Hodaie, M., J.S. Neimat, and A.M. Lozano, *The Dopaminergic Nigrostriatal System and Parkinson's Disease: Molecular Events in Development, Disease, and Cell Death, and New Therapeutic Strategies*. Neurosurgery, 2007. **60**(1): p. 17-30.
2. de Lau, L.M. and M. Breteler, *Epidemiology of Parkinson's disease*. The Lancet Neurology, 2006. **5**(6): p. 525-535.
3. Elbaz, A. and F. Moisan, *Update in the epidemiology of Parkinson's disease*. Current opinion in neurology, 2008. **21**(4): p. 454-460.
4. Detmer, S.A. and D.C. Chan, *Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2007. **8**(11): p. 870-879.
5. Li, Z., et al., *The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses*. Cell, 2004. **119**(6): p. 873-887.
6. Henchcliffe, C., et al., *Multinuclear magnetic resonance spectroscopy for in vivo assessment of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2008. **1147**(1): p. 206-220.
7. Bowen, B.C., et al., *Proton MR spectroscopy of the brain in 14 patients with Parkinson disease*. American journal of neuroradiology, 1995. **16**(1): p. 61-68.
8. Parker Jr, W.D., J.K. Parks, and R.H. Swerdlow, *Complex I deficiency in Parkinson's disease frontal cortex*. Brain research, 2008. **1189**: p. 215-218.
9. Shoffner, J.M., et al., *Mitochondrial oxidative phosphorylation defects in Parkinson's disease*. Annals of neurology, 1991. **30**(3): p. 332-339.
10. Shinde, S. and K. Pasupathy, *Respiratory-chain enzyme activities in isolated mitochondria of lymphocytes from patients with Parkinson's disease: preliminary study*. Neurology India, 2006. **54**(4): p. 390.
11. Müftüoğlu, M., et al., *Mitochondrial complex I and IV activities in leukocytes from patients with parkin mutations*. Movement Disorders, 2004. **19**(5): p. 544-548.
12. Haas, R.H., et al., *Low platelet mitochondrial complex I and complex II/III activity in early untreated Parkinson's disease*. Annals of neurology, 1995. **37**(6): p. 714-722.
13. Montoya, J., et al., *20 years of human mtDNA pathologic point mutations: Carefully reading the pathogenicity criteria*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 2009. **1787**(5): p. 476-483.
14. Bender, A., et al., *High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease*. Nature genetics, 2006. **38**(5): p. 515-517.
15. Simon, D., et al., *Familial multisystem degeneration with parkinsonism associated with the 11778 mitochondrial DNA mutation*. Neurology, 1999. **53**(8): p. 1787-1787.
16. Thyagarajan, D., et al., *A novel mitochondrial 12SrRNA point mutation in parkinsonism, deafness, and neuropathy*. Annals of neurology, 2000. **48**(5): p. 730-736.
17. Egensperger, R., et al., *Association of the mitochondrial tRNA^A4336G mutation with Alzheimer's and Parkinson's diseases*. Neuropathology and applied neurobiology, 1997. **23**(4): p. 315-321.
18. Esteves, A.R., et al., *Oxidative stress involvement in α -synuclein oligomerization in Parkinson's disease cybrids*. Antioxidants & redox signaling, 2009. **11**(3): p. 439-448.
19. Langston, J.W., et al., *Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis*. Science, 1983. **219**(4587): p. 979-980.
20. Terzioglu, M. and D. Galter, *Parkinson's disease: genetic versus toxin-induced rodent models*. FEBS journal, 2008. **275**(7): p. 1384-1391.
21. Yao, Z. and N.W. Wood, *Cell death pathways in Parkinson's disease: role of mitochondria*. Antioxidants & redox signaling, 2009. **11**(9): p. 2135-2149.
22. Gasser, T., *Mendelian forms of Parkinson's disease*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 2009. **1792**(7): p. 587-596.

23. Moore, D.J., et al., *Molecular pathophysiology of Parkinson's disease*. Annu. Rev. Neurosci., 2005. **28**: p. 57-87.
24. Lotharius, J. and P. Brundin, *Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and α -synuclein*. Nature Reviews Neuroscience, 2002. **3**(12): p. 932-942.
25. Parihar, M., et al., *Mitochondrial association of alpha-synuclein causes oxidative stress*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2008. **65**(7-8): p. 1272-1284.
26. Martin, L.J., et al., *Parkinson's disease α -synuclein transgenic mice develop neuronal mitochondrial degeneration and cell death*. The Journal of neuroscience, 2006. **26**(1): p. 41-50.
27. Moore, D.J., *The biology and pathobiology of LRRK2: Implications for Parkinson's disease*. Parkinsonism & related disorders, 2008. **14**: p. S92-S98.
28. Berwick, D.C. and K. Harvey, *LRRK2 signaling pathways: the key to unlocking neurodegeneration?* Trends in cell biology, 2011. **21**(5): p. 257-265.
29. West, A.B., et al., *Parkinson's disease-associated mutations in leucine-rich repeat kinase 2 augment kinase activity*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(46): p. 16842-16847.
30. Lin, X., et al., *Leucine-rich repeat kinase 2 regulates the progression of neuropathology induced by Parkinson's-disease-related mutant α -synuclein*. Neuron, 2009. **64**(6): p. 807-827.
31. Hoepken, H.-H., et al., *Mitochondrial dysfunction, peroxidation damage and changes in glutathione metabolism in PARK6*. Neurobiology of disease, 2007. **25**(2): p. 401-411.
32. Clark, I.E., et al., *Drosophila pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin*. Nature, 2006. **441**(7097): p. 1162-1166.
33. Kitada, T., et al., *Impaired dopamine release and synaptic plasticity in the striatum of PINK1-deficient mice*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. **104**(27): p. 11441-11446.
34. Lücking, C.B., et al., *Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene*. New England Journal of Medicine, 2000. **342**(21): p. 1560-1567.
35. Shin, J.-H., et al., *PARIS (ZNF746) repression of PGC-1 α contributes to neurodegeneration in Parkinson's disease*. Cell, 2011. **144**(5): p. 689-702.
36. Kuroda, Y., et al., *Parkin enhances mitochondrial biogenesis in proliferating cells*. Human molecular genetics, 2006. **15**(6): p. 883-895.
37. Mortiboys, H., et al., *Mitochondrial function and morphology are impaired in parkin-mutant fibroblasts*. Annals of neurology, 2008. **64**(5): p. 555-565.
38. Palacino, J.J., et al., *Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin-deficient mice*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(18): p. 18614-18622.
39. Taira, T., et al., *DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death*. EMBO reports, 2004. **5**(2): p. 213-218.
40. Tang, B., et al., *Association of PINK1 and DJ-1 confers digenic inheritance of early-onset Parkinson's disease*. Human molecular genetics, 2006. **15**(11): p. 1816-1825.
41. Takatori, S., G. Ito, and T. Iwatsubo, *Cytoplasmic localization and proteasomal degradation of N-terminally cleaved form of PINK1*. Neuroscience letters, 2008. **430**(1): p. 13-17.
42. Kondapalli, C., et al., *PINK1 is activated by mitochondrial membrane potential depolarization and stimulates Parkin E3 ligase activity by phosphorylating Serine 65*. Open biology, 2012. **2**(5): p. 120080.
43. Rothfuss, O., et al., *Parkin protects mitochondrial genome integrity and supports mitochondrial DNA repair*. Human molecular genetics, 2009. **18**(20): p. 3832-3850.
44. Scarffe, L.A., et al., *Parkin and PINK1: much more than mitophagy*. Trends in neurosciences, 2014. **37**(6): p. 315-324.

45. Chen, J., L. Li, and L.-S. Chin, *Parkinson disease protein DJ-1 converts from a zymogen to a protease by carboxyl-terminal cleavage*. *Human molecular genetics*, 2010. **19**(12): p. 2395-2408.
46. Saito, Y., *Oxidized DJ-1 as a possible biomarker of Parkinson's disease*. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 2014. **54**(3): p. 138.
47. Gómez-Suaga, P., et al., *Novel insights into the neurobiology underlying LRRK2-linked Parkinson's disease*. *Neuropharmacology*, 2014.
48. Dzamko, N., et al., *Parkinson's disease-implicated kinases in the brain; insights into disease pathogenesis*. Name: *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2014. **7**: p. 57.
49. Nelson, W.J. and P. Traub, *Proteolysis of vimentin and desmin by the Ca²⁺-activated proteinase specific for these intermediate filament proteins*. *Molecular and cellular biology*, 1983. **3**(6): p. 1146-1156.
50. Petrucelli, L., et al., *Parkin protects against the toxicity associated with mutant α -synuclein: proteasome dysfunction selectively affects catecholaminergic neurons*. *Neuron*, 2002. **36**(6): p. 1007-1019.