



**Universidad** Zaragoza



TRABAJO FINAL DEL MÁSTER DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

Supervisado por Pilar Bayona Bafaluy y Nuria Garrido Pérez,

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

**“Modelos celulares para el estudio de factores  
genéticos asociados a casos esporádicos de  
enfermedad de Parkinson”**

María San Anselmo Jarauta

Zaragoza, 2015

# ÍNDICE

	<u>Página</u>
1. Resumen y Abstract.....	3
2. Introducción.....	4
3. Antecedentes y Objetivos.....	11
4. Metodología.....	12
4.1. Líneas celulares.....	12
4.2. Oligonucleótidos.....	13
4.3. Anticuerpos.....	16
4.4. Cultivos celulares eucariotas.....	16
4.4.1. Medios de cultivo.....	16
4.4.2. Siembra y mantenimiento.....	17
4.4.3. Congelación y descongelación.....	18
4.5. Diferenciación a neuronas dopaminérgicas.....	18
4.6. Transfección celular con vectores lentivirales.....	19
4.7. Contaje celular.....	20
4.8. Cuantificación de material genético.....	21
4.9. Extracción de RNA total.....	21
4.10. RT-PCR.....	22
4.11. PCR.....	23
4.12. Electroforesis.....	24
4.13. Secuenciación de DNA.....	25
4.14. Q-PCR.....	25
4.15. Extracción de proteínas.....	27
4.16. Cuantificación de proteínas.....	28
4.17. Western-Blot.....	28
4.17.1. SDS-PAGE.....	28
4.17.2. Transferencia a membrana.....	30
4.17.3. Incubación con anticuerpos.....	30
4.17.4. Detección quimioluminiscente.....	31

5. Resultados.....	32
5.1. Secuenciación de genes nucleares.....	32
5.1.1. Secuenciación del gen <i>POLG</i> .....	32
5.1.2. Secuenciación del gen <i>LRRK2</i> .....	32
5.2. Generación de líneas derivadas de neuroblastoma y madre neural que sobreexpresan Parkina.....	34
5.2.1. Incorporación de variantes de Parkina.....	35
5.2.2. Cuantificación de la expresión del gen <i>PARK2</i> en las líneas generadas.....	36
5.2.3. Detección de la proteína Parkina en las líneas generadas.....	37
5.3. Generación de líneas derivadas de neuroblastoma y madre neural que sobreexpresan <i>POLG</i> .....	40
5.3.1. Incorporación de variantes de <i>POLG</i> .....	41
5.3.2. Cuantificación de la expresión del gen <i>POLG</i> en las líneas generadas.....	42
5.3.3. Detección de la proteína <i>POLG</i> en las líneas generadas.....	43
5.4. Influencia del tratamiento de diferenciación en proteínas relacionadas con Parkinson familiar.....	46
6. Discusión.....	47
6.1. Secuenciación de los genes <i>POLG</i> y <i>LRRK2</i> .....	47
6.2. Generación de líneas derivadas de neuroblastoma y madre neural que expresan mutaciones relacionadas con Parkinson.....	48
6.2.1. Líneas con mutaciones en Parkina.....	49
6.2.2. Líneas con mutaciones en <i>POLG</i> .....	50
6.3. Influencia del tratamiento de diferenciación en proteínas relacionadas con Parkinson familiar.....	51
6.4. Utilidad de los modelos celulares para estudiar EP.....	51
7. Conclusiones y Conclusions.....	52
8. Perspectivas futuras.....	53
9. Referencias bibliográficas.....	54

## 1. Resumen

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más extendida, con síntomas principalmente motores y caracterizada por la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra. Su etiología combina factores genéticos, nucleares y mitocondriales, con factores ambientales. Este proyecto se centra en el estudio del papel del sistema OXPHOS y la mitocondria en la enfermedad. Para ello, se han caracterizado líneas celulares derivadas de neuroblastoma y células madre neurales por su potencial para diferenciarse a neuronas dopaminérgicas, las principales células afectadas en la enfermedad. Se ha descartado la presencia de mutaciones patológicas en los genes *POLG* y *LRRK2* en dichas líneas celulares y se han generado líneas derivadas que sobreexpresan variantes de las proteínas Parkina y *POLG* relacionadas con la enfermedad. En ellas se ha comprobado la incorporación de la mutación, se ha cuantificado la expresión de mRNA mediante q-PCR, con sonda o tinción con Sybr Green respectivamente y se ha analizado la expresión proteica mediante inmunodetección indirecta. También se ha estudiado en una línea derivada de neuroblastoma el efecto de la diferenciación dopaminérgica sobre las proteínas PINK1 y HtrA2. Para finalizar, se discute la relación de la EP con otras patologías y se proponen nuevas estrategias para abordar el estudio de la enfermedad, como la generación de híbridos transmitocondriales.

## Abstract

Parkinson's disease (PD) is the second most widely spread neurodegenerative disease, with mainly motor symptoms and characterized by the loss of dopaminergic neurons in substantia nigra. Its etiology combines nuclear and mitochondrial genetic factors with environmental factors. This project focuses on the role of OXPHOS system and mitochondria in the disease. For that purpose, cell lines derived from neuroblastoma and neural stem cells have been characterized because of their potential to be differentiated into dopaminergic neurons, the most affected cells in PD. The presence of pathological mutations in *POLG* and *LRRK2* genes has been discarded in those cell lines. Derived lines overexpressing Parkin and *POLG* variants involved in the disease have been generated. The mutation incorporation has been confirmed, the mRNA expression has been quantified by q-PCR, with probe or staining with Sybr Green

respectively and protein expression has been analyzed by indirect immunodetection. What is more, the effect of dopaminergic differentiation on PINK1 and HtrA2 proteins has been studied in a cell line derived from neuroblastoma. Finally, the relationship between PD and other pathologies is discussed and new strategies are proposed for the study of disease, such as transmitochondrial cybrids generation.

## 2. Introducción

La enfermedad de Parkinson (EP) fue descrita por primera vez en 1817 por James Parkinson. Se trata de un síndrome neurodegenerativo crónico y progresivo, caracterizado principalmente por trastornos del movimiento como bradiquinesia, temblor, rigidez y afección de los reflejos posturales. Además de los síntomas motores, también se asocia con trastornos mentales como depresión o psicosis, así como con disfunción autonómica y gastrointestinal.

Tras el Alzheimer, la EP es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común en la sociedad occidental, afectando al 1% de la población por encima de 50 años. Sus tasas de prevalencia e incidencia en Europa son de 108 a 257/100.000 y de 11 a 19/100.000 al año, respectivamente [1]. Con un 75% de incidencia, la forma más frecuente de la enfermedad es el Parkinsonismo idiopático, habitualmente de aparición tardía y no heredable (OMIM #168600). Dado que el envejecimiento es el factor de riesgo más importante asociado con esta forma de EP [2] y que la población occidental está envejeciendo, la enfermedad está alcanzando dimensiones epidémicas. Una segunda forma menos frecuente de EP es la familiar, con un 25% de incidencia y asociada a mutaciones en un reducido grupo de genes nucleares.

La principal característica histopatológica de la EP es la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra, aunque cada vez existen más evidencias de anomalías bioquímicas y morfológicas generalizadas, tanto dentro como fuera del sistema nervioso central [3]. Otro distintivo de la enfermedad es la aparición en diversos tejidos de depósitos intracitoplasmáticos ricos en  $\alpha$ -sinucleína, denominados cuerpos de Lewy [4]. Se trata de agregados anómalos de proteínas formados debido al incorrecto plegamiento y autoensamblaje de la cadena polipeptídica. Las especies oligoméricas con gran potencial citotóxico que se acumulan como intermediarios en el proceso de

formación de fibras amiloides insolubles han sido caracterizadas por primera vez en un estudio reciente donde participaron grupos españoles [5].

### Influencia de la mitocondria en la vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas

El fallo en los mecanismos celulares de supervivencia que protegen la integridad y la funcionalidad mitocondrial puede generar la pérdida neuronal en el Parkinson y otras muchas enfermedades neurodegenerativas. Las neuronas son células extremadamente polarizadas, con morfologías complejas y variadas, caracterizadas por la extensión de largos axones y ramificaciones de dendritas (Figura 1). Estas regiones tan especializadas tienen necesidades energéticas muy diversas y requieren una adaptación local rápida de la función mitocondrial, que incluye el transporte de mitocondrias a lo largo de los axones y la eliminación de orgánulos dañados. Aunque los sistemas de control de calidad mitocondrial son comunes a todos los tipos celulares; la elevada demanda energética, la mayor tendencia a acumular daños y las restricciones espaciales debidas a la peculiar morfología de las células, hacen que la disfunción mitocondrial afecte en mayor medida a las neuronas que a otros tipos celulares [6].

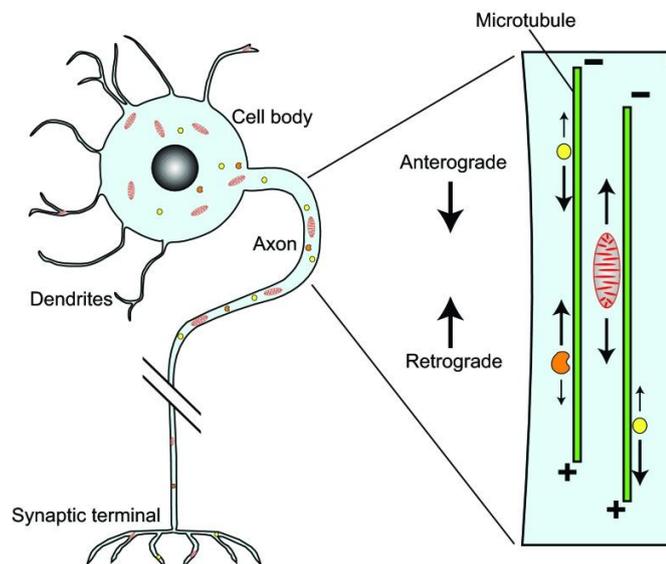


Figura 1. Estructura de la neurona y transporte axonal [7]. El correcto funcionamiento de la neurona requiere el transporte a largas distancias a través del axón de componentes citoplasmáticos que incluyen vesículas (amarillo), mitocondrias (rojo) y orgánulos endocíticos (naranja). Un propósito principal de este transporte es enviar orgánulos recién sintetizados en el cuerpo celular hacia la terminal sináptica (transporte anterógrado) y devolver materiales envejecidos al cuerpo celular (retrógrado), para su degradación y reciclaje.

Se han descrito una serie de factores que contribuyen a la vulnerabilidad preferencial de las neuronas dopaminérgicas en la EP, tanto familiar como de aparición tardía [8]. Entre ellos destacan el aumento del flujo de calcio y largos axones sin recubrimiento de mielina con elevadas demandas energéticas, que en conjunto incrementan el estrés oxidativo mitocondrial. Además, la presencia del neurotransmisor dopamina puede generar especies reactivas de oxígeno (ROS) y forma aductos con proteínas implicadas en la homeostasis mitocondrial, como DJ-1, afectando a su función.

#### DNA mitocondrial y Parkinson

El DNA mitocondrial (mtDNA) se localiza en la matriz mitocondrial unido a la membrana mitocondrial interna, donde se encuentra embebida la cadena de transporte de electrones (ETC). La tasa de mutación de este genoma es mucho mayor que la del nuclear, debido en parte al carácter mutagénico de ROS generadas por la ETC y por ciertas propiedades intrínsecas del mtDNA. Entre las frecuentes mutaciones somáticas en el mtDNA, adquiridas o heredadas por vía materna, destacan las grandes deleciones. Dado que hay varias copias de mtDNA por mitocondria y varios de estos orgánulos por célula, el alcance de las consecuencias depende del porcentaje de mtDNA mutado. En las neuronas de la sustancia negra de individuos ancianos los niveles de deleciones en el mtDNA se encuentran aumentados y en pacientes con Parkinson también se han visto más elevados que en individuos sanos de la misma edad, lo cual podría justificar que el envejecimiento sea el mayor factor de riesgo en la EP de aparición tardía.

#### Sistema de fosforilación oxidativa y Parkinson

El sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) se compone de la ATP sintasa (complejo V) y la ETC, que incluye a los complejos respiratorios I, III y IV, el citocromo c y el coenzima Q. Siete polipéptidos del CI, uno del CIII, tres del CIV y dos del CV están codificados por el mtDNA, además de 2 rRNAs y 22 tRNAs necesarios para la expresión de dichos polipéptidos. El paso de los electrones procedentes de nutrientes a través de los complejos de la ETC genera un gradiente electroquímico a través de la membrana mitocondrial interna, el cual se emplea para diversos fines como la producción de ATP y ROS. Ciertas anomalías metabólicas descritas en pacientes con EP como bajos niveles de fosfatos ricos en energía (ATP y fosfocreatina) o elevados niveles de lactato, son coherentes con una disfunción sistémica de OXPHOS. La

disminución de la actividad de CI y CIV y la reducción de los niveles de ATP sintasa observadas en varios tejidos de pacientes con Parkinson, respaldan la implicación del sistema OXPHOS en el desarrollo de la enfermedad [1].

### Genes nucleares implicados en Parkinson

El Parkinsonismo familiar está asociado a mutaciones en varios genes nucleares, cuyos productos interactúan con el sistema OXPHOS provocando disfunción mitocondrial. Algunos de estos productos génicos son:  $\alpha$ -sinucleína, DJ-1, HtrA2, PINK1, Parkina y LRRK2. Aunque se trata de un reducido grupo de genes, están dotados de gran importancia ya que el descubrimiento de su implicación en EP fue clave para dilucidar las rutas afectadas en la enfermedad.

- $\alpha$ -sinucleína es una proteína neuronal soluble muy abundante, cuya función y estructura exacta son motivo de controversia. El incorrecto plegamiento y la formación de agregados insolubles de este polipéptido dan lugar a un grupo de enfermedades neurodegenerativas denominadas sinucleinopatías, incluyendo la EP [9]. Ciertas mutaciones en  $\alpha$ -sinucleína que provocan daño en el mtDNA neuronal, reducen la actividad de los complejos respiratorios y provocan degeneración mitocondrial, se han asociado con EP [1].

- DJ-1 o PARK7 es un homodímero que pertenece a la familia de peptidasas C56. Es una proteína citoplasmática pero también puede ser translocada a la mitocondria, donde actúa como antioxidante. Esta función parece ser particularmente importante en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra, las cuales están expuestas a niveles muy elevados de estrés oxidativo. Estudios recientes sugieren un papel relevante de la proteína DJ-1 en la EP de aparición tardía [10].

- La serin-proteasa HtrA2 (High temperature requirement factor A2) se encuentra en la mitocondria y se asocia con varias enfermedades neurodegenerativas, incluyendo el Parkinson. Entre sus funciones destacan el mantenimiento de la homeostasis mitocondrial y la regulación de la apoptosis celular, participando en la estabilidad conformacional del mtDNA y en la protección frente a ROS [11].

- Mutaciones en los genes de PINK1 (PARK6) y Parkina (PARK2) desencadenan la forma familiar de EP. Sus productos génicos, serin/treonin quinasa y E3-ubiquitin ligasa respectivamente, son proteínas neuroprotectoras que actúan en conjunto en una ruta de control de calidad mitocondrial [12]. La Ser/Thr quinasa codificada por PINK1

posee un dominio N-terminal de localización mitocondrial y tres bucles de inserción dentro del dominio catalítico. En condiciones basales, PINK1 es translocada a la mitocondria donde sufre procesamiento y degradación, manteniendo niveles bajos de PINK1 en células sanas. Sin embargo, el tratamiento con desacoplantes mitocondriales que inducen la despolarización mitocondrial, estabiliza los niveles de PINK1 gracias a la inhibición del importe a la mitocondria y de su escisión. De esta manera, se acumula PINK1 en la membrana mitocondrial externa donde su dominio quinasa queda expuesto hacia el exterior, se produce un aumento de su actividad catalítica e indirectamente, estimula el reclutamiento de Parkina en las mitocondrias dañadas [13].

- Por su parte, Parkina está implicada en la biogénesis y función mitocondrial, además de proteger la integridad del mtDNA frente al estrés oxidativo. Mutaciones autosómicas recesivas, en homocigosis o heterocigosis compuesta, en el gen de Parkina (*PARK2*) son la causa genética más comúnmente identificada en el Parkinsonismo familiar, provocado por la acumulación de mtDNA dañado en la sustancia negra [14]. Se han descrito varias mutaciones puntuales en *PARK2* en pacientes con EP. Algunas de ellas alteran la secuencia codificante de la proteína, consistente en 12 exones (Figura 2, parte superior), mientras que otras son mutaciones sin sentido provocadas por la sustitución de un aminoácido por otro (Figura 2, parte inferior).

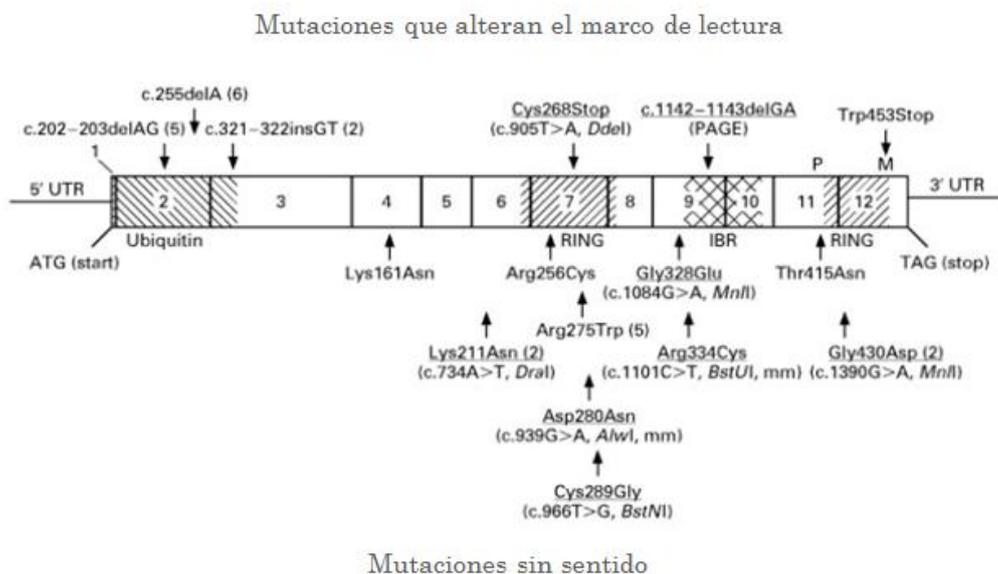


Figura 2. Mutaciones puntuales en el gen de Parkina descritas en pacientes con Parkinson [14]. En la parte superior se muestran 6 mutaciones puntuales que interrumpen la secuencia codificante compuesta de 12 exones y en la inferior, 10 mutaciones sin sentido consistentes en la sustitución de un aminoácido por otro. Las mutaciones encontradas en más de un paciente van acompañadas del número de individuos entre paréntesis.

- Las mutaciones en *LRRK2* (Leucine-Rich Repeat Kinase 2) son la causa genética más frecuente identificada hasta la fecha de la enfermedad de Parkinson de aparición tardía. El gen *LRRK2* consta de 51 exones que codifican una gran proteína de 2527 aa denominada dardarina, la cual consta de varios dominios ricos en leucina (LRRs), un dominio GTPasa tipo Ras (ROC) junto con su extremo C terminal (COR), un dominio quinasa y un motivo WD40. Se han descrito alrededor de 100 mutaciones en *LRRK2* pero sólo algunas de ellas se han asociado con patogenicidad (p.N1437H, p.R1441C/G/H, p.Y1699C, p.S1761R, p.G2019S y p.I2020T), estando todas agrupadas en los tres dominios que forman el núcleo enzimático de dardarina (Figura 3).

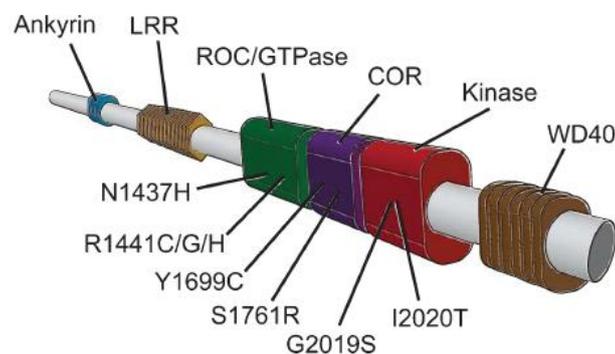


Figura 3. Representación esquemática de la proteína dardarina codificada por el gen *LRRK2* [15]. Se muestran los dominios funcionales de la proteína (LRR, ROC/GTPasa, COR, quinasa y WD40) y las mutaciones patógenas que provocan Parkinson (p.N1437H, p.R1441C/G/H, p.Y1699C, p.S1761R, p.G2019S y p.I2020T).

El fenotipo asociado a la EP provocada por mutaciones en *LRRK2* es muy parecido al de EP de aparición tardía, aunque la enfermedad se cataloga como ligeramente más benigna en el primer caso, ya que los portadores presentan menor riesgo de deterioro cognitivo y rasgos psiquiátricos. La penetrancia de las mutaciones de *LRRK2* depende claramente de la edad, aumentando desde el 17% a los 50 años hasta el 85% a la edad de 70 años [15]. Las mutaciones descritas en *LRRK2* presentan distinta distribución geográfica, existiendo una variación prácticamente exclusiva del País Vasco, p.R1441G, responsable del 2,5% de EP aparentemente esporádica y de hasta el 46% de EP familiar en dicha población del norte de España. El origen de R1441G apunta a un ancestro común hacia el siglo VII en la población vasca, a partir de donde se produjo una dispersión de corto alcance de la mutación limitada a las regiones cercanas dentro de España [16]. El nombre que recibe el producto del gen *LRRK2*, dardarina, proviene de

la palabra vasca “dardara” cuyo significado es temblor y hace alusión al fenotipo observado en pacientes de descendencia vasca con dicha mutación [17].

#### Mutaciones asociadas con riesgo de EP

La DNA polimerasa  $\gamma$ , POLG, es una proteína codificada en el núcleo e implicada en la síntesis, replicación y reparación del mtDNA. Ciertas mutaciones en POLG se asocian con enfermedades neurodegenerativas como oftalmoplegia externa progresiva (OEP) o síndrome de Alpers [18]. Además, se han encontrado varias familias con mutaciones en POLG que padecen Parkinsonismo, habitualmente junto con otras manifestaciones clínicas como OEP, como consecuencia de la disfunción mitocondrial generada [19]. Entre dichas variaciones se encuentra la sustitución de la tirosina altamente conservada de la posición 955 de la proteína por cisteína, Tyr955Cys, correspondiente a la mutación c.2864A>G en la secuencia codificante [20]. Por otra parte, la proteína POLG posee una secuencia rica en glutaminas (Gln o Q) dentro de la cual, los tres últimos aminoácidos Gln codificados por los codones CAA-CAG-CAG son fijos, pudiendo variar el número de Gln codificadas por CAG que les precede (tracto poli-Q). El alelo más frecuente de este tracto poli-Q variable contiene 10 Q en la especie humana en condiciones fisiológicas, mientras que la variación en la longitud del tracto poli-Q se ha asociado con susceptibilidad a la enfermedad, especialmente tractos con menos de 10 Q [21].

#### Tóxicos medioambientales asociados a EP

Además de los factores genéticos, se han asociado varias sustancias tóxicas ambientales con EP, como los pesticidas MPTP, rotenona o paraquat. La exposición humana a ciertos xenobióticos, por ejemplo las organotinas, es inevitable debido a su extendido uso como estabilizadores de PVC y como biocidas marinos. Habitualmente, los xenobióticos se unen a las subunidades del sistema OXPHOS codificadas por los genes mitocondriales inhibiendo su función y contribuyen al Parkinsonismo.

Con todo lo anterior, se puede concluir que la etiología de la enfermedad de Parkinson es multifactorial, combinando factores genéticos, tanto nucleares como mitocondriales, junto con factores ambientales. La combinación de estos factores tiene efectos aditivos e incrementa el riesgo de EP. Actualmente se dispone de varios tratamientos para los síntomas, pero ninguno es eficaz sobre la progresión de la

enfermedad. La gravedad del fenotipo, la elevada prevalencia de la enfermedad, su impacto económico y la incapacidad para prevenirla, hacen que el establecimiento de sus causas sea crítico para el desarrollo de terapias eficaces.

### 3. Antecedentes y Objetivos

La disfunción mitocondrial es un factor determinante de susceptibilidad de las neuronas dopaminérgicas a la EP cada vez más consolidado, y es una característica de ambas formas de la enfermedad, esporádica y familiar, así como del Parkinsonismo inducido por toxinas [8]. Sin embargo, la etiología multifactorial y compleja de la enfermedad hace que sea complicado disponer de buenos modelos para su estudio.

El presente trabajo final de máster se enmarca dentro de un proyecto más extenso que pretende estudiar el efecto de la combinación de diversos factores genéticos y ambientales que afectan a la función OXPHOS en el desarrollo de EP. Dado que la principal característica histopatológica de la enfermedad es la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra [3], se proponen como objeto de estudio líneas celulares aneuploides derivadas de neuroblastoma (**SK-N-BE(2)-C** y **SH-SY5Y**) y células madre neurales humanas euploides (**hNSC**), por su potencial para diferenciarse a neuronas dopaminérgicas.

En términos generales, se persigue la caracterización de las tres líneas celulares humanas mencionadas a nivel genético y molecular, y la generación de líneas derivadas expresando mutaciones en Parkina y POLG asociadas a Parkinson o descritas previamente en pacientes con la enfermedad. Posteriormente, a dichos modelos generados se les introducirán distintos haplotipos mitocondriales y se ensayará el efecto de varios xenobióticos, con el fin de estudiar la combinación de factores que provocan EP. Adicionalmente, se estudian los efectos del tratamiento de diferenciación a neuronas dopaminérgicas sobre proteínas implicadas en casos de EP familiar.

Objetivos concretos:

- I. Secuenciar los genes *LRRK2* y *POLG* en las tres líneas celulares mencionadas para detectar las posibles variaciones respecto a la secuencia consenso y completar así el

estudio de los principales genes nucleares implicados en casos de Parkinson familiar.

- II. Generar y caracterizar líneas derivadas de neuroblastoma y células madre neurales humanas con mutaciones severas en Parkina que se han asociado a EP de aparición temprana: p.Lys161Asn, localizada en la región proteica denominada RING0 [22] y p.Gly430Asp, localizada en la región denominada RING2 de la proteína, donde reside su actividad E3-Ubiquitin ligasa [23].
- III. Generar y caracterizar líneas derivadas de neuroblastoma y células madre neurales humanas con la mutación patológica p.Tyr955Cys en POLG [20] y con una variación en la longitud del tracto poli-Q de la proteína, asociada con susceptibilidad a la enfermedad.
- IV. Estudiar los efectos del tratamiento de diferenciación celular a neuronas dopaminérgicas en las proteínas PINK1 y HtrA2 relacionadas con la enfermedad de Parkinson.

## 4. Metodología

### 4.1. Líneas celulares

En el presente proyecto de final de máster, se emplearon las siguientes líneas celulares eucariotas por su capacidad para diferenciarse a neuronas dopaminérgicas:

- 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.

Adicionalmente, se empleó la línea celular 293T (célula humana embrionica de riñón) para producir partículas lentivirales.

## 4.2. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos empleados en las reacciones de amplificación fueron diseñados específicamente para los genes diana. En la Tabla 1 se muestran los cebadores empleados en la secuenciación del gen *POLG*, mientras que la Tabla 2 muestra los cebadores con los que se secuenció el gen *LRRK2* en su totalidad. Por otra parte, en la Tabla 3 se detallan los cebadores con los que se caracterizaron las líneas transfectadas con variantes de *POLG* y *PARK2*, para evaluar la incorporación de estos genes al DNA nuclear. Por último, la tabla 4 recoge los cebadores empleados en la reacción de PCR a tiempo real para cuantificar la expresión de la proteína *POLG* endógena y total, respectivamente.

Tabla 1. Oligonucleótidos para secuenciar el gen *POLG* en 6 fragmentos.

Oligo	Secuencia 5'→3'	% GC	Tm (°C)	Fragmento (pb)
POLG-001 1F	TGGAGCCCAAAGCCAGGTG	63,2	60,7	826
POLG-001 1R	GAGGTCAGCCGGCGACAGC	73,7	63,8	
POLG1.int1	ACTTGCCCCACATTGGCGG	63,2	61,5	1225
POLGSmaIR	AGTAGTGCAGAGGGAAGCCATCCCAG	57,7	63,7	
POLG-001 2bF	GAGGAGCTCCAGCGGGAGA	68,4	61,4	487
POLGSmaIR	AGTAGTGCAGAGGGAAGCCATCCCAG	57,7	63,7	
POLGSmaIF	TCCTGGACACCCTGGATGGTACCGG	64	65,7	760
POLG-001 R(1)	CTGACCTGGGCAGCCACAC	68,4	61,4	
POLG2.int1	AGTGGGCCCCGTGCTCTGG	73,7	65,4	1400
POLG-001 R(2)	GCCTGAGTTTGGGAGCCTG	63,2	58,7	
POLG-001 5F	ACCAGCCGTGTGAATTGGGT	55	62	511
POLG-001 R(2)	GCCTGAGTTTGGGAGCCTG	63,2	58,7	

Tabla 2. Oligonucleótidos para secuenciar el gen *LRRK2* completo en 15 fragmentos.

Oligo	Secuencia 5'→3'	% GC	Tm (°C)	Fragmento (pb)
LRRK2-004 1F	TGAGCAGCGGACGTTTCATG	57,9	58,1	309
LRRK2-004 2bR	ACAGAAGTGACCAACCCACC	55	57,3	
LRRK2-004 1F	TGAGCAGCGGACGTTTCATG	57,9	58,1	735
LRRK2-004 1R	AATGCAGCACATGAAGCAC	47,4	54,2	
LRRK2-004 2F	GAGAGAGTCTCAGAGGAGC	57,9	53,5	813
LRRK2-004 2R	CAGCCACTTCAGGAGAATG	52,6	53,1	
LRRK2-004 3F	GATGGCCATTTCCCAGCTC	57,9	56,4	736
LRRK2-004 3R	GGTATAAGCTGGAAACCAG	47,4	50,2	
LRRK2-004 4F	TCCCTGGAAGGTGCTATGG	57,9	56,5	718
LRRK2-004 4R	GACCAAGCCAAGAAGGTTC	52,6	53,5	
LRRK2-004 5F	AGGTGACAGCCAGATCATC	52,6	54,2	720
LRRK2-004 5R	TTCTGGTGAAGCTCCAGCT	52,6	56,3	
LRRK2-004 6F	CAGATGATTCACCTCAGGTC	47,4	49,8	741
LRRK2-004 6R	CTAAAGACCGCAAGTGTGG	52,6	53,6	
LRRK2-004 7F	CTTGCCTAAAGTGGAGAG	47,4	49,5	743
LRRK2-004 7R	ACGACCTGCAAATCCCAC	52,6	55,8	
LRRK2-004 8F	GTGGGAAATACTGGGAGTG	52,6	52,6	703
LRRK2-004 8R	GAAGTGCCTGAGGAAGCTC	57,9	56	
LRRK2-004 9F	ACAGCTGATTCCAGACTGC	52,6	55	702
LRRK2-004 9R	ACTTCAGATCCTACCAGAC	47,4	50,5	
LRRK2-004 10F	GCTTCCCCATTGTGAGAAC	52,6	53,7	716
LRRK2-004 10R	CTTGTCTTAACAGCCTGAG	47,4	50,3	
LRRK2-004 11F	TTTTGGCTGACCTGCCTAG	52,6	55	738

LRRK2-004 11R	TAGGCCATGGGGCACAACC	63,2	60,5	
LRRK2-004 12F	CACCTGAAGTTGCCAGAGG	57,9	55,8	696
LRRK2-004 12R	ACTTGCCATCAGCGGTTC	57,9	58,3	
LRRK2-004 13F	TGGTACTCTCCTGGTCATC	52,6	53	717
LRRK2-004 13R	GTCATCATGACTCTGACCG	52,6	52,5	
LRRK2-004 14F	GGACTAATAGACTGCGTGC	52,6	52,8	523
LRRK2-004 14R	TGAGTACCCTTTCCATGTG	47,4	51,6	

Tabla 3. Oligonucleótidos para secuenciar las variaciones de los genes *POLG* y *PARK2*.

Oligo	Secuencia 5'→3'	% GC	Tm (°C)	Fragmento (pb)
POLG2F	ATGAGCCGCCTGCTCTGGAGG	66,7	64,1	732
POLG-001 1R	GAGGTCAGCCGGCGACAGC	73,7	63,8	
POLG2.int	AGTGGGCCCCGTGCTCTGG	73,7	65,4	1362
POLG-001 R (1)	CTGACCTGGGCAGCCACAC	68,4	61,4	
PARK2 F	ATGATAGTGTGTTGTCA	31,3	59,4	1398
PARK2 R	GGATCCCTACACGTCGAACCAG	59,1	59,2	

Tabla 4. Oligonucleótidos empleados en la reacción de PCR a tiempo real para cuantificar la expresión de *POLG* endógena y total, respectivamente.

Oligo	Secuencia 5'→3'	% GC	Tm (°C)	Posición
POLG endo F	ACCGTGAGGACCGAGGAT	61	60	161-178
POLG endo R	CCTGTCAGTGAAATGGGTTTG	48	60	202-222
POLG total F	ACGCCCATAAACGTATCAGC	50	59	2742-2761

POLG total R	CATAGTCGGGGTGCCTGA	61	60	2811-2828
$\beta$ -actina F	CCAACCGCGAGAAGATGA			
$\beta$ -actina R	CCAGAGGCGTACAGGGATAG			

### 4.3. Anticuerpos

Para la inmunodetección de proteínas se emplearon los anticuerpos primarios descritos en la Tabla 5.

Tabla 5. Anticuerpos primarios para inmunodetección de proteínas.

	PM proteína (kDa)	Dilución	Origen
Anti-PolG	149	1:500	conejo
Anti-Parkina	51,6	1:1.000	conejo
Anti-Pink1	63	1:500	ratón
Anti-HtrA2	49	1:1.000	conejo
Anti-Actina	42	Varias	conejo
Anti-Lámina $\beta$	68	1:10.000	conejo

### 4.4. Cultivos celulares eucariotas

El trabajo con cultivos celulares se llevó a cabo en campanas de flujo laminar. Todo el material se esterilizó con etanol al 70 % y bajo luz UV. Los conductos empleados para succionar los medios de cultivo mediante bomba de vacío, se lavaron con lejía al 20% tras cada uso y al finalizar la sesión de trabajo. Cuando se manipularon lentivirus se hizo una limpieza adicional con lejía al 50%. Todos los medios usados para lavar, tripsinizar, centrifugar y cultivar las células se precalentaron a 37°C en un baño de agua. Todo el material en contacto directo con cultivos celulares fue depositado en los contenedores adecuados y procesado por empresas especializadas.

#### 4.4.1. Medios de cultivo

Para crecer las líneas de neuroblastoma, SH-SY5Y y SK-N-BE(2)-C, se empleó DMEM (GIBCO™) rico en glucosa 4,5 g/l, con piruvato de sodio 1 mM y L-glutamina

584 mg/l, suplementado con suero fetal bovino (SFB, Invitrogen) al 10%, el cual aporta proteínas y factores de crecimiento.

La línea hNSC se creció en medio KnockOut DMEM/F-12, complementado con suplemento neural StemPro, EGF 10 ng/ml, bFGF 10 ng/ml y L-Glutamina 2 mM. Para sembrar esta línea celular las placas de cultivo fueron tratadas con CELLstart, un sustrato definido que sólo contiene componentes de origen humano (xeno-libre) y permite una correcta adhesión y expansión de las células. El CELLstart se disolvió en D-PBS con calcio y magnesio a una proporción de 50 µl por cada 5 ml de D-PBS, se añadió a la placa y se incubó 1 hora a 37 °C. Se utilizaron 5 ml por placa de 100 mm. Una vez finalizada la incubación, se retiró toda la solución CELLstart y se procedió a su utilización.

No se añadieron antibióticos para reproducir lo más fielmente posible las condiciones fisiológicas.

#### **4.4.2. Siembra y mantenimiento celular**

Las células se sembraron en placas de Petri aptas para cultivo celular a una densidad entre 10.000-100.000 células/ml de medio de cultivo, a las que se añadió 0,2 ml de medio de cultivo/cm<sup>2</sup> de superficie de la placa. Los cultivos se mantuvieron durante su crecimiento en un incubador a 37°C, en atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub>, renovando el medio periódicamente cada 2-3 días. Cuando los cultivos celulares se sometieron a la acción de ciertos compuestos químicos, como inhibidores de la cadena de transporte electrónico o antioxidantes, el medio se renovó cada 24 h. Cuando las células alcanzaron la confluencia en la placa de cultivo, se procedió a la resiembra mediante tripsinización ya que las líneas celulares empleadas son adherentes y crecen en monocapa. Para ello, se retiró el medio de cultivo por succión, se lavaron las células con PBS (GIBCO™) para eliminar las proteínas del suero que inhiben la acción de la tripsina y por último, se añadieron 0,033 ml/cm<sup>2</sup> de una mezcla al 0,05% de tripsina (SIGMA) y 0,02% de EDTA en PBS (esterilizada mediante filtros de 0,22 µm de tamaño de poro Stericup™ de Millipore), incubando durante 2-3 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo, se comprobó que las células se hubieran despegado y se recogieron en PBS al 10% SFB, pasándolas a un tubo Falcon de 15 ml para su posterior centrifugación (1500 rpm, 5 minutos). El pellet celular se resuspendió en el volumen adecuado de medio de cultivo para su división, contaje o congelación inmediata.

#### **4.4.3. Congelación y descongelación celular**

Las células a congelar se dejaron crecer hasta alcanzar un 70-80% de confluencia en placas de 100 mm, se tripsinizaron y se recogieron por centrifugación. El pellet celular obtenido, se resuspendió en 500  $\mu$ l de medio de congelación (DMEM con 10% de SFB y 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO, SIGMA) como agente crioprotector) pasándolo a un tubo criogénico resistente a N<sub>2</sub> líquido. Los criotubos se almacenaron en una caja de congelación con isopropanol a -80°C durante al menos un día, para favorecer una congelación paulatina y uniforme (descenso de aproximadamente 1°C/min). Tras 24 h, se pasaron a un contenedor de N<sub>2</sub> líquido donde pueden mantenerse durante largos períodos de tiempo, incluso años, sin sufrir deterioro.

La descongelación de los criotubos almacenados se realizó diluyendo la suspensión y eliminando el agente preservante (DMSO) con la mayor rapidez posible. Para ello, se tomó el vial indicado del tanque de N<sub>2</sub> líquido y se descongeló en un baño a 37°C, tras lo cual se añadió la suspensión celular resultante a un tubo Falcon con 5 ml de solución de PBS al 10% de SFB y se centrifugó 2 minutos a 1500 rpm para eliminar el DMSO. Se descartó el sobrenadante y el precipitado celular obtenido se resuspendió en medio de cultivo y se sembró en una placa de cultivo. Una vez que las células se adhirieron a la placa, se cambió el medio de cultivo para eliminar posibles trazas de DMSO que perjudicarían el crecimiento celular.

#### **4.5. Diferenciación a neuronas dopaminérgicas**

Para diferenciar las células SH-SY5Y y SK-N-BE(2)-C de neuroblastoma a neuronas dopaminérgicas se siguió el protocolo de Presgraves [24]. Las células se dejaron crecer hasta aproximadamente un 80 % de confluencia. Se añadió entonces al medio de cultivo all-trans ácido retinoico (RA) a una concentración de 10  $\mu$ M durante cinco días, reemplazando el medio cada dos días. Al finalizar los cinco días, el RA fue sustituido del medio por 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato (TPA) a una concentración 120 nM durante tres días. Pasados los tres días, las células fueron recogidas en PBS y, tras un lavado en el mismo medio, se centrifugaron, se descartó el sobrenadante y se guardó el pellet a -80°C hasta su utilización.

Las células madre neurales humanas (hNSC) se diferenciaron con un protocolo establecido según Swistowski [25]. Las células se dejaron crecer hasta obtener

aproximadamente un 80 % de confluencia, tras lo cual se reemplazó el medio con los factores FGFb y EGF por medio de diferenciación que contenía los siguientes factores: BDNF (20 ng/mL), GDNF (20 ng/mL), TGF- $\beta$  (1  $\mu$ M), cAMP (1 mM) y ácido L-ascórbico (200  $\mu$ M). La diferenciación se llevó a cabo durante 25-30 días. Transcurrido este tiempo, las células fueron recogidas en PBS y, tras un lavado en el mismo medio, se centrifugaron, se descartó el sobrenadante y se guardó el pellet a -80°C hasta su utilización.

Para evaluar la eficacia del proceso de diferenciación, se observó la morfología celular al microscopio y además, se determinaron por inmunodetección algunas proteínas que se expresan en mayor cantidad en las neuronas dopaminérgicas que en las células de neuroblastoma.

#### **4.6. Transfección celular con vectores lentivirales**

La generación de distintas líneas celulares que expresan una determinada proteína de manera estable o transitoria se llevó a cabo mediante transfección celular con vectores lentivirales. Estos vectores son herramientas derivadas de lentivirus, cuyo potencial para transferir genes fue revelado por primera vez en 1996, gracias a la demostración de que se podían transducir neuronas *in vivo* [26]. Son vectores virales deficientes en replicación dada la separación de las secuencias víricas que actúan en *cis* de las secuencias *trans*.

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

- *Día 1:*

El día anterior a la infección se sembraron las células empaquetadoras, 293T, en placa de 6 pocillos a una densidad adecuada para alcanzar entre el 60 y el 80% de confluencia. Para incrementar la eficiencia de la infección, 1-2 horas antes se cambió el medio de cultivo y se añadió cloroquina a una concentración 25  $\mu$ M. La línea celular 293T se transfecta transitoriamente con tres plásmidos distintos que codifican respectivamente el sistema de empaquetamiento del virión, la envuelta y el gen de interés. La transfección química de la línea celular 293T se realizó utilizando el sistema XtremeGENE<sup>®</sup>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 transporta

al interior de las células animales. Se emplearon 0,6 µg del plásmido que porta información para la generación de la envuelta (pMD2G), 1,2 µg del que codifica la cápside y la polimerasa del virus (psPAX2) y 1,8 µg del tercero (pWPXLD-Ires<sup>Neo</sup>), que contiene clonado el gen que deseamos expresar. (10,8 µl de XtremeGENE<sup>®</sup> para 3,6 µg de DNA total).

- *Día 2:* Se cambió el medio de cultivo de las células 293T por medio fresco para eliminar la cloroquina. Por otra parte, se sembraron las células diana que iban a ser infectadas con los virus producidos por las células empaquetadoras 293T. Para ello, se sembraron en placas de 100 mm de diámetro o de 6 pocillos (en función del experimento) a una densidad adecuada para alcanzar una confluencia del 70% el día de la infección.

- *Día 3:* Transcurridas 48 horas de la transfección de la línea 293T con los plásmidos, se recogieron los lentivirus empaquetados que se encontraban en el medio de cultivo. Se centrifugaron a 1500–2000 rpm durante 5 minutos y se filtraron a través de un filtro de 0,45 µm de tamaño de poro para descartar restos celulares.

La cantidad de virus que se añadió al medio de cultivo de las células diana se optimizó (1,5 µL/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. Se añadió además polibreno a una concentración final de 8 µg/ml, para aumentar la eficiencia de la infección.

- *Día 4:* Se sustituyó el medio de las células diana infectadas para eliminar el polibreno que puede resultar tóxico en periodos largos de exposición, por medio de selección con G418, un análogo de la geneticina (la dosis de selección varía en función de la línea celular utilizada). El medio con G418 permite seleccionar únicamente las células que han incorporado nuestro gen de interés. Tras varios días en cultivo en presencia de este medio, se homogenizaron y resembraron los clones resistentes. La dosis de G418 se redujo entonces a una dosis de mantenimiento, generalmente la mitad de la empleada en la selección.

#### **4.7. Contaje celular**

Para determinar la densidad celular (nº de células/ml de medio de cultivo) se utilizó una cámara de Neubauer adaptada a un microscopio óptico. Se tomó una alícuota de la suspensión celular y se diluyó a la mitad con una solución de colorante 0,4% Azul

Tripán en NaCl 0,15 M. Dicha sustancia coloreada es de gran peso molecular y sólo es capaz de penetrar en la célula si la membrana plasmática se encuentra dañada, permitiendo así distinguir entre células vivas y muertas.

Para el recuento celular, se colocó un cubreobjetos de cristal sobre la cámara de Neubauer y se depositó una gota de las células teñidas, que entraron por capilaridad en el espacio que queda entre el cubreobjetos y la cámara. Finalmente, se contaron las células vivas (transparentes, sin colorante) presentes en los cuatro cuadrantes y se calculó la densidad de la suspensión celular inicial utilizando la siguiente fórmula, que incluye el factor de dilución:

$$\text{cel/ml} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de cel contadas} \times 10.000 \times 2}{\text{n}^{\circ} \text{ de cuadrantes contados}}$$

#### **4.8. Cuantificación espectrofotométrica de material genético**

Para determinar la concentración y pureza de DNA o RNA en distintas preparaciones, se empleó un espectrofotómetro NanoVue™, que mide la absorbancia de la muestra a distintas longitudes de onda. Para realizar la medida, se depositaron 2 µl de la muestra en la placa del aparato y se obtuvieron directamente la concentración en ng/µl y los distintos valores de absorbancia. La relación de absorbancias a 260 nm y 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) da idea del grado de pureza de la muestra, considerándose aceptable  $A_{260}/A_{280} \approx 1,8$  para DNA y próximo a 2 para RNA.

#### **4.9. Extracción de RNA total**

Al manipular RNA se extremaron las precauciones y las condiciones de esterilidad para evitar la posible contaminación con RNAsas y degradación del RNA. Para extraer el RNA total se empleó el método de extracción con TRIzol® Reagent (Invitrogen).

Las células se lisaron mediante la adición de 1 ml de TRIzol® por cada 5-10 x 10<sup>6</sup> células, resuspendiendo varias veces a fin de maximizar la ruptura y disgregación celular. El homogeneizado se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente (15-30°C) para permitir la disociación completa de los complejos formados entre proteínas y ácidos nucleicos. Posteriormente, se añadió un volumen de 0,2 ml de cloroformo por mililitro de TRIzol® añadido, para iniciar la separación de fases. Se agitó vigorosamente durante 15 segundos, se dejó estabilizar a temperatura ambiente durante

2-3 minutos y se centrifugó a 12.000xg durante 15 minutos a 4°C. Se observó la aparición de distintas fases: la fase orgánica inferior de color rosa compuesta de fenol-cloroformo, una interfase blanca, y la fase acuosa incolora superior. El RNA se encontraba exclusivamente en la fase acuosa, cuyo volumen era aproximadamente el 60% del volumen de TRIzol empleado para homogenizar. La fase acuosa se transfirió a otro eppendorf para proceder a la precipitación del RNA, añadiendo 0,5 ml de alcohol isopropílico por cada ml de TRIzol, incubando a temperatura ambiente durante 10 minutos y centrifugando a 12.000 x g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se retiró con cuidado para evitar arrastrar el RNA precipitado depositado en el fondo del tubo. Este precipitado se lavó con un mililitro de etanol al 75% en agua DEPC (dietilpirocarbonato, compuesto capaz de eliminar la actividad de las RNAsas) por cada ml de TRIzol, agitándolo suavemente con ayuda de un agitador vórtex y centrifugando a 7.500 x g durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se eliminó con ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio estéril y se dejó secar el pellet al aire a temperatura ambiente protegido. Finalmente, el precipitado de RNA se redisolvió en 60-100 µl de agua DEPC y se incubó a 60°C durante 10 minutos en el Thermomixer para garantizar su correcta redisolución. Las muestras se cuantificaron empleando el espectrofotómetro Nanovue™ y se almacenaron a -80°C.

#### 4.10. Retrotranscripción (RT-PCR)

A partir del RNA total aislado de suspensiones celulares, se sintetizó el DNA complementario (cDNA) mediante la reacción de transcripción inversa o retrotranscripción, empleando un kit de Roche.

En primer lugar, se realizó una desnaturalización inicial durante 10 minutos a 65°C en un termociclador, para asegurar la desnaturalización de las estructuras secundarias del RNA (Tabla 6.1.)

Tabla 6.1. Reacción de desnaturalización inicial del RNA. \*Para las células SH-SY5Y y SK-N-BE(2)-C se partió de 1 µg de RNA. En el caso de las células NSC, fue necesario partir de la máxima cantidad posible de RNA para obtener una cantidad de cDNA suficiente para los ensayos posteriores.

Reactivo	Cantidad
RNA	10 ng - 5 µg*
Oligo dT18	1 µl
H <sub>2</sub> O	Hasta 13µl

Al producto de reacción anterior se añadieron a continuación los reactivos indicados en la Tabla 6.2., hasta completar un volumen de 20  $\mu$ l. El programa empleado consistía en incubar a 50°C durante 1 hora y finalmente, a 85°C durante 5 minutos para inactivar la transcriptasa reversa.

Tabla 6.2. Reacción de síntesis de cDNA.

Reactivo	Concentración inicial	Volumen ( $\mu$ l)	Concentración final
Tampón	5x	4	1x
Inhibidor de RNAsas		0.5	
dNTPs	10 mM	2	1 mM
Enzima Transcriptasa Reversa		0.5	
Volumen total		<b>20</b>	

#### 4.11. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Con el fin de obtener muchas copias de un determinado fragmento de DNA, se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa en un termociclador; utilizando como molde el cDNA retrotranscrito a partir de RNA. La mezcla de PCR, de 25  $\mu$ l de volumen final, contenía los componentes que se recogen en la Tabla 7.

Tabla 7. Reactivos para la reacción de PCR. \*Se añadió DMSO a las reacciones en las que el fragmento a amplificar contenía un elevado porcentaje de G y C.

Reactivo	Concentración inicial	Volumen ( $\mu$ l)	Concentración final
Tampón de reacción	5 x	5	1 x
Mix dNTPs	10 mM	0,5	0.2 mM (cada uno)
Cebador Directo	10 $\mu$ M	1,25	0.5 $\mu$ M
Cebador Reverso	10 $\mu$ M	1,25	0.5 $\mu$ M
DMSO (opcional)*	-	0,75	3%
DNA Polimerasa Phusion Hot Start II	2 U/ $\mu$ l	0,25	0,02U/ $\mu$ l
cDNA molde	-	2	8 %
Agua	-	<b>hasta 25</b>	-

El programa de PCR utilizado para amplificar fragmentos de DNA se recoge en la Tabla 8:

Tabla 8. Programa de PCR convencional.

Etapa	Tiempo	Temperatura
1. Desnaturalización inicial	30 s	98°C
2. Desnaturalización	10 s	98°C
3. Hibridación	20 s	$T_m + 3^\circ\text{C}$
4. Extensión	30 s/Kb	72°C
5. Final de la reacción	5 min	72°C
	mantener	4°C



35 ciclos

La temperatura de fusión ( $T_m$ ) de cada cebador se determinó empleando la siguiente fórmula aproximada:  $T_m = 2(A + T) + 4(G + C)$ . Para cada reacción de PCR, la temperatura de hibridación se determinó sumando  $3^\circ\text{C}$  al cebador con menor  $T_m$ . El tiempo de extensión depende del tamaño del fragmento de DNA a amplificar. Como norma general, para la enzima Phusion Hot Start II, se estimaron 30 segundos por cada mil pares de bases.

#### 4.12. Electroforesis horizontal en geles de agarosa

Se prepararon geles de agarosa del 1% (p/v) para separar distintos fragmentos de DNA según su tamaño. Para ello, se disolvieron 0,4 g de agarosa en 40 ml de tampón de electroforesis TAE (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM) a unos  $60\text{--}70^\circ\text{C}$ . Posteriormente, se dejó enfriar brevemente la disolución antes de añadir bromuro de etidio (a una concentración final de  $0,5\ \mu\text{g/ml}$ ) y se vertió sobre el molde del gel, con el peine para delimitar los pocillos. Finalmente, se dejó enfriar hasta su completa polimerización.

Las muestras de DNA se mezclaron con  $1/3$  del volumen de colorante (Ficoll 400 al 30% y azul de bromofenol al 0,1 % (p/v) en TAE) para proporcionar densidad, facilitar su carga en el gel y poder controlar el frente en el transcurso de la electroforesis. Como marcadores de pesos moleculares se utilizaron Low Mass Ladder (100-2.000 pb) y High Mass Ladder (1.000-10.000 pb), (Invitrogen). La electroforesis

se desarrolló en tampón TAE aplicando un voltaje constante de 80–100 V, durante aproximadamente media hora.

#### 4.13. Secuenciación automática del DNA

La secuenciación de los fragmentos de DNA amplificados se realizó en el Servicio de Secuenciación de DNA de la empresa Secugen S.L. Previo al envío de las muestras, la mezcla de reacción de PCR se sometió a un tratamiento de purificación con el kit “UltraClean PCR Clean-Up” (MOBIO), para eliminar posibles restos de cebadores, dNTPs... En algunos casos, fue necesario purificar una banda de DNA a partir de gel de agarosa al 1% una vez realizada la electroforesis. Para ello, se empleó el kit “Spin Clean Gel Extraction” (MOBIO), siguiendo el protocolo de centrifugación.

Una vez purificadas las muestras, en un mismo tubo de color morado se envió una mezcla de 15  $\mu$ l de DNA a la concentración idónea junto con 1,5  $\mu$ l del cebador específico para cada fragmento a una concentración de 5  $\mu$ M, ambos en agua bidestilada. La concentración de DNA requerida variaba en función del tamaño del fragmento de DNA a secuenciar (ver Tabla 9). Los resultados de la secuenciación se analizaron con el programa *CodonCodeAligner v.5.0.1*.

Tabla 9. Concentración de DNA necesaria para secuenciar un fragmento purificado del tamaño indicado.

Tamaño del DNA	Concentración (ng/ $\mu$ l)
Hasta 500 pb	10
De 500-1000 pb	20
De 1000-1500 pb	30
De 1500-2500 pb	40

#### 4.14. PCR cuantitativa (q-PCR)

La PCR cuantitativa o PCR en tiempo real, es una variante de la PCR convencional que permite cuantificar de manera absoluta el producto de amplificación. A la mezcla de reacción de la PCR convencional (molde de DNA, cebadores específicos, dNTPs, tampón de reacción y DNA polimerasa termoestable), se incorpora una sustancia marcada con un fluoróforo que permite detectar la generación de

productos específicos. Se trata de un método con gran sensibilidad que, tras cada ciclo de amplificación, mide el incremento de fluorescencia producido conforme se va sintetizando DNA. Se representa intensidad de fluorescencia frente a número de ciclo de la PCR, siendo de interés el ciclo (Ct) al cual la fluorescencia emitida atraviesa el nivel umbral. Además, se obtiene la temperatura de fusión (T<sub>m</sub>) del producto de reacción, que da idea del grado de especificidad de la amplificación.

Para distintos genes, se emplearon sustancias fluorescentes que diferían en cuanto a su especificidad. Por una parte, se empleó Sybr Green, un fluorocromo que se une inespecíficamente al DNA de doble cadena, para cuantificar la expresión del gen *POLG*. La primera vez que se emplearon los cebadores para *POLG*, se hizo una recta de calibrado con distintas diluciones de cDNA para comprobar su eficiencia. Una vez preparados los capilares con la mezcla de reacción, se centrifugaron a 2.000 rpm durante 2 minutos y se introdujeron en el carrusel del aparato LightCycler2.0. Las muestras se analizaron con el programa LightCycler Software 4.05 a una temperatura de cuantificación de 59°C.

Para el gen de Parkina, se utilizó una sonda fluorescente dependiente de secuencia. En este caso, no se empleó el par de cebadores convencionales directo y reverso; sino un oligonucleótido marcado con dos fluorocromos, que hibrida específicamente en la zona intermedia del amplicón. Esta técnica se basa en el fenómeno de transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) para monitorizar la síntesis de DNA. Es más cara, pero permite amplificar más de un producto en cada reacción empleando las correspondientes sondas. Las muestras se prepararon en placas de 96 pocillos y se trasladaron para su análisis, debidamente selladas, al servicio de Secuenciación y Genómica Funcional de la Universidad de Zaragoza y el Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud. En la misma reacción fue posible cuantificar la expresión de Parkina y Actina, ya que sus espectros de fluorescencia no mostraban superposición.

Se hicieron triplicados de todas las medidas y como control, se cuantificó la expresión de  $\beta$ -actina en las mismas muestras. Para evitar posibles contaminaciones, las muestras se prepararon en campana de flujo laminar. Al tratarse de compuestos fluorescentes, se mantuvieron en todo momento preservados de la luz.

Tabla 10. Volúmenes ( $\mu\text{l}$ ) de la reacción q-PCR con fluorocromo inespecífico y con sonda específica de secuencia.

	<b>Fluorocromo</b>	<b>Sonda específica</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	5,5	3
<b>Mezcla cebadores 5<math>\mu\text{M}</math></b>	0,5	-
<b>Mezcla SYBR Green</b>	2	-
<b>Mezcla 2x</b>	-	5
<b>Sonda Parkina</b>	-	0,5
<b>Sonda Actina</b>	-	0,5
<b>cDNA</b>	2	1
<b>V<sub>T</sub></b>	10	10

#### 4.15. Extracción de proteínas

La extracción de proteínas 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 con PBS frío y se procedió a la extracción, o se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

Para extraer las proteínas se empleó tampón RIPA a  $4^{\circ}\text{C}$  (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 50 mM, Tritón X-100 1%, deoxicolato de sodio 0,5 %, EDTA 5 mM) esterilizado en el autoclave, que contenía una mezcla de inhibidores de proteasas (pepstatina 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , leupeptina 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , aprotinina 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , PMSF 1 mM), añadida al tampón de extracción en el momento de su utilización. La mezcla de inhibidores, a excepción del PMSF, se preparó en etanol 100 veces concentrada y se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$ . El PMSF se preparó en isopropanol a una concentración de 200 mM y se conservó a  $4^{\circ}\text{C}$ . Las células se resuspendieron en 100  $\mu\text{l}$  de tampón RIPA, se incubaron 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  en una rueda giratoria y se centrifugaron a 13.000 rpm durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Finalmente, se recuperó el sobrenadante y se procedió a la medida de la concentración de proteínas en las muestras. Las proteínas se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.16. Cuantificación de proteínas

Para la determinación de proteínas se empleó el método de Bradford [27], que es un método colorimétrico muy sensible (1-15  $\mu\text{g}$ ), simple, rápido, económico y con pocas interferencias. Se basa en la unión del colorante Comassie Blue G-250 a las proteínas. A grandes rasgos, el colorante en solución ácida existe en dos formas: azul y naranja. Las proteínas se unen a la forma azul para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre.

En primer lugar, se construyó una recta de calibrado a partir de concentraciones conocidas de la proteína patrón seroalbúmina bovina (BSA), a partir de la cual se calculó la concentración de proteínas de las muestras problema. Para ello, se prepararon distintas diluciones de una solución 1 mg/ml de BSA (0, 1, 2, 3, 5, 10 y 15  $\mu\text{l}$ ) con 200  $\mu\text{l}$  del reactivo de Bradford (Bio-Rad Protein Assay) y  $\text{H}_2\text{O}$  hasta un volumen final de 1 ml. De la misma manera, se hicieron distintas diluciones de las muestras problema. Tanto los patrones como las muestras, se agitaron varias veces por inversión y se dejó desarrollar el color durante al menos 5 minutos. Finalmente, se procedió a la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm, en cubeta de plástico de 1 cm de longitud de paso.

Al representar los valores de Absorbancia (595 nm) frente a la concentración de proteína BSA (mg/ml), se obtuvo la recta patrón, que se ajusta a una ecuación del tipo  $y = ax + b$ ; donde  $a$  es la pendiente de la recta. Comparando esta ecuación con la Ley de Beer-Lambert,  $A = \epsilon \cdot c \cdot l$ , la pendiente  $a$  se corresponde con el coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) a 595 nm. La concentración de proteínas en la muestra es:

$$[\text{proteína}] = \frac{\text{Abs media}}{\epsilon} \times 1000 \text{ mg/ml}$$

#### 4.17. Western Blot: inmunodetección de proteínas

##### 4.17.1. Electroforesis desnaturizante de proteínas: SDS-PAGE

La separación proteica se llevó a cabo mediante electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). El sistema utilizado fue el Mini Protean III de Bio-Rad y las disoluciones necesarias para preparar los geles fueron las siguientes:

- Disolución stock de acrilamida-bisacrilamida: acrilamida-bisacrilamida 30:0,8% (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 50 mM pH 6,8, SDS 2% (p/v), azul de bromofenol 0,02% (p/v), β-mercaptoetanol 1% (v/v).

El porcentaje del gel separador depende del tamaño de la proteína de interés, siendo menor el porcentaje cuanto más grande es la proteína. El porcentaje del gel concentrador es siempre el 12%. Para preparar 5 ml de gel separador y 2 ml de gel concentrador, se mezclaron los compuestos que se recogen en la Tabla 11.

Tabla 11. Composición de las disoluciones necesarias para preparar los geles separador y concentrador para realizar una electroforesis de proteínas SDS-PAGE.

	Gel separador		Gel concentrador
	8 %	10 %	
Acrilamida:Bisacrilamida (30:0,8)	1,333 ml	1,700 ml	0,333 ml
Tampón 4x	1,250 ml	1,250 ml	0,5 ml
H <sub>2</sub> O destilada	2,420 ml	2 ml	1,167 ml
APS 20%	15 µl	15 µl	10 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl

En primer lugar, se preparó el gel separador y se vertió entre los cristales que forman el soporte, dejando unos 2 cm por encima para el gel concentrador. A continuación, se añadió una fina capa de isopropanol para favorecer la formación del frente y evitar la posible entrada de oxígeno, que dificultaría la polimerización. Una vez polimerizado el gel, se eliminó el isopropanol y se lavó la superficie con agua destilada. Tras retirar el exceso de agua con un papel secante, se vertió el gel concentrador hasta rebosar, se insertó el peine para delimitar los pocillos y se dejó polimerizar. Finalmente, se retiró el peine y se montaron los geles en vertical en la cubeta de electroforesis. Antes de cargar las muestras, se limpiaron los pocillos con tampón de electroforesis a presión con ayuda de una jeringa. La cubeta se llenó de tampón de electroforesis 1x y se procedió a cargar 40 µg de las muestras proteicas, mezcladas con 3 µl de tampón de carga 4x y agua hasta 12 µl. Como marcador de pesos moleculares se empleó Precision

Plus Protein Standards, de Bio-Rad. 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 duplicó la intensidad hasta que las muestras llegaron al final del gel.

#### **4.17.2. Transferencia de proteínas a membranas de PVDF**

La transferencia de las proteínas desde el gel de electroforesis a membranas de PVDF se realizó mediante electrotransferencia húmeda, utilizando el sistema 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, se activó con metanol durante 10 segundos y se lavó con agua destilada. Seguidamente, la membrana se equilibró en el tampón de transferencia frío (BSN: Tris 48 mM, glicina 39 mM, metanol 20% (v/v)) durante unos 10 minutos. Simultáneamente, el gel se sumergió en el mismo tampón durante el mismo tiempo.

El “sándwich” del aparato de transferencia se montó sumergido en tampón de transferencia según las indicaciones del fabricante. La transferencia se realizó a 4°C con agitación a 80 V durante 2 h, o a 30 V durante toda la noche. La eficiencia de la transferencia se comprobó mediante tinción reversible con Rojo Ponceau (SIGMA), que tiñe de manera inespecífica y permite observar todas las proteínas presentes en la membrana. Para eliminar la solución de colorante, se lavó la membrana con H<sub>2</sub>O destilada varias veces.

Posteriormente, se incubó la membrana con una disolución de leche desnatada en polvo al 5% en PBS-T (Tween20 al 0,1% en PBS), durante toda la noche a 4°C o al menos durante 1 hora a temperatura ambiente, para bloquear los posibles sitios de unión inespecíficos y evitar así falsos positivos en la detección proteica.

#### **4.17.3. Incubación con anticuerpos**

Para detectar las proteínas presentes en la membrana se empleó el sistema de inmunodetección indirecta, que emplea un anticuerpo primario para localizar la proteína de interés y un segundo anticuerpo que detecta al primario y que es capaz de producir una señal detectable.

Antes de realizar la primera incubación, se eliminó el exceso de agente bloqueante mediante 3 lavados de 5 min con PBS-T. Cabe destacar que todas las

incubaciones y lavados se realizaron con agitación suave, a temperatura ambiente o a 4°C.

La membrana se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo primario diluido a la proporción adecuada (ver Tabla X) en una disolución de PBS-T al 0,25% de leche desnatada en polvo. Pasado este tiempo, se retiró la solución y se realizaron tres lavados con PBS-T de 5 minutos cada uno. El anticuerpo secundario (anti IgG de conejo o de ratón) conjugado con peroxidasa de rábano, se diluyó a la proporción correspondiente en PBS-T al 0,25% de leche y se incubó la membrana con él durante 1 hora. Finalmente, se retiró esta disolución y se procedió a los tres últimos lavados con PBS-T.

#### **4.17.4. Detección quimioluminiscente**

La proteína de interés se detectó gracias a la luz emitida en la reacción catalizada por la enzima peroxidasa de rábano, conjugada con el anticuerpo secundario, al entrar en contacto con el luminol como sustrato quimioluminiscente (ECL de Amersham).

El reactivo ECL se preparó y se guardó preservándolo de la luz 5 minutos antes de su uso. La membrana se incubó durante un minuto con el sustrato quimioluminiscente y la luz emitida en dicha reacción quedó impresa en una película de autorradiografía. Para ello, se envolvió la membrana en un plástico transparente y se puso en contacto con la película de autorradiografía, haciendo exposiciones de distinta duración en el casete.

El revelado se realizó sumergiendo la película de autorradiografía durante aproximadamente 1 minuto en el líquido revelador de Kodak<sup>®</sup> (SIGMA). Posteriormente, se lavó la película en agua destilada y la señal obtenida se fijó durante 1 minuto sumergiendo dicha película en el líquido fijador de Kodak<sup>®</sup> (SIGMA).

## 5. Resultados

### 5.1. Secuenciación de genes nucleares

Varios de los genes nucleares implicados en casos de Parkinson familiar (*SNCA*, *PARK2*, *PINK1*, *DJ-1* y *HTRA2*) habían sido estudiados con anterioridad. En este trabajo se llevó a cabo la secuenciación completa de los genes *POLG* y *LRRK2* en las líneas derivadas de neuroblastoma SK-N-BE(2)-C y SH-SY5Y, y en la línea madre neural humana hNSC.

#### 5.1.1. Secuenciación del gen *POLG*

El gen *POLG*, también conocido como *POLG1* o *POLGA*, posee 13 transcritos y es miembro de 4 familias proteicas según la clasificación de la base de datos Ensembl, aunque sólo una de ellas posee función conocida, la DNA polimerasa gamma, denominada EC 2.7.7.7. El transcrito consenso POLG-001 se localiza en el cromosoma 15: 89,316,305-89,334,847 en la hebra reversa, pudiendo ser identificado como: ENST00000268124 (Ensembl), CCDS10350 (CCDS) o P54098 (Uniprot). El transcrito estudiado posee una longitud de 4500 pb distribuidas a lo largo de 23 exones, de los cuales 22 son codificantes y dan lugar a una proteína de 1239 residuos. La secuencia codificante estudiada consiste en 3720 nt.

La secuenciación del gen *POLG* se llevó a cabo en 6 fragmentos solapantes a partir de un único transcrito de cDNA. Tras alinear las secuencias obtenidas con el transcrito consenso POLG-001, en la línea SK-N-BE(2)-C se detectaron la mutación somática COSM1221464 en la posición c.313G>A y el polimorfismo de nucleótido único rs2307441 (SNP) en la posición c.3428A>G. En las otras dos líneas celulares, SH-SY5Y y hNSC, únicamente se detectó un SNP en la posición c.3708G>T de la secuencia codificante denominado rs3087374.

#### 5.1.2. Secuenciación del gen *LRRK2*

*LRRK2*, también denominado *DKFZp434H2111*, *FLJ45829*, *PARK8*, *RIPK7* o *ROCO2*, se trata de un gen complicado de abordar dada la existencia de un parálogo, *LRRK1*, y de 7 transcritos distintos en la especie humana recogidos en la base de datos “Ensembl”, de los cuales 4 codifican proteínas. El transcrito consenso LRRK2-004 se encuentra en la hebra directa del cromosoma 12 en la posición 12: 40,225,074-

40,369,281 y se identifica con las siguientes referencias: ENST00000298910 (Ensembl), NM\_198578 (GenBank), CCDS31774 (CCDS) y Q5S007 (Uniprot). Dicho transcrito posee una longitud de 9158 pb, con una secuencia codificante de 7584 nt repartidos en 51 exones que rinde una proteína de 2527 aa denominada dardarina y clasificada como EC 2.7.11.1.

La amplificación mediante PCR con la enzima Taq DNA Polimerasa no fue satisfactoria debido a la gran extensión de la secuencia codificante, siendo necesario recurrir a una enzima con fidelidad de copia superior, la Pfu DNA Polimerasa. De esta manera, se secuenció el gen en 15 fragmentos a partir de un único fragmento de cDNA. En la línea madre neural fue necesario optimizar las condiciones debido a la presencia de menor cantidad de mRNA respecto a las otras líneas celulares, siendo necesario partir del triple de cantidad de material genético para lograr amplificaciones detectables.

Una vez obtenida la secuencia completa de *LRRK2* en las tres líneas celulares, se alineó frente a la secuencia consenso de Ensembl y se anotaron las variaciones presentes a lo largo del gen, detalladas en la Tabla 12. En la línea SK-N-BE(2)-C se hallaron varios polimorfismos de un único nucleótido (SNPs) recogidos en la base de datos dbSNP, como las variaciones sin sentido rs2256408, rs199557665\*, rs201343106, rs3761863\* y rs150062967\*; los polimorfismos silenciosos rs10878245\*, rs1427263\* y rs10878371; además de una inserción de un nucleótido, rs113611544, que modifica el marco de lectura del gen. Los polimorfismos marcados con un asterisco (\*) colocalizan con mutaciones somáticas halladas en cánceres humanos, recogidas en el proyecto COSMIC. Por su parte, la línea SH-SY5Y poseía los polimorfismos silenciosos y la inserción descritos anteriormente, además de las variaciones sin sentido rs2256408, rs200965490, rs3761863\* y una variación somática exclusiva de esta línea localizada en c.3486. Por último, la línea hNSC compartía con las dos anteriores los polimorfismos rs2256408, rs10878245\*, rs10878371 y rs3761863\* y además poseía el polimorfismo rs35303786, exclusivo de esta línea.

El análisis exhaustivo del gen *LRRK2* en las tres líneas celulares (SK-N-BE(2)-C, SH-SY5Y y hNSC) no revelaba ninguna de las mutaciones patológicas asociadas a Parkinson de aparición tardía (p.N1437H, p.R1441C/G/H, p.Y1699C, p.S1761R, p.G2019S o p.I2020T).

Tabla 12. Variaciones encontradas en el gen *LRRK2* en las líneas celulares SK-N-BE(2)-C, SH-SY5Y y hNSC recogidas en las bases de datos dbSNP (rs) y COSMIC (COSM).

Línea celular			Variación				
SK-N-BE(2)-C	SH-SY5Y	hNSC	Posición cDNA (nt)	Codón	Amino-ácido	Referencia	Tipo
X	X	X	149	cGc/cAc	R/H	rs2256408	SNP
X	X	X	457	Ttg/Ctg	L/L	COSM1128598 COSM1128599 rs10878245	SNP
X			776	gCa/gAa	A/E	rs199557665	SNP
	X		3477	agT/agG	S/R	rs200965490	SNP
	X		3486	atG/atA	M/I	COSM3460486 COSM3460487	
X	X		4872	ggC/ggA	G/G	rs1427263 COSM3753216 COSM3753217	SNP
X	X		4910-4911	aaa/aaGa	K/KX	rs113611544	Inserción
		X	4937	aTg/aCg	M/T	rs35303786	SNP
X			5104	Atg/Gtg	M/V	rs201343106	SNP
X	X	X	5457	ggT/ggC	G/G	rs10878371	SNP
X	X	X	7190	aTg/aCg	M/T	COSM3753218 COSM3753219 rs3761863	SNP
X			7483	Gtt/Att	V/I	COSM187442 COSM187443 rs150062967	SNP

## 5.2. Generación de líneas derivadas de neuroblastoma y madre neural que sobreexpresan Parkina

La causa genética más comúnmente identificada de Parkinsonismo de aparición temprana son mutaciones autosómicas recesivas heredadas, en homocigosis o heterocigosis compuesta, en el gen de Parkina, *PARK2*. En este proyecto se escogieron dos de las mutaciones patogénicas de la proteína descritas en pacientes con la EP: p.Lys161Asn (K161N) y p.Gly430Asp (G430D), para generar líneas SK-N-BE(2)-C, SH-SY5Y y hNSC que las sobreexpresaran y así disponer de modelos celulares para un mejor estudio de la enfermedad.

### 5.2.1. Incorporación de variantes de Parkina

Para generar líneas celulares derivadas que expresen la proteína Parkina o sus variantes de manera estable, se llevó a cabo la transfección celular mediante vectores lentivirales. En cada ocasión, el plásmido pWPXLD-Ires<sup>Neo</sup> contenía clonado el correspondiente gen que se deseaba expresar: Parkina silvestre (WT), Parkina K161N, Parkina G430D o GFP. Las variantes introducidas de la proteína, K161N y G430D, corresponden a las mutaciones c.483A>T y c.1289G>A de la secuencia codificante, respectivamente. Mediante secuenciación se identificó el nucleótido presente en las posiciones 483 y 1289 de la secuencia codificante del gen *PARK2* en las líneas celulares SK-N-BE(2)-C, SH-SY5Y y hNSC transfectadas con la proteína Parkina WT, las variantes K161N o G430D, o la proteína GFP (Tabla 13).

Tabla 13. Variaciones de *PARK2* presentes en las líneas SK-N-BE(2)-C, SH-SY5Y y hNSC transfectadas. La mutación c.483A>T se encuentra en las líneas celulares transfectadas con Parkina K161N y la mutación c.1289G>A en aquellas transfectadas con Parkina G430D. En negrita se muestran las mutaciones incorporadas.

	PARK2		
	c.483	c.1289	
Park WT	A	G	SK-N-BE(2)-C
	A	G	SH-SY5Y
	A	G	hNSC
Park K161N	<b>T</b>	G	SK-N-BE(2)-C
	<b>T</b>	G	SH-SY5Y
	<b>T</b>	G	hNSC
Park G430D	A	<b>A</b>	SK-N-BE(2)-C
	A	<b>A</b>	SH-SY5Y
	A	<b>A</b>	hNSC
GFP	A	G	SK-N-BE(2)-C
	A	G	SH-SY5Y
	A	G	hNSC

Todas las líneas poseían el alelo nativo A en la posición c.483, salvo las líneas transfectadas con Parkina K161N, donde había sido reemplazado por el alelo T (Figura 4). Por su parte, la sustitución de G por A en la posición c.1289 de la secuencia

codificante de la proteína se observaba en las líneas transfectadas con Parkina G430D (Figura 5), mientras que en el resto de líneas era el alelo G el que ocupaba dicha posición. La existencia de un solo pico en el cromatograma en la posición correspondiente (Figuras 4 y 5) indica que se asemeja a una situación de homocigosis, ya que la mutación se introdujo en cantidad suficiente para detectar en el cDNA únicamente la forma incorporada.

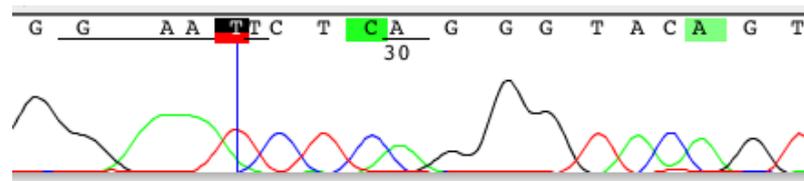


Figura 4. Mutación c.483A>T en el gen *PARK2*, secuenciado a partir de cDNA de la línea celular SK-N-BE(2)-C transfectada con Parkina K161N. Código de colores de las bases nitrogenadas: adenina (A): verde, timina (T): rojo, guanina (G): negro, citosina (C): azul.

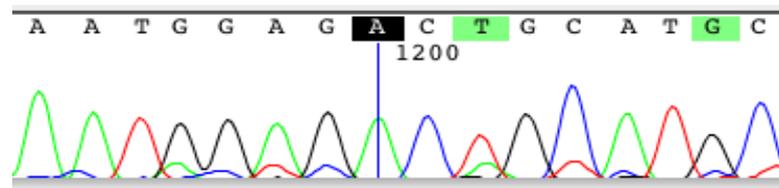


Figura 5. Mutación c.1289G>A en el gen *PARK2*, secuenciado a partir de cDNA de la línea SK-N-BE(2)-C transfectada con Parkina G430D. Código de colores de las bases nitrogenadas: adenina (A): verde, timina (T): rojo, guanina (G): negro, citosina (C): azul.

### 5.2.2. Cuantificación de la expresión del gen *PARK2* en las líneas generadas

Una vez generadas las líneas derivadas con las variantes de Parkina anteriormente descritas, se determinó la cantidad de mRNA correspondiente a la proteína mediante PCR cuantitativa con sonda fluorescente dependiente de secuencia, acoplada a RT-PCR. Se cuantificó la expresión del gen *PARK2* total tras la transfección lentiviral y como control se determinó la  $\beta$ -actina en las mismas líneas celulares. Los resultados se expresaron respecto a los niveles de expresión de *PARK2* en las células

transfectadas con la proteína GFP, para contemplar los posibles cambios inespecíficos en la expresión del gen inducidos por el propio mecanismo de transfección lentiviral. Se realizaron triplicados de las medidas y los resultados se evaluaron según el método Pfaffl [28].

La expresión de *PARK2* en las líneas SK-N-BE(2)-C y SH-SY5Y aumentaba entre 300 y 800 veces al transfectar con la proteína silvestre o sus variantes K161N y G430D (Figura 6). En ambas líneas celulares, el mayor aumento en la expresión se observaba al transfectar con la variante de Parkina G430D, alcanzando prácticamente el doble de expresión en SK-N-BE(2)-C. La incorporación de la proteína silvestre y de la variante K161N originaba un aumento en la expresión de Parkina entre 300 y 400 veces en ambas líneas celulares.

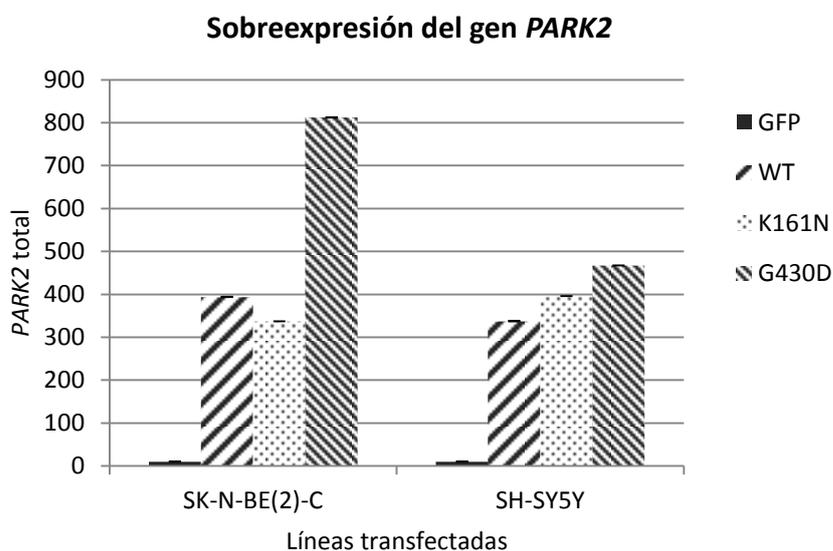


Figura 6. Cuantificación mediante q-PCR de la expresión de *PARK2* en las líneas SK-N-BE(2)-C y SH-SY5Y transfectadas con GFP, Parkina silvestre (WT), Parkina K161N y Parkina G430D. Se muestran los niveles de expresión de *PARK2* en cada línea celular respecto a la línea transfectada con GFP. Se incluye la desviación estándar de las medidas.

### 5.2.3. Detección de la proteína Parkina en las líneas generadas

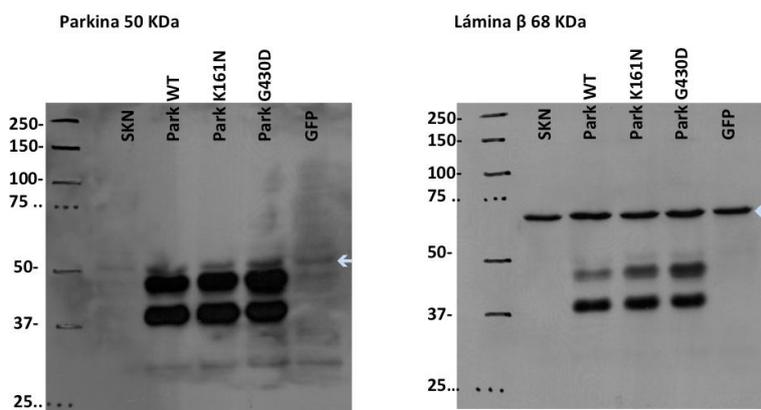
El siguiente paso en la caracterización de las líneas generadas consistió en analizar la expresión de Parkina a nivel proteico. Para ello se llevó a cabo la inmunodetección indirecta con un anticuerpo primario anti-Parkina obtenido en conejo.

Adicionalmente, se determinó mediante densitometría la cantidad de proteína correspondiente a cada banda en el gel de Western Blot para posteriormente, normalizar la cantidad de proteína en cada línea celular respecto a su control de lámina  $\beta$  o  $\beta$ -actina y se calculó el porcentaje de sobreexpresión respecto a la línea transfectada con GFP.

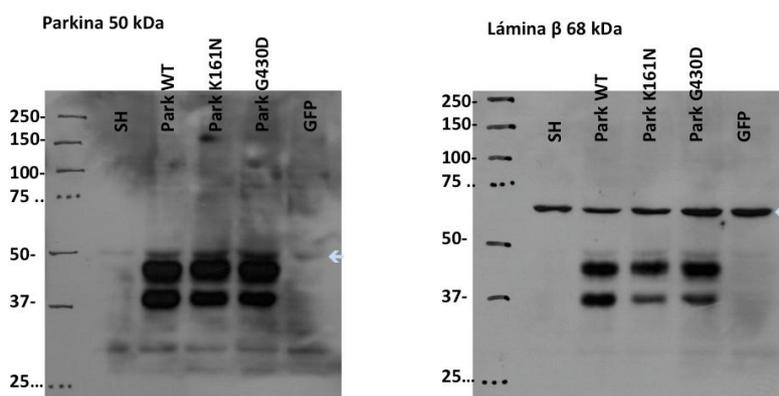
En las líneas celulares SK-N-BE(2)-C, SH-SY5Y y hNSC control y en las transfectadas con GFP, se obtenía una banda de 50 kDa de escasa intensidad correspondiente a la proteína Parkina silvestre (Figura 7, izquierda). Sin embargo, cuando se sobreexpresaba Parkina o alguna de sus variantes, el patrón de bandas variaba; la proteína sufría proteólisis rindiendo dos bandas predominantes entre 50 y 37 kDa de elevada intensidad.

En las células transfectadas con Parkina WT y sus variantes K161N y G430D, la expresión de la proteína se incrementaba entre 1,4 y 2 veces respecto a las líneas SK-N-BE(2)-C, SH-SY5Y y hNSC transfectadas con GFP (Figura 8). Las líneas SK-N-BE(2)-C y SH-SY5Y seguían la misma tendencia en cuanto a que la mayor expresión de Parkina (2 y 1,7 veces aumentada, respectivamente) se daba al transfectar con Parkina G430D, mientras que la transfección con Parkina silvestre y Parkina K161N provocaban aumentos en torno al 1,5. En el caso de la línea hNSC, se observaban tasas de expresión similares al introducir Parkina G430D o la variante K161N, detectando la mayor cantidad de proteína tras la transfección con Parkina silvestre.

a) SK-N-BE(2)-C



b) SH-SY5Y



c) hNSC

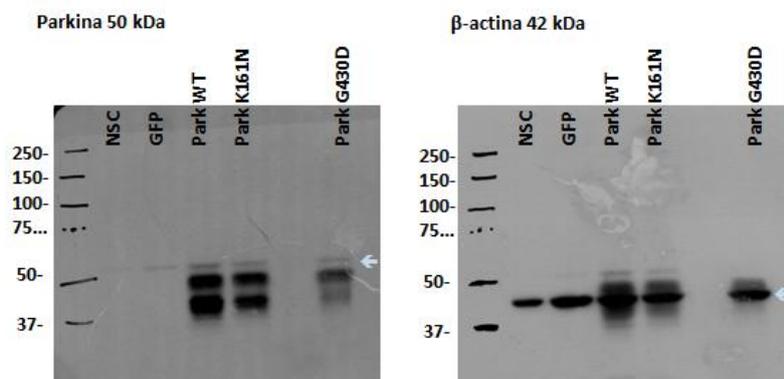
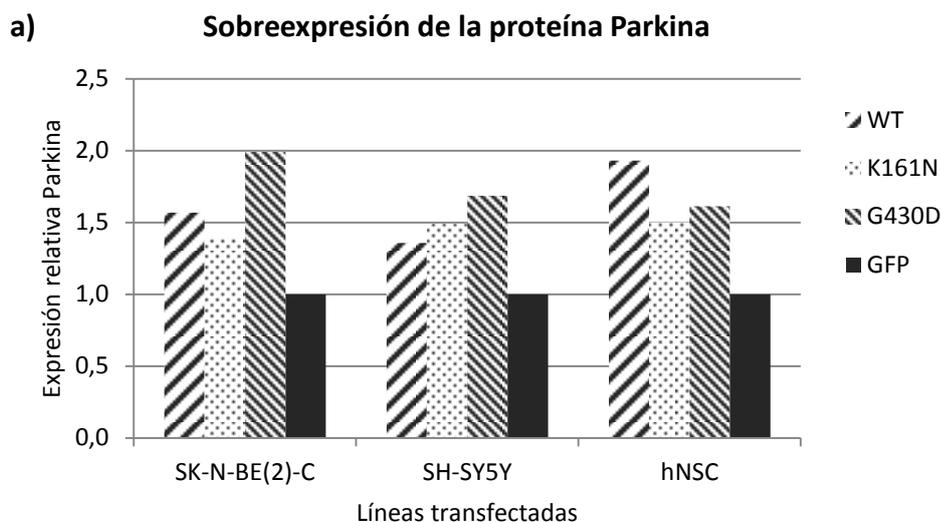


Figura 7. Izquierda: Inmunodetección proteica de Parkina en células a) SK-N-BE(2)-C, b) SH-SY5Y y c) hNSC. Geles de AA/BA (30:0,8) al 10%, 40 µg de proteínas. Derecha: Control de Lámina β o β-actina.



**b)**

	<u>SK-N-BE(2)-C</u>	<u>SH-SY5Y</u>	<u>hNSC</u>
Park WT	1,6	1,4	1,9
Park K161N	1,4	1,5	1,5
Park G430D	2,0	1,7	1,6
GFP	1	1	1

Figura 8. Cuantificación mediante densitometría de la sobreexpresión de Parkina en cada línea respecto a la expresión en la línea transfectada con GFP. a) Representación gráfica. b) Valores numéricos.

### 5.3. Generación de líneas derivadas de neuroblastoma y madre neural que sobreexpresan POLG

Entre las variaciones de POLG asociadas a Parkinson, se escogieron la sustitución patológica p.Tyr955Cys, correspondiente a la mutación c.2864A>G en la secuencia codificante [20], y la variación en la longitud del tracto poli-Q de la proteína asociada con susceptibilidad a la enfermedad, para generar líneas SK-N-BE(2)-C, SH-SY5Y y hNSC derivadas que sirvieran como modelo de estudio. Dada la carencia de muestras de pacientes humanos, se buscó el tracto poli-Q que más difiriera del alelo conservado de 10 Q y, a ser posible, con menor número de glutaminas [21]. Finalmente, para generar modelos de la enfermedad se empleó el tracto poli-Q de una especie de chimpancé denominada Bonobo, que posee 5 Q (más las 3 Q finales conservadas codificadas por CAA-CAG-CAG).

### 5.3.1. Incorporación de variantes de POLG

En este caso, el mecanismo de transfección lentiviral de las líneas SK-N-BE(2)-C, SH-SY5Y y hNSC requería del plásmido pWPXLD-Ires<sup>Neo</sup> conteniendo los siguientes genes: PolG silvestre (WT), PolG Y955C, PolG con el tracto poliQ8 o GFP. A continuación, se secuenciaron por separado el tracto poli-Q de POLG y la región de la mutación c.2864A>G y se anotaron en la Tabla 14 las variaciones encontradas.

Tabla 14. Variaciones de *POLG* presentes en las líneas SK-N-BE(2)-C, SH-SY5Y y hNSC transfectadas. La mutación c.2864A>G se encuentra en las líneas celulares transfectadas con PolG Y955C y el tracto de 8 Gln en aquellas transfectadas con PolG poliQ8. En negrita se muestran las mutaciones incorporadas.

	POLG		
	c.2864	n° Gln	
PolG WT	A	13	SK-N-BE(2)-C
	A	13	SH-SY5Y
	A	13	hNSC
PolG Y955C	<b>G/a</b>	13	SK-N-BE(2)-C
	<b>G/a</b>	13	SH-SY5Y
	<b>G/a</b>	13	hNSC
PolG poliQ8	A	<b>8</b>	SK-N-BE(2)-C
	A	<b>8</b>	SH-SY5Y
	A	<b>8</b>	hNSC
GFP	A	13	SK-N-BE(2)-C
	A	13	SH-SY5Y
	A	13	hNSC

En las líneas transfectadas con PolG Y955C, la mutación se encontraba en heterocigosis, con presencia del alelo nativo (A) y el mutado (G), pero siendo predominante el mutado (Figura 9). Por su parte, las líneas transfectadas con el tracto de chimpancé poseían 8 Gln en total, 5 Q del tracto variable junto con las últimas 3 Q fijas, en lugar de las 13 Gln (10 Q más las 3 Q fijas) correspondientes a la especie humana fisiológica (Figura 10).

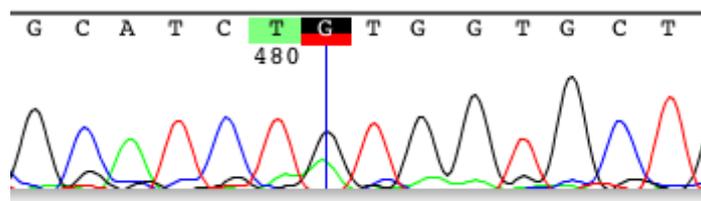


Figura 9. Mutación c.2864A>G en el gen *POLG*, secuenciado a partir de cDNA de la línea SK-N-BE(2)-C transfectada con PolG Y955C. La base marcada en rojo corresponde a la posición 2864, donde se observa la mutación en heterocigosis (G/A). Código de colores de las bases nitrogenadas: adenina (A): verde, timina (T): rojo, guanina (G): negro, citosina (C): azul.



Figura 10. Tracto de 8 glutaminas en el gen *POLG*, secuenciado a partir de cDNA de la línea SK-N-BE(2)-C transfectada con el tracto poliQ8 de chimpancé. Las primeras 5 Gln corresponden al tracto variable, codificadas todas ellas por el codón CAG, mientras que las 3 últimas Gln codificadas por los codones CAA-CAG-CAG son fijas. La línea discontinua indica la posición de las 5 Gln del tracto poli-Q variable que restan hasta las 10 Gln conservadas en la especie humana.

### 5.3.2. Cuantificación de la expresión del gen *POLG* en las líneas generadas

Una vez generadas las líneas que expresaban las variantes de *POLG* anteriormente descritas, se determinó la cantidad de mRNA correspondiente a la proteína mediante PCR cuantitativa con fluorocromo inespecífico acoplada a RT-PCR. Por una parte, se cuantificó la expresión del gen *POLG* endógeno intrínseco de cada línea celular con un par de oligonucleótidos que hibrida en la región no codificante 5'UTR del gen y, adicionalmente, se determinó la expresión total tras la transfección (endógeno y exógeno), mediante el diseño de cebadores dirigidos a la secuencia codificante. Como control se cuantificó la expresión de *POLG* en células transfectadas con la proteína GFP, para contemplar los posibles cambios inespecíficos en la expresión del gen inducidos por el propio mecanismo de transfección lentiviral. Se realizaron triplicados de las medidas y se evaluaron los resultados según el método Pfaffl [28]. Como resultado se muestra el número de veces que aumenta la expresión del gen al

transfectar con el vector lentiviral correspondiente, obtenido de la relación entre el porcentaje de mRNA total expresado en una línea y el endógeno.

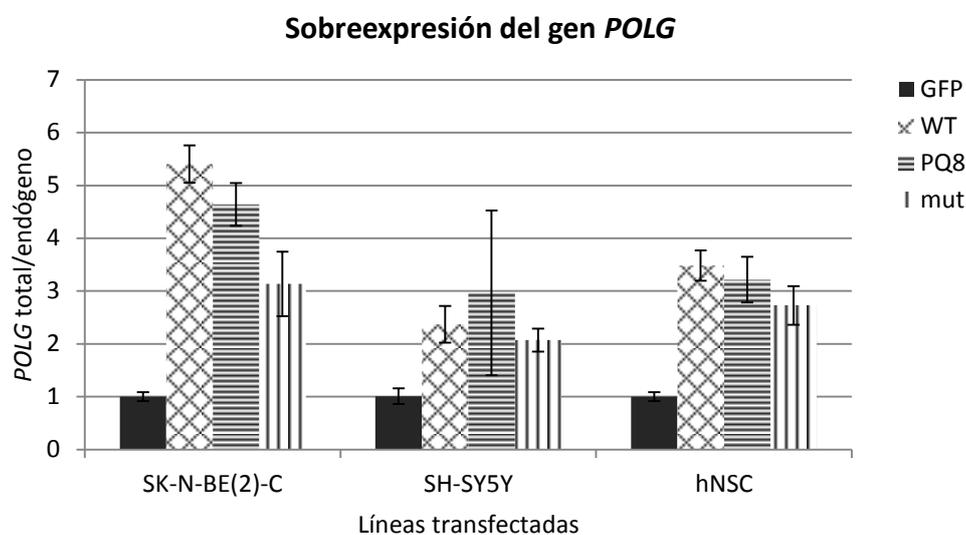


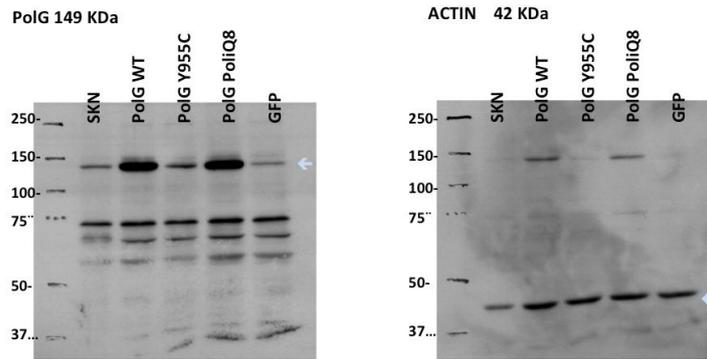
Figura 11. Cuantificación mediante q-PCR de la sobreexpresión de *POLG* en las líneas transfectadas con GFP, *POLG* silvestre (WT), *POLG* con el tracto de 8 Gln (PQ8) y *POLG* Y955C (mut). Se muestra la relación entre el mRNA total y endógeno, incluyendo la desviación estándar de las medidas.

Como se observa en la Figura 11, en términos generales, las mayores tasas de sobreexpresión se daban cuando se transfectaba con *POLG* WT, seguido de la proteína con el tracto de 8 Gln y por último, al transfectar con la variante Y955C. Sin embargo, en la línea SH-SY5Y se interrumpía la tendencia anterior, mostrando la mayor tasa de sobreexpresión al transfectar con *POLG* PQ8. En cuanto a las líneas celulares, la línea SK-N-BE(2)-C es donde se alcanzaba mayor sobreexpresión de *POLG*, aumentando hasta 5 veces su expresión al transfectar con la proteína silvestre respecto a la línea transfectada con GFP.

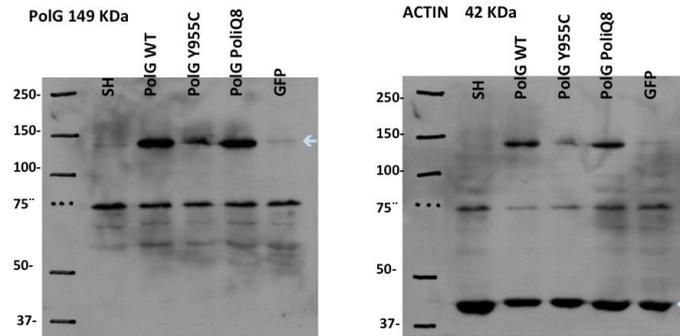
### 5.3.3. Detección de la proteína *POLG* en las líneas generadas

El análisis mediante Western Blot con el anticuerpo primario anti-*POLG* producido en conejo permitió detectar los niveles de expresión de la proteína. Además, se realizaron medidas de densitometría para normalizar la cantidad de la proteína en cada línea respecto a su control de actina y se calculó el porcentaje de sobreexpresión respecto a la línea transfectada con GFP.

**a) SK-N-BE(2)-C**



**b) SH-SY5Y**



**c) hNSC**

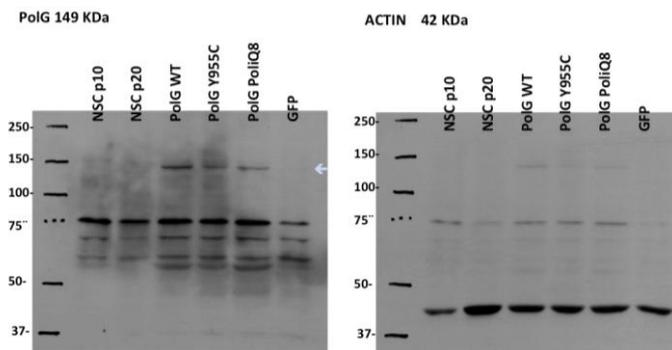
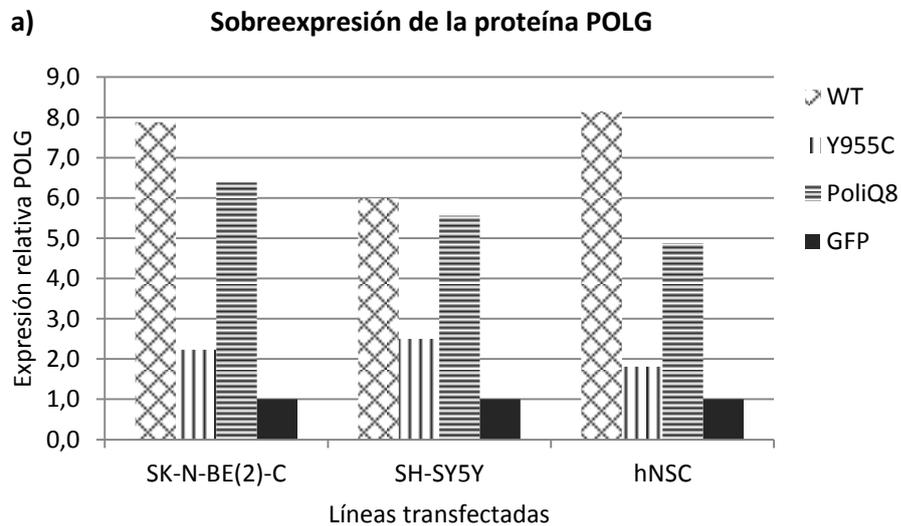


Figura 12. Izquierda: Inmunodetección de POLG en células a) SK-N-BE(2)-C, b) SH-SY5Y y c) hNSC. Geles de AA/BA (30:0,8) al 8%, 40  $\mu$ g de proteínas. Derecha: control de  $\beta$ -actina.

La Figura 12 izquierda muestra en todas las líneas celulares la banda de 149 kDa correspondiente a POLG. En la línea hNSC (Figura 12.c) en general se obtuvieron bandas de menor intensidad que en SK-N-BE(2)-C o SH-SY5Y (Figuras 12.a y b). En las tres líneas, la mayor sobreexpresión de POLG tenía lugar al transfectar con la proteína silvestre y con el tracto poliQ8.

El nivel de expresión de POLG en las tres líneas celulares aumentaba entre 6 y 8 veces al transfectarlas con la proteína silvestre, y entre 5 y 6 veces en el caso del tracto poliQ8; siendo considerablemente menor la sobreexpresión, en torno a 2 veces, al transfectar con la variante Y955C (Figura 13).



**b)**

	<u>SK-N-BE(2)-C</u>	<u>SH-SY5Y</u>	<u>hNSC</u>
POLG WT	7,9	6,0	8,2
POLG Y955C	2,2	2,5	1,8
POLG PQ8	6,4	5,6	4,9
GFP	1	1	1

Figura 13. Cuantificación mediante densitometría de la sobreexpresión de POLG en cada línea respecto a la expresión en la línea transfectada con GFP. a) Representación gráfica. b) Valores numéricos.

#### **5.4. Influencia del tratamiento de diferenciación en proteínas relacionadas con Parkinson familiar**

Para comprobar si el proceso de diferenciación de células derivadas de neuroblastoma a neuronas dopaminérgicas había sido eficaz, se analizaron algunas propiedades de la línea SH-SY5Y sometida al tratamiento de diferenciación a neurona dopaminérgica de 5 días con RA y 3 días con TPA. Como consecuencia del proceso de diferenciación, las células mostraban cambios morfológicos apreciables al microscopio, como reducción del tamaño del soma neuronal y extensión de neuritas que interconectaban las entidades próximas entre sí. También se analizaron otros marcadores neuronales mediante citometría de flujo y Western Blot: tubulina, para observar la extensión de dendritas y tirosina hidroxilasa (TH), enzima que cataliza la conversión del aminoácido L-tirosina a dihidroxifenilalanina (DOPA), el precursor de la dopamina (Datos no mostrados).

Por otra parte, se estudió la expresión de las proteínas PINK1 y HtrA2, implicadas en la patogénesis de casos de Parkinson familiar, en células SH-SY5Y sin diferenciar (SD) y diferenciadas (D), comparándolas con el tratamiento con carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP), un potente desacoplante de la cadena respiratoria mitocondrial que se emplea para estabilizar la banda de 63 kDa de PINK1 [29].

La proteína PINK1 mostraba niveles de expresión prácticamente no detectables en las células SH-SY5Y sin diferenciar. Sin embargo, al someterlas al tratamiento de diferenciación o a la acción de CCCP, se observaba una clara estabilización de PINK1 respecto a las células sin diferenciar (Figura 14.A). El tratamiento de diferenciación a neurona dopaminérgica estabilizaba la proteína de la misma manera que el tratamiento de la línea celular con el desacoplante CCCP.

Los resultados de inmunodetección de HtrA2 mostraban proteólisis de la proteína de 49 kDa, rindiendo una banda de peso molecular en torno a 36 kDa (Figura 14.B). Además, los tratamientos de diferenciación celular y con el desacoplante CCCP no provocaban diferencias apreciables en la expresión de HtrA2.

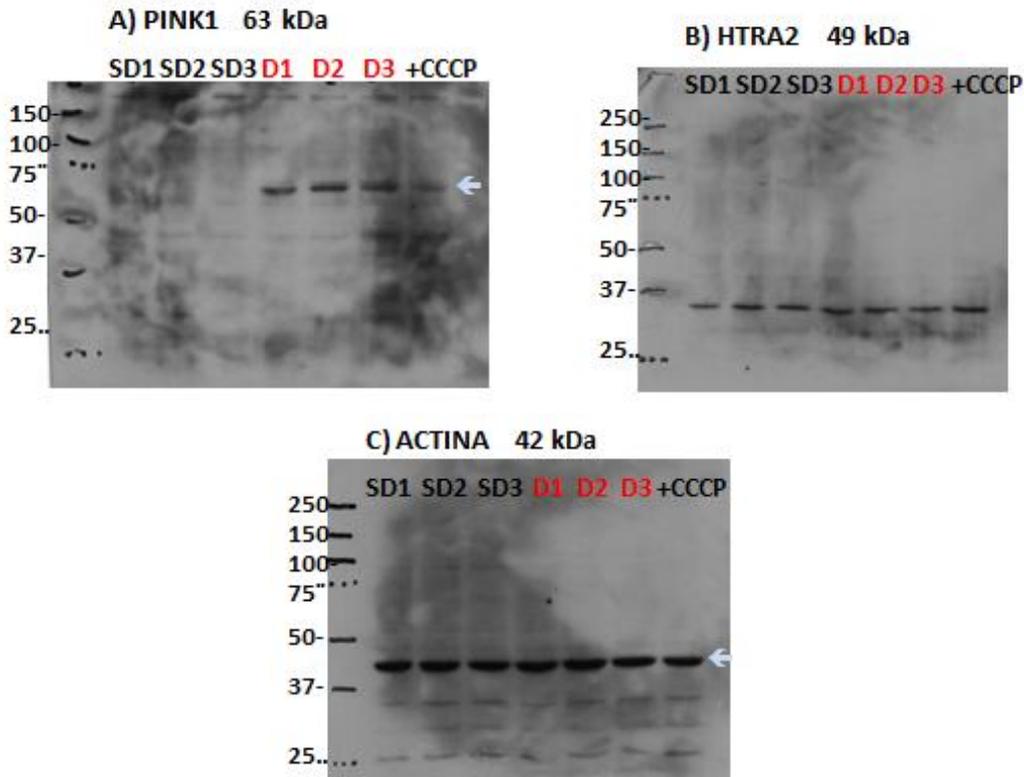


Figura 14. Comparación de la expresión de proteínas en células SH-SY5Y tras distintos tratamientos (SD, D y tratadas con CCCP). Se analizaron mediante inmunodetección indirecta las proteínas A) PINK1, de 63 kDa y B) HTRA2, de 49 kDa. Gel de AA/BA (30:0,8) al 10%, 30  $\mu$ g de proteínas. C) Control de  $\beta$ -actina, de 42 kDa.

## 6. Discusión

### 6.1. Secuenciación de los genes *POLG* y *LRRK2*

La secuenciación del gen *POLG* se consiguió en 6 fragmentos que engloban la secuencia codificante de 3720 pb. Las escasas variaciones de *POLG* encontradas en las líneas celulares SK-N-BE(2)-C, SH-SY5Y y hNSC respecto a la secuencia consenso, no muestran relación con la EP.

La secuenciación del gen *LRRK2* fue laboriosa debido a la existencia de 7 transcritos distintos en la especie humana y a la gran extensión de su secuencia codificante. Además, posee un elevado número de variaciones, algunas de las cuales se agrupan en determinadas zonas dificultando la hibridación específica de los cebadores. En la Tabla 12 se observa que algunas variaciones encontradas en el gen eran comunes a todas las líneas, mientras que otras aparecían en dos de las líneas o eran exclusivas de

una de ellas. Aparentemente, la línea SK-N-BE(2)-C era la que poseía mayor número de variaciones en el gen *LRRK2*, seguida de SH-SY5Y y por último hNSC. Las variantes descritas eran de diversa naturaleza, incluyendo mutaciones sin sentido, silenciosas e inserciones que modifican el marco de lectura. Además, en algunos casos, en la misma posición del genoma colocalizaba más de una variante distinta, como se muestra en la penúltima columna de la Tabla 12, aumentando la complejidad de su clasificación. Entre las variaciones descritas en las tres líneas celulares, se descarta la presencia de las 6 mutaciones patológicas asociadas a Parkinson de aparición tardía (p.N1437H, p.R1441C/G/H, p.Y1699C, p.S1761R, p.G2019S o p.I2020T). Por último, cabe destacar la presencia de ciertas mutaciones somáticas implicadas en el desarrollo de cáncer, que indica una posible relación de algunas variantes del gen *LRRK2* con los procesos tumorales.

En particular, la línea celular hNSC presentaba un crecimiento en cultivo mucho más lento y rendía menor cantidad de RNA total que las otras dos líneas, posiblemente debido a una menor tasa de transcripción del DNA en esas células. Esto complicó la secuenciación de los genes *POLG* y *LRRK2* en esta línea.

## **6.2. Generación de líneas derivadas de neuroblastoma y madre neural que expresan mutaciones relacionadas con Parkinson**

La mayoría de genes asociados con EP codifican proteínas implicadas directa o indirectamente en la homeostasis mitocondrial o en mitofagia (degradación mediante autofagia de mitocondrias no funcionales). Entre ellos, mutaciones en los genes que codifican PINK1, Parkina y DJ-1 provocan EP autosómica recesiva; mientras que las mutaciones en *LRRK2* y  $\alpha$ -sinucleína desencadenan EP autosómica dominante. Al parecer, la disfunción mitocondrial en la EP autosómica dominante y recesiva no ocurre por el mismo mecanismo [8]. Por su parte, el fenotipo asociado a mutaciones en *POLG* difiere de la manifestación clínica de mutaciones en el resto de genes nucleares implicados en EP. Las mutaciones en *POLG* tienen gran repercusión en la integridad del mtDNA y los síntomas de Parkinsonismo suelen ir acompañados de otros síntomas neurodegenerativos.

En este proyecto se escogieron dos mutaciones severas en el gen de Parkina en dominios con distinta actividad catalítica y dos variaciones menos graves en POLG para disponer de distintos tipos de modelos celulares de EP. En el primer caso, p.Lys161Asn (c.483A>T) y p.Gly430Asp (c.1289G>A), son mutaciones autosómicas recesivas en el gen de Parkina, previamente descritas en pacientes con EP. En cuanto a POLG, se generaron líneas derivadas con la mutación patológica p.Tyr955Cys y una variación en la longitud del tracto poli-Q asociada con susceptibilidad a la enfermedad.

### 6.2.1. Líneas con mutaciones en Parkina

La secuenciación de las líneas generadas para sobreexpresar variaciones de la proteína Parkina, mostraba en todos los casos la incorporación de la variante deseada (c.483A>T o c.1289G>A) al genoma del huésped en homocigosis (Tabla 13). Este dato es relevante ya que se trata de mutaciones autosómicas recesivas; es decir, para que tengan efecto patógeno deben estar presentes en homocigosis o heterocigosis compuesta. De esta manera, al conseguir líneas celulares con las mutaciones de Parkina en homocigosis, se había logrado obtener un buen modelo para el estudio de la enfermedad.

La cuantificación de la expresión del gen *PARK2* mostraba los mayores niveles de expresión en las líneas SK-N-BE(2)-C y SH-SY5Y transfectadas con la variante de Parkina G430D (Figura 6), confirmado por los análisis de expresión proteica (Figura 8), mientras que en la línea hNSC era la transfección con Parkina silvestre la que provocaba mayor aumento en la expresión proteica. Además, el análisis proteico mostraba que al mismo tiempo que se sobreexpresaba la proteína al transfectar con las distintas variantes de Parkina, se producía proteólisis (Figura 7). Esta degradación de Parkina previamente descrita [30] justifica que los niveles de sobreexpresión del gen sean mucho más elevados que en el caso de la proteína, donde se obtiene como máximo el doble de expresión. Cabe destacar que el control proteico adecuado para Parkina (50 kDa) es la proteína lámina  $\beta$  de 68 kDa. En la Figura 7.c se empleó  $\beta$ -actina (42 kDa) como control y su cuantificación no era fiable porque se producía solapamiento con las bandas de Parkina degradada.

### 6.2.2. Líneas con mutaciones en POLG

En primer lugar, se comprobó que todas las líneas celulares habían incorporado en su genoma la variación de la proteína POLG correspondiente (la mutación c.2864A>G o el tracto poliQ8) introducida mediante transfección lentiviral (Tabla 14).

En este caso se cuantificó el mRNA correspondiente a la proteína POLG en cada línea celular (POLG endógena) y el mRNA de POLG tras infectar con los virus (POLG total), pudiendo obtener la relación POLG total/endógena (Figura 11), que indica el aumento de expresión debido a la transfección. La mayor sobreexpresión de POLG se producía en la línea SK-N-BE(2)-C, lo cual indica una mayor tasa de incorporación del gen de interés al genoma de esta línea celular. El hecho de que en todas las líneas se observara menor incremento en la expresión de POLG cuando se transfectaba con la variante Y955C, es posible que se deba a un mecanismo de compensación que regule los niveles de proteína endógena al sobreexpresar una forma mutada. En la línea SH-SY5Y se obtenía la mayor tasa de sobreexpresión al transfectar con POLG PQ8 en lugar de POLG WT como en las otras líneas, pero este valor no es significativo dada la gran desviación estándar de dichas medidas.

El análisis mediante Western Blot permitió confirmar a nivel de expresión proteica los resultados de cuantificación de mRNA obtenidos. En general, en la línea hNSC se obtuvieron menores niveles de expresión (Figura 12.c), coherentes con la reducida cantidad de RNA total en esta línea. El nivel de expresión de POLG en las tres líneas celulares aumentaba al transfectarlas con la proteína silvestre y las dos variantes, siendo considerablemente menor la sobreexpresión en el caso de la mutación Y955C (Figura 13) debido al mecanismo de compensación anteriormente citado. La cuantificación de la sobreexpresión mediante densitometría seguía la misma tendencia que los datos de PCR cuantitativa: mayor sobreexpresión de POLG en las líneas transfectadas con POLG silvestre, muy similar a poliQ8 y por último Y955C.

### **6.3. Influencia del tratamiento de diferenciación en proteínas relacionadas con Parkinson familiar**

La estabilidad de PINK1 se ve afectada por mecanismos de procesamiento y degradación en el proteasoma, poco frecuentes entre las proteínas mitocondriales. Sin embargo, bajo condiciones de estrés celular PINK1 se une a otras proteínas y consigue estabilizarse. Como ya se ha descrito previamente [29], el tratamiento con el desacoplante mitocondrial CCCP estabiliza a PINK1 y en este estudio se observó que la diferenciación de la línea SH-SY5Y a neurona dopaminérgica provocaba un aumento en la estabilización de PINK1 en dicha línea (Figura 14.A). Este hallazgo es importante, ya que PINK1 está implicada en la enfermedad de Parkinson.

La proteína HtrA2 es sintetizada como un zimógeno de 50 kDa de peso molecular que requiere maduración proteolítica para su activación [31]. El procesamiento proteolítico del precursor de HtrA2 genera una forma madura de 36 kDa, que es mayoritariamente confinada al espacio intermembrana mitocondrial para proteger a la mitocondria de diversas formas de estrés [32]. En el presente estudio, la proteína HtrA2 experimentaba proteólisis bajo todas las condiciones ensayadas, pudiendo observarse la banda de 36 kDa (Figura 14. B). En este caso, el desacoplante y la diferenciación celular no provocaban cambios apreciables en la expresión de HtrA2 respecto a las células SH-SY5Y sin diferenciar.

### **6.4. Utilidad de los modelos celulares para estudiar EP**

Para finalizar, además de la conocida relación de la enfermedad de Parkinson con la enfermedad de Gaucher [33, 34], a lo largo de esta memoria se cita su conexión con otros fenotipos neurológicos como oftalmoplegia externa progresiva o síndrome de Alpers; reafirmando la complejidad de establecer modelos celulares adecuados para el estudio de la patología.

Para estudiar la degeneración celular en la EP es más apropiado emplear modelos celulares que un modelo animal de ratón, ya que los primeros son más parecidos a las células humanas. Los modelos celulares generados en este proyecto van a permitir estudiar cómo afectan ciertas mutaciones patológicas en las proteínas Parkina y POLG al proceso de diferenciación celular a neurona dopaminérgica.

## 7. Conclusiones

Los estudios genéticos y moleculares realizados han permitido profundizar en el conocimiento de las líneas celulares derivadas de neuroblastoma SK-N-BE(2)-C y SH-SY5Y y de la madre neural hNSC. En primer lugar, se ha completado el estudio de los principales genes nucleares implicados en casos esporádicos de Parkinson ( $\alpha$ -sinucleína, *DJ-1*, *HtrA2*, *PINK1*, *PARK2* y *LRRK2*) y la proteína POLG, implicada en el mantenimiento del mtDNA y asociada a Parkinsonismo. Se han identificado las variaciones en los genes *POLG* y *LRRK2* presentes en dichas líneas celulares y se han descartado mutaciones encontradas en pacientes con Parkinson.

Por otra parte, los resultados muestran que la generación de líneas derivadas que expresan mutaciones relacionadas con EP, algunas de gran severidad (Parkina K161N y Parkina G430D) y otras asociadas con susceptibilidad a la enfermedad (POLG Y955C y una variación en la longitud del tracto poli-Q de POLG), fue satisfactoria. Se ha comprobado la incorporación de la variante correspondiente y se ha cuantificado la sobreexpresión ocasionada del gen (*PARK2* o *POLG*) y de la proteína (Parkina o POLG), obteniendo tasas de sobreexpresión de Parkina del doble y de POLG entre 2 y 8 veces.

Por último, se ha observado que el tratamiento de diferenciación celular a neurona dopaminérgica promueve la estabilización de la proteína PINK1 de la misma manera que el desacoplante mitocondrial CCCP, mientras que no produce ningún efecto apreciable sobre la proteína HtrA2.

### Conclusions

Genetic and molecular studies have allowed a better knowledge about cell lines derived from neuroblastoma SK-N-BE(2)-C and SH-SY5Y and neural stem cells hNSC. Firstly, the study of the major nuclear genes involved in sporadic cases of PD ( $\alpha$ -synuclein, *DJ-1*, *HtrA2*, *PINK1*, *PARK2* and *LRRK2*) and the POLG protein, involved in the mtDNA maintenance and associated with Parkinsonism, has been completed. Variations in *POLG* and *LRRK2* genes have been identified in those cell lines and mutations found in patients with Parkinson have been discarded.

On the other hand, results show a successful generation of derived cell lines expressing mutations related to PD, some of them very severe (Parkin K161N and Parkin G430D) and others associated with PD susceptibility (POLG Y955C and a variation in POLG poli-Q tract length). Incorporation of the pertinent variant has been confirmed and gen (*PARK2* or *POLG*) and protein (Parkin or POLG) overexpression have been quantified. Parkin shows twofold overexpression, while POLG expression increases from 2 to 8 times.

Finally, it has been found that the treatment to differentiate cells into dopaminergic neurons promotes PINK1 stabilization in the same way that does mitochondrial uncoupling CCCP, while such treatment has no significant effect over HtrA2 protein.

## **8. Perspectivas futuras**

Una vez generadas y caracterizadas las líneas derivadas con mutaciones en Parkina y POLG, el siguiente paso consiste en diferenciarlas a neuronas dopaminérgicas y estudiar la expresión de proteínas antes y después de diferenciar, para observar el efecto de mutaciones con distinto grado de severidad sobre el proceso de diferenciación.

Por otra parte, los híbridos transmitocondriales [1] constituyen una herramienta de gran utilidad para elucidar las complejas relaciones entre factores que desencadenan Parkinson. Se trata de modelos celulares resultantes de la fusión de plaquetas (carentes de núcleo) de pacientes con EP junto con células rho0 (sin mtDNA). Además, se pueden añadir complejidades nucleares al modelo mediante mutagénesis dirigida. De esta manera, homogenizando los factores genéticos nucleares, estas líneas celulares permitirán entender las complejas relaciones entre los factores ambientales, el DNA nuclear y el mtDNA. También sirve para conocer las complejidades de la función OXPHOS en la EP, que son debidas al doble origen (nuclear y mitocondrial) de las subunidades OXPHOS, a la elevada frecuencia de mutaciones somáticas en el mtDNA y al efecto de ciertos xenobióticos que actúan sobre las subunidades OXPHOS.

## 9. Referencias bibliográficas

1. Lopez-Gallardo E, Iceta R, Iglesias E, Montoya J, Ruiz-Pesini E: **OXPHOS toxicogenomics and Parkinson's disease.** *Mutation research* 2011, **728**(3):98-106.
2. Vanitallie TB: **Parkinson disease: primacy of age as a risk factor for mitochondrial dysfunction.** *Metabolism: clinical and experimental* 2008, **57 Suppl 2**:S50-55.
3. Mortiboys H, Thomas KJ, Koopman WJ, Klaffke S, Abou-Sleiman P, Olpin S, Wood NW, Willems PH, Smeitink JA, Cookson MR *et al*: **Mitochondrial function and morphology are impaired in parkin-mutant fibroblasts.** *Annals of neurology* 2008, **64**(5):555-565.
4. Taymans JM, Baekelandt V: **Phosphatases of alpha-synuclein, LRRK2, and tau: important players in the phosphorylation-dependent pathology of Parkinsonism.** *Frontiers in genetics* 2014, **5**:382.
5. Chen SW, Drakulic S, Deas E, Ouberai M, Aprile FA, Arranz R, Ness S, Roodveldt C, Williams T, De-Genst EJ *et al*: **Structural characterization of toxic oligomers that are kinetically trapped during alpha-synuclein fibril formation.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2015, **112**(16):E1994-2003.
6. Rugarli EI, Langer T: **Mitochondrial quality control: a matter of life and death for neurons.** *The EMBO journal* 2012, **31**(6):1336-1349.
7. Saxton WM, Hollenbeck PJ: **The axonal transport of mitochondria.** *Journal of cell science* 2012, **125**(Pt 9):2095-2104.
8. Ryan BJ, Hoek S, Fon EA, Wade-Martins R: **Mitochondrial dysfunction and mitophagy in Parkinson's: from familial to sporadic disease.** *Trends in biochemical sciences* 2015, **40**(4):200-210.
9. Dettmer U, Selkoe D, Bartels T: **New insights into cellular alpha-synuclein homeostasis in health and disease.** *Current opinion in neurobiology* 2015, **36**:15-22.
10. Bekris LM, Mata IF, Zabetian CP: **The genetics of Parkinson disease.** *Journal of geriatric psychiatry and neurology* 2010, **23**(4):228-242.
11. Goo HG, Jung MK, Han SS, Rhim H, Kang S: **HtrA2/Omi deficiency causes damage and mutation of mitochondrial DNA.** *Biochimica et biophysica acta* 2013, **1833**(8):1866-1875.
12. Seirafi M, Kozlov G, Gehring K: **Parkin structure and function.** *The FEBS journal* 2015, **282**(11):2076-2088.
13. Kazlauskaitė A, Muqit MM: **PINK1 and Parkin - mitochondrial interplay between phosphorylation and ubiquitylation in Parkinson's disease.** *The FEBS journal* 2015, **282**(2):215-223.
14. Lucking CB, Durr A, Bonifati V, Vaughan J, De Michele G, Gasser T, Harhangi BS, Meco G, Deneffe P, Wood NW *et al*: **Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene.** *The New England journal of medicine* 2000, **342**(21):1560-1567.
15. Paisan-Ruiz C, Lewis PA, Singleton AB: **LRRK2: cause, risk, and mechanism.** *Journal of Parkinson's disease* 2013, **3**(2):85-103.
16. Mata IF, Hutter CM, Gonzalez-Fernandez MC, de Pancorbo MM, Lezcano E, Huerta C, Blazquez M, Ribacoba R, Guisasaola LM, Salvador C *et al*: **Lrrk2 R1441G-related Parkinson's disease: evidence of a common founding event in the seventh century in Northern Spain.** *Neurogenetics* 2009, **10**(4):347-353.
17. Paisan-Ruiz C, Jain S, Evans EW, Gilks WP, Simon J, van der Brug M, Lopez de Munain A, Aparicio S, Gil AM, Khan N *et al*: **Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease.** *Neuron* 2004, **44**(4):595-600.

18. Ylonen S, Ylikotila P, Siitonen A, Finnila S, Autere J, Majamaa K: **Variations of mitochondrial DNA polymerase gamma in patients with Parkinson's disease.** *Journal of neurology* 2013, **260**(12):3144-3149.
19. Davidzon G, Greene P, Mancuso M, Klos KJ, Ahlskog JE, Hirano M, DiMauro S: **Early-onset familial parkinsonism due to POLG mutations.** *Annals of neurology* 2006, **59**(5):859-862.
20. Luoma P, Melberg A, Rinne JO, Kaukonen JA, Nupponen NN, Chalmers RM, Oldfors A, Rautakorpi I, Peltonen L, Majamaa K *et al*: **Parkinsonism, premature menopause, and mitochondrial DNA polymerase gamma mutations: clinical and molecular genetic study.** *Lancet* 2004, **364**(9437):875-882.
21. Eerola J, Luoma PT, Peuralinna T, Scholz S, Paisan-Ruiz C, Suomalainen A, Singleton AB, Tienari PJ: **POLG1 polyglutamine tract variants associated with Parkinson's disease.** *Neuroscience letters* 2010, **477**(1):1-5.
22. Kahns S, Lykkebo S, Jakobsen LD, Nielsen MS, Jensen PH: **Caspase-mediated parkin cleavage in apoptotic cell death.** *The Journal of biological chemistry* 2002, **277**(18):15303-15308.
23. Mellick GD, Siebert GA, Funayama M, Buchanan DD, Li Y, Imamichi Y, Yoshino H, Silburn PA, Hattori N: **Screening PARK genes for mutations in early-onset Parkinson's disease patients from Queensland, Australia.** *Parkinsonism & related disorders* 2009, **15**(2):105-109.
24. Presgraves SP, Ahmed T, Borwege S, Joyce JN: **Terminally differentiated SH-SY5Y cells provide a model system for studying neuroprotective effects of dopamine agonists.** *Neurotoxicity research* 2004, **5**(8):579-598.
25. Swistowski A, Peng J, Han Y, Swistowska AM, Rao MS, Zeng X: **Xeno-free defined conditions for culture of human embryonic stem cells, neural stem cells and dopaminergic neurons derived from them.** *PLoS One* 2009, **4**(7):e6233.
26. Naldini L, Blomer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D: **In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector.** *Science (New York, NY)* 1996, **272**(5259):263-267.
27. Bradford MM: **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem* 1976, **72**:248-254.
28. Pfaffl MW: **A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.** *Nucleic acids research* 2001, **29**(9):e45.
29. Vives-Bauza C, Zhou C, Huang Y, Cui M, de Vries RL, Kim J, May J, Tocilescu MA, Liu W, Ko HS *et al*: **PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010, **107**(1):378-383.
30. Xiong H, Wang D, Chen L, Choo YS, Ma H, Tang C, Xia K, Jiang W, Ronai Z, Zhuang X *et al*: **Parkin, PINK1, and DJ-1 form a ubiquitin E3 ligase complex promoting unfolded protein degradation.** *The Journal of clinical investigation* 2009, **119**(3):650-660.
31. Hegde R, Srinivasula SM, Zhang Z, Wassell R, Mukattash R, Cilenti L, DuBois G, Lazebnik Y, Zervos AS, Fernandes-Alnemri T *et al*: **Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction.** *The Journal of biological chemistry* 2002, **277**(1):432-438.
32. Vande Walle L, Lamkanfi M, Vandenabeele P: **The mitochondrial serine protease HtrA2/Omi: an overview.** *Cell death and differentiation* 2008, **15**(3):453-460.
33. Elstein D, Alcalay R, Zimran A: **The emergence of Parkinson disease among patients with Gaucher disease.** *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism* 2015, **29**(2):249-259.

34. Barrett MJ, Giraldo P, Capablo JL, Alfonso P, Irun P, Garcia-Rodriguez B, Pocovi M, Pastores GM: **Greater risk of parkinsonism associated with non-N370S GBA1 mutations.** *Journal of inherited metabolic disease* 2013, **36**(3):575-580.