

Trabajo Fin de Grado

**Grado en Química**

Curso 2020/2021

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y  
Celular**

# Papel de la autofagia en los procesos iniciales de agregación de alfa-sinucleína

*Autophagy's role in the initial alpha-synuclein aggregation processes*

Autora

**Sara García Gadea**

Director

**Prof. José Alberto Carrodegua Villar**

*En agradecimiento a Beatriz Sáenz de Buruaga  
por su inestimable ayuda*

# 1 Índice

<b>1</b>	<b>Índice</b>	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>Abreviaturas</b>	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>Resumen</b>	<b>5</b>
<b>4</b>	<b>Introducción</b>	<b>6</b>
<b>4.1</b>	<b>La enfermedad de Parkinson</b>	<b>6</b>
<b>4.2</b>	<b>La autofagia</b>	<b>6</b>
<b>4.3</b>	<b><math>\alpha</math>-Sinucleína</b>	<b>7</b>
4.3.1	Estructura de la aSyn	7
4.3.2	Función de la aSyn	8
4.3.3	aSyn y autofagia	8
<b>4.4</b>	<b>Tau y p62</b>	<b>9</b>
4.4.1	Tau	9
4.4.2	p62	9
<b>5</b>	<b>Objetivos</b>	<b>10</b>
<b>6</b>	<b>Materiales y métodos</b>	<b>11</b>
<b>6.1</b>	<b>Cultivos celulares</b>	<b>11</b>
6.1.1	Líneas celulares	11
6.1.2	Mantenimiento de los cultivos de células	11
6.1.3	Descongelación de células	11
6.1.4	Congelación de células	12
6.1.5	Recuento celular	12
6.1.6	Siembra en placa	12
6.1.7	Fijación de las células con paraformaldehído	12
6.1.8	Tinción con marcadores fluorescentes	13
<b>6.2</b>	<b>Preparación y verificación de los plásmidos</b>	<b>13</b>
<b>6.3</b>	<b>Transfecciones</b>	<b>14</b>
<b>6.4</b>	<b>Western Blot</b>	<b>15</b>
6.4.1	Extracción de proteínas y cross-linking	15
6.4.2	Electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE)	15
6.4.3	Transferencia	16
6.4.4	Incubación con anticuerpos y revelado	16
<b>6.5</b>	<b>Microscopía</b>	<b>17</b>
<b>7</b>	<b>Resultados y discusión</b>	<b>18</b>
<b>7.1</b>	<b>Estudio de la morfología y viabilidad celular</b>	<b>18</b>
<b>7.2</b>	<b>Análisis mediante Western Blot de la expresión de proteínas</b>	<b>18</b>
<b>7.3</b>	<b>Plásmidos y sobreexpresión de proteínas</b>	<b>19</b>
7.3.1	Preparación de los plásmidos	19

7.3.2	Optimización de la transfección .....	20
<b>7.4</b>	<b>Cotransfecciones y estudio de colocalización subcelular .....</b>	<b>23</b>
7.4.1	Experimentos in vivo.....	28
<b>7.5</b>	<b>Estudio de la autofagia .....</b>	<b>28</b>
<b>8</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>30</b>
<b>9</b>	<b>Bibliografía .....</b>	<b>31</b>
<b>10</b>	<b>Anexo 1: Listado de plásmidos .....</b>	<b>33</b>
<b>11</b>	<b>Anexo 2: Mapas de los plásmidos utilizados .....</b>	<b>34</b>
<b>12</b>	<b>Anexo 3: Eficiencias de transfección de distintos reactivos .....</b>	<b>35</b>

## 2 Abreviaturas

<b>APS</b>	Persulfato amónico
<b>aSyn</b>	$\alpha$ -Sinucleína
<b>ATG5</b>	Relacionado con la autofagia 5 (Gen)
<b>BSOCOES</b>	<i>Bis</i> [2-(succinimidiloxicarboniloxi)etil]sulfona
<b>DMEM</b>	Medio Eagle modificado de Dulbecco
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DPBS</b>	Tampón fosfato salido de Dulbecco
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>eGFP</b>	Proteína verde fluorescente mejorada
<b>EP</b>	Enfermedad de Parkinson
<b>FBS</b>	Suero fetal bovino
<b>GJ</b>	GeneJuice
<b>Gt</b>	Cabra
<b>IMDM</b>	Medio Dulbecco modificado de Iscove
<b>KO</b>	Knockout
<b>LB</b>	Medio de cultivo de Luria-Bertani
<b>LF</b>	Lipofectamina
<b>MEM</b>	Medio mínimo esencial
<b>mRFP</b>	Proteína roja fluorescente monomérica
<b>Ms</b>	Ratón
<b>NAC</b>	Componente no $\beta$ -amiloide
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PFA</b>	Paraformaldehído
<b>PVDF</b>	Fluoruro de polivinilideno
<b>Rb</b>	Conejo
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>RT</b>	Temperatura ambiente
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
<b>TEMED</b>	Tetrametiletildiamina
<b>Tris</b>	Tris(hidroximetil)aminometano
<b>Tween-20</b>	Monolaurato de polioxietilen-20-sorbitano (polisorbato 20)
<b>VF</b>	ViaFect
<b>WB</b>	Western Blot
<b>WT</b>	Silvestre

### 3 Resumen

La enfermedad de Parkinson (EP) es una enfermedad neurodegenerativa que afecta al 1 % de la población de más de 65 años, lo que la convierte en la segunda enfermedad neurodegenerativa con mayor prevalencia del mundo. Se caracteriza por la pérdida de las neuronas dopaminérgicas en el sistema estriado de la *substancia nigra* y los cuerpos de Lewy, agregados proteicos citoplasmáticos que se componen mayoritariamente de  $\alpha$ -sinucleína (aSyn), una pequeña proteína altamente cargada que se expresa principalmente en neuronas. Todavía no se conocen con exactitud las funciones de la aSyn, pero los datos sugieren que participa en las conexiones sinápticas y la regulación de la síntesis de dopamina. Numerosos estudios relacionan, además, las alteraciones en el tráfico de vesículas con la EP, especialmente las que afectan a la autofagia, un mecanismo celular de degradación de componentes citosólicos infecciosos, disfuncionales o innecesarios. En el presente trabajo se utilizan modelos celulares para estudiar el papel de la autofagia en los procesos de agregación de aSyn. Para ello se emplearon dos variantes de la línea celular HAP-1: la variante silvestre y una deficiente en una proteína, ATG5, necesaria para la formación de la membrana de los autofagosomas. Mediante transfecciones transitorias se sobreexpresaron las proteínas aSyn, tau y p62, estando estas dos últimas implicadas en el transporte axonal y la autofagia selectiva, respectivamente. Se estudió la localización subcelular de las proteínas sobreexpresadas, así como su interacción mediante microscopía de fluorescencia, cross-linking y Western Blot. Se demostró la interacción de p62 con aSyn, pero no se evidenció la interacción entre tau y aSyn ni entre tau y p62. También se demostró la relación de la autofagia con la supervivencia de las células que sobreexpresan aSyn, aunque no se pudo detallar el proceso.

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disease that affects 1 % of the population above 65 years old, this turns it into the second most prevalent neurodegenerative disease worldwide. It is characterized by the loss of dopaminergic neurons of the *substantia nigra-striatum* system and Lewy Bodies, cytoplasmic proteinaceous aggregates mostly composed of  $\alpha$ -synuclein (aSyn), a small highly charged protein expressed mainly in neurons. The exact functions of aSyn are still unknown, but data suggest that it is related to synaptic connexions and regulation of dopamine homeostasis. Numerous studies establish a relationship between vesicle trafficking abnormalities and PD, especially the ones affecting autophagy, a mechanism that allows cells to degrade infectious, dysfunctional, or unnecessary cytosolic components. In this work, we studied the role of autophagy in the aSyn aggregation processes using cellular models. We worked with two variants of the cell line HAP-1: the wild type variant and one lacking a protein, ATG5, necessary for autophagosomal membrane formation. aSyn, tau -a protein related to axonal transportation- and p62 -a protein involved in selective autophagy process- proteins were overexpressed using transient transfections. The subcellular localization of overexpressed proteins was studied, as well as their interactions, using fluorescence microscopy, cross-linking, and Western Blot. The interaction between p62 and aSyn was proved. However, interaction between tau and aSyn and between tau and p62 was not demonstrated. The relationship between autophagy and aSyn overexpressing cell viability was evidenced, even though the process could not be detailed.

## 4 Introducción

### 4.1 La enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) es una enfermedad neurodegenerativa que afecta al 1 % de la población de más de 65 años, lo que la convierte en la segunda enfermedad neurodegenerativa con mayor prevalencia del mundo.<sup>1</sup> Sus síntomas pueden dividirse en motores (rigidez, temblor) y no motores (depresión, apatía), de los cuales, los no motores son los primeros en aparecer.<sup>2</sup> La EP se caracteriza por la pérdida de las neuronas dopaminérgicas en el sistema estriado de la *sustancia nigra* y la aparición de agregados proteicos citoplasmáticos llamados cuerpos de Lewy. Estos agregados están formados por distintos componentes, siendo la  $\alpha$ -sinucleína (aSyn) el mayoritario. Es por esto que la EP se clasifica, junto con otras enfermedades como la demencia con cuerpos de Lewy, como una  $\alpha$ -sinucleinopatía.<sup>3</sup>

La etiología de la EP tan solo se conoce parcialmente y se cree que es multifactorial, es decir, que responde a factores tanto genéticos como ambientales, aunque solamente se han identificado factores genéticos en un 10 % de los casos. No obstante, la aSyn ha demostrado jugar un importante papel en el desarrollo de esta enfermedad.<sup>4</sup>

### 4.2 La autofagia

La autofagia es un mecanismo mediante el cual las células son capaces de degradar componentes intracelulares como agentes infecciosos, macromoléculas u orgánulos disfuncionales o innecesarios. Las aplicaciones de la autofagia son tan variadas que existen tipos de autofagia especializados en dianas concretas: mitofagia (mitocondrias), lipofagia (gotas lipídicas), xenofagia (patógenos), etc. De manera generalista podemos hablar de que la autofagia tiene dos funciones. Por un lado, sirve como mecanismo de control de calidad que, en condiciones de homeostasis, degrada proteínas y orgánulos defectuosos y los recicla en forma de precursores moleculares y energía. Por otro, puede actuar como mecanismo de supervivencia al ser inducida en situaciones de estrés, por ejemplo, como respuesta a la falta de nutrientes.<sup>5,6</sup>

El proceso por el cual se lleva a cabo la autofagia es una secuencia de múltiples pasos que se pueden resumir en: inducción de la autofagia, nucleación de la estructura del fagóforo alrededor de los componentes a degradar, maduración del autofagosoma, fusión del autofagosoma con un lisosoma, degradación del contenido por las hidrolasas ácidas del lisosoma y liberación de los nutrientes al citoplasma para su reutilización en procesos metabólicos. En la Figura 1 se representa la formación de un autofagolisosoma o autolisosoma. Al ser un proceso tan complejo, la autofagia depende de la formación de diversos complejos proteicos clave. Algunas de las proteínas efectoras identificadas están codificadas en una familia de genes clave llamados ATG (Genes relacionados con la autofagia).<sup>5</sup>

Las alteraciones en el proceso de la autofagia y en la expresión de las proteínas que la regulan han demostrado guardar relación con numerosas patologías, entre ellas la neurodegeneración. Concretamente en la EP se ha demostrado que las neuronas de los pacientes no solo son incapaces de degradar correctamente los agregados proteicos, sino que tampoco pueden eliminar las mitocondrias disfuncionales de forma eficiente.<sup>7</sup>

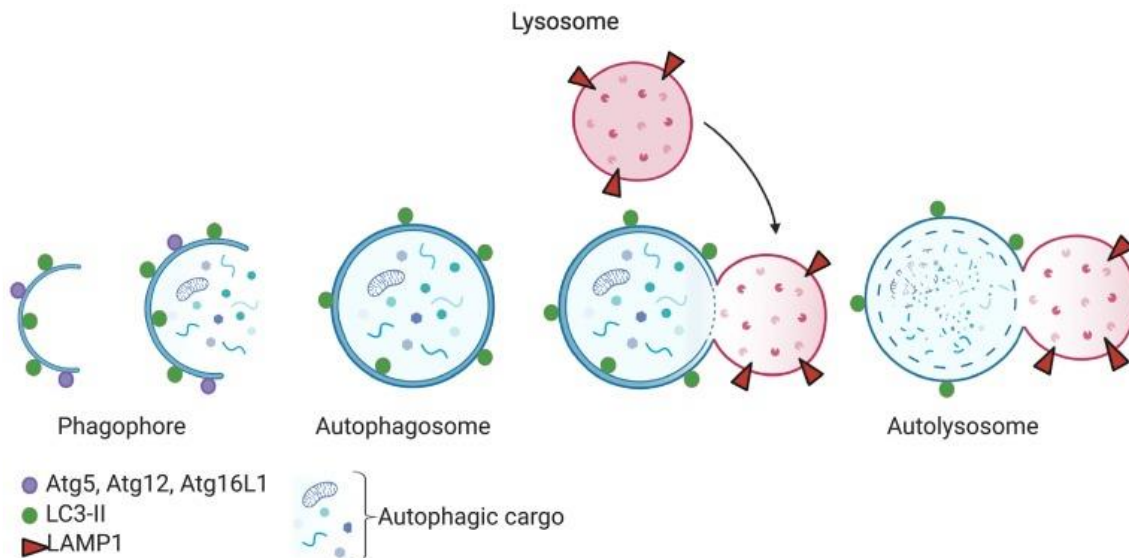


Figura 1. Representación del proceso de formación de un autofagolisosoma. Se resaltan algunas de las proteínas implicadas en la formación de las membranas (Imagen tomada de Fleming et al (2020)).

### 4.3 $\alpha$ -Sinucleína

La  $\alpha$ -sinucleína (aSyn) pertenece, junto con la  $\beta$ -sinucleína y la  $\gamma$ -sinucleína, a la familia de las sinucleínas, pequeñas proteínas altamente cargadas que son expresadas predominantemente en neuronas. Aunque las tres proteínas tienen secuencias similares, parece que la aSyn es la única relacionada con la EP.<sup>8,9</sup>

#### 4.3.1 Estructura de la aSyn

La aSyn está formada por 140 aminoácidos y en medio acuoso presenta una estructura primaria intrínsecamente desordenada. Sin embargo, como resultado de la interacción con determinados ligandos y proteínas, puede modificar su conformación formando hélices  $\alpha$ . La aSyn se puede dividir en tres regiones que aparecen representadas en la Figura 2. El dominio amino-terminal (residuos 1-65) es una región anfipática capaz de adoptar la conformación de hélice  $\alpha$ . La unión de este dominio a fosfolípidos promueve el plegamiento de la proteína y ha demostrado acelerar su agregación, lo que parece estar relacionado con su papel en las enfermedades neurodegenerativas. Los residuos 66-95 constituyen el dominio central, conocido como el “componente no  $\beta$ -amiloide” (NAC), que tiene la capacidad de adoptar la conformación de lámina  $\beta$ . Se trata de una región hidrofóbica también relacionada con otras enfermedades neurodegenerativas, ya que es el segundo componente mayoritario de las placas amiloides formadas en el cerebro de pacientes con la enfermedad de Alzheimer. Por último, el dominio carboxilo-terminal formado por los residuos 96-140, la mayor parte de los cuales son aminoácidos ácidos, por lo que presenta una elevada carga negativa. A diferencia de los otros dos, este dominio no es capaz de adoptar ninguna conformación y presenta una elevada variación entre especies.<sup>8,10</sup>



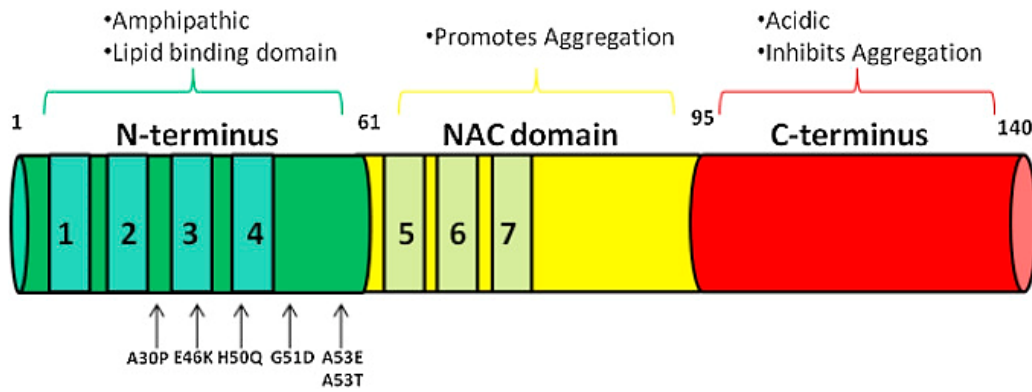


Figura 2. Representación esquemática de la estructura de la aSyn. Se indican sus dominios principales con algunas de sus características. También aparecen indicadas algunas de las mutaciones relacionadas con la EP. (Imagen tomada de Butler et al (2017)).

#### 4.3.2 Función de la aSyn

Cabe destacar que las funciones que desempeña la aSyn todavía no se conocen con exactitud. La aSyn se expresa también en otros tejidos, pero se encuentra mayoritariamente en células nerviosas, tanto del sistema nervioso central como del periférico. Dentro de las neuronas se acumula preferentemente en los terminales nerviosos, por lo que parece estar relacionada con los procesos presinápticos, aunque no es imprescindible para la sinapsis.<sup>11</sup> Los estudios sugieren que participa en varias etapas del ciclo de las vesículas sinápticas, modulando el número, la movilización y la endocitosis de las mismas. Para ello la aSyn debe interactuar con los fosfolípidos de las membranas y multimerizar, por lo que se cree que existe un equilibrio entre la forma monomérica de la aSyn citosólica y la multimerizada. Tanto la interacción con los fosfolípidos como la multimerización de la aSyn dependen de su dominio amino-terminal, por lo que no es de extrañar que todas las mutaciones conocidas relacionadas con la EP se encuentren en dicha región, como se indica en la Figura 2.<sup>10</sup>

La aSyn puede ser fosforilada por quinasas endógenas en la posición S129. Esto ocurre en condiciones fisiológicas en un pequeño porcentaje de aSyn, pero se ha observado que alrededor del 90 % de la aSyn que forma los cuerpos de Lewy está fosforilada en dicha posición. Aunque todavía se desconoce su papel en la patogénesis de la EP, hay estudios que sugieren que la fosforilación de la aSyn reduce su citotoxicidad.<sup>12</sup>

Por último, los datos sugieren que aSyn participa en la regulación de la síntesis de dopamina en las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra*. El metabolismo de la dopamina en estas neuronas se caracteriza por la producción de especies químicas altamente reactivas, como las ROS (especies reactivas de oxígeno). Parece que aSyn inhibe la síntesis de dopamina, por lo que la reducción de la actividad de aSyn debida a su agregación o a su menor expresión podría alterar la homeostasis de la dopamina y disminuir la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas.<sup>8</sup>

#### 4.3.3 aSyn y autofagia

Los defectos en el tráfico de vesículas, particularmente aquellos en el sistema autofagolisosomal, se han relacionado de forma reiterada con la patogénesis de la EP y demás sinucleinopatías. Se ha observado que la aSyn puede ser degradada tanto por el proteasoma como por autofagia. Sin embargo, las formas patogénicas de la aSyn, como los mutantes indicados en la Figura 2, no solo no son degradadas de forma eficiente por estos mecanismos, sino que los bloquean, inhibiendo su propia degradación y la de otras proteínas citosólicas. Por

ejemplo, estudios en animales transgénicos con aSyn humana han documentado alteraciones en el flujo autofagosómico y en la morfología de los autofagosomas y lisosomas de las neuronas.<sup>1,13,14</sup>

## 4.4 Tau y p62

### 4.4.1 *Tau*

La proteína tau se ha relacionado con diversas enfermedades neurodegenerativas debidas al mal plegamiento de la misma, conocidas como taupatías, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer. Tau se concentra en los axones de las neuronas, donde participa en el transporte axonal al estabilizar los microtúbulos por medio de la interacción con la tubulina, aunque también tiene otras funciones, algunas relacionadas con las membranas lipídicas. Los cambios en su estructura o conformación provocan que tau se disocie de los microtúbulos y forme agregados. Estos oligómeros presentan, además, un comportamiento priónico, ya que inducen el mal plegamiento y la agregación de otras proteínas tau nativas a lo largo de la sinapsis. Los microtúbulos sin tau se desestabilizan y se disgregan, lo que afecta al transporte y da lugar a las taupatías.<sup>15,16</sup> Aunque todavía existe controversia sobre la relación entre la expresión de tau y aSyn, sí se han encontrado anomalías en la expresión de estas proteínas fosforiladas en pacientes de EP y parálisis progresiva supranuclear.<sup>17</sup>

### 4.4.2 *p62*

p62 es uno de los componentes de los cuerpos de Lewy, así como de otros agregados proteicos presentes en otras enfermedades neurodegenerativas como los ovillos neurofibrilares de la enfermedad de Alzheimer.<sup>18</sup> Se trata de una proteína implicada en la autofagia selectiva, concretamente juega el papel de proteína adaptadora. Para ello interacciona con las proteínas que marcan los orgánulos o componentes celulares defectuosos para su degradación. p62 contiene un dominio de interacción con LC3, una proteína que contribuye al cerramiento de la membrana del autofagosoma. De esta forma el autofagosoma se construye selectivamente alrededor del sustrato seleccionado.<sup>19</sup>

## 5 Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es el estudio del papel de la autofagia en la agregación inicial de aSyn mal plegada utilizando modelos celulares. Para ello utilizaremos dos variantes de la línea celular HAP-1 (disponible comercialmente): HAP-1 silvestre (Wild Type, WT) y HAP-1 deficiente específicamente en autofagia (ATG5<sup>-</sup>) debido a la inactivación de la proteína ATG5, necesaria para la formación de la membrana del autofagosoma.

Este objetivo general se ha dividido en 5 más específicos:

- \* Sobreexpresión de proteínas (aSyn, tau y p62) mediante transfecciones transitorias.
- \* Determinación de la formación de agregados proteicos que contengan aSyn, tau y p62 mediante microscopía de fluorescencia utilizando proteínas de fusión a proteínas fluorescentes y mediante experimentos de Western Blot y cross-linking.
- \* Estudios de la autofagia utilizando DAPGreen como marcador de los autofagosomas.
- \* Estudio de la localización subcelular de proteínas transfectadas (aSyn, tau y p62).
- \* Estudio de las diferencias fisiológicas dependientes de la capacidad de realizar la autofagia: viabilidad y morfología.

## 6 Materiales y métodos

### 6.1 Cultivos celulares

El trabajo con cultivos celulares se llevó a cabo en campanas de flujo laminar, que se esterilizaron antes y después de cada uso con etanol al 70 % y luz UV. El material utilizado se esterilizó en autoclave y/o con etanol al 70 %. Tanto los medios de cultivo como las disoluciones empleadas para lavar y tripsinizar las células se precalentaron antes de su uso en un baño termostatzado a 37 °C. El material en contacto con los cultivos celulares fue depositado en contenedores adecuados, autoclavado y procesado por empresas autorizadas.

#### 6.1.1 Líneas celulares

Para el presente trabajo de fin de grado se utilizaron células HAP-1, una línea celular humana casi haploide derivada de la línea de leucemia mieloide crónica KBM-7. Se trata de células adherentes con morfología similar a los fibroblastos.

Con el fin de estudiar las diferencias debidas exclusivamente a la autofagia se trabajó paralelamente con dos tipos de células a las que se dio siempre el mismo tratamiento teniendo especial cuidado para evitar contaminaciones entre ellas.

- \* Wild Type (WT): Células HAP-1 no modificadas genéticamente.
- \* Knockout (ATG5<sup>-</sup>): Células HAP-1 modificadas genéticamente para inactivar el gen que codifica la proteína ATG5 y hacerlas deficientes específicamente en autofagia.

Adicionalmente se utilizaron cultivos de células procariotas de *Escherichia coli* para la amplificación de los plásmidos utilizados para las transfecciones. El procedimiento se describe en el apartado 6.2.

#### 6.1.2 Mantenimiento de los cultivos de células

Al ser células adherentes se crecieron en frascos T de 25 o 75 cm<sup>2</sup> (T25 y T75 respectivamente) y se incubaron a 37 °C en una atmósfera húmeda rica en CO<sub>2</sub> (5 %). El medio empleado fue IMDM (GIBCO™), especialmente enriquecido con nutrientes adicionales para cultivos de rápida proliferación y elevada densidad; que se suplementó, además, con 2 mM L-glutamina, 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomina y 10 % FBS (PAN Biotech).

Los pases se realizaron cada 3 o 4 días en función de la densidad del cultivo. El procedimiento seguido consistió en retirar el medio de cultivo, realizar un lavado con DPBS 1X (2,7 mM KCl, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 10 mg/L rojo fenol) y añadir 2 (T25) o 4 mL (T75) de Tripsina-EDTA para romper proteínas de adhesión celular. Las células se incubaron con tripsina durante 5 minutos a 37 °C y, una vez se habían desprendido de la superficie del frasco, se resuspendieron y se tomó la cantidad necesaria para sembrar en un nuevo frasco con 5 (T25) o 15 (T75) mL de medio. La dilución habitual fue (1:15).

#### 6.1.3 Descongelación de células

Para llevar a cabo la descongelación de células contenidas en crioviales se resuspendió el contenido de los mismos en 15 mL de IMDM completo para diluir el agente criopreservante (DMSO) y reducir sus efectos citotóxicos. La suspensión de células se centrifugó en un tubo tipo Falcon durante 5 minutos a 500 g. Se retiró el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 5 mL de medio completo, que luego fueron sembrados en un frasco T75 en el que previamente se habían añadido 10 mL de IMDM completo.

### 6.1.4 Congelación de células

Para la congelación en crioviales se tripsinizaron las células y se añadió medio suficiente para neutralizar la tripsina. En un Falcon se centrifugaron durante 5 minutos a 500 g, se retiró el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1,5 mL de IMDM completo con 20 % de FBS. Después se añadieron lentamente 1,5 mL de IMDM completo con un 20 % de FBS y un 20 % de DMSO, de tal forma que la solución final estuviese al 20 % de FBS y al 10 % de DMSO. A cada criotubo se añadió 1 mL de la suspensión y se colocaron en un contenedor con isopropanol durante 24 horas a -80 °C (permite que la temperatura disminuya gradualmente al ritmo de 1 °C/min hasta -80 °C). Por último, se almacenaron en nitrógeno líquido (-196 °C).

### 6.1.5 Recuento celular

El conteo de las células se realizó con un hemocitómetro o cámara de Neubauer (MARIENFELD, Germany). En función del experimento se utilizó o no azul tripán para distinguir las células muertas de las vivas (las vivas excluyen el colorante). Para ello se mezclaron 20  $\mu$ L de azul tripán 0,4 % con 20  $\mu$ L de suspensión celular.

### 6.1.6 Siembra en placa

Previamente a la siembra de las placas se contaron las células y se añadió el volumen de suspensión celular necesario a un volumen adecuado de medio completo para sembrar los pocillos a la densidad deseada.

#### 6.1.6.1 Placa de 24 pocillos

Se utilizaron placas de plástico con 24 pocillos de 2 cm<sup>2</sup> de superficie cada uno, a los que se añadieron 500  $\mu$ L de medio con células por pocillo. Dependiendo del experimento, la siembra se realizó directamente sobre el fondo del pocillo o sobre un cubreobjetos de vidrio. En este último caso cada cubreobjetos se esterilizó con etanol al 70 %, se colocó en el pocillo y se lavó tres veces con 500  $\mu$ L de DPBS para eliminar el etanol antes de la siembra.

#### 6.1.6.2 Placas de canales

Para la siembra en placas de canales ( $\mu$ -Slide VI 0.4, IBIDI®) se tomaron 35  $\mu$ L de suspensión celular y se sembraron directamente a través de uno de los pocillos hasta llenar el canal, luego se añadió alternadamente el medio completo a los pocillos de cada lado del canal (60  $\mu$ L/pocillo) en alícuotas de 20  $\mu$ L para evitar arrastrar las células fuera del canal. Los pocillos se llenaron al máximo para reducir la evaporación. En la Figura 3 se muestra un esquema de la placa utilizada.

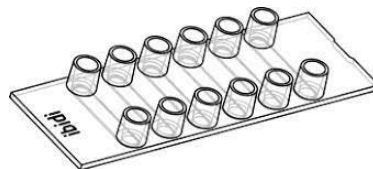


Figura 3. Esquema de una placa de canales  $\mu$ -Slide VI 0.4, IBIDI®.

### 6.1.7 Fijación de las células con paraformaldehído

La preservación de las células para su posterior visualización en el microscopio se llevó a cabo mediante la fijación de las mismas con paraformaldehído (PFA) al cubreobjetos o al fondo del pocillo, dependiendo de dónde se hubieran crecido. Cabe destacar que todos los pasos en los que se retire o añada un volumen a las células deben realizarse lentamente con cuidado de no dañarlas o arrastrarlas para que la preservación morfológica sea lo más fiel posible. Después de retirar el medio se lavó con DPBS y se añadieron 500  $\mu$ L de PFA al 4 % en PBS (ChemCruz™)

(10 mM tampón fosfato, 2,7 mM KCl, 137 mM NaCl y 1,76 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) a cada pocillo (placa de 24). Se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente, se retiró el PFA y se lavó una vez con DPBS 1X para luego guardar las placas con DPBS 1X en la nevera a 4 °C.

Antes de observar con el microscopio las células fijadas a los cubreobjetos, estos se colocaron sobre un portaobjetos con una gota de Diamond Antifade Mountant (ProLong™) con las células entre el portaobjetos y el cubreobjetos.

### 6.1.8 Tinción con marcadores fluorescentes

El procedimiento seguido para la tinción de orgánulos celulares con marcadores fluorescentes consistió en añadir a los pocillos (placa de 24 o de canales) el volumen de disolución de fluorocromo requerido para obtener la concentración de trabajo en el medio del pocillo preparando, si fuera necesario, una disolución intermedia. Se dejó incubar el tiempo indicado en la Tabla 1 y se observó con el microscopio de fluorescencia o se fijaron las células.

Fluorocromo	Orgánulo	Concentración de trabajo	Incubación	Longitud de onda de excitación	Longitud de onda de emisión
<b>Hoechst 33342</b>	Núcleo	0,5 ng/mL	25 min. a 37 °C	352 nm	461 nm
<b>Mitotracker Red CMXRos</b>	Mitocondria	50 nM	30 min. a 37 °C	579 nm	599 nm
<b>ER Tracker™ Green (BODIPY)</b>	Retículo endoplásmico	200 nM	15-30 min. a 37 °C	504 nm	511 nm
<b>DAPGreen</b>	Autofagosoma	0,1 µM	30 min. a 37 °C	425-475 nm	500-560 nm

Tabla 1. Resumen de los nombres, el orgánulo marcado, la concentración de trabajo, el tiempo de incubación y las longitudes de onda de absorción y emisión de los marcadores fluorescentes utilizados.

## 6.2 Preparación y verificación de los plásmidos

Los plásmidos utilizados para la realización de este trabajo se recogen en la Tabla 8 en el Anexo 1, pero el único que fue preparado por este procedimiento como parte de este trabajo fue pJAC321, para los demás se utilizó el stock disponible en el laboratorio.

La amplificación de los plásmidos se realizó con cultivos de *Escherichia coli* crecidos en 5 o 10 mL de medio LB/Ampicilina (100 µg/mL) e incubados a 37 °C y 220 rpm durante la noche previa a la purificación.

Para la extracción y el aislamiento de los plásmidos se utilizó el kit NZYMiniprep (Nzytech), que sirve para la purificación a pequeña escala de plásmidos con un alto grado de pureza, y se siguió el procedimiento facilitado por la empresa, al que se le aplicaron las siguientes modificaciones: tras la adición de 500 µL de Buffer AY en la columna se centrifugó durante 2 minutos y para eluir el DNA se añadieron 30 µL de agua Milli-Q® en el centro de la membrana, se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó durante 2 minutos a 11000 g.

La concentración y pureza de los plásmidos se midió utilizando un espectrofotómetro DS-11 (DeNovix®) que proporciona directamente el valor de la concentración en ng/ $\mu$ L. Para ello se tomaron 2  $\mu$ L de muestra y se midió su absorbancia a distintas longitudes de onda.

Sabiendo que el máximo de absorbancia de los ácidos nucleicos corresponde a 260 nm y el de las proteínas, a 280 nm, la concentración del DNA se determina mediante la ley de Lambert-Beer a partir del valor de la absorbancia a 260 nm; mientras que la pureza viene indicada por el cociente Abs(260)/Abs(280), que debe estar entre 1,8 y 2,0.

Para la verificación del plásmido purificado se realizó una digestión con enzimas de restricción utilizando pJAC295 como control, ya que es el plásmido del que proviene pJAC321. Las enzimas utilizadas y los fragmentos resultantes se resumen en la Tabla 2. La digestión se llevó a cabo con 0,4  $\mu$ L de enzima y los fragmentos se separaron mediante una electroforesis en gel de agarosa 1 % a voltaje constante (90 V) cargando 10  $\mu$ L por pocillo.

Plásmido	Enzimas de restricción	Tamaños de los fragmentos resultantes (pb)
pJAC295	PstI FastDigest (ThermoFisher)	668, 1212, 2665
pJAC321	PstI FastDigest (ThermoFisher)	1212, 994, 2665

Tabla 2. Verificación por digestión de los plásmidos purificados.

Los plásmidos purificados se guardaron a -20 °C hasta su uso.

### 6.3 Transfecciones

Con el objetivo de sobreexpresar proteínas de interés, las células se transfectaron con los plásmidos indicados en el apartado 6.2. Todas las transfecciones se llevaron a cabo mediante métodos químicos utilizando los reactivos indicados en la Tabla 3.

Para que las células a transfectar estuvieran a la densidad adecuada (40-80 %) se sembraron en la placa con 24 horas de antelación. Pasado ese tiempo se preparó la mezcla de DNA y reactivo de transfección siguiendo el procedimiento facilitado por cada casa comercial y con las cantidades y proporciones indicadas en la Tabla 3. El medio utilizado en todos los casos para preparar la mezcla fue Opti-MEM® (GIBCO™), un medio reducido en suero especial para transfecciones con reactivos lipídicos catiónicos. Las células se observaron con el microscopio de fluorescencia a las 24 y 48 horas de la transfección.

Reactivo	Ratio (DNA:reactivo)	Cantidad de DNA ( $\mu$ g)	Tipo de reactivo
Gene Juice® (Novagen®)	(1:3) (1:4) (1:6)	0,25 y 0,5	Proteico
ViaFect™ (Promega)	(1:3)	0,5	Catiónico
TransIT®-2020 (Mirus™)	(1:3)	0,5	Lipídico
Lipofectamina 2000™ (Invitrogen™)	(1:3)	0,8	Lipídico
Lipofectamina 3000™ (Invitrogen™)	(1:1,5) (1:3)	1	Lipídico

Tabla 3. Resumen de los nombres, ratios (DNA ( $\mu$ g):reactivo ( $\mu$ L)), cantidades de DNA ( $\mu$ g) y naturaleza de los reactivos utilizados para las transfecciones.

También se realizaron cotransfecciones con 2 plásmidos distintos para estudiar la interacción entre las dos proteínas. En este caso el procedimiento fue el mismo que para las transfecciones simples con la excepción de que todas se realizaron utilizando Gene Juice® con 0,25 µg de DNA de cada plásmido (0,5 µg de DNA total) y un ratio (DNA:GJ) de (1:4). Las combinaciones utilizadas fueron:

- \* pJAC321 + pJAC318: mRFP-aSyn + EGFP-Tau
- \* pJAC333 + pJAC318: mCherry-p62 + EGFP-Tau
- \* pJAC332 + pJAC333: EGFP-aSyn + mCherry-p62

## 6.4 Western Blot

Para el estudio de las proteínas de interés sobreexpresadas se utilizó la técnica de Western Blot, que permite la separación y el estudio de proteínas específicas a partir de mezclas proteicas complejas. Primero se realiza una electroforesis desnaturizante para separar las proteínas en función del criterio elegido, en este caso, su tamaño. Una vez separadas, las proteínas se transfieren del gel a una membrana para facilitar la detección de las proteínas mediante anticuerpos. La membrana es incubada con un anticuerpo llamado “anticuerpo primario” que se une específicamente a la proteína elegida, para que la especificidad sea máxima es necesario bloquear la membrana con anterioridad. A continuación, se trata con un “anticuerpo secundario” que reconoce específicamente una región del anticuerpo primario y se une a él. El anticuerpo secundario está marcado para facilitar la detección de las bandas de proteína, es decir, el revelado de la membrana. En este trabajo se han utilizado anticuerpos secundarios marcados con fluorocromos y con enzimas que catalizan reacciones quimioluminiscentes.

El equipo de Western Blot que se empleó fue Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad).

### 6.4.1 Extracción de proteínas y cross-linking

Para extraer las proteínas de interés sobreexpresadas en los cultivos se levantaron las células mediante tripsinización, luego se añadió medio completo suficiente para inactivar la tripsina y se centrifugaron durante 1 minuto a 3000 g. Se retiró el sobrenadante y el pellet se lavó 2 veces con PBS 1X. Después del último lavado el pellet se resuspendió en PBS 1X.

Para saber si las proteínas sobreexpresadas colocalizan en el interior de las células, la mitad de la suspensión celular en PBS 1X se trató con el cross-linker BSOCOES (Pierce Biotechnology), un agente bifuncional que forma enlaces covalentes entre moléculas con aminas primarias. Para ello se preparó una disolución de BSOCOES 20 mM en DMSO, de la cual se añadieron 10 µL a cada muestra para una concentración final de 2 mM y se incubaron 2 horas en agitación constante a 4 °C. Después se adicionaron 5 µL de Quenching Solution (Tris-HCl 1 M, pH 7,5) y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos.

Finalmente, todas las muestras se centrifugaron 1 minuto a 6000 rpm, se retiró el sobrenadante, se resuspendieron en 50 µL de SDS Loading Buffer 1X y se hirvieron 5 minutos a 100 °C. Luego se guardaron a -80 °C o se cargaron en el gel de electroforesis.

### 6.4.2 Electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE)

Para la electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) se prepararon los geles de acrilamida mezclando los reactivos recogidos en la Tabla 4 en las cantidades y el orden indicados. Primero se preparó el gel separador (running gel; la concentración de acrilamida depende del tamaño de



las proteínas que se quieren separar) y se vertió en el molde. Se utilizó *t*-butanol saturado en agua para eliminar el menisco. Una vez polimerizado el running gel se lavó el *t*-butanol con agua destilada y se añadió el gel concentrador (stacking gel; 4 % acrilamida). Finalmente se colocó el peine para dar forma a los pocillos y se incubó a temperatura ambiente hasta que la acrilamida polimerizó.

Orden	Running Gel (10 %)		Stacking Gel (4 %)	
	Reactivo	Volumen	Reactivo	Volumen
1º	Agua desionizada	4,84 mL	Agua desionizada	3,8 mL
2º	Acrilamida 40 %	2,5 mL	Acrilamida 40 %	500 µL
3º	Tris 1,5 M, pH 8,8	2,5 mL	Tris 1,5 M, pH 6,8	625 µL
4º	SDS 20 %	50 µL	SDS 20 %	25 µL
5º	APS 10 %	100 µL	APS 10 %	50 µL
6º	TEMED	10 µL	TEMED	5 µL

Tabla 4. Reactivos y volumen de los mismos necesario para la preparación de SDS PAGE con un running gel al 10 % y un stacking gel al 4 %, así como el orden a seguir. Cantidades para la preparación de dos geles.

Para colocar las muestras se retiró el peine y se cargaron 10 µL por pocillo. El marcador de masa molecular utilizado fue PageRuler™ Prestained Protein Ladder 10-180 kDa (Thermo Scientific) y se diluyó a 30 µL con SDS Loading Buffer 1X para que tuviese el mismo volumen que las muestras, de manera que al poner 10 µL de la dilución, se cargaran 5-7 µL de marcador.

Las electroforesis se llevaron a cabo utilizando un tampón de electroforesis desnaturante de composición 0,38 M Glicina, 25 mM Tris-Base y 1 g/L SDS (pH 6,8). Se realizaron a voltaje constante (120 V) durante 90 minutos.

#### 6.4.3 Transferencia

Una vez terminada la electroforesis, las proteínas del gel se transfirieron a una membrana mediante una electrotransferencia. Se emplearon membranas de PVDF Immobilon-FL e Immobilon-P (Merck) en función del experimento. Las membranas se activaron primero con metanol y luego se lavaron con tampón de transferencia (0,38 M Glicina, 25 mM Tris-Base y 20 % metanol). La transferencia se realizó a amperaje constante (200 A) durante 90 minutos a 4 °C. Después se bloquearon las membranas en agitación constante durante 30 minutos con 10 mL de una disolución de caseína 1 % obtenida a partir de leche desnatada en polvo disuelta en TBST 1X (20 mM Tris-Base, 150 mM NaCl y 0,1 % Tween-20, pH 7,6).

#### 6.4.4 Incubación con anticuerpos y revelado

Las membranas se incubaron durante al menos 1 hora a temperatura ambiente y con agitación constante con las disoluciones de los anticuerpos primarios en caseína 1 % indicadas en la Tabla 5. Seguidamente se retiró el anticuerpo primario y se lavó durante 5 minutos con TBST 1X 3 veces. Después de retirar el TBST 1X del último lavado se incubó durante otra hora en las mismas condiciones con la disolución en caseína 1 % del anticuerpo secundario adecuado de los recogidos en la Tabla 6. Se lavó de nuevo 3 veces durante 5 minutos con TBST 1X y se visualizaron las membranas con el equipo ChemiDoc (BioRad) por quimioluminiscencia o fluorescencia, en función del experimento. En el primer caso el revelado de la membrana se realizó con el reactivo SuperSignal™ West Pico Plus (Thermo Scientific), se añadieron los dos reactivos (peroxidasa y luminol) y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente en oscuridad antes de visualizar la membrana; mientras que con anticuerpos fluorescentes se visualizó

directamente con los filtros de fluorescencia adecuados para los fluorocromos Alexa 488 y Alexa 647.

Anticuerpo primario	Compañía	Referencia	Hospedador	Dilución
<b>aSynuclein 211</b>	Santa Cruz	sc-12767	Ratón	(1:5000)
<b>Tau</b>	Abcam	ab76128	Conejo	(1:10000)
<b>Anti p62</b>	Abcam	ab109012	Conejo	(1:15000)
<b>Anti-ATG5</b>	Abcam	ab108327	Conejo	(1:10000)

Tabla 5. Resumen con los nombres, la compañía, la referencia, el hospedador y la dilución de los anticuerpos primarios utilizados para el Western Blot.

Anticuerpo secundario	Compañía	Referencia	Hospedador	Dilución	Marcaje
<b>Gt x Rb IgG (H+L) Alexa 488</b>	Invitrogen	A32731	Cabra	(1:10000)	Fluorescencia (emisión a 488 nm)
<b>Rb x Ms IgG (H+L) Alexa 647</b>	Invitrogen	A21236	Conejo	(1:10000)	Fluorescencia (emisión a 647 nm)
<b>Gt x Rb IgG (H+L) HRP</b>	Millipore	AP307P	Cabra	(1:10000)	Quimioluminiscencia
<b>Rb x Ms IgG (H+L) HRP</b>	Millipore	AP160P	Conejo	(1:10000)	Quimioluminiscencia

Tabla 6. Resumen con los nombres, la compañía, la referencia, el hospedador, la dilución y el marcaje de los anticuerpos secundarios utilizados para el Western Blot.

## 6.5 Microscopía

El microscopio utilizado para el mantenimiento y el conteo de las células fue el microscopio invertido AE20 (Motic).

Para la visualización de las células después de las transfecciones y la tinción con fluorocromos se empleó el microscopio LEICA DMI6000B. Además del campo claro se utilizaron también los filtros de fluorescencia resumidos en la Tabla 7. Los experimentos *in vivo* se llevaron a cabo en este microscopio, ya que consta de una cámara que permite mantener a las células a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> durante largos periodos de tiempo. Para ello se utilizó la función timelapse del software (MetaMorph® Microscopy Automation and Image Analysis Software), que permite programar la toma de imágenes en determinadas posiciones, planos y tiempos a diferentes longitudes de onda. El software también ofrece la posibilidad de procesar las imágenes y maquetar vídeos. Adicionalmente para la visualización y el procesamiento de las mismas fuera del microscopio se utilizó el software FIJI (Image J).

Filtro	Excitación	Dicroico	Emisión
<b>A4</b>	BP 360/40	400	BP 470/40
<b>GFP</b>	BP 470/40	500	BP 525/50
<b>TX2</b>	BP 560/40	595	BP 645/75

Tabla 7. Resumen de los filtros empleados para la microscopía de fluorescencia.

## 7 Resultados y discusión

### 7.1 Estudio de la morfología y viabilidad celular

Para determinar posibles diferencias morfológicas en las líneas celulares se llevó a cabo la tinción de los núcleos, las mitocondrias y el retículo endoplasmático de las células utilizando los fluorocromos recogidos en la Tabla 1. Para ello se realizaron las siguientes combinaciones:

- \* Hoechst 33342 + Mitotracker Red CMXRos
- \* Hoechst 33342 + ER Tracker Green
- \* Hoechst 33342 + Mitotracker Red CMXRos + ER Tracker Green.

Después del tiempo de incubación requerido, se observaron las células con el microscopio de fluorescencia y se tomaron fotografías. Algunas de las imágenes más representativas se muestran en la Figura 4. El retículo endoplasmático no se tiñó, seguramente por un error en la preparación de la disolución o quizás porque el reactivo era viejo, por lo que no se adjuntan imágenes de la combinación Hoechst 33342 + ER Tracker Green.

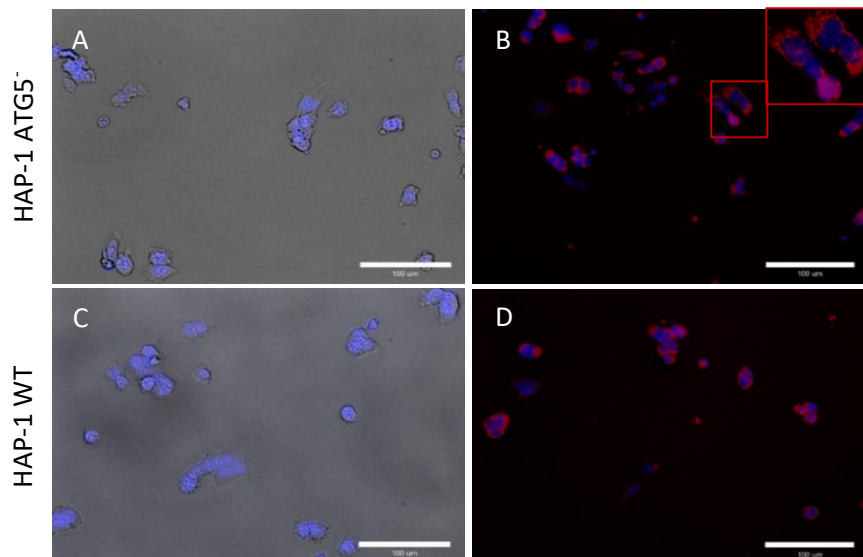


Figura 4. Ay B, HAP-1 ATG5<sup>-</sup>; C y D, HAP-1 WT; A y C muestran la combinación de campo claro y Hoechst 33342; B y D, Hoechst 33342 y Mitotracker Red CMXRos. En B se muestra en el inserto una ampliación de la zona encuadrada. Imágenes adquiridas a 200 aumentos. La barra de escala marca 100  $\mu$ m.

No se observaron diferencias morfológicas entre las células HAP-1 WT y las HAP-1ATG5<sup>-</sup> pero sí se encontraron diferencias en la viabilidad de los cultivos, siendo las KO menos resistentes y más propensas a la apoptosis.

### 7.2 Análisis mediante Western Blot de la expresión de proteínas

Se realizó un análisis por WB de dos muestras de células HAP-1 WT y ATG5<sup>-</sup> para comprobar la expresión de proteína ATG5 (33 kDa) en las WT y su ausencia en las ATG5<sup>-</sup>. En la

Figura 5 se puede ver una fotografía de la membrana después de la incubación con el anticuerpo Anti-ATG5 indicado en la Tabla 5 y el revelado. Aunque la proteína ATG5 tiene una masa molecular de 33 kDa aproximadamente, no se observa ninguna banda con tal masa, sino dos muy finas de entre 100 y 130 kDa, una en cada carril, una tercera banda muy intensa en el carril de las HAP-WT de cerca de 55 kDa y una cuarta en el mismo carril de aproximadamente 40 kDa, que seguramente se deba a la degradación de las proteínas debida al tratamiento de la

muestra. Sabiendo que, para poder desarrollar su función, la proteína ATG5 debe unirse covalentemente a la proteína ATG12 y que este complejo tiene una masa de 56 kDa, podemos deducir que la banda intensa corresponde al conjugado y demuestra, por tanto, la presencia de ATG5 en las células WT y su ausencia en las knockout (KO). Las otras bandas pueden deberse a la unión del anticuerpo con otras proteínas de la familia ATG, ya que tienen secuencias similares.

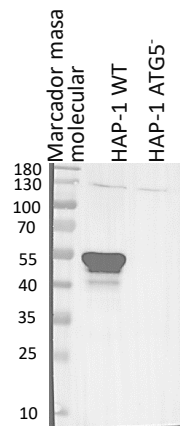


Figura 5. Western Blot para detectar ATG5. Se ha utilizado un anticuerpo Anti-ATG5 a una dilución 1:10000 con muestras de HAP-1 WT y HAP-1 ATG5<sup>-</sup> y se ha revelado utilizando un anticuerpo quimioluminiscente y el Chemidoc. A la izquierda se indican los tamaños de los marcadores de masa molecular en kDa.

## 7.3 Plásmidos y sobreexpresión de proteínas

### 7.3.1 Preparación de los plásmidos

En el presente trabajo se emplearon seis plásmidos para la sobreexpresión de proteínas en las células, de los cuales, uno se preparó mediante una miniprep (purificación de DNA a pequeña escala) mientras que para los demás se utilizó el stock del laboratorio. Cinco de ellos están contruidos de manera que la proteína de interés se exprese como proteína de fusión a una proteína fluorescente, EGFP (Proteína verde fluorescente mejorada), mRFP (Proteína roja fluorescente monomérica) o mCherry, para poder visualizarla con el microscopio de fluorescencia. El plásmido restante solo contenía la proteína fluorescente EGFP.

El plásmido pJAC295 (pCMV-Myc-mRFP-TM BclXL) se utilizó como control en la digestión con enzimas de restricción del plásmido preparado mediante una miniprep: pJAC321, puesto que este se construyó a partir de pJAC295 (un vector previamente generado en el laboratorio).

El plásmido pJAC318 (pRK5-EGFP-Tau (4R/ON)) se empleó en las transfecciones para la sobreexpresión de tau. Las células eucariotas transfectadas expresan tau como proteína de fusión con EGFP. El plásmido contiene, además, el gen de la proteína  $\beta$ -lactamasa para que las bacterias que lo expresen presenten resistencia a la ampicilina. De esta forma es posible la amplificación del plásmido en cultivos bacterianos, ya que permite la selección de las bacterias transfectadas al tratar el cultivo con dicho antibiótico.

El plásmido pJAC321 (C-myc-mRFP-Human alpha synuclein WT) se utilizó para la sobreexpresión de aSyn humana WT. En este caso la proteína fluorescente es mRFP, de manera que es posible la cotransfección con pJAC318 para la sobreexpresión simultánea de las dos proteínas, ya que ambas pueden visualizarse con el microscopio de fluorescencia a distintas longitudes de onda. Este plásmido también confiere a las bacterias resistencia a la ampicilina por medio del mismo gen que pJAC318.

El plásmido pJAC332 (EGFP-aS-WT), al igual que pJAC321, contiene el gen de aSyn humana WT. La diferencia radica en que en este caso es una proteína de fusión con EGFP, por lo que no se puede sobreexpresar junto con pJAC318, ya que ambas emitirían a la misma longitud de onda y sería imposible distinguirlas, pero sí con pJAC333. En este caso el antibiótico frente al que confiere resistencia es la kanamicina.

El plásmido pJAC333 (mCherry-p62) se empleó para la sobreexpresión de p62 como proteína de fusión con mCherry. Del mismo modo que pJAC332, confiere a las bacterias que lo expresan resistencia a la kanamicina.

Por último, el plásmido EGFP N1 (EGFP) se utilizó como control en la optimización de la transfección, pues sólo codifica la proteína fluorescente EGFP que no presenta citotoxicidad.

A continuación, se muestran los resultados de la digestión de pJAC295 y pJAC321 con la enzima de restricción PstI FastDigest (ThermoFisher). En la Figura 6 se muestra el gel de agarosa en el que se corrieron las muestras digeridas de pJAC321 y pJAC295 en los carriles 2 y 7 respectivamente, así como el marcador de masa molecular en el carril 1. En los carriles 3, 4, 5 y 6 se cargaron otros plásmidos ajenos a este proyecto para aprovechar la electroforesis.

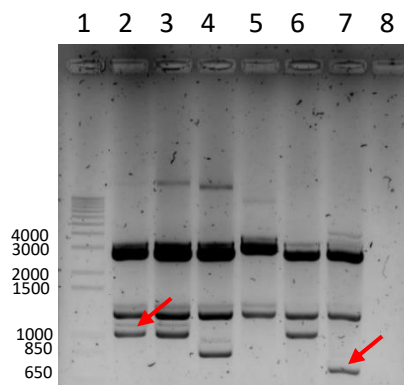


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa (1 %). En el gel se muestra la digestión de pJAC321 (carril 2) y la de pJAC295 (carril 7), ambas con PstI. Los carriles 3-6 muestran las digestiones de otros plásmidos ajenos a este trabajo. A la izquierda de las bandas del marcador de masa se indica el número de pares de bases al que corresponden. Las flechas señalan los fragmentos en los que se diferencian pJAC295 y pJAC321.

La digestión de los dos plásmidos genera 3 fragmentos para cada plásmido. Dos tienen el mismo tamaño para ambas muestras, mientras que el fragmento más pequeño es diferente en cada plásmido. Esto se debe a que el plásmido pJAC321 deriva de pJAC295: se sustituyó el fragmento del gen TM-BclXL de pJAC295 por el gen aSyn (WT) en pJAC321. Dado que PstI no corta los plásmidos en ninguno de estos genes, sólo se diferenciará en tamaño el fragmento que contenga dichos genes, que resulta ser el más pequeño. En la Tabla 2 se indica el número de pares de bases (pb) de los fragmentos: los fragmentos grande y mediano contienen 2665 y 1212 pb respectivamente, mientras que el más pequeño de pJAC295 tiene 668 pb y el de pJAC321, 994 pb. El mapa de los plásmidos pJAC295 y pJAC321 se puede consultar en el Anexo 2 (Figura 20 y Figura 21) y en cada mapa se indican los lugares de corte de PstI.

### 7.3.2 Optimización de la transfección

La optimización de la transfección de las células con los plásmidos es necesaria para determinar qué reactivos producen una mayor eficiencia (mayor número de células que captan

el DNA) con la menor toxicidad. Primero se determinó el mejor reactivo de transfección. Para ello se transfectaron las células con 5 reactivos distintos:

- \* GeneJuice® (Novagen®): 0,5 µg de DNA ratio 1:3.
- \* ViaFect™ (Promega): 0,5 µg de DNA ratio 1:3.
- \* TransIT® 2020 (Mirus™): 0,5 µg de DNA ratio 1:3.
- \* Lipofectamina 2000™ (Invitrogen™): 0,8 µg de DNA ratio 1:3.
- \* Lipofectamina 3000™ (Invitrogen™): 0,5 µg de DNA ratios 1:1,5 y 1:3.

Se tomaron imágenes de cada pocillo en campo claro y en fluorescencia a las 48 horas tras la transfección y se analizaron con el programa FIJI (Image J), para determinar el número de células fluorescentes (transfectadas) respecto al número total. En la Figura 7 se muestran algunas imágenes representativas de la transfección de las células con 4 de los reactivos.

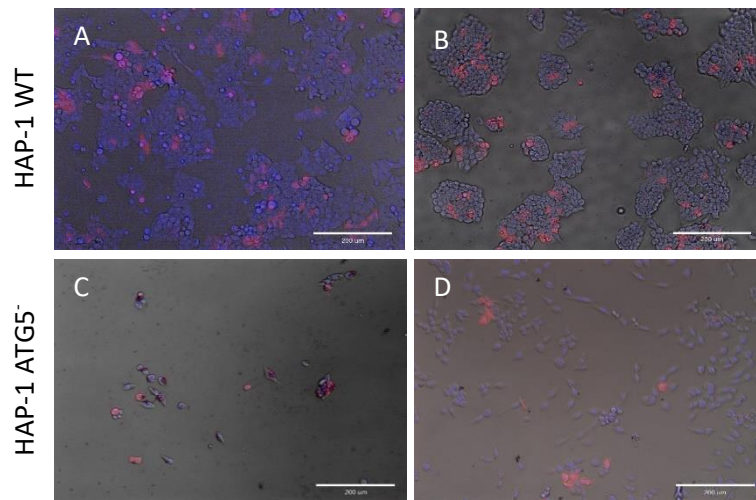


Figura 7. Combinación del campo claro, los núcleos teñidos con Hoechst 33342 (azul) y aSyn sobreexpresada (rojo) a 100 aumentos. En la Figura 7 A se muestra la transfección con GeneJuice; en las 7 B y 7 C, con TransIT 2020; y en la 7 D, con Viafect. La barra de escala marca 200 µm.

En las Figuras 8 y 9 se representan los porcentajes de proliferación con respecto a un control de transfecciones con los distintos reactivos; y en las Figuras 10 y 11, la eficiencia de transfección (porcentaje de células transfectadas respecto a las células totales) para cada reactivo. En el Anexo 3 se adjuntan las tablas (Tabla 9 y Tabla 10) de las que derivan las gráficas.

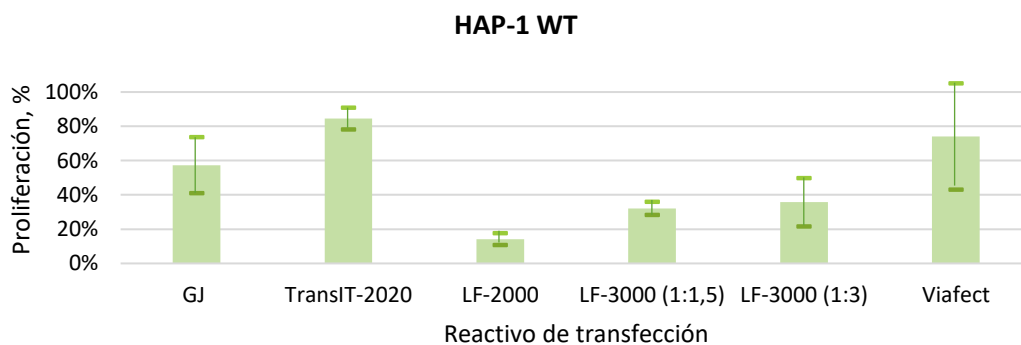


Figura 8. Porcentaje de proliferación, respecto a células no transfectadas, para cada reactivo de transfección utilizado de las células HAP-1 WT transfectadas con pJAC321. Se representa el valor medio y la desviación estándar (número de ensayos realizados=3). GJ: GeneJuice, LF: Lipofectamina.

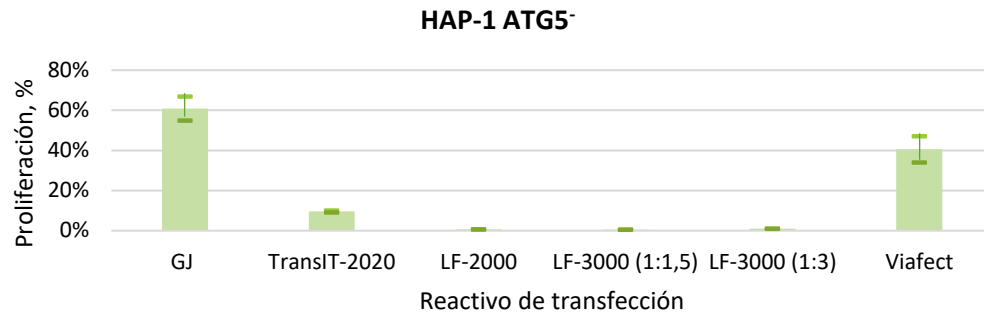


Figura 9. Porcentaje de proliferación, respecto a células no transfectadas, para cada reactivo de transfección utilizado de las células HAP 1 ATG5<sup>-</sup> transfectadas con pJAC321. Se representa el valor medio y la desviación estándar (número de ensayos realizados=3). Reactivos como en la Figura 8.

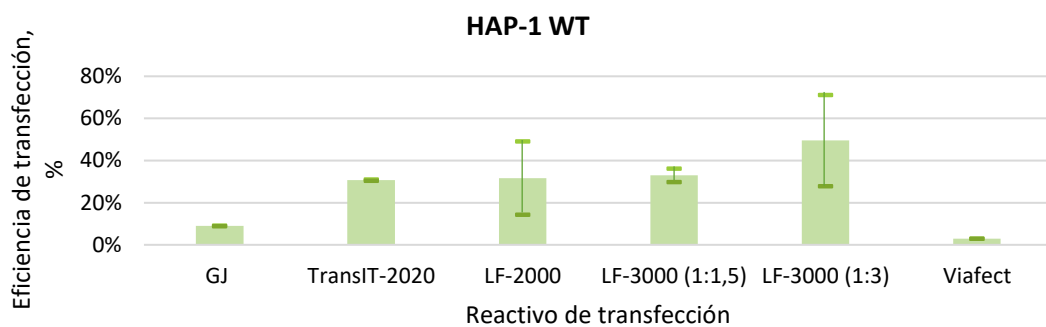


Figura 10. Eficiencia de transfección de pJAC321 con diferentes reactivos de células HAP-1 WT. Se representa el valor medio y la desviación estándar (número de ensayos realizados=3). Reactivos como en la Figura 8.

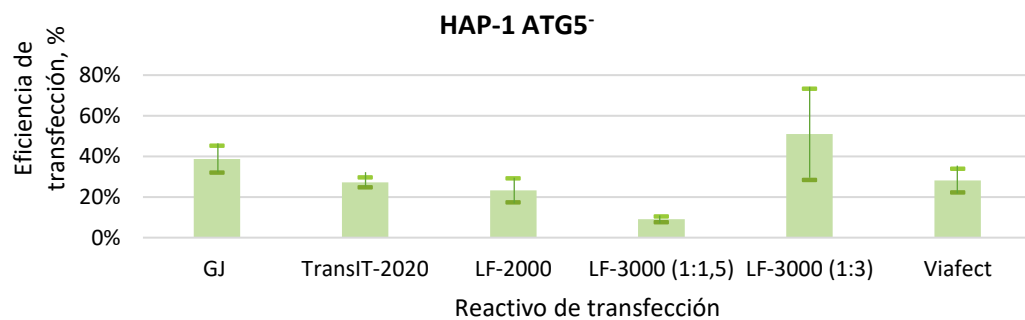


Figura 11. Eficiencia de transfección de pJAC321 con diferentes reactivos de células HAP-1 ATG5<sup>-</sup>. Se representa el valor medio y la desviación estándar (número de ensayos realizados=3). Reactivos como en la Figura 8.

En las gráficas se observa que, tanto para las HAP-1 WT como para las KO, la mayor eficiencia de transfección la proporciona la Lipofectamina (LF) 3000 con un ratio 1:3 aunque este reactivo resulta extremadamente tóxico para las células, como se refleja en los porcentajes de proliferación (en el caso de las HAP-1 WT el porcentaje de proliferación es mayor porque las fotos se tomaron más cerca del centro del pocillo, donde todavía había células vivas ya que en esa zona la concentración de reactivo es menor). Lo mismo ocurre, aunque en menor medida, con la Lipofectamina 3000 1:1,5 y la Lipofectamina 2000. El reactivo TransIT 2020 presenta una citotoxicidad menor con las células HAP-1 WT (Figura 7 B), pero es altamente tóxico para las ATG5<sup>-</sup> (Figura 7 C). Los porcentajes de proliferación de las células tratadas con GeneJuice (GJ) y

Viafect (VF) son de los más altos, aunque tienen peores eficiencias de transfección. Finalmente se eligió el reactivo GJ como óptimo por ser el que presentaba un comportamiento más parecido para los dos tipos de células.

Seguidamente se procedió a la optimización de la cantidad de DNA y el ratio DNA:Reactivo. En la Figura 12 se representa la eficiencia de transfección para las células HAP-1 WT y en la Figura 13, para las HAP-1 ATG5<sup>-</sup>.

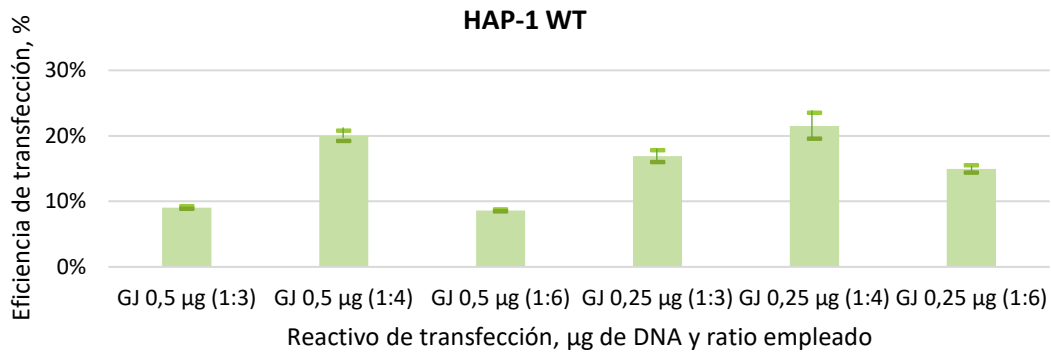


Figura 12. Eficiencia de transfección de células HAP-1 WT con pJAC321 con diferentes cantidades de DNA y ratios DNA:Reactivo. Se representa el valor medio y la desviación estándar (número de ensayos realizados=3). GJ: GeneJuice.

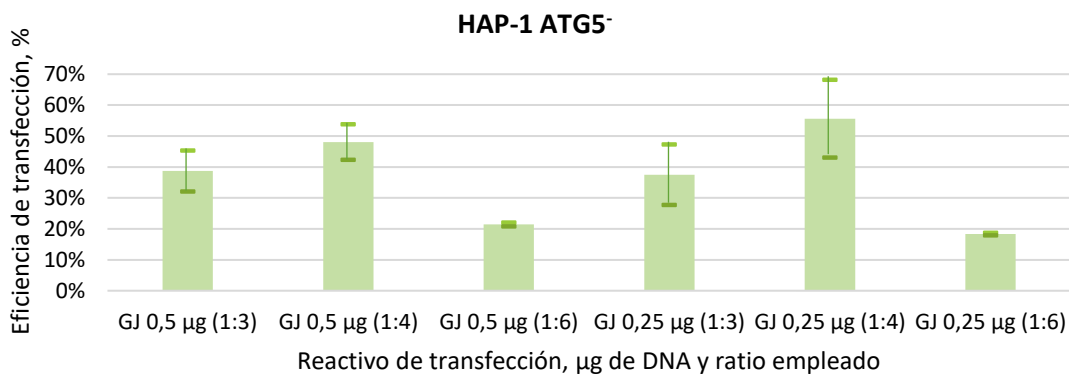


Figura 13. Eficiencia de transfección de células HAP 1 ATG5<sup>-</sup> con pJAC321 con diferentes cantidades de DNA y ratios DNA:Reactivo. Se representa el valor medio y la desviación estándar (número de ensayos realizados=3). Reactivos como en la Figura 12.

A pesar de que este reactivo transfecta más eficientemente las células HAP-1 ATG5<sup>-</sup>, en ambos tipos de células la máxima eficiencia de transfección se obtuvo con 0,25 µg de DNA y ratio 1:4, seguido por 0,5 µg de DNA y ratio 1:4. Por tanto, se utilizaron estos parámetros para sucesivos experimentos.

#### 7.4 Cotransfecciones y estudio de colocalización subcelular

Para el estudio del comportamiento y la localización subcelular de las proteínas sobreexpresadas se realizaron cotransfecciones con diferentes combinaciones de dos proteínas utilizando GJ con 0,25 µg de DNA y ratio 1:4 de cada plásmido (0,5 µg de DNA totales). Las combinaciones realizadas fueron:



- \* pJAC321 + pJAC318: mRFP-aSyn + EGFP-Tau
- \* pJAC333 + pJAC318: mCherry-p62 + EGFP-Tau
- \* pJAC332 + pJAC333: EGFP-aSyn + mCherry-p62

Los resultados de las cotransfecciones se analizaron mediante microscopía de fluorescencia a las 24 y 48 horas. En la Figura 14 se recogen algunas de las fotografías más representativas de las células a las 48 horas. En ellas se pueden apreciar las diferencias en la localización de las tres proteínas: tau se une a los microtúbulos (patrón filamentososo), aSyn se distribuye por el interior de toda la célula, incluido el núcleo (patrón difuso), y p62 se concentra en pequeñas regiones del citoplasma que probablemente correspondan a orgánulos o componentes a degradar (patrón punteado).

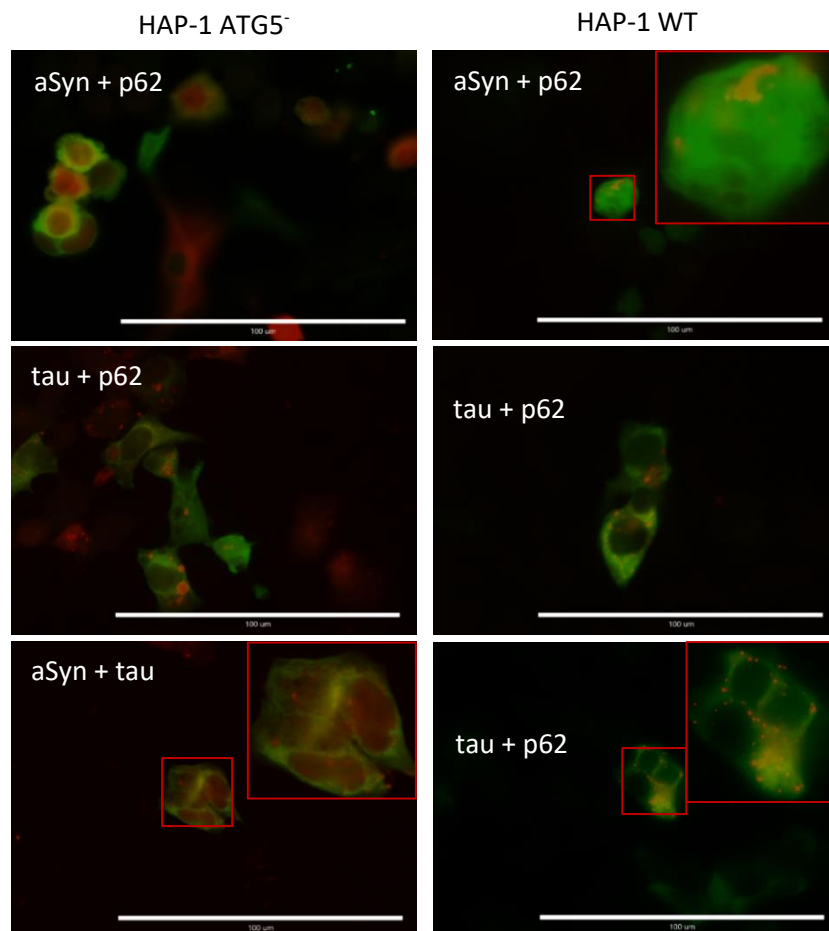


Figura 14. Resultados de las tres combinaciones de cotransfecciones realizadas en células HAP-1 WT y HAP-1 ATG5<sup>-</sup> a 630 aumentos: aSyn (rojo) + tau (verde), tau (verde) + p62 (rojo) y aSyn (verde) + p62 (rojo). En algunos paneles se muestran insertos con ampliaciones de las zonas encuadradas. La barra de la escala marca 100  $\mu$ m.

Debido a la errónea colocación del cubreobjetos con las células fijadas en el portaobjetos, no se pudieron tomar imágenes de las células HAP-1 WT cotransfectadas con tau y aSyn.

A continuación, se tomaron muestras de las células cotransfectadas y se analizaron por WB. Se tomaron alícuotas de cada muestra y se trataron con BSOCOES, un cross-linker que permite unir covalentemente proteínas que interaccionan de forma no covalente dentro de la célula y que se separarían durante la electroforesis desnaturante. En las siguientes figuras se muestran las membranas incubadas con Anti-aSyn-211, Anti-Tau y Anti-p62 (las membranas de las Figuras 15 y 16 corresponden a la misma membrana incubada con dos anticuerpos primarios

distintos simultáneamente (al ser los anticuerpos primarios de distintas especies, se pueden detectar con dos anticuerpos secundarios fluorescentes diferentes que se observan a distintas longitudes de onda), mientras que la membrana mostrada en la Figura 17 proviene de un segundo gel. Los dos gels fueron cargados con las mismas muestras). Las muestras tratadas con el cross-linker aparecen indicadas con “CL”. También se cargaron muestras de células HAP-1 WT y ATG5<sup>-</sup> sin cotransfectar ni tratar con BSOCOES.

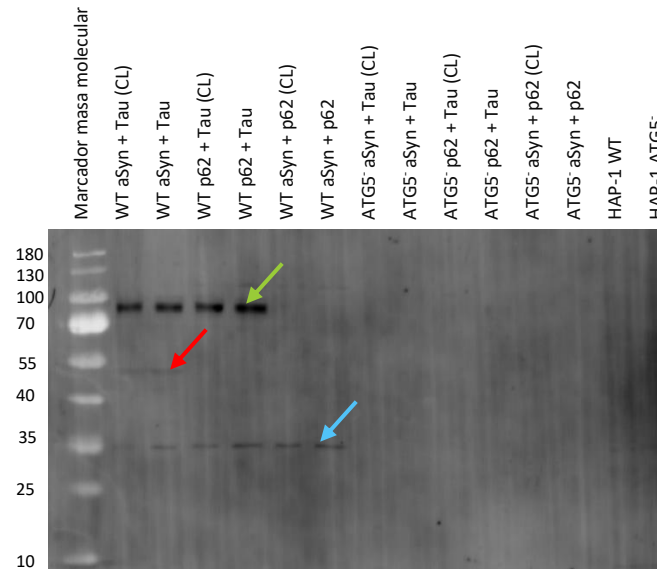


Figura 15. Western Blot con Anti-Tau en células que sobreexpresan distintas combinaciones de proteínas y células sin transfectar. Se han sobreexpresado aSyn (pJAC321) con tau (pJAC318), p62 (pJAC333) con tau (pJAC318) y aSyn (pJAC332) con p62 (pJAC333), como se indica en la parte superior del panel; y las muestras se han tratado con el cross-linker BSOCOES (CL) o sin él. Con flechas de distintos colores se señalan bandas específicas que se discuten en el texto. El revelado se realizó utilizando un anticuerpo secundario fluorescente y el Chemidoc. A la izquierda se indica la masa molecular en kDa de los marcadores.

En la Figura 15, una fotografía de la membrana incubada con Anti-Tau, se observan 3 tipos de bandas distintas todas ellas en muestras de HAP-1 WT. Las bandas más intensas (flecha verde) aparecen en los carriles cargados con muestras de células HAP-1 WT transfectadas con tau y parecen corresponder a la proteína sobreexpresada (eGFP-tau: 67,4 kDa). Estas bandas no se ven en las muestras de células KO transfectadas con tau, pero el análisis microscópico confirma la expresión de la proteína de fusión, lo que sugiere una diferencia entre las células WT y ATG5<sup>-</sup> que todavía no tiene explicación.

Con la flecha roja se señala una banda que colocaliza con una banda más intensa de aSyn en la membrana de la Figura 16, por lo que seguramente se deba a una contaminación o un problema con la fluorescencia (hay que tener en cuenta que las dos imágenes son de la misma membrana).

En las muestras de células WT cotransfectadas se observa una banda (flecha azul) de aproximadamente 35 kDa. Esta banda también aparece en la membrana incubada con Anti-p62 (flecha negra), y parece deberse a una contaminación del anticuerpo secundario, ya que en ambas se utilizó el mismo Gt x Rb indicado en la Tabla 6 y, al repetir el WB empleando anticuerpos de revelado mediante quimioluminiscencia, dichas bandas desaparecen.

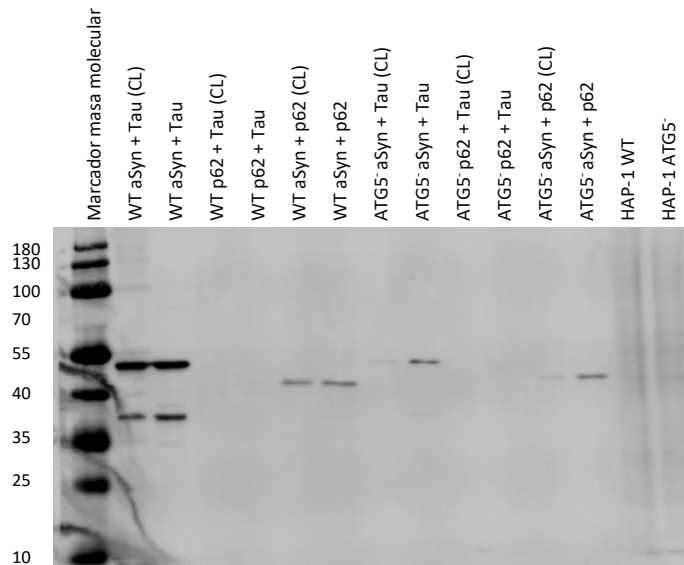


Figura 16. Western Blot con con Anti-aSyn 211 en células que sobreexpresan distintas combinaciones de proteínas y células sin transfectar. Se han sobreexpresado aSyn (pJAC321) con tau (pJAC318), p62 (pJAC333) con tau (pJAC318) y aSyn (pJAC332) con p62 (pJAC333), como se indica en la parte superior del panel; y las muestras se han tratado con el cross-linker BSOCOES (CL) o sin él. El revelada se realizó utilizando un anticuerpo secundario fluorescente y el Chemidoc. A la izquierda se indica la masa molecular en kDa de los marcadores.

En la membrana incubada con Anti-aSyn 211 mostrada en la Figura 16, tanto en las cuatro muestras de HAP-1 WT como en las HAP-1 ATG5<sup>-</sup> cotransfectadas con tau y aSyn se observan dos bandas. Esto se debe a que, por motivos todavía desconocidos (actualmente está siendo investigado por el grupo), pJAC321 proporciona esta distribución de bandas. La hipótesis con la que se trabaja en el laboratorio es que, por algún motivo todavía desconocido, la proteína mRFP-aSyn codificada en pJAC321 se corta cerca de su extremo amino, pero casualmente siempre, aproximadamente, la mitad de la proteína. Esto se ha observado también con otras construcciones que expresan fragmentos de aSyn e incluso con otra proteína fluorescente.

Al cotransfectar aSyn con p62 solo se obtiene una banda que parece corresponder con la proteína sobreexpresada (eGFP-aSyn: 41,36 kDa), lo que concuerda con la distribución de bandas que da pJAC332.

Cabe destacar que las muestras transfectadas con aSyn y tratadas con BSOCOES dan las mismas bandas que las no tratadas con el cross-linker, aunque de menor intensidad. Esto sugiere que aSyn interacciona con alguna otra proteína o componente celular, pero, dado que no aparece una nueva banda, la interacción podría ser tal que bloquee la zona de unión aSyn-anticuerpo Anti-aSyn.

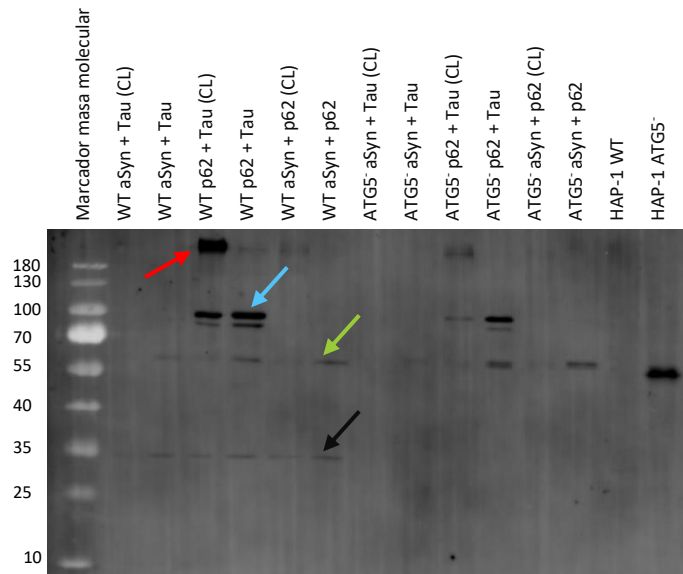


Figura 17. Western Blot con Anti p62 en células que sobreexpresan distintas combinaciones de proteínas y células sin transfectar. Se han sobreexpresado aSyn (pJAC321) con tau (pJAC318), p62 (pJAC333) con tau (pJAC318) y aSyn (pJAC332) con p62 (pJAC333), como se indica en la parte superior del panel; y las muestras se han tratado con el cross-linker BSOEES (CL) o sin él. Con flechas de distintos colores se señalan bandas específicas que se discuten en el texto. El revelado se realizó utilizando un anticuerpo secundario fluorescente y el Chemidoc. A la izquierda se indica la masa molecular en kDa de los marcadores.

En la membrana incubada con Anti-p62 mostrada en la Figura 17 se aprecia, en todas las muestras de células cotransfectadas y en la muestra de células KO sin transfectar, una banda entre 55-70 kDa (flecha verde). Esta banda corresponde a la proteína p62 endógena, y se aprecia también en la muestra de HAP-1 ATG5<sup>-</sup>. En la muestra de HAP-1 WT no se observa esta banda, pero podría deberse a que la banda de las KO es tan intensa que no permite apreciarla o a que la muestra fuera defectuosa.

En las muestras con células transfectadas con p62 se observan unas bandas intensas (flecha azul) que parecen corresponder a la proteína de fusión (mCherry-p62: 74,4 kDa). Es interesante que esta banda no aparece en las muestras cotransfectadas con aSyn y p62, lo que podría sugerir una interacción entre las dos proteínas o la influencia de aSyn sobre la expresión de p62. En primer lugar, descartamos que aSyn afecte a la expresión de pJAC333 puesto que en dichas muestras se observa la proteína con el microscopio de fluorescencia. Por otra parte, aunque no se observa ninguna banda que corresponda a la interacción entre ambas, podría considerarse una interacción entre las proteínas tal que bloquease los sitios de unión con el anticuerpo de las dos proteínas. Aunque podría argumentarse la interacción con aSyn por la diferencia de intensidad entre las bandas de las muestras cotransfectadas con aSyn y p62 y las cotransfectadas con aSyn y tau en la Figura 16; sin embargo, no podemos realizar tal comparación ya que no se trata del mismo plásmido y la expresión de los diferentes plásmidos de aSyn no tiene por qué ser igual.

Podemos asegurar que p62 interacciona con otras proteínas, puesto que en aquellas muestras tratadas con BSOEES y que expresan p62 aparece una banda de alta masa molecular y la banda correspondiente a p62 endógena es menos intensa que en las muestras sin tratar con el cross-linker. No obstante, no se puede determinar con qué proteínas interacciona. La flecha roja señala la más intensa de estas bandas.

### 7.4.1 Experimentos *in vivo*

Para los experimentos *in vivo* se cotransfectaron células HAP-1 WT y KO con pJAC321 y pJAC318 24 horas antes de comenzar a tomar las fotografías. Los experimentos duraron entre 12 y 48 horas, pero no se obtuvieron resultados concluyentes ya que, la cantidad de células transfectadas era pequeña y el ritmo al que crecen y se dividen las HAP-1 es tan alto que la densidad del cultivo se elevaba rápidamente y las células morían.

## 7.5 Estudio de la autofagia

El estudio de la autofagia en las células HAP-1 se realizó utilizando DAPGreen como marcador de autofagosomas. En un primer experimento se indujo la autofagia sustituyendo el medio de cultivo de las células por medio pobre:

- \* Dos pocillos con DMEM 0 % FBS: uno se sustituyó 5 horas antes (DMEM 0 %, -5 h) y el otro, justo antes de tomar las fotos.
- \* Dos pocillos con MEM 0 % FBS (medio mínimo): uno se sustituyó 5 horas antes (MEM 0 %, -5 h) y el otro, justo antes de tomar las fotos.

También se transfectaron las células de un quinto pocillo con pJAC321 con 24 horas de antelación para poder observar la relación entre la autofagia y la sobreexpresión de esta proteína. Las células se fotografiaron con el microscopio de fluorescencia después del tiempo de incubación del fluorocromo requerido, pasadas 2 horas y a las 18 horas tanto en campo claro como de fluorescencia. Las imágenes se analizaron posteriormente con el programa FIJI (Image J). En la Figura 19 se muestran algunas de las imágenes más representativas a las 0, 2 y 18 horas de los pocillos de células KO y WT transfectados con pJAC321.

Lo primero que llama la atención es que las células KO también muestran fluorescencia a pesar de ser deficientes en autofagia. Esto puede deberse a que la proteína ATG5 participa en la extensión de la membrana lipídica del autofagosoma y DAPGreen se une a dicha membrana cuando todavía está en formación, como se puede apreciar en la Figura 18, de manera que es posible que las células KO comiencen a formar autofagosomas, a los que se une DAPGreen, pero que estos nunca lleguen a madurar.

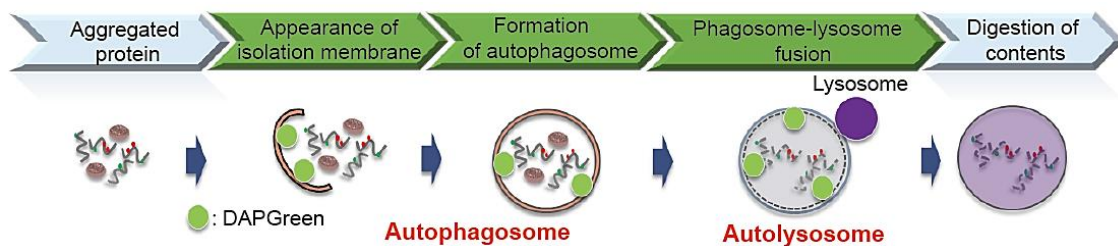


Figura 18. Detección de la autofagia con DAPGreen. (Imagen tomada del manual técnico DAPGreen Autophagy Detection facilitado por Dojindo Molecular Technologies, Inc.).

Con el paso de las horas se observó que las células cultivadas en medios de inducción a la autofagia, tanto las WT como las KO, aumentaban el número de autofagosomas y, finalmente, iniciaban la apoptosis y morían. Las células cultivadas en MEM 0 % murieron antes que las cultivadas en DMEM 0 %. Esto se explica porque el medio de cultivo DMEM, a pesar de no estar complementado con FBS, contiene más nutrientes que el medio mínimo MEM. Como era de esperar, las células HAP-1 ATG5<sup>-</sup> murieron antes que las WT. Lo más interesante fue que, al cabo de las 18 horas, las células WT transfectadas apenas se diferenciaban del control mientras que

la mayoría de las KO estaban muertas, como se muestra en la Figura 19, lo que demuestra la importancia de la autofagia como mecanismo de defensa frente a la sobreexpresión de aSyn.

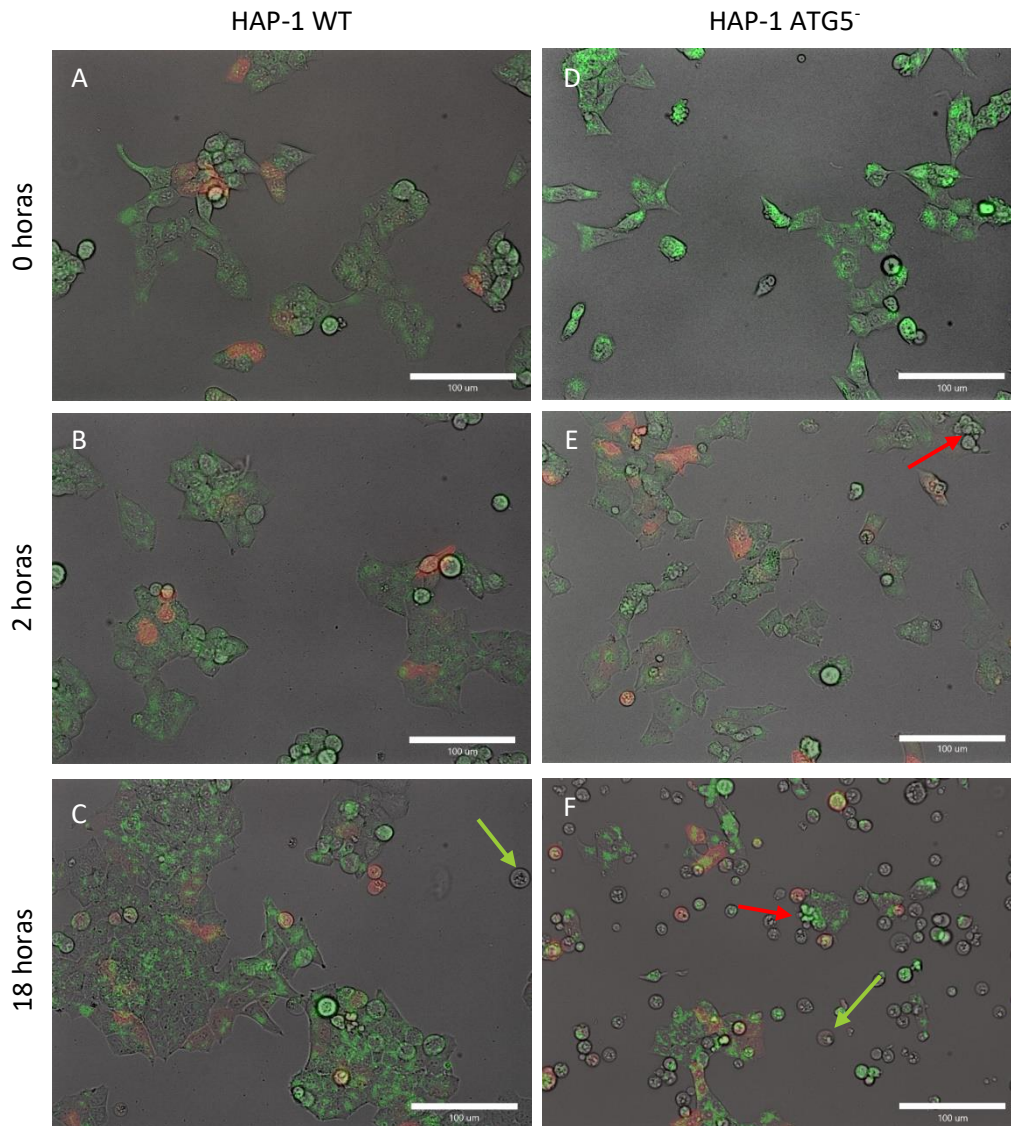


Figura 19. Análisis microscópico de células transfectadas con pJAC321 teñidas con DAPI. Fotografías A-C: células HAP-1 WT transfectadas con pJAC321 cultivadas en IMDM 10 % FBS a las 0h, 2h y 18h después de haber sido teñidas con DAPI. En las imágenes se muestra la combinación del campo claro, aSyn (rojo) y DAPI (verde). Fotografías D-F: células HAP-1 ATG5<sup>-</sup> transfectadas con pJAC321 cultivadas en IMDM 10 % FBS a las 0h, 2h y 18h después de haber sido teñidas con DAPI. Las flechas señalan ejemplos de células apoptóticas (rojo) y muertas (verde). La barra de escala marca 100 μm.

Por último, se realizó un segundo experimento con DAPI. Para ello se utilizó la placa de canales  $\mu$ -Slide VI 0.4, IBIDI®. En este caso las células se cultivaron en medio IMDM 10 % FBS y se teñieron con DAPI. Después del tiempo de incubación se añadieron a través de uno de los pocillos del canal fibras de aSyn marcadas con Alexa 488, un fluorocromo verde, para poder ver el avance de las fibras de aSyn por el canal y su influencia en la autofagia. Sin embargo, las células comenzaron a morir antes de poder observar los efectos de la aSyn, por lo que es posible que la concentración de DAPI fuese demasiado alta para las células del canal. Actualmente el grupo continúa con la investigación con DAPI y se están comenzando a utilizar dispositivos de cultivo celular que permiten la observación mediante microscopía a más alta resolución para continuar el trabajo aquí presentado.

## 8 Conclusiones

- \* Con este trabajo se ha puesto a punto en el laboratorio el cultivo de células HAP-1 WT y deficientes en ATG5, para determinar el papel de la autofagia en los eventos iniciales en la enfermedad de Parkinson.
- \* Se han expresado mediante transfecciones transitorias las proteínas aSyn, tau y p62. A pesar de que las eficiencias de transfección obtenidas con los reactivos de transfección utilizados ha sido baja (por lo que habría que investigar otros métodos de transfección, por ejemplo, los lentivirus o el Nucleofector) se han puesto en evidencia algunas interacciones entre las proteínas mencionadas.
- \* Se ha evidenciado la interacción de aSyn y p62 en el interior de la célula, pero no se ha demostrado la interacción entre tau y aSyn ni entre tau y p62 con las técnicas empleadas.
- \* Se ha demostrado la diferencia en la expresión de tau a partir del vector pJAC318 entre las células HAP-1 WT y las HAP-1 ATG5<sup>-</sup>, cuyas causas se están investigando en el laboratorio.
- \* Se ha demostrado que mediante Western Blot utilizando el cross-linker BSOCOES se pueden detectar interacciones en las que participa p62.
- \* No se han encontrado diferencias morfológicas, mediante los experimentos realizados, entre células que pueden o no realizar la autofagia, pero se ha evidenciado la menor viabilidad de las células que no pueden realizarla. No obstante, estos experimentos continúan en el laboratorio y es posible que se observen diferencias utilizando técnicas alternativas o mayor resolución en microscopía.
- \* Se ha demostrado que la autofagia está íntimamente ligada con la supervivencia de células que sobreexpresan aSyn, lo que ha abierto una nueva línea de investigación en el laboratorio.

## 9 Bibliografía

- (1) Sarkar, S.; Olsen, A. L.; Sygnecka, K.; Lohr, K. M.; Feany, M. B.  $\alpha$ -Synuclein Impairs Autophagosome Maturation through Abnormal Actin Stabilization. *PLoS Genet* **2021**, *17* (2), 26. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009359>.
- (2) Sveinbjornsdottir, S. The Clinical Symptoms of Parkinson's Disease. *J. Neurochem.* **2016**, *139*, 318–324. <https://doi.org/10.1111/jnc.13691>.
- (3) Martínez, M.; Menéndez, Ma.; López-Muñiz, A. Alteraciones neuropsicológicas en las alfa-sinucleopatías. *iMedPub Journals* **2011**, *7* (1:1), 9. <https://doi.org/10.3823/064>.
- (4) Eun Hee Ahn; Seong Su Kang; Xia Liu; Guiqin Chen; Zhentao Zhang; Bindu Chandrasekharan; Ashfaqu M. Alam; Andrew S. Neish; Xuebing Cao; Keqiang Ye. Initiation of Parkinson's Disease from Gut to Brain by  $\delta$ -Secretase. *Cell Research* **2020**, *30* (1), 70–87. <https://doi.org/10.1038/s41422-019-0241-9>.
- (5) Chang, N. C. Autophagy and Stem Cells: Self-Eating for Self-Renewal. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *8*, 138. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00138>.
- (6) Giorgi, C.; Bouhamida, E.; Danese, A.; Previati, M.; Pinton, P.; Patergnani, S. Relevance of Autophagy and Mitophagy Dynamics and Markers in Neurodegenerative Diseases. *Biomedicines* **2021**, *9* (2), 149. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9020149>.
- (7) Chen, L.; Xie, Z.; Turkson, S.; Zhuang, X. A53T Human Alpha-Synuclein Overexpression in Transgenic Mice Induces Pervasive Mitochondria Macroautophagy Defects Preceding Dopamine Neuron Degeneration. *Journal of Neuroscience* **2015**, *35* (3), 890–905. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0089-14.2015>.
- (8) Recchia, A.; Debetto, P.; Negro, A.; Guidolin, D.; Skaper, S. D.; Giusti, P. A-Synuclein and Parkinson's Disease. *FASEB j.* **2004**, *18* (6), 617–626. <https://doi.org/10.1096/fj.03-0338rev>.
- (9) Norris Erin H.; Benoit I. Giasson; Virginia M.-Y. Lee. Alpha-Synuclein: Normal Function and Role in Neurodegenerative Diseases. *Current Topics in Development Biology* **2004**, *60*, 38. <https://doi.org/0070-2153/04>.
- (10) Villar-Piqué, A.; Lopes da Fonseca, T.; Fleming Outeiro, T. Structure, Function and Toxicity of ASyn: The Bermuda Triangle on Synucleopathies. *JNC* **2016**, *139*, 16. <https://doi.org/10.1111/jnc.13249>.
- (11) David F. Clayton; Julia M. George. The Synucleins: A Family of Proteins Involved in Synaptic Function, Plasticity, Neurodegeneration and Disease. *Trends Neurosci.* **1998**, *21* (6), 6. <https://doi.org/249-254>.
- (12) Tenreiro, S.; Reimão-Pinto, M. M.; Antas, P.; Rino, J.; Wawrzycka, D.; Macedo, D.; Rosado-Ramos, R.; Amen, T.; Waiss, M.; Magalhães, F.; Gomes, A.; Santos, C. N.; Kaganovich, D.; Outeiro, T. F. Phosphorylation Modulates Clearance of Alpha-Synuclein Inclusions in a Yeast Model of Parkinson's Disease. *PLoS Genet* **2014**, *10* (5), e1004302. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004302>.
- (13) Ferrucci, M.; Pasquali, L.; Ruggieri, S.; Paparelli, A.; Fornai, F. Alpha-Synuclein and Autophagy as Common Steps in Neurodegeneration. *Parkinsonism & Related Disorders* **2008**, *14*, S180–S184. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2008.04.025>.
- (14) Cuervo, A. M.; Stefanis, L.; Fredenburg, R.; Lansbury, P. T.; Sulzer, D. Impaired Degradation of Mutant -Synuclein by Chaperone-Mediated Autophagy. *Science* **2004**, *305* (5688), 1292–1295. <https://doi.org/10.1126/science.1101738>.
- (15) Popov, K. I.; Makepeace, K. A. T.; Petrotchenko, E. V.; Dokholyan, N. V.; Borchers, C. H. Insight into the Structure of the “Unstructured” Tau Protein. *Structure* **2019**, *27* (11), 1710–1715.e4. <https://doi.org/10.1016/j.str.2019.09.003>.
- (16) Li, L.-Y.; Wang, X.-Y. Progress in Analysis of Tau Protein. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* **2020**, *48* (6), 685–694. [https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(20\)60024-X](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(20)60024-X).
- (17) Rong, Z.; Shen, F.; Wang, Y.; Sun, L.; Wu, J.; Zhang, H.; Yuan, Y.; Jiang, W.; Li, X.; Ji, P.; Zhang, K. Phosphorylated  $\alpha$ -Synuclein and Phosphorylated Tau-Protein in Sural Nerves May



- Contribute to Differentiate Parkinson's Disease from Multiple System Atrophy and Progressive Supranuclear Paralysis. *Neuroscience Letters* **2021**, 756, 135964. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.135964>.
- (18) Nakaso, K.; Yoshimoto, Y.; Nakano, T.; Takeshima, T.; Fukuhara, Y.; Yasui, K.; Araga, S.; Yanagawa, T.; Ishii, T.; Nakashima, K. Transcriptional Activation of P62/A170/ZIP during the Formation of the Aggregates: Possible Mechanisms and the Role in Lewy Body Formation in Parkinson's Disease. *Brain Research* **2004**, 1012 (1–2), 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.03.029>.
- (19) Phospho-p62 in neurodegenerative disease and cancer research <https://www.nordichiosite.com/news/phospho-p62-in-neurodegenerative-disease-and-cancer-research> (accessed 2021 -06 -16).

## 10 Anexo 1: Listado de plásmidos

Nombre	Inserto	Proteína de interés	Color de la proteína fluorescente
<b>pJAC295</b>	Myc-mRFP-TM BclXL	-	Rojo
<b>pJAC318</b>	EGFP-Tau (4R/0N)	Tau	Verde
<b>pJAC321</b>	C-myc-mRFP-Human alpha synuclein WT	aSyn	Rojo
<b>pJAC332</b>	EGFP-aS-WT	aSyn	Verde
<b>pJAC333</b>	mCherry-p62	p62	Rojo
<b>eGFP N1</b>	EGFP	EGFP	Verde

Tabla 8. Resumen de los plásmidos, inserto y proteínas que codifican (de interés y fluorescente) utilizados en las transfecciones.

## 11 Anexo 2: Mapas de los plásmidos utilizados

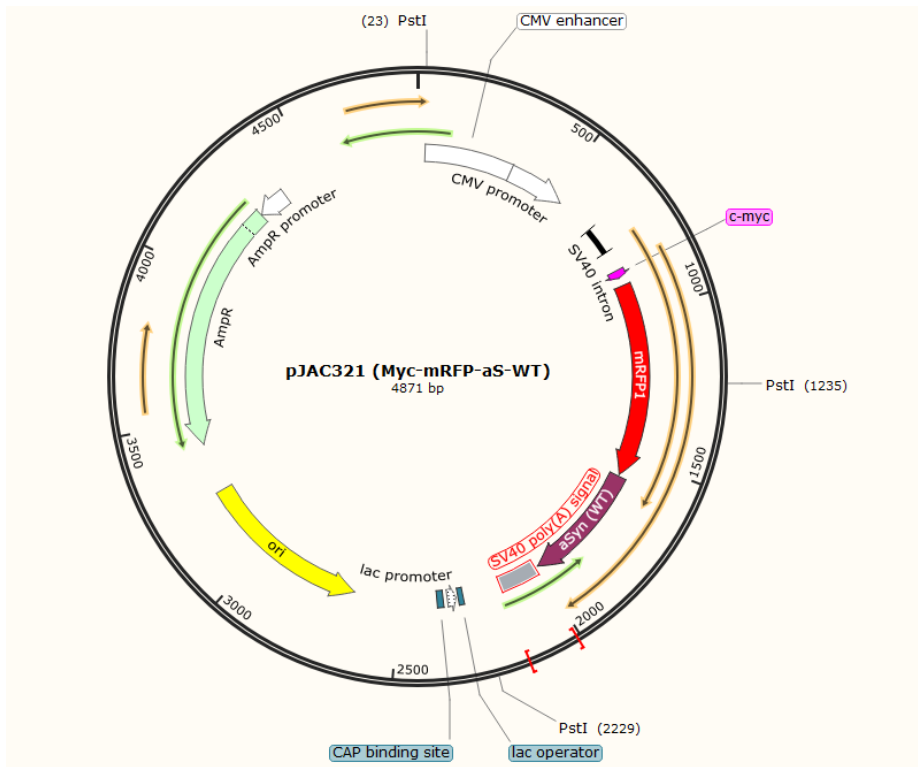


Figura 20. Mapa del plásmido pJAC321. Se muestran los sitios de corte de la enzima de restricción PstI y las proteínas.

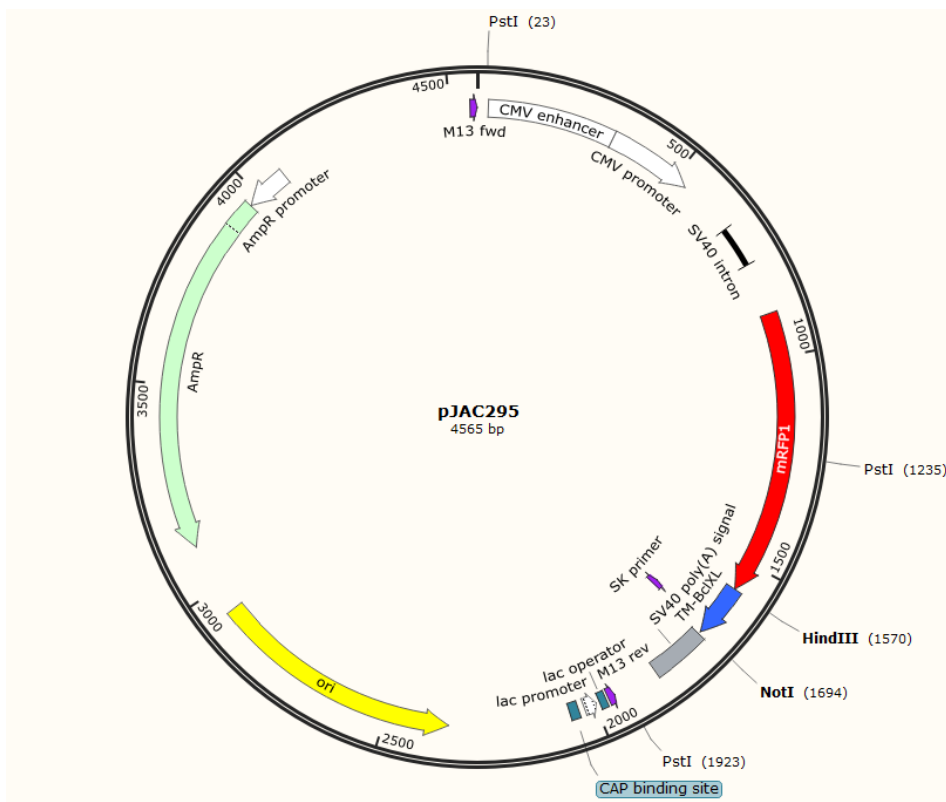


Figura 21. Mapa del plásmido pJAC295. Se muestran los sitios de corte de la enzima de restricción PstI y las proteínas codificadas.

## 12 Anexo 3: Eficiencias de transfección de distintos reactivos

### HAP-1 WT

Reactivo	Proliferación %	Desviación estándar %	Eficiencia de transfección %	Desviación estándar %
GeneJuice	57%	28,5%	9%	2,1%
TransIT-2020	85%	7,5%	31%	1,0%
LF-2000	14%	24,4%	32%	54,9%
LF-3000 (1-1,5)	32%	12,0%	33%	9,7%
LF-3000 (1-3)	36%	39,4%	50%	43,7%
ViaFect	74%	41,9%	3%	1,3%

Tabla 9. Porcentaje de proliferación y eficiencia de transfección y sus respectivas desviaciones estándar de los distintos reactivos de transfección para las células HAP-1 WT.

### HAP-1 ATG5<sup>-</sup>

Reactivo	Proliferación %	Desviación estándar %	Eficiencia de transfección %	Desviación estándar %
GeneJuice	61%	9,8%	39%	17,1%
TransIT-2020	10%	5,2%	27%	8,8%
LF-2000	1%	0,1%	23%	25,2%
LF-3000 (1-1,5)	0%	0,8%	9%	15,7%
LF-3000 (1-3)	1%	1,1%	51%	44,1%
ViaFect	41%	16,2%	28%	20,7%

Tabla 10. Porcentaje de proliferación y eficiencia de transfección y sus respectivas desviaciones estándar de los distintos reactivos de transfección para las células HAP-1 ATG5<sup>-</sup>.