

Tesis Doctoral

Establecimiento de un modelo humano de neurodegeneración a partir de células pluripotentes diferenciadas a linaje neural en un contexto de sobreexpresión de alfa sinucleína

Dimopoulos, Nicolás Alexis

2018

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Dimopoulos, Nicolás Alexis. (2018). Establecimiento de un modelo humano de neurodegeneración a partir de células pluripotentes diferenciadas a linaje neural en un contexto de sobreexpresión de alfa sinucleína. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6494_Dimopoulos

Cita tipo Chicago:

Dimopoulos, Nicolás Alexis. "Establecimiento de un modelo humano de neurodegeneración a partir de células pluripotentes diferenciadas a linaje neural en un contexto de sobreexpresión de alfa sinucleína". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2018. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6494_Dimopoulos



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Establecimiento de un modelo humano de neurodegeneración a partir de células pluripotentes diferenciadas a linaje neural en un contexto de sobreexpresión de alfa sinucleína.

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires
en el área de Ciencias Biológicas.

Lic. Nicolás Alexis Dimopoulos.

Director de tesis: Dr. Gustavo Emilio Sevlever.

Consejero de estudios: Dr. Osvaldo Uchitell.

Lugar de trabajo: Laboratorio de Investigación Aplicada a Neurociencias (LIAN). Fundación para la Lucha contra las Enfermedades Neurológicas de la Infancia (FLENI). Sede Escobar

Buenos Aires, 2018.

Fecha de defensa: 14 de septiembre del 2018

Establecimiento de un modelo humano de neurodegeneración a partir de células pluripotentes diferenciadas a linaje neural en un contexto de sobre-expresión de alfa sinucleína.

Resumen:

Las células pluripotentes humanas pueden ser de origen embrionario, (CMEH), o inducidas (CMPih). Sus características más atrayentes residen en su inagotable potencial proliferativo y su pluripotencia o capacidad de diferenciarse a tejidos pertenecientes a las tres capas germinales. Las CMEH están constituidas por una población de células derivadas del macizo celular interno del blastocisto de mamíferos. Las CMPih son células somáticas que han sido reprogramadas mediante la expresión ectópica de factores de transcripción fundamentales para el mantenimiento del estado indiferenciado (por ejemplo: Oct3/4; Sox2 con Klf4 y c-Myc o Nanog y Lin28) (KazutoshiTakahashi *et al*, 2007). Las CMPih una vez reprogramadas adquieren características de auto-renovación y capacidad de diferenciarse dando origen a células de las tres capas germinales.

La capacidad de estas células pluripotentes para recapitular sistemas celulares humanos experimentalmente *in vitro* es alta y constituye una herramienta muy valiosa para el estudio tanto de los mecanismos moleculares que subyacen el desarrollo humano como de enfermedades neurodegenerativas o cardíacas entre otras

La proteína Alfasinucleína (α Sin) es una proteína pequeña de 14 KDa altamente desorganizada de localización ubicua en el citosol y en las terminales sinápticas de las neuronas. En condiciones normales es soluble, pero en concentraciones elevadas, frente a cambios en el pH, o cambios en los niveles intracelulares de Ca^{2+} se agrega produciendo neurofilamentos conocidos como cuerpos de Lewy. Dichos agregados se han observado en formas esporádicas y hereditarias de la Enfermedad de Parkinson (EP), así como en la demencia de Lewy.

En el presente trabajo se utilizaron células pluripotentes diferenciadas a neuronas como plataforma para el modelaje de la sobre-expresión de α Sin wt y 2 mutantes asociados a la EP Familiar. El análisis del impacto de este tratamiento sobre los cultivos celulares utilizados se centró en la evaluación de la homeostasis mitocondrial en un contexto de sobreexpresión en contraste con el control no tratado. El enfoque sobre la mitocondria se debe a que existen múltiples genes asociados con la EP que convergen en el mantenimiento de la homeostasis de dicha organela como

un factor etiológico crucial en la iniciación y el desarrollo temprano de la enfermedad. Los parámetros analizados fueron morfología, estado redox, transporte y biodinámica mitocondrial.

Se logró utilizar exitosamente células pluripotentes humanas diferenciadas como modelo neuronal humano, proveyendo evidencia novedosa del impacto de la sobreexpresión de α Sin sobre la homeostasis mitocondrial neural. Estos efectos están asociados, por un lado, a las mutaciones presentes en las variantes estudiadas, así como a los niveles de expresión y localización de la proteína respecto a la mitocondria. Asimismo, hemos probado que la fisión mitocondrial dependiente de α Sin requiere de una interacción directa entre la proteína y/o agregados de la misma con la membrana externa mitocondrial. Determinamos además que la interacción de α Sin con membranas mitocondriales depende en gran parte de su secuencia N-terminal, ya que la disrupción de dicho dominio en el gen de α Sin endógeno por edición génica CRISPR-Cas9 indujo cambios en la morfología y biodinámica mitocondrial en las neuronas derivadas a partir de la línea celular editada, lo que soporta un rol fisiológico de la proteína dependiente de su dominio N-terminal.

El rol fisiológico y patológico de α Sin en la homeostasis mitocondrial axonal evidenciado, aporta al objetivo de un camino etiológico común subyacente a la patología de la EP, que en última instancia es fundamental para el entendimiento de las enfermedades neurodegenerativas y es una herramienta muy útil para el diseño de estrategias terapéuticas y/o preventivas para el tratamiento de las mismas.

Palabras Clave: Enfermedad de Parkinson, Neurodegeneración, α Sin, Neuronas humanas, Células madre embrionarias humanas, Células madre pluripotentes inducidas humanas, Mitocondria, Transporte mitocondrial, Fisión mitocondrial, Biodinámica mitocondrial, Homeostasis mitocondrial, Edición génica.

Establishment of a Human neurodegeneration model from pluripotent cells differentiated to neural lineage in an over-expression context of alpha synuclein.

Abstract

Human pluripotent cells can have several origins; they can be embryonic (hESC) or induced (hiPSC). Their most appealing features reside in their limitless capacity to self-renew and their pluripotency, or their ability to differentiate into cells from the three germinal layers. The hESCs are derived from the inner blastocyst mass of mammals. hiPSCs are somatic cells that underwent reprogramming by the ectopic expression of transcription factors that act as master genes controlling the undifferentiated state (e.g.: Oct3/4; Sox2 con Klf4 y c-Myc o Nanog y Lin28) (Kazutoshi Takahashi *et al*, 2007). Once reprogrammed, the hiPSCs acquire characteristics that resembles the proliferative and pluripotent nature of an embryonic stem cell.

The ability of these pluripotent cells, to experimentally model human cell systems *in vitro* is high. Mainly due to the straight forward homology with its study object and the possibility of modeling cellular types that cannot be cultured as primary cultures from adult human tissue, such is the case for human central nervous system tissues and human cardiomyocytes.

Alpha synuclein (α Syn) is a small protein of 14 KDa, inherently disorganized, and ubiquitously found in both cytosol and synaptic termini of neurons. In physiological conditions, it remains soluble, but when present in high concentration and faced with sudden changes in cellular pH or against changes in intracellular Ca^{2+} levels, it aggregates and produces neurofilaments known as Lewy Bodies. Those aggregates have been observed in sporadic and familial forms of Parkinson's Disease (PD) as well as in Lewy's Dementia.

In this work, neurons derived from pluripotent human cells were used as a novel platform to model the overexpression of α Syn wt and 2 mutants associated with familial PD. The analysis of the impact of such treatment on the chosen cellular cultures focused on the evaluation of mitochondrial homeostasis in an α Syn overexpression context when compared with the untreated control. Our group focused on the mitochondria as our main focal point, since there are multiple genes associated with PD that converge in that organelle as a key etiological factor, crucial in the

initiation and early development of the disease. To achieve this, we analyzed the following parameters: mitochondrial morphology, oxidative state transport, and biodynamics.

We have managed to successfully use differentiated pluripotent human stem cells as a human neural model, providing novel evidence of the α Syn overexpression over neural mitochondrial homeostasis. These effects are associated, both to the mutations present in the studied variants, as well as the expression level and localization of the protein regarding the mitochondria.

More so, we have proven that α Syn dependent mitochondrial fission requires the direct interaction of the protein or aggregates of it with the mitochondrial outer membrane. Our group also determined that the interaction between α Syn and mitochondrial membranes largely depends on its N-terminal sequence, since the disruption of that domain in the endogenous α Syn gene by genomic edition using CRISPR-Cas9 induced changes in both mitochondrial morphology and biodynamics within the neurons derived from the edited cell line, which supports the notion of a physiological role for the protein dependent on its N-terminal domain.

The evidenced physiological and pathological role of α Syn in the maintenance of axonal mitochondrial homeostasis, contributes to a common underlying path to PD pathology, which ultimately is fundamental for the understanding of neurodegenerative diseases and is both a useful and powerful tool for the design of therapeutic and/or preventive strategies for the treatment of such ailments.

Key words: Parkinson's Disease, Neurodegeneration, α Syn, Human neurons, Human embryonic stem cells, human induced pluripotent stem cells, Mitochondria, Mitochondrial Transport, Mitochondrial fission, Mitochondrial Biodynamics, Mitochondrial Homeostasis, Genomic Edition.

Agradecimientos:

El ciclo de formación Doctoral es un momento complejo en la vida de todo estudiante, el apoyo y el factor humano de un equipo de trabajo siempre se pone a prueba en dicho periodo, me considero una persona afortunada por el haber compartido esta experiencia con gente de gran capacidad y valía, y es por ello que quisiera dedicarles a ellos las siguientes palabras:

Al Dr. Gustavo Sevlever, mi director, siempre le agradeceré la paciencia, la escucha y la ayuda otorgada en todo tipo de situación, su predisposición para discutir resultados, su guía para el establecimiento de colaboraciones y el haber depositado su confianza en el desarrollo de la presente tesis.

A la Dra. María Elida Scassa quiero agradecerle por haberme dado tantas herramientas para la mesada y la vida, siempre recordaré con mucho cariño su calidez y sus enseñanzas respecto a cómo manejarse en la actividad académica y como hacer frente a los cambios y eventualidades propios de la misma de manera profesional y consistente.

A la Dra. Vanesa Heyd, por haber creído y confiado en mí al haberme ofrecido la posición de becario doctoral en el laboratorio del desarrollo celular en FLENI.

Al Dr. Falzone del laboratorio de transporte axonal y enfermedades neurodegenerativas, quiero agradecerle por su aporte en el trabajo realizado entre ambos laboratorios, y su excelente disposición para la discusión de resultados y planeamiento del trabajo diario.

Al Dr. Pozo Devoto, mi compañero directo de mesada en el trabajo aquí presentado, muchas gracias por escucharme, y enseñarme tanto en cuanto a técnicas, consejos y análisis de resultados. Su aporte fue fundamental en mi formación, siempre le estaré agradecido por ello. Al Lic. Alloati, a la Dra. Saez y al Dr. Cromberg, compañeros del laboratorio de transporte axonal, gracias por todas esas extensas charlas variopintas y fundamentalmente divertidas, mediadas por el siempre presente mate frente a las siempre presentes computadoras y su disponibilidad para discutir y lograr masa crítica.

A mis compañeros del LIAN, el Dr. Romorini, el Dr. Videla Richardson, la Dra. Blugerman, la Dra. García, la lic. Morrison, la lic. Scaraffia, la lic. Mucci, la lic. Rodriguez Varela, a Gerónimo y a Jonathan por su disponibilidad continua para ofrecer una mano en cualquier cosa necesaria y hacer que el día a día fuese algo digno de ser recordado. Quisiera aprovechar para agradecer especialmente a Marcela Cañari, Olivier Blond y a Darío Espinoza, administrativa y

técnicos de laboratorio y de cultivo respectivamente, su trabajo tras bambalinas es la fuerza de empuje que mantiene a los proyectos del LIAN en actividad.

A mi familia, gracias por haberme otorgado tantas oportunidades y gracias por haberme enseñado todo. Gracias a mi Madre, por su amor y apoyo incondicional, siempre has sido un pilar en mi vida, te quiero Ma. Gracias a mis hermanos, Carolina, Ignacio y Theo por bancarme en todo, incluso en nuestras diferencias, gracias por haberme enseñado como compartir y la importancia de escuchar. A mis tíos Patricia, Daniel y Miriam, por haberme inspirado tantas veces para formarme profesionalmente y por todas las enseñanzas y vivencias compartidas.

A mis primos Luccia y Francesco, por siempre estar dispuestos a ayudarme o a disfrutar y reír conmigo. A mis abuelos, Ítalo y Teresita, por haber trabajado incansablemente para formar y sostener a nuestra familia, sin Uds. hoy no estaría aquí.

Gracias a mis amigos, mi familia elegida, por haber acompañado mi existencia a través de las glorias y miserias de la vida, en un sentido profesional y general. Siempre estarán en mi corazón, gracias Victoria, Carolina, Flor, Tamara, Mariana, Yanina, Sol, Micaela, Sara, María, Hernán, Ezequiel, Yael y Noelia.

Gracias a mi amor, Leonardo, presente en cada logro y cada quebranto, por tantos esfuerzos y sacrificios, por estar siempre pendiente de mí. Gracias por darme tu amor, me alegra mucho el cerrar esta etapa contigo a mi lado y seguir caminando hacia un futuro juntos.

A mi facultad y mis profesores, todos y cada uno de ellos, gracias por enseñarme a explorar universos nuevos del pensamiento, gracias por inspirarme y compartir su pasión por el conocimiento. Siempre estaré en deuda con la casa de estudios de la FCEyN que incluso en momentos difíciles del país, se ha esforzado en ofrecer una educación de excelencia a fuerza del trabajo y pasión de las personas que la componen. En palabras del inmortal Gustavo Ceratti, Gracias.... Totales.

Lic. Nicolás Alexis Dimopoulos.

Este trabajo fue financiado por subsidios y becas de las siguientes instituciones:



El presente trabajo de tesis fue publicado en *Scientific reports* (2017) :

α Synuclein control of mitochondrial homeostasis in human-derived neurons is disrupted by mutations associated with Parkinson's disease.

Pozo Devoto VM, Dimopoulos N, Alloatti M, Pardi MB, Saez TM, Otero MG, Cromberg LE, Marín-Burgin A, Scassa ME, Stokin GB, Schinder AF, Sevlever G, Falzone TL (2017). *Scientific reports*, 7(1), 5042.

Indice:

Abreviaturas:.....	11
1. Introducción.....	14
1.1 Células Madre Embrionarias.....	14
1.1.2 Células pluripotenciales inducidas:.....	15
1.2 Desordenes Neurodegenerativos asociados a Alfa Sinucleína (α Sin):.....	18
1.3 Factores Hereditarios asociados a la EP:	23
1.4 Funciones fisiológicas de α Sin:.....	25
1.5 Formación de semilla de agregación.	26
1.6 Propagación del estado patológico en α -Sinucleinopatías.....	27
1.7 Membranas lipídicas y agregación de α Sin.....	29
1.8 Homeostasis de Ca^{2+} y α Sin.....	31
1.9 Disfunción mitocondrial y enfermedad de Parkinson:	32
1.10 Alfa-Sinucleinopatías y envejecimiento:.....	36
1.11 Estado actual de modelaje y tratamiento de Alfa-sinucleinopatías.....	37
Hipótesis.....	39
Objetivos.....	39
Objetivo general:	39
Objetivos particulares:.....	40
2. Materiales y Métodos.....	41
2.1. Cultivo Celular.....	41
2.1.1 Aislamiento de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF)	41
2.1.2 Irradiación de MEF.....	42
2.1.3 Cultivo de Células pluripotentes humanas.	42
2.1.4 Diferenciación Neural.....	43
2.1.5 Cultivos de células madre neurales.....	45
2.1.6 Cultivo primario de células hipocampales murinas.....	45
2.1.7 Línea humana de neuroblastoma.....	46
2.1.8 Extracción de ADN genómico.....	46
2.1.9 Detección de Micoplasma.....	47
2.1.10 Criopreservación de células pluripotentes.....	48

2.2 Electrofisiología.....	48
2.3 Inmunocitoquímica.	49
2.4 Ensayo de actividad de Fosfatasa Alcalina.....	50
2.4 Aislamiento de ARN total, RT-PCR y qPCR.	50
2.5 Transfección.....	52
2.5.1 Eficiencia de transfección:	52
2.7 Transducción.....	53
2.7.1 Titulación Viral	53
2.6 Imágenes en “ <i>time lapse</i> ”.....	54
2.8 Potencial de membrana mitocondrial.	54
2.9 Fraccionamiento subcelular.....	56
2.10 Western Blot	56
2.11 Sistema de heterodimerización FKBP/FRB.	57
2.12 Edición Genómica Crispr/Cas9.....	57
2.13 Análisis de imágenes y Estadística:	58
3. Resultados.....	60
3.1 Las células madre embrionarias indiferenciadas, presentan fenotipo pluripotente:.....	60
3.2 El protocolo de diferenciación implementado, es capaz de generar neuronas humanas maduras a nivel morfológico y funcional.....	61
3.3 Sobreexpresión de α Sin en neuronas derivadas a partir de CMEH.....	64
3.4 La sobreexpresión de α Sin induce defectos en el transporte mitocondrial axonal.	67
3.5 Fragmentación mitocondrial axonal en neuronas que sobreexpresan A53T α Sin.....	70
3.6 La expresión direccionada de α Sin WT y A53T, pero no de A30P, reduce el tamaño mitocondrial.74	
3.7 La integridad del dominio N-terminal de α Sin es necesaria para el control de la morfología mitocondrial neuronal.	78
4. Discusión.	83
4.1. El protocolo de diferenciación utilizado es capaz de generar neuronas terminalmente diferenciadas para ser utilizadas como modelo experimental.....	83
4.2 La sobreexpresión de las diferentes variantes de α Sin tiene un efecto diferencial sobre la morfología mitocondrial.	85
4.3 La sobreexpresión de α Sin induce defectos en el transporte mitocondrial.....	86
4.4 Localización de α Sin e interacción con membranas mitocondriales.....	87
4.5 Expresión de α Sin dirigida a mitocondria.	89

4.6 El dominio N-terminal de α Sin es clave en la interacción con la membrana mitocondrial.....	90
4.7 Perspectivas Futuras:	91
Conclusión.....	92
Bibliografía:	94

Abreviaturas:

6-OHDA : 6-hidroxidopamina.

ActA: Proteína inductora del ensamblaje de actina.

ADN: Acido desoxirribonucleico

ARD: Acoplamiento residual dipolar.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARP: Relajación paramagnética.

BDNF: factor neurotrófico derivado de cerebro.

BFGF: Factor de crecimiento de fibroblastos básico.

CL : Cuerpos de Lewy

CMEH: Células madre embrionarias humanas.

CMNH: Células madre neurales humanas.

CMPih/hiPSC: Células madre pluripotenciales inducidas humanas/ *induced pluripotent stem cells*.

c-Myc: proto-oncogén de la familia Myc que funciona como factor de transcripción requerido para la expresión de muchos genes involucrados en la transición del ciclo celular y eventos asociados a la proliferación.

CO₂: Dióxido de carbono.

COX-1: subunidad 1 de la citocromo C. oxidasa.

CRISPR-Cas9: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*- enzima endonucleasa de ADN de ARN guía.

Dibutiril AMPc: Dibutiril Adenosina monofosfato cíclico.

DRP1: Proteína 1 relacionada a dinamina.

EP: Enfermedad de Parkinson.

FA: Fosfatasa Alcalina.

FCCP: Carbonilcianuro-4 trifluorometoxi-fenilhidrazona.

Fgf8: Factor de crecimiento de fibroblastos.

FKBP: Peptidyl-Prolyl Cis-Trans Isomerasa.

FRB: demonio de unión a FKBP de mTOR.

GDNF: factor neurotrófico derivado de glia.

GFP/EGFP: *Green fluorescent protein/enhanced Green fluorescent protein*.

Klf4: De sus siglas en inglés Kruppel-like factor 4

KO: *Knock Out*.

Abreviaturas.

Lin28: Proteína que se une al ARN y actúa como regulador post-transcripcional de genes involucrados en la expresión cronológica de genes asociados al desarrollo y la auto-renovación de las células madre embrionarias.

MAMs: Membranas del retículo endoplasmático asociadas a mitocondria.

MAP 5: *Microtubule Associated Protein 5*.

MDN: Medio de diferenciación neural.

MEM: Membrana externa mitocondrial.

MFN 1/2: Mitofusina 1/2.

MIN: Medio de inducción neural.

MPTP / MPP⁺: 1-metil-4-fenil-1, 2, 3, 6-tetrahidropiridina/ 1-Metil-4-fenil-piridino.

MSA: atrofia sistémica múltiple.

Nanog: Factor de transcripción con dominio homeobox, involucrado en la proliferación renovación y pluripotencia de las células madre embrionarias.

Neuronas DA: neuronas dopaminérgicas.

NHEJ: *Non homologous end joining*.

Oct3/4: De sus siglas en inglés *octamer-binding transcription factor 4*

PA: Potencial de acción.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PGC-1 α : Coactivador 1alfa del receptor gama activado por proliferadores de peroxisomas.

PID: Proteínas intrínsecamente desordenadas.

PM: Potencial de membrana.

PPIasa: Peptidil prolil Isomerasa.

RE: retículo endoplasmático.

Región NAC : péptido amiloidogénico no asociado al componente A β .

RMN: Resonancia magnética nuclear.

ROS: Especies reactivas del oxígeno.

SDS: Dodecil sulfato sódico.

SHH: *Sonic Hedgehog*.

SNARE: *Soluble NSF Attachment Protein*.

SNC: Sistema nervioso central.

SNCA: Gen codificante para α Sin.

Sox2: De sus siglas en inglés Sex determining Region Y-box 2

TH: tirosin hidroxilasa.

TOM20: traslocasa mitocondrial de membrana externa.

Abreviaturas.

Tuj1: Beta 3 tubulina.

VDAC: *Voltage-Dependent Anion-Selective Channel*.

VPS35: Proteína asociada al tráfico vacuolar 35.

WT: *wild type*.

α Sin : Alfa sinucleína

β Sin: Beta sinucleína.

γ Sin: Gama sinucleína.

1. Introducción.

1. Introducción.

1.1 Células Madre Embrionarias.

Las células madre embrionarias (CME) constituyen una población de células derivadas del macizo celular interno del blastocisto (Hyslop *et al.* 2005), definidas por dos características principales:

- Pluripotencia: potencial para diferenciarse y dar origen a células de las tres capas embrionarias (Stojkovic *et al.* 2004).
- Auto-renovación: habilidad para dividirse indefinidamente. La auto-renovación debe distinguirse de la proliferación celular, a pesar de que ambas dependen de la división celular. Este proceso implica que al menos una de las células hijas debe conservar intacta la naturaleza pluripotente que poseía la célula que le dio origen (Shenghui *et al.*, 2009).

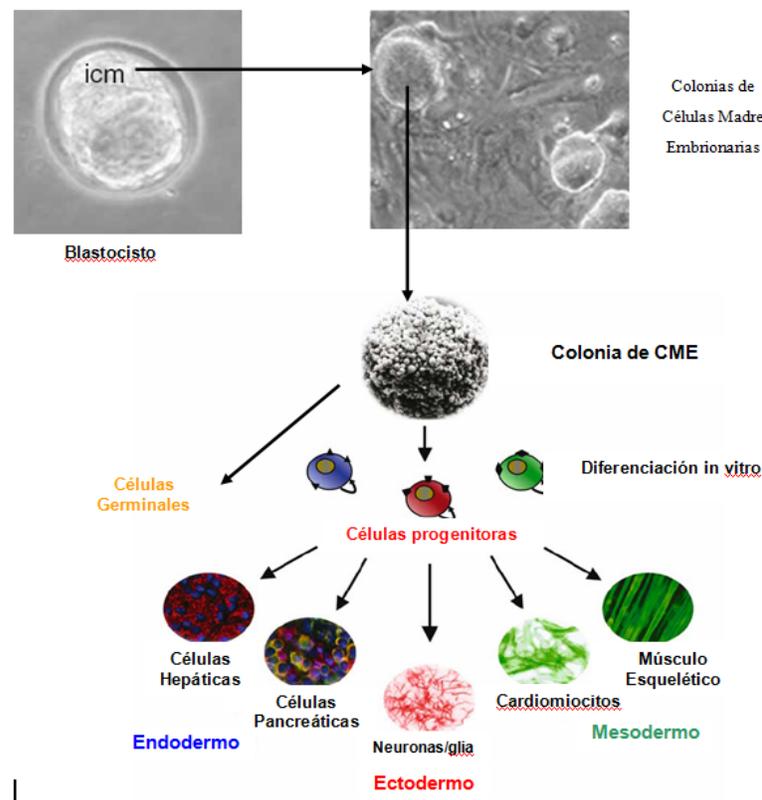


Figura 1.1: Origen y pluripotencia de las CME humanas. Esquema de obtención y diferenciación *in vitro*.

Estas características de las CME son mantenidas gracias a la acción orquestada de factores de transcripción y vías de señalización que transducen señales extracelulares que previenen su diferenciación y promueven su expansión, manteniendo así los rasgos epigenéticos que presenta su cromatina en el estado indiferenciado.

Uno de los mayores beneficios que presentan las CME humanas (CMEH) es su potencial para generar una fuente ilimitada de poblaciones celulares específicas y homogéneas (Cervera *et al*, 2007 Lerou *et al*, 2005) plausibles de ser utilizadas en medicina regenerativa (Fig. 1.1).

1.1.2 Células pluripotenciales inducidas:

Gracias al aporte del grupo de Yamanaka, en el año 2007 se logró la reprogramación de células humanas desde un estado somático al pluripotente mediante la expresión ectópica de factores de transcripción específicos que actúan como genes maestros del estado indiferenciado (Oct3/4; Sox2 con Klf4 y c-Myc o Nanog y Lin28) (Kazutoshi Takahashi, *et al*. 2007) (Fig. 1.2).

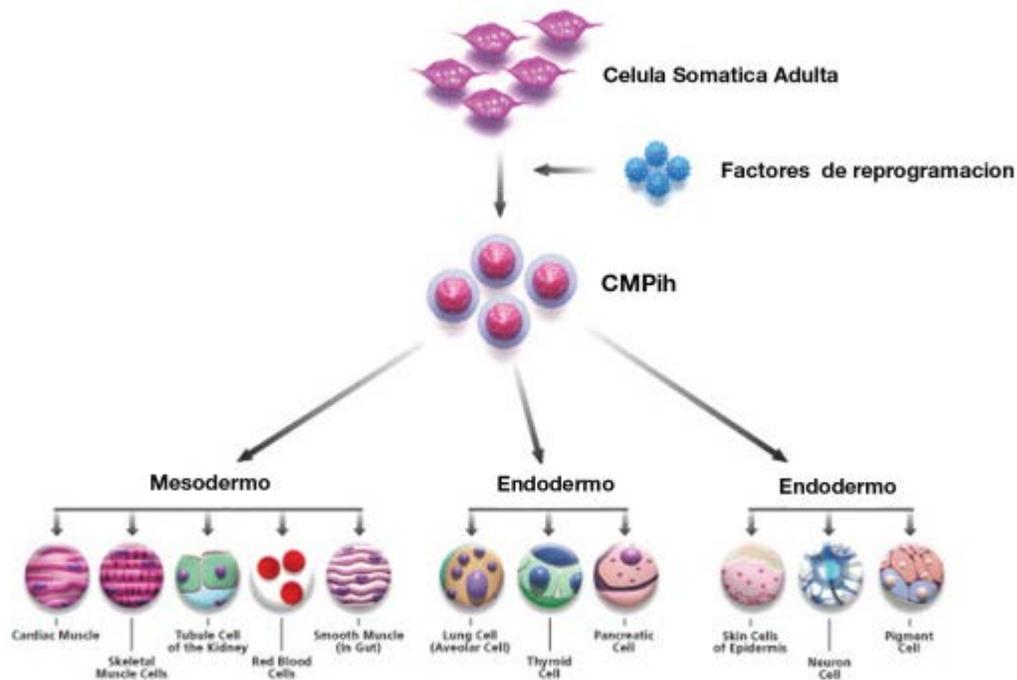


Figura 1.2: Origen y pluripotencia de las CMPih (*New York Stem Cell Foundation. Beyond the Dish – WordPress 2015*)

Estas células madre humanas inducidas (CMPih o hiPSC por sus siglas en inglés) son un excelente modelo para estudiar los mecanismos moleculares subyacentes a las enfermedades

neurodegenerativas. Esto se debe a la posibilidad de obtener líneas de células pluripotentes genotipo específicas del paciente donador. Los alcances para el estudio de patologías y la aplicación clínica que ofrecen las CMPih son extensos, y todavía están en desarrollo. El objetivo de aplicación más avanzado será la aplicación de terapias de corrección génica en la línea derivada del paciente *in vitro* y la reintroducción al organismo de tipos celulares específicos sin la alteración génica asociada a la enfermedad (J.L. Badger, *et al.* 2013).

Asimismo, las células pluripotentes, sean de origen embrionario o inducidas y las células derivadas a un linaje específico a partir de ellas, pueden ser utilizadas como fuente de modelos celulares humanos *in vitro*, una herramienta de gran utilidad para la investigación básica. Obtener cultivos primarios de tejidos con potencial proliferativo reducido en el humano adulto ha probado ser dificultoso y limitadamente reproducible. Este es el caso de los tejidos del sistema nervioso. La obtención de material cadavérico presenta múltiples desventajas, tales como una ventana de tiempo reducida en cuanto a la obtención de explantos viables, la supervivencia de los mismos y las dificultades logísticas y regulatorias para manejar un cadáver humano y obtener las muestras. Otras desventajas son la escasa cantidad de individuos que donan sus tejidos para investigación y la baja supervivencia *per se* de los cultivos primarios. Los modelos animales, si bien fundamentales en la neurociencia, tienen limitaciones en la representación de un sistema nervioso tan complejo como lo es el del ser humano. Estados patológicos neurodegenerativos asociados al envejecimiento y carga genómica del individuo humano no pueden ser evocados en su totalidad en un contexto animal.

El número de enfermedades que podrían ser tratadas y/o modeladas con CMEH es extenso e incluye desórdenes neurodegenerativos, como la Enfermedad de Parkinson (EP), lesiones producidas por accidentes cerebro vasculares, lesiones de médula, entre otras como así también otros desórdenes no relacionados con el sistema nervioso central (SNC), tales como diabetes, distrofia muscular o disfunción cardíaca entre otros.

Induciendo la diferenciación de células pluripotentes es posible generar un número ilimitado de neuronas con fenotipo específico bajo condiciones de cultivo estandarizadas y controladas. En 1998, Ye y Rosenthal descubrieron que las neuronas dopaminérgicas (DA) requieren concentraciones específicas de los morfógenos *Sonic hedgehog* (SHH) y factor de crecimiento de fibroblasto 8 (FGF8), que son aportados *in vivo* por el tubo neural y la frontera entre el mesencéfalo y el metencéfalo respectivamente, por ende los primeros protocolos *in vitro*

con el fin de inducir neuronas DA positivas para tirosina hidroxilasa (TH⁺) a partir de CMEH, fueron orientados a la utilización de protocolos que incluyan dichos factores de crecimiento en cultivos indiferenciados.

Desde aquel entonces, se han producido avances significativos en las técnicas de cultivo, especialmente en lo referente a la profundización en el conocimiento empírico que mejora la activación de las vías de transducción que modulan la diferenciación dopaminérgica. Sin embargo, existen todavía interrogantes acerca del conocimiento de todos los factores intrínsecos, exógenos y la interrelación entre estos que permiten la diferenciación desde un estado de neuroblastos a precursores comprometidos al fenotipo DA, derivando finalmente a la neurona DA madura (Smith S, Burbach H y Marten P. Smidt 2006).

Las terapias de reemplazo celular en enfermedades neurodegenerativas como la EP utilizando los diseños de trasplante al día de la fecha, han fallado en cumplir con las expectativas. Las pruebas clínicas preliminares han mostrado las falencias actuales del estado de la técnica. Entre ellas podemos nombrar: el desarrollo de potenciales efectos adversos no anticipados y frecuentemente discapacitantes, la evidencia del desarrollo de síntomas de la enfermedad en las células trasplantadas y la probabilidad de que el tratamiento de implante no ayude en la mejoría de los síntomas no dependientes de dopamina durante el estado avanzado de la enfermedad (Olanow *et al*, 2009).

Es por ello necesario la caracterización exhaustiva de las moléculas responsables de la adquisición de un determinado fenotipo neuronal en el modelo *in vitro* para eventualmente lograr una aplicación efectiva y segura de los tratamientos de reemplazo celular, las perspectivas son buenas, pero todavía falta un largo camino por recorrer.

El potencial de modelado de tejidos neurales *in vitro* de las células pluripotentes sin embargo puede ser aprovechado con el conocimiento actual del desarrollo y diferenciación tisular. Para poder evaluar un modelo experimental como exitoso, el mismo debe cumplir:

- Compartir características con lo que se desea modelar (por ej. no es posible estudiar factores de transcripción en procariontes).
- Homología respecto al objeto de estudio: Una misma acción ejercida tanto sobre el modelo como en el objeto de estudio tendrá una misma consecuencia.

- Isomorfismo con el objeto de estudio: Existe un paralelismo en las formas del objeto de estudio y el modelo propuesto.
- Validez de constructo: para generar el modelo, se toman elementos de la etiología de la enfermedad y se incorporan al mismo. En el caso de la enfermedad de Parkinson (EP), no existe construcción fija (desconocida la etiología exacta de la patología). En estos casos, para poder modelar, se usan las teorías más aceptadas en el momento como puede ser el modelo de EP inducido por neurotoxinas como la 1-metil-4-fenil-1, 2, 3, 6-tetrahidropiridina (MPTP), o lesión estereotáxica con 6-hidroxidopamina (6-OHDA).
- Validez aparente (*Face validity*): Fenotipos del modelo son similares a los de la patología a modelar.
- Validez predictiva: Relacionada al éxito de las predicciones basadas en el modelo.

(F. Josef van der Staay, *et al.* 2009).

Resulta claro entonces que los modelos *in vitro* a partir de células pluripotentes diferenciadas o tempranamente comprometidas a linaje cumplen con todos esos requisitos y permiten el trabajo en línea humana con un mayor éxito en los puntos de isomorfismo, homología, validez aparente y reproducibilidad frente a modelos no humanos, líneas inmortalizadas o de cultivo humano primarios con todos los desafíos que ello implica.

Existen varios modelos animales establecidos que proveen información respecto a los mecanismos moleculares subyacentes a la EP, sin embargo, ninguno de estos modelos recapitula totalmente la patofisiología de la enfermedad en humanos.

1.2 Desordenes Neurodegenerativos asociados a Alfa Sinucleína (α Sin):

Las enfermedades neurodegenerativas, al día de la fecha, presentan amplias incógnitas en cuanto a su etiología y mecanismos patológicos y este es el caso de las alfa-sinucleinopatías. La proteína alfa sinucleína (α Sin) es una proteína con localización ubicua en el citosol y en las terminales sinápticas de las neuronas. En condiciones normales es soluble, pero en concentraciones elevadas se agrega produciendo neurofilamentos conocidos como cuerpos de Lewy. Dichos agregados se han observado en formas esporádicas y hereditarias de la EP, así como en la demencia de Lewy. La EP es considerada la segunda patología neurodegenerativa en frecuencia sólo después

de la enfermedad de Alzheimer. La etiología de la EP aún no se conoce, aproximadamente el 90% de los casos se consideran esporádicos o idiopáticos, mientras que el resto tienen un origen genético ligado a alguno de los 20 loci identificados hasta el presente. La EP se caracteriza clásicamente por manifestaciones motoras denominadas cardinales (temblor de reposo, bradicinesia, rigidez e inestabilidad postural. Por otra parte, los síntomas no motores son frecuentes presentándose hasta en el 90% de los casos y en particular la hiposmia, trastornos del sueño, trastornos neuropsiquiátricos y síntomas gastrointestinales disautonómicos pueden preceder a las manifestaciones motoras (Hughes AJ, *et al.* 2007; O'Sullivan SS, 2007)

Esta enfermedad está caracterizada por la pérdida progresiva de neuronas DA y la acumulación de inclusiones eosinofílicas intracelulares llamadas cuerpos de Lewy (CL) (Fig1.3). Existen otras patologías neurodegenerativas que comparte el síntoma de los CL, como la demencia de Lewis. En las últimas décadas se ha generado una vasta cantidad de información respecto a las patologías asociadas a cuerpos de Lewy, sin embargo, todavía existen múltiples incógnitas respecto a las causas y progresión de estas enfermedades. Una de las preguntas principales se centra en si los agregados que contienen α Sin son dañinos *per-se* o si se trata de un mecanismo de detoxificación donde la célula secuestra componentes proteicos individuales que de otra manera serían tóxicos.

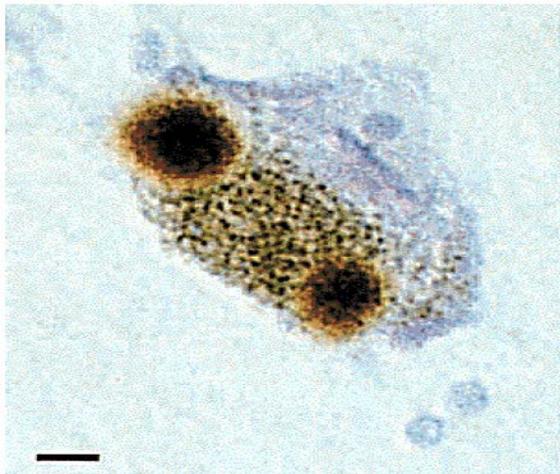


Figura 1.3: Cuerpos de Lewy α Sin⁺. En tejido post mortem de *substantia nigra* de pacientes con Enfermedad de Parkinson. Tinción con anticuerpo anti α Sin (marrón). En la imagen se observa una única célula nerviosa conteniendo dos cuerpos de Lewy. Barra de escala: 8 μ m. (Spillantini, M. G. *et al* 1997)

Dos grupos sugieren que las inclusiones conteniendo α Sin podrían no ser tóxicas en sí mismas, pero las especies de oligómeros intermedarios en la vía de agregación podrían ser

responsables por la proteotoxicidad de α Sin (Volles, M.J. and Lansbury, P.T., 2003; Winner, B., *et al.*, 2011).

Las bases moleculares asociadas a la EP (y otras sinucleinopatías) parecen estar estrechamente relacionadas a la agregación de α Sin. α Sin es una proteína ácida pequeña (14KDa), no contiene residuos cisteína ni triptófano, y se encuentra distribuida de manera ubicua en el SNC tanto en forma soluble como asociada a membranas y enriquecida en las terminales pre-sinápticas. Representa hasta el 1% de fracciones cerebrales de proteínas solubles del citosol neuronal (Kim WS *et al.*, 2014). En neuronas DA se ha sugerido que interactúa con vesículas sinápticas cargadas con dopamina (Jo, E., *et al.*, 2000).

En 1997 se realizaron dos importantes descubrimientos que condujeron a la profundización del estudio del rol de esta proteína en la etiología de la EP. La demostración de que mutaciones específicas en el gen de α Sin está relacionada con casos familiares de la EP de aparición temprana (P. Flagmeier *et al.*, 2016) y la demostración de que dicha proteína es componente principal de los CL (Bayer TA, *et al.*, 1999). La homología de α Sin entre especies es mayor en su extremo N-terminal, y presenta una mayor variabilidad hacia el extremo C-terminal. La expresión de α Sin es bastante alta, constituyendo hasta el 1% de proteína total en ciertas regiones del cerebro. Dentro de las células neuronales, α Sin ha sido detectada tanto en citoplasma como en núcleo (Iwai, A., *et al.*, 1995).

La secuencia aminoacídica de α Sin (Fig. 1.3) está muy conservada especialmente en los extremos N- terminales. Dicha región contiene siete repeticiones imperfectas de 11 residuos (formando una α -hélice anfipática) que contienen la secuencia consenso KTKEGV (Vamvaca, K., Volles, M.J. y Lansbury, P.T. 2009). Los residuos 61-95 contienen varios aminoácidos hidrofóbicos y un péptido específico de esta región, que es llamado péptido amiloidogénico no asociado al componente A β (región NAC) mientras que el dominio C-terminal se encuentra enriquecido en aminoácidos de tipo ácidos, lo que determina una carga regional negativa (Figura 1.4). La región C-terminal, comprendida entre los residuos 96-140 está enriquecida en aminoácidos ácidos y prolinas, las primeras dos regiones constituyen el dominio de asociación a membrana y se propone a la cola C-terminal como la región que contiene los sitios donde se dan las interacciones proteína-proteína y proteína-molécula pequeña.

1 MDVFMKGLSK AKEGVVAAAE KTKQGVAAEA GKTKEGVLYV GSKTKEGVVH GVATVAEKT **EQVTNVGGAV**
 80 **VTGVTAVAQK TVEGAGSIAA ATGFVKKDQL** GKNEEGAPQE GILEDMPVDP DNEAYEMPSE EGYQDYPEA

Figura 1.4: Secuencia proteica humana de α Sin (140 aa; *accession number*: P37840.1). Las regiones resaltadas corresponden a las 7 repeticiones imperfectas de 11 residuos cada una y en rojo se marca la secuencia amiloidogénica NAC (Vamvaca *et al.* 2009).

La proteína α Sin se incluye en el conjunto de proteínas conocidas como intrínsecamente desordenadas, una clase de proteínas caracterizadas por la falta de estructura definida en su conformación soluble nativa (Dunker, A.K., *et al.*, 2001). En 1996, Weinreb *et al* demostraron que en solución α Sin sedimenta más lentamente y presenta un radio de Stokes (34 Å) mucho mayor que proteínas globulares de similar tamaño sugiriendo que la conformación soluble es la de una proteína desplegada o elongada.

Otros estudios enfocados en la caracterización del estado no agregado de α Sin han dependido de las técnicas de simulación *in silico* de dinámicas moleculares y técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN) (Fig. 1.5) de mayor complejidad, como puede ser el acoplamiento residual dipolar (ARD) y ensayos de aumento de la relajación paramagnética (ARP).

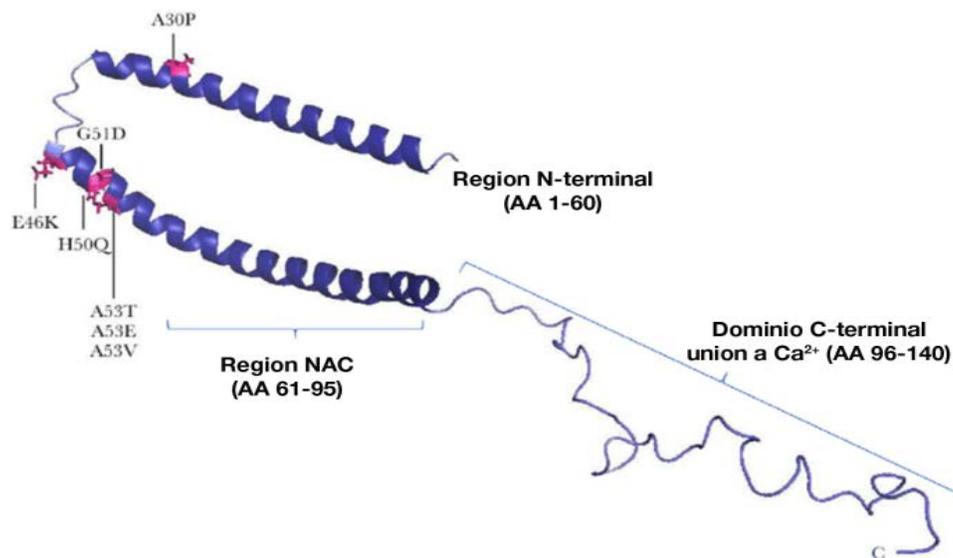


Figura 1.5: Estructura de α Sin unida a vesículas de SDS. La estructura de la proteína completa fue determinada por RMN (PDB ID: 1XQ8) y la imagen fue representada mediante el software Pymol. La estructura está coloreada desde el azul (Extremo N-terminal) hacia el rojo (extremo C-Terminal). (Whittaker, H. T., *et al* 2017)

Estas técnicas han producido resultados que sugieren que α Sin adopta varios miles de conformaciones estructurales diferentes, muchas de las cuales son más compactas que las esperadas para un espiral proteico desplegado (Dedmon, M.M., *et al.* 2005).

Muchas de estas conformaciones incluyen interacciones de larga distancia (15 a 20 Å) entre los dominios C- y N-terminales y la porción central de la proteína (Dedmon, M.M., *et al.*, 2005; Bertocini, C.W., Jung, Y.-S., *et al.*, 2005). La estructura nativa de α Sin está determinada en gran medida por su relativa baja hidrofobicidad y alta carga neta. Es entonces esperable que alteraciones ambientales del microambiente donde se encuentre la proteína lleve a un aumento en la hidrofobicidad o una disminución de la carga neta y esto a su vez induzca el plegamiento parcial de la misma. El exceso de carga negativa de la proteína (Punto Isoeléctrico 4.7) puede ser neutralizado por la acidificación de la solución proteica, y es esperable que la hidrofobicidad de la proteína aumente con un aumento en la temperatura. Esta hipótesis fue probada y se observó que, cambiando dichos parámetros de solución, α Sin gana un cierto nivel de estructura secundaria ordenada, y una mayor compactación (V.N. Uversky, *et al.*, 2001).

Se ha demostrado que los aniones inducen el plegamiento parcial de α Sin a pH neutro, favoreciendo la aparición de intermediarios de plegamiento y acelerando la formación de fibrillas. La magnitud de este efecto depende de la posición del anión en la serie de Hofmeister, indicando que el mayor impacto de estas especies cargadas negativamente en la formación de fibrillas se debe a su modulación de las interacciones proteína- H_2O , aunque los efectos electrostáticos directos también deben ser tenidos en cuenta. El aumento en la agregación puede ser considerado entonces como el resultado de la pérdida de carga descompensada, que es un factor que promueve la solubilidad en medio polar, y un aumento en la hidratación preferencial que promueve el plegamiento y agregación por la estabilización de interacciones hidrofóbicas. Los procesos de nucleación y crecimiento de fibrillas se ven afectadas por una combinación de estos dos efectos. La adición de bajas concentraciones de sal disminuye la repulsión electrostática entre residuos de la proteína, dando lugar a los confórmeros que favorecen la agregación amiloidogénica. Altas concentraciones de sales deshidratan la proteína y favorecen más aun su agregación (L.A. Munishkina *et al.*, 2004)

Finalmente se llegó a la conclusión que α Sin en un medio a pH neutro, se mantiene en un estado desordenado y falta de estructura terciaria, sin embargo, demuestra un nivel de compactación mayor al esperable para un péptido totalmente extendido.

Se ha sugerido que α Sin es degradada por vías lisosomales que pueden presentar pH de valores tan bajos como 5.5 (Masliah E, *et al.* 2005). Esto indica que el pH local al que se halla expuesto α Sin puede cambiar significativamente durante su ciclo funcional. α Sin es además detectada en fluidos biológicos humanos y en el medio de cultivo de células neuronales, sugiriendo un modo de acción parácrino en el medio extracelular (Vekrellis *et al.*, 2011).

Podemos concluir entonces que, al igual que otras proteínas desordenadas, α Sin puede describirse como un ensamble altamente dinámico de conformaciones favorecidas según las condiciones del medio circundante (D. Eliezer *et al.*, 2001). Dentro de las variables de plegamiento, la tendencia a la agregación es variada, la forma levemente plegada se considera poco propensa a la agregación y muchos intermediarios de mayor plegamiento si presentan dicha tendencia.

En condiciones fisiológicas normales, el equilibrio entre los conformeros de plegamiento se encuentra favorecido hacia las formas no adherentes de la proteína, sin embargo, como ya ha sido expuesto, dicho equilibrio es sumamente inestable y puede ser fácilmente desplazado por cambios sutiles del ambiente hacia conformaciones que permiten los agregados amiloidogénicos. Diferentes factores pueden estabilizar diferentes conformeros y por lo tanto producir estados de agregación variados de α Sin, como pueden ser: oligómeros, agregados amorfos y fibrillas de tipo amiloide.

La forma soluble parcialmente compacta de α Sin ilustra un concepto ampliamente aceptado respecto a la ventaja adaptativa de la variabilidad en conformeros de plegamiento de las proteínas intrínsecamente desordenadas (PID). Las PID contienen en sí mismas los elementos que pueden asociarse en interacciones moleculares no nativas. De esta manera el plegamiento intermedio de una cadena poli-peptídica de una PID puede ocultar dichos elementos dentro del núcleo de plegamiento, previniendo de esa manera asociaciones no requeridas o innecesarias con moléculas inespecíficas que actuarían como compañeros de interacción (V.N. Uversky *et al.*, 2011).

1.3 Factores Hereditarios asociados a la EP:

En el caso de la EP, tres mutaciones de sentido alterado (*missense*) puntuales en el gen de α Sin (A30P, A53T, y E46K), presentes en linajes con EP familiar, han demostrado estar correlacionadas con la aparición de síntomas tempranos de la enfermedad. Dos mutaciones *missense* en el gen de α Sin, correspondientes a las sustituciones A53T y la A30P fueron identificadas en 2 linajes que presentaban EP de aparición temprana de herencia autosómica

dominante (Polymeropoulos, M *et al* 1997; Kruger, R *et al* 1998). Asimismo, la sobreexpresión de α Sin *wt*, en ratones transgénicos (Masliah, E, *et al* 2005) o *wt*, A30p y A53T en moscas transgénicas (Feany, M *et al* 2000) llevan a déficits motores e inclusiones neurales que evocan síntomas de la EP. Reportes previos han demostrado que estas mutaciones forman agregados fibrilares de manera más rápida que la versión *wt*. Esta mayor tendencia a la agregación depende directamente de los intermediarios parcialmente plegados de α Sin que en el caso de los mutantes son más proclives a agregarse y no así a cambios en la forma monomérica desplegada de la proteína (Jie Li *et al* 2002).

Los efectos del cambio en la secuencia génica en la cinética de agregación de α Sin han sido objeto de intenso estudio desde el descubrimiento de esta proteína como principal constituyente de los CL (Spillantini MG *et al* 1998; Conway KA, *et al.* 2000; Fares MB *et al.* 2014). Duplicaciones (Chartier-Harlin, M.-C. *et al.* 2004) y triplicaciones (Singleton, A.B. *et al.* 2003) del gen de α Sin y por ende su sobreexpresión también son causa de síntomas tempranos en la etiología de la EP.

Pacientes con triplicaciones del gen de la α Sin (SNCA) presentan un inicio temprano de la enfermedad en comparación con pacientes con duplicaciones del SNCA, esto indica que los niveles intracelulares de α Sin determinan el desarrollo de la patología de manera dosis dependiente (Fuchs, J. *et al* 2007; Ibáñez, P. *et al.* 2009). Como ya ha sido mencionado, las propiedades de agregación en membrana de α Sin *in vitro*, sugieren que la proteína toma una conformación de α -hélice en su extremo N-terminal al interactuar con lípidos. La disrupción de este tipo de conformación vía la mutación puntual de α Sin A30P conlleva a una disminución en la afinidad de la proteína por lípidos, mientras que la mutación α SinA53T produce el efecto contrario (Perlmutter *et al.* 2009). Esta diferencia en la afinidad por lípidos correlaciona con un establecimiento más temprano y síntomas más severos en el desarrollo de la EP para los pacientes que portan la mutación A53T.

Los pacientes con mutación A30P presentan un desarrollo más tardío y síntomas más ligeros que el otro mutante (Kruger, R. *et al.* 2001; Puschmann, A. *et al.* 2009). Sin embargo, no es claro como estas dos mutaciones que tienen efectos opuestos en la afinidad de α Sin por las membranas culmina en defectos mitocondriales. Se ha propuesto una asociación diferencial con dicha organela dependiendo de la mutante en cuestión, algunos estudios han reportado presencia de α Sin dentro de la mitocondria y otros han reportado la localización en la membrana externa

mitocondrial (MEM) (Zhang, L. *et al.* 2008; Devi, L. *et al.* 2008; Martin, L. J. *et al.* 2006). De manera interesante, se han observado cambios en la morfología mitocondrial como un desarrollo en común tanto en modelos animales como en modelos celulares humanos de sobreexpresión de ambas mutantes y la variante *wt* de α Sin (Butler, E. K. *et al.* 2012; Kamp, F. *et al.* 2010; Xie, W. & Chung, K. 2012; Devi, L. *et al.* 2008, Nakamura, K. *et al.* 2011). Además, la función de α Sin ha sido relacionada con el proceso de fisión mitocondrial (Kamp, F. *et al.* 2010, Nakamura, K. *et al.* 2011, Martinez, J. H *et al.* 2018). Sin embargo, no ha habido hasta el momento evidencia robusta demostrando una regulación directa del tamaño mitocondrial dependiente de α Sin en neuronas humanas.

1.4 Funciones fisiológicas de α Sin:

Existen diferentes posibles funciones que se le atribuyen a α Sin, incluyendo funciones en el tráfico y liberación de vesículas sinápticas, asociación a ácidos grasos y regulación fisiológica de ciertas enzimas, y elementos proteicos de la maquinaria de transporte celular (K.K. Dev, *et al.* 2003). Está además relacionada a procesos referentes a la supervivencia neuronal. Se cree que la proteína α Sin es parte del sistema de protección neuronal frente a estímulos apoptóticos (C.A. da Costa, *et al.* 2000) α Sin es paróloga a otras dos proteínas del SNC, llamadas β - y γ -sinucleína. Ratones triple KO para α - β - y γ Sin mostraron una mayor disminución dependiente de la edad en el ensamblado del complejo SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor por sus siglas en inglés) cuya función principal es mediar la fusión entre membranas. α Sin presenta una actividad chaperona no clásica que juega un rol en el ensamblaje de dicho complejo. Tanto el extremo N- como el C-terminal de la proteína están implicados en esta función, ya que el extremo N-terminal se une a los fosfolípidos mientras que el extremo C-terminal es necesario para la unión con sinaptobrevina (una de las componentes del complejo SNARE) (Burré, J., *et al.*, 2010).

Esto demuestra que las sinucleínas son importantes contribuyentes al mantenimiento de la homeostasis celular a largo plazo de las células del SNC (B. Greten-Harrison *et al.* 2010). Se ha demostrado que la α Sin interactúa físicamente con al menos 30 proteínas, dando cuenta del rol subyacente de esta proteína en la señalización celular (K.K. Dev, *et al.* 2003; V.N. Uversky, 2008; J.E. Payton *et al.* 2001).

1.5 Formación de semilla de agregación.

Una característica distintiva del proceso de formación de agregados amiloides de α Sin de acuerdo a estudios *in vitro*, es que la nucleación primaria homogénea (la formación de núcleos de agregación competentes en una solución de la proteína) es indetectablemente lenta (Buell AK, *et al.* 2014). Sin embargo, está bien establecido que el proceso *per se* es altamente favorecido por la presencia de superficies como pueden ser las presentes en vesículas lipídicas o membranas de organelas (Galvagnion C, *et al.* 2015; Grey M, *et al.* 2015). Esta función de soporte puede ser llevada a cabo por polímeros hidrofóbicos en forma de nano-partículas (Vácha R, Linse S *et al.* 2014) o superficies macroscópicas (Grey M *et al.* 2011).

Cabe agregar que, si bien la agregación espontánea no es observada en condiciones quiescentes en ausencia de superficies de nucleación apropiadas, la adición de fibrillas “semilla” permite el desarrollo de los agregados (Buell AK, *et al.* 2014; Wood SJ, *et al.* 1999). En este contexto ha sido observado que el mecanismo de agregación de α Sin es dependiente en gran medida de las condiciones de la solución en donde la proteína esta solubilizada. Siendo condiciones centrales en el crecimiento y proliferación de fibrillas de α Sin el pH de la solución y la presencia de los nombrados agregados “semilla” (Buell AK, *et al.* 2014).

La tasa de elongación de las fibrillas es modificada de manera leve por cambios en la secuencia aminoacídica de α Sin asociados a la EP familiar. Sin embargo, estas mutaciones pueden alterar en varios órdenes de magnitud la tasa de iniciación de producción de fibrillas inducidas por vesículas lipídicas y su proliferación por auto-catálisis en la superficie de fibrillas pre-existentes, cambiando significativamente la importancia relativa de los pasos específicos propios del mecanismo de formación de las fibrillas amiloides (P. Flagmeier *et al.* 2016)

En el modelo *Caenorhabditis Elegans sp.* la sobreexpresión de las variantes humanas de α Sin (*wt*, A30P, y A53T) causaron una acumulación fibrilar de α Sin en neuronas DA. Estos gusanos fallaron en la modulación de la tasa de movimiento frente a estímulos asociados a la alimentación, función que normalmente es atribuida al control del eje dopaminérgico (T. Kuwahara *et al.* 2006). Individuos transgénicos *C.elegans sp* expresando α Sin bajo el control del transportador activo de dopamina (DAT por sus siglas en inglés) mostraron una neurodegeneración asociada al envejecimiento y a la exposición a dopamina de manera dosis dependiente (S. Cao, *et al.* 2005; S. Hamamichi *et al.* 2008).

Notablemente, mediante la sobreexpresión de α Sin humana en el sistema de eucariotas inferiores, *Sacharomyces Cerevisiae sp*, se ha podido recapitular varios de los aspectos relacionados con el plegamiento anómalo de proteínas y la toxicidad amiloide características presentes en la EP. Actualmente es un modelo sumamente utilizado para estudiar el rol patológico de la proteína en cuestión (Franssens. V *et al.* 2010). En diferentes modelos animales, se observó la aparición de depósitos α Sin⁺ en respuesta a la exposición de diferentes neurotoxinas (R. Betarbet, *et al.* 2000).

1.6 Propagación del estado patológico en α -Sinucleinopatías

En estudios *in vitro* se demostró que la proteína α Sin es fundamental en la propagación de las sinucleinopatías. Cuando dos poblaciones de neuronas DA humanas fueron co-cultivadas, unas sobre-expresando α Sin (células donantes) y las otras con una expresión endógena de la proteína (células receptoras) se demostró que la patología en efecto se propagaba de neurona a neurona a juzgar por la presencia de agregados de α Sin en ambas poblaciones. La aparición de inclusiones tipo CL en las células receptoras se dio de manera correlativa al nivel de sobre-expresión y el número de inclusiones tipo CL presentes en las células donantes observadas (P. Desplats, *et al.* 2009).

La proteína es secretada, a través de mecanismos no clásicos dependientes de calcio que en parte depende de exosomas (Emmanouilidou *et al.*, 2010), pequeñas vesículas extracelulares que derivan de endosomas luego de su fusión con la membrana plasmática (Chivet *et al.*, 2012). α Sin extracelular es tóxica para las células receptoras, lo cual le ha otorgado una importancia central en la propagación de la enfermedad también conocida como “contagio” en el contexto de la EP (Kordower *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008). Se ha demostrado además que formas oligoméricas de α Sin pueden crear poros que comprometen la integridad de la membrana plasmática y sirven como núcleos de agregación cruzada para otras proteínas propensas a la agregación como los priones o el péptido beta amiloide (Danzer *et al.*, 2007; Tsigelny *et al.*, 2012).

Estos resultados fueron avalados por numerosos estudios *in vitro* que establecieron que α Sin recombinante se ensambla fácilmente en agregados fibrilares amiloides y oligómeros bajo diversas condiciones. Esta tendencia a la agregación es modulada por factores ambientales, modificaciones post-traduccionales, mutaciones puntuales asociadas con la EP familiar e interacciones con membranas celulares o proteínas, incluyendo chaperonas β y γ sinucleínas

(Breydo *et al.*, 2012). Análisis conformacionales revelaron que tanto α -, β - como γ Sin se encuentran desplegadas bajo condiciones fisiológicas *in vitro*, y son capaces de adoptar conformaciones parcialmente plegadas a bajo pH. Si bien α - y γ Sin forman agregados fibrilares, β Sin no formó agregados bajo las mismas condiciones experimentales. Curiosamente la adición *in vitro* tanto de β - como γ Sin en una relación molar 1:1 aumentó dramáticamente el tiempo *lag* del inicio de nucleación de α Sin y disminuyó la tasa de elongación de sus fibrillas. Asimismo, la formación de agregados fibrilares de α Sin se ve completamente inhibida en un contexto de relación molar 4:1 de exceso de β - o γ Sin (V.N. Uversky, *et al.* 2002) 11970–11978. β -Sin también inhibe la agregación de α Sin en modelos animales (M. Hashimoto *et al.* 2001).

La formación de tetrámeros mixtos estables entre las sinucleínas ha sido propuesta como un mecanismo de inhibición (E. Israeli *et al.* 2009) esto sugiere que β - y γ Sin serían reguladoras de la fibrilación de α Sin *in vivo*, actuando como una suerte de chaperona. De ello se desprende que uno de los factores posibles en la etiología de la EP sería una disminución en los niveles de β - o γ Sin (V.N. Uversky, *et al.* 2002).

La nucleación cruzada ha sido también demostrada para oligómeros de proteínas amiloidogénicas. Kaye *et al* demostraron que tanto los oligómeros de péptido A β amiloide como los de α Sin son capaces de servir como “semilla” para la formación de oligómeros Tau citotóxicos (E.A.Waxman *et al.* 2011). Es por ello altamente probable que la nucleación cruzada sea un mecanismo subyacente en la agregación de α Sin por parte de proteínas amiloidogénicas. Proteínas no amiloides también pueden influir la agregación de α Sin por otros mecanismos, por ejemplo: la adición de la peptidil-prolil-isomerasa (PPIasa) FKBP acelera la agregación de α Sin *in vitro*, mientras que la adición de un inhibidor de PPIasa suprime dicho proceso (J. Meuvlis, *et al* 2010; M. Gerard, *et al.* 2006).

Varios factores han demostrado contribuir al desarrollo y progresión de enfermedades que presentan cuerpos de Lewy, incluyendo factores genéticos y ambientales. Existen tres mecanismos moleculares principales propuestos para explicar la neurotoxicidad de α Sin y sus agregados: la distorsión mecánica de procesos y compartimentos celulares y la ganancia o pérdida de función que resulta en citotoxicidad. La noción más importante asociada a la EP y otras sinucleinopatías es que si bien están caracterizadas por la acumulación de depósitos de α Sin, estas enfermedades neurodegenerativas son multifactoriales, su patogénesis no puede ni debe ser explicada solamente por la agregación de dicha proteína. Factores como la predisposición genética, insultos tóxicos,

fallas en el sistema de chaperonas disfunción proteosomal, daño oxidativo, son sólo algunos de los motivos que pueden contribuir a la aparición y desarrollo de las α -sinucleinopatías (M.C. Bennett, 2005).

1.7 Membranas lipídicas y agregación de α Sin.

En el caso de las membranas, las propiedades fisicoquímicas de los lípidos que las componen influyen de manera significativa la magnitud en la que pueden desencadenar el evento de nucleación (Galvagnion C. *et al.* 2016). Estudios estructurales enfocados a la caracterización de la forma unida a membrana de α Sin mediante RMN revelaron que su acople a lípidos cambia dramáticamente el contenido de α -hélices (R.J. Perrin, *et al.* 2000; W.S. Davidson *et al.* 1998). O sea, α Sin forma una variedad de estructuras helicoidales al unirse a membranas dependiendo de la composición de estas. La estructura *full-length* unida a membranas de vesículas de dodecil sulfato sódico (SDS) negativamente cargadas, adopta una conformación de dos α -hélices antiparalelas curvas (Val3-val37 y Lys45-Thr92) conectadas por una región *linker* ordenada, mientras que la región C-terminal se mantiene sin estructura fija (T.S. Ulmer *et al.* 2005) (Fig.9). Micelas de lauroil sarcocinato sódico, o Sarkosylmicelas, promueven una estructura similar exceptuando que el linker entre las α -hélices se mantiene desestructurado (J.N. Rao *et al.* 2010). Sin embargo, la unión a bicapas lipídicas promueve una forma de una α -hélice curvada única entre los residuos 1-90 (C.C. Jao *et al.* 2008; S.B. Lokappa *et al.* 2011). Esto sugiere un rol fundamental de la composición lipídica de membranas en la regulación del balance del comportamiento fisiológico y aberrante de α Sin (Galvagnion C. *et al.* 2016).

Las α -hélices que puede formar α Sin forman parte de la clase A2 de dominios helicoidales de unión a lípidos de membrana. Este grupo se distingue por la agrupación de residuos básicos con prevalencia de lisinas respecto de argininas en la interfase polar-apolar, posicionada $\pm 100^\circ$ del centro apolar embutido en la bicapa y varios residuos glutamato en la superficie polar [408-410]. En terminales pre-sinápticas, los monómeros de α Sin existen en un equilibrio entre su estado soluble y asociado a membrana (P.J. McLean, *et al.* 2000). Estudios realizados en fracciones de cerebros de rata revelaron que aproximadamente 15% de α Sin se encuentra asociado a membrana (Lee, H.-J., Choi, C. y Lee, S.-J. 2002) y la proteína ha sido recientemente hallada en asociación con membranas mitocondriales en neuronas normales (Li, W.-W. *et al.* 2007; Zhang, L. *et al.*, 2008).

Utilizando espectroscopia ^2H y ^{31}P -RMN se demostró que la asociación de αSin con membranas negativamente cargadas de vesículas multilamelares, tiene un efecto profundo sobre la integridad de dichas bicapas conteniendo fosfolípidos aniónicos, favoreciendo la formación de estructuras vesiculares pequeñas con monocapa lipídica (J. Madine *et al.* 2006). Estudios de espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica, y espectroscopia de fluorescencia revelaron que la carga lipídica de vesículas pequeñas unilamelares también es afectada por su interacción con αSin . Se ha observado que la unión de la proteína aumenta las temperaturas de desagregación de las cadenas lipídicas y favorece la cooperatividad de transiciones de fase, que ha sido atribuida a defectos de curvatura de las membranas de las vesículas (F. Kamp y K. Beyer, 2006).

La unión de αSin a las membranas además, aumenta la curvatura de las mismas y favorece su disgregación, convirtiendo grandes vesículas fosfolipídicas en túbulos y pequeñas vesículas (J. Varkey, *et al.* 2010). La formación de túbulos fue especialmente favorecida en vesículas con contenido bajo de lípidos aniónicos (A.P. Pandey, *et al.* 2011).

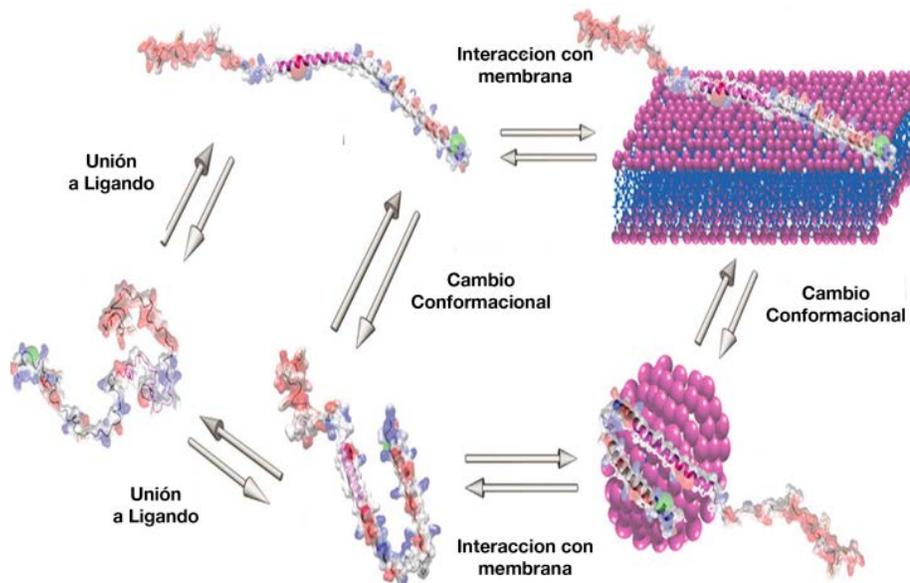


Figura 1.6: Modelo del plegamiento de αSin y cambios conformacionales inducidos por la unión a pequeñas moléculas superficies estabilizantes (Ferreon *et al.* 2009).

También se ha observado que la forma monomérica de αSin unida a la membrana lipídica previene la oxidación lipídica. La función antioxidante de αSin es atribuida a su fácil oxidación

vía la formación de sulfóxido de metionina. Estos hallazgos sugieren que α Sin bien podría inhibir la oxidación lipídica como parte de sus funciones fisiológicas (M. Zhu, *et al.* 2006).

La interacción de α Sin con membranas altera la cinética y las vías de agregación *in vitro*. Los efectos de unión a membrana varían desde la inhibición a la aceleración de la agregación de la proteína (M. Necula, *et al.* 2003; E. Jo, *et al.* 2000/2004; M. Zhu, *et al.* 2003; R.J. Perrin *et al.* 2001; N.B. Cole *et al.*, 2002; R. Sharon *et al.* 2003). La inducción de plegamiento por interacción con membranas genera tanto oligómeros ricos en hojas plegadas β (N.B. Cole *et al.* 2002; M. Ramakrishnan, *et al.* 2006) como oligómeros enriquecidos en α -hélices (A. Abedini, *et al.* 2009). La heterogeneidad en estructuras observadas en la agregación de la proteína con membranas fosfolipídicas depende fuertemente de las condiciones experimentales (F. Haque, *et al.* 2010).

1.8 Homeostasis de Ca^{2+} y α Sin

Estudios recientes han revelado que α Sin regula el ingreso de Ca^{2+} al medio intracelular, esta proteína puede interactuar con canales de calcio (Ca^{2+}), alterando su función y comprometiendo el equilibrio de Ca^{2+} entre los espacios intra y extracelulares (Demuro *et al.*, 2010). Los iones Ca^{2+} cumplen un rol crucial en la plasticidad y supervivencia neuronal (Berridge *et al.*, 2003; Greer y Greenberg, 2008); por lo tanto, existen redes homeostáticas complejas que regulan el Ca^{2+} intracelular. Las corrientes entrantes de Ca^{2+} han sido consideradas una fuente primordial de las vías de señalización dependientes de dicho catión. En conjunto con la liberación de reservas intracelulares, como puede ser las del retículo endoplasmático, la homeostasis dependiente del ion Ca^{2+} es regulada finamente (Patel y Docampo, 2010).

Otros estudios han establecido una correlación entre la homeostasis dependiente de Ca^{2+} , α Sin y la dopamina citosólica. La misma sería responsable de la muerte selectiva de estas neuronas en la *substantia nigra* (E.V. Mosharov *et al.* 2009). Usando técnicas de micro-diálisis se demostró que α Sin se une a Ca^{2+} con un IC_{50} en el rango micromolar y se determinó que el dominio C-terminal contiene el sitio de unión a Ca^{2+} en esta proteína (M.S. Nielsen *et al.* 2001).

Al igual que otros iones metálicos, el agregado de Ca^{2+} *in vitro* repercute en el desplazamiento del equilibrio de agregación de α Sin hacia una forma mixta de oligómeros anulares de 70-90 nm de diámetro 4nm de altura y oligómeros esféricos de 10-20 nm de diámetro (R. Lowe *et al.* 2004; S. Nath, *et al.* 2011). Cada uno de los oligómeros anulares está compuesto por un anillo de varias partículas esféricas. Cuando los iones Ca^{2+} fueron co-incubados con α Sin recombinante

sin los 15 aminoácidos del extremo C-terminal no se observaron la aparición de agregados anulares. Indicando que el dominio está involucrado en la formación de dichos oligómeros. De manera interesante, oligómeros anulares solubles de 30-50 nm de diámetro fueron aislados a partir de la disgregación por tratamiento con detergentes suave de inclusiones citoplasmáticas gliales purificadas de tejido cerebral de pacientes con atrofia sistémica múltiple (MSA) (D.L. Pountney *et al.* 2004). Se ha propuesto que la formación de dichos agregados en la patología MSA es influenciada directamente por la concentración de Ca^{2+} intracitoplasmático (D.L. Pountney, *et al.* 2005). Esto es un fuerte indicio que la agregación de αSin dependiente de Ca^{2+} puede ocurrir también *in vivo*.

El Ca^{2+} modula además la interacción de αSin con membranas celulares. En la ausencia del ion, la proteína interactúa con las membranas lipídicas vía el dominio N-terminal, y al agregar Ca^{2+} se promueve la interacción adicional del extremo C-terminal que favorece la agregación de αSin [263]. En el SNC, las neuronas DA se encuentran constitutivamente activadas. Los canales voltaje-dependientes de Ca^{2+} tipo L regulan la actividad marcapasos de estas neuronas, manteniendo así una alta concentración del mencionado ion en citoplasma (Chan *et al.*, 2007).

Este exceso de Ca^{2+} en las neuronas DA representa un peso en el mantenimiento de la homeostasis mitocondrial y eventualmente favorece fallas en su actividad; lo cual bien podría ser un motivo fundamental de la vulnerabilidad de estas células en la EP (Guzman *et al.* 2010). La apertura del poro de transición de permeabilidad es facilitada por el exceso de Ca^{2+} favoreciendo la despolarización de la membrana interna mitocondrial dentro de las células que eventualmente lleva a la disfunción de la organela (Alavian *et al.*, 2014). Asimismo, el exceso de Ca^{2+} favorece la liberación del citocromo C y la apoptosis (Rao *et al.* 2014).

1.9 Disfunción mitocondrial y enfermedad de Parkinson:

Hasta ahora se han correlacionado más de 20 loci con las formas familiares de la EP, y gran parte de ellos están implicados en la regulación de la homeostasis mitocondrial. Y a pesar de que las mutaciones genéticas representan un porcentaje menor de los casos de EP en el mundo, existen evidencias patológicas y farmacológicas que proponen a la disfunción mitocondrial como un evento central en la progresión de la forma esporádica de la enfermedad.

En condiciones fisiológicas, la expresión tanto endógena como heteróloga de αSin es primariamente citosólica, y no hay un enriquecimiento obvio en membranas mitocondriales

(Rideout HJ, *et al.*, 2003; Cole NB, *et al.*, 2008). Sin embargo, a partir de estudios estructurales previos es claro que al menos una fracción de α Sin se asocia normalmente con la mitocondria, tanto en neuronas DA como en otras neuronas del SNC de animales transgénicos y de cerebros de pacientes enfermos (Martin LJ, *et al.*, 2006 ; Li WW, Yang R, *et al.*, 2007).

A pesar de que α Sin puede interactuar con diferentes membranas dentro de la célula, la proteína presenta una marcada afinidad por las membranas mitocondriales, frente a las de otras organelas (Nakamura K, *et al.*, 2008) el mecanismo subyacente a este hecho todavía no ha sido elucidado, pero es probable que implique una interacción directa entre la α Sin y cardiolipina, presente predominantemente en la membrana mitocondrial interna (Daum G, 1985; Hovius R, *et al.*, 1993). La afinidad de α Sin por cardiolipina fue probada en membranas artificiales enriquecidas en este lípido y es comparable por la que presentó por membranas artificiales enriquecidas en ácido fosfatídico (Nakamura K, *et al.*, 2008).

Tanto el monómero soluble como la forma oligomérica de α Sin puede asociarse con la mitocondria (Parihar MS, *et al.*, 2009; Chinta SJ, Mallajosyula, *et al.*, 2010) solo los oligómeros pequeños, no los monómeros o los agregados, remodelan la estructura de los liposomas enriquecidos en fosfolípidos ácidos como la cardiolipina (Nakamura K, *et al.*, 2011; Van Rooijen BD, *et al.*, 2009) sugiriendo que los oligómeros podrían ser la especie activa. De manera notable, la prevalencia de la forma monomérica versus la oligomérica en células vivas en condiciones fisiológicas o patológicas se mantiene en controversia. Este debate no puede ser resuelto con las aproximaciones experimentales actuales, que requieren la disrupción de la membrana (Bartels T, *et al.*, 2011; Fauvet B, *et al.*, 2012), o el uso de cromóforos como etiquetas moleculares que en última instancia interrumpirían las propiedades de la α Sin (Nakamura K, *et al.*, 2008).

Cabe destacar que la extensión de la interacción entre la proteína y la mitocondria parece ser bastante dinámica y puede aumentar marcadamente por acción de un rango amplio de estresores, como la caída en el pH citosólico (Cole NB, *et al.*, 2008). De manera notable las mitocondrias neuronales aisladas de pacientes con EP también presentan un alto contenido de α Sin al comparar frente a individuos controles sanos pareados por edad (Devi L, *et al.*, 2008).

El primer estudio que demostró el rol de la mitocondria en la patogénesis de la EP fue el análisis del impacto de la infusión accidental de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) en adictos expuestos al neurotóxico presente en dosis de narcóticos como un contaminante. Se observó que la actividad del complejo I de la cadena de transporte de electrones era inhibida

selectivamente (Langston et al, 1983; Burns R.S et al. 1984). La rotenona, el piridabén, el tricloroetileno y el fenpiroximato son otros inhibidores del complejo I que induce la degeneración de neuronas DA en moscas, humanos y roedores, sugiriendo que la disfunción mitocondrial cumple un rol central en la patología de la EP (Chaturvedi y Beal 2008).

Estas toxinas afectan la mitocondria causando defectos en la cadena de transporte de electrones (Panov et al. 2005) reducen el movimiento mitocondrial (Borland *et al*, 2008) causan un aumento en la permeabilidad de transición mitocondrial y un aumento tanto de las especies reactivas de oxígeno (ROS) como de la actividad óxido nítrico sintasa mitocondrial. En la *substantia nigra*, en los músculos esqueléticos y en las plaquetas de enfermos de Parkinson se observa la falta de actividad del complejo I (Beal 2005, Lin y Beal 2006, Chaturvedi y Beal 2008).

La administración sistémica de rotenona en modelo murino ha probado ser capaz de evocar un fenotipo que se asemeja a los síntomas de la EP de manera robusta (R. Betarbet, et al. 2000). La subunidad catalítica del complejo I, aislada a partir de mitocondrias obtenidas de tejido de lóbulo frontal de pacientes con la EP, se encuentra oxidada y se observa un aumento en especies reactivas de oxígeno (ROS) lo cual está asociado con deficiencias en la actividad de dicho complejo y tendencia al desensamblado (Keeney *et al*. 2006).

Ratones transgénicos que sobre-expresan la enzima catalasa junto a un péptido señal mitocondrial, están protegidos contra las ROS producidas por MPTP y la pérdida de neuronas DA (Perier *et al*. 2010). Esto soporta la idea del rol que cumplen las ROS en la neurodegeneración asociada a la EP. Ratones que sobre-expresan α Sin son más susceptibles a los efectos tóxicos de MPTP mientras que los ratones KO α Sin^{-/-} no son susceptibles a la acción del ácido 3-nitro propiónico (3-NP), malonato y MPTP, sugiriendo que la mitocondria está involucrada en la toxicidad inducida por α Sin (Dauer *et al.*, 2002; Klivenyi P. *et al*. 2006; Thomas y Beal 2007).

El coactivador 1 α del Receptor Gamma activado por Proliferadores de Peroxisomas (PGC-1 α) es un coactivador de varios factores de transcripción. Es un regulador clave de la biogénesis mitocondrial. Los niveles de PGC-1 α se ven disminuidos en cerebros post-mortem de pacientes con EP tanto en la *substantia nigra* como en células blancas sanguíneas (Zheng *et al.*, 2010). Células DA en ratones KO para PGC-1 α son más sensibles al daño por MPTP (St-Pierre *et al.*, 2006).

Cuando PGC-1 α es sobre-expresado ofrece protección contra la neurotoxicidad inducida por MPTP. La activación de PGC-1 α por acción del resveratrol evidenció una neuroprotección

similar (Mudo *et al.*, 2012). Un trabajo reciente demostró que la necdina, que estabiliza PGC-1 α protege a las neuronas frente a insultos con oligomicina, MPP⁺ y MPTP (Hasegawa *et al* 2016). Un estudio reportó que la sobre-expresión de PGC-1 α causaba una degeneración súbita de las neuronas DA en el sistema nigroestriatal de ratas (Ciron *et al.*, 2012). Otro estudio demostró que la deficiencia de PGC-1 α aumenta la propensión de α Sin por oligomerizarse, mientras que la sobre-expresión la reduce, protegiendo a las células del efecto tóxico de α Sin (Eschbach *et al.*, 2015). Por lo tanto, PGC-1 α cumple un rol protector frente a la EP.

Recientemente se ha reportado que la α Sin modificada post traduccionalmente se une a la traslocasa mitocondrial de membrana externa (TOM20, por sus siglas en inglés) e inhibe la importación de proteínas *in vitro* e *in vivo*. Interacciones anormales entre α Sin y TOM20 fueron observadas en tejido nigroestriatal de cerebros postmortem de pacientes con EP (Di Maio *et al.*, 2016).

Un estudio demostró que, en levaduras, la sobreexpresión de α Sin dispara la translocación de la endonucleasa G entre la mitocondria y el núcleo, esta endonucleasa mitocondrial en núcleo media la degradación del ADN (Büttner *et al.*, 2013).

La proteína asociada al tráfico vacuolar 35 (VPS35) es un componente de un gran complejo multimérico llamado complejo retrómero, y está involucrado en el transporte retrógrado de proteínas desde el endosoma hacia la red de Golgi. Mutaciones en VPS35 causan comportamientos anormales en el tráfico y esto puede tener un rol muy importante en el proceso neurodegenerativo asociado a la patología de la EP. El aumento de la expresión de VPS35 lleva a una caída en los niveles de α Sin en ratones transgénicos. Estas dos proteínas interactúan en levaduras, gusanos y ratones, sugiriendo que estas interacciones bien pueden formar parte de la etiología de la enfermedad (Dhungel *et al.*, 2015).

α Sin se acumula en los CL y en neuritas distróficas de pacientes con EP esporádica. En el desarrollo de la EP (Spillantini MG, *et al*, 1998) también se han observado defectos en la actividad del complejo I mitocondrial en la *substantia nigra* (Schapira AHV, *et al.*, 1990). Asimismo, durante el envejecimiento, se acumulan mutaciones somáticas en el ADN mitocondrial de dichas neuronas (Bender A, *et al.*, 2006). En la EP temprana se observa una disminución en la expresión de genes que codifican para subunidades de la cadena de transporte de electrones y proteínas involucradas en la biogénesis mitocondrial y el metabolismo de la glucosa (Zheng B, *et al.*, 2010).

En tejido post mortem humano, en líneas celulares y en ratones, se ha observado que α Sin se halla tanto dentro de la mitocondria como asociada con las membranas asociadas a la mitocondria (MAMs). Las MAMs son microdominios interorganelares entre la mitocondria y el retículo endoplasmático (RE). Mutaciones puntuales de α Sin llevan a una disminución en la asociación de la mitocondria con las MAMs, que resulta en una menor aposición de la mitocondria con el RE (Guardia Laguarda *et al.*, 2014).

La proteína mitofusina 2 (MFN2) enriquecida en la interfase mito-RE participa en el proceso de fusión mitocondrial e interactúa con la mitofusina MFN1, presente en la superficie mitocondrial manteniendo a las dos organelas en cercanía entre sí. La función de unir y estabilizar la interacción mito-RE de MFN2, se evidenció en células de fibroblastos embrionarios murinos (MEF) y línea Hela con MFN2 silenciado que presentaron una morfología desordenada del RE y las MAMs frente a sus controles (De Brito y Scorrano, 2008). Esta aposición cercana entre el RE y la mitocondria en conjunto con proteínas y enzimas selectivas en esta área determinan que dicho espacio sea favorable para la realización de procesos celulares claves. Entre ellos podemos nombrar el metabolismo de glúcidos, transferencias lipídicas, transferencia y señalización por Ca^{2+} y regulación de señales relacionadas con la regulación de procesos apoptóticos. (Denton 2009). La mitocondria cumple varias funciones en el mantenimiento de la vía autofágica-lisosomal, función cerebral y cognición. Defectos en la actividad mitocondrial y la disfunción de los procesos de autofagia lisosomal son características comunes en la EP. (Gegg y Schapira 2016).

1.10 Alfa-Sinucleinopatías y envejecimiento:

El factor de riesgo más prevalente en el desarrollo de enfermedades asociadas a los cuerpos de Lewy es la edad. Algunos de los procesos fisiológicos propios del envejecimiento que han sido correlacionados con los procesos neurodegenerativos con presencia de CL incluyen el aumento del daño oxidativo a componentes celulares (Sohal, R.S. y Orr, W.C. 2012) disfunción mitocondrial (Bratic, I. y Trifunovic, A. 2010) y la exposición a largo plazo a toxinas ambientales (Masalha, R., *et al.*, 1997) Asimismo, varios estudios han apuntado a que los procesos propios del envejecimiento impactan a la maquinaria de degradación proteica. La proteólisis de por sí, funcionaría como un mecanismo de salvaguarda contra la aparición y evolución de enfermedades neurodegenerativas asociadas al mal plegamiento proteico, mediante la reducción de protómeros citotóxicos. Defectos en las principales vías de degradación proteica, tanto en el sistema ubiquitin-

proteosoma como en el proceso de autofagia, han sido observados durante el envejecimiento. Considerando estas alteraciones fisiológicas, es razonable hipotetizar que existirá una tendencia hacia la acumulación de proteínas mal plegadas a lo largo del tiempo, lo cual a su vez aumentaría su propensión al agregado y el posible inicio de la enfermedad (Shibatani, T., Nazir, M. and Ward, W.F., 1996; Ponnappan, U., Zhong, M. and Trebilcock, G.U., 1999).

Las enfermedades neurodegenerativas con presencia de CL podrían ser entonces el resultado de fallas en las vías de degradación proteica que impactaría en el aumento de proteínas intracelulares dañadas. Ciertas combinaciones de variables ambientales y *backgrounds* genéticos específicos podrían ser los determinantes de que un individuo sea más o menos susceptible a este tipo de alteraciones y la falta de mecanismos compensatorios, explicando así por qué solo algunos individuos sucumben a este tipo de enfermedades.

1.11 Estado actual de modelaje y tratamiento de Alfa-sinucleinopatías.

La naturaleza multifactorial de la EP y otras sinucleinopatías y el entendimiento limitado de las claves moleculares que desencadenan el proceso neurodegenerativo, son las principales razones que determinan la poca oferta de tratamientos para la cura o inhibición del progreso de dichas enfermedades (W. Dauer, S. *et al.* 2003)

Otro factor que impide el desarrollo de terapias efectivas es la falta de conocimiento de las especies neurotóxicas que se acumulan durante los eventos de plegamiento aberrante y la agregación de α Sin que eventualmente llevan a la muerte celular. Como resultado, los tratamientos actuales para el tratamiento de la EP logran retardar levemente el proceso neurodegenerativo, y las drogas desarrolladas hasta este momento se centran en el tratamiento de los síntomas, particularmente en el reemplazo de la dopamina que disminuye por la degeneración de las neuronas DA.

Es por ello que el uso de sistemas experimentales que presenten alto isomorfismo, homología, validez aparente (*face validity*) y reproducibilidad respecto al SNC permitirán el modelaje de las α -sinucleinopatías y procesos de formación de agregados amiloidogénicos, proveyendo bases de conocimiento importantes para el futuro desarrollo de protocolos terapéuticos más efectivos.

Los modelos celulares de neuronas post-mitóticas son muy requeridos para su utilización en proyectos de toxicología y selección de principios activos farmacológicos. Un modelo

ampliamente utilizado es la línea murina PC12 derivada de una feocromocitoma medular (Greene y Tischler 1976). Esta línea permitió el desarrollo de varias áreas de la investigación en neurociencias, pero su dependencia estricta de neurotrofinas para su supervivencia y diferenciación configura su mayor desventaja para muchas aplicaciones.

En contraste con las PC12 de rata la línea celular SH-SY5Y son de origen humano. Estas células derivadas de neuroblastoma son otro ejemplo de un modelo celular *in vitro* bien establecido en neurociencia (Biedler *et al* 1973, 1978). Las SH-SY5Y son fácilmente expandibles en cultivo, pero su diferenciación al estado post-mitótico resulta dificultosa, y al haber sido derivadas de un tumor, estas células no representan el mejor modelo experimental de estudio de un estado celular fisiológico normal (Påhlman *et al.*, 1984; Lopes *et al.*, 2010).

Las neuronas primarias murinas, tanto de origen cortical o células granulares, son una alternativa a las líneas celulares (Hatten and Liem, 1981; Hatten, 1985) con los límites propios de un modelo heterólogo. Sin embargo, el cultivo primario de células del SNC humanas es dificultoso, las células no son sencillas de derivar ni de mantener en cultivo. Asimismo, las variaciones entre lotes de células, las contaminaciones con células no neuronales y el requerimiento continuo de nuevo material son limitaciones críticas al modelo a partir de cultivos primarios humanos. Las células pluripotentes diferenciadas emergen entonces como una fuente de células humanas con fenotipos precisamente determinados (Leist *et al.*, 2008, 2012; Basketter *et al.*, 2012).

Hipótesis y Objetivos.

Hipótesis.

Existen evidencias que sugieren un vínculo entre α Sin y cambios patológicos en la actividad mitocondrial. Estos cambios correlacionan con una amplia gama de déficits bioenergéticos en neuronas. Resulta entonces probable que α Sin tenga un impacto en la patogenia de la EP a través de un mecanismo convergente con la disfunción mitocondrial. Tomando esto en cuenta, la hipótesis sobre la que se trabajó en el desarrollo de esta tesis es la siguiente:

La sobreexpresión de α Sin en células neurales humanas tiene un efecto directo sobre la morfología, transporte y homeostasis mitocondrial. Dicho efecto dependería en parte de la formación de confórmeros de agregación en la membrana de dicha organela. Esta nucleación estaría supeditada en gran medida a la concentración de α Sin y a la secuencia del gen SNCA y su consecuente impacto sobre la tendencia a la agregación del monómero de la proteína.

Objetivos.

Objetivo general:

Establecer un modelo experimental humano de α -sinucleinopatías, usando neuronas generadas a partir de células pluripotentes humanas (CMEH y CMPih), para evaluar el impacto de la sobreexpresión de α Sin en su forma wt y mutantes puntuales asociados al Parkinson familiar A30P y A53T sobre la homeostasis y el transporte mitocondrial.

Objetivos particulares:

- Desarrollar una plataforma de cultivo de células pluripotentes humanas, tanto para su expansión como para su diferenciación a linaje neural.
- Usar los cultivos neuronales obtenidos para sobre-expresar α Sin en su forma *wt* y mutantes A30P y A53T, empleando técnicas de transfección, o transducción utilizando plásmidos lentivirales donde se encuentran cada secuencia mencionada.
- Analizar el impacto de dicha sobreexpresión sobre la morfología y el transporte mitocondrial en las neuronas.
- Observar el estado redox de las mitocondrias neuronales en este contexto de sobreexpresión.
- Analizar la localización de α Sin en cultivos tratados vs control, mediante la separación por centrifugación diferencial de la fracción citoplasmática y la fracción mitocondrial de las células diferenciadas.
- Forzar la interacción de α Sin con las membranas mitocondriales, empleando vectores de expresión diseñados para lograr una dimerización mediada por rapamicina en construcciones FRB/FRP. Uno de los componentes del par FRB/FRP tiene una secuencia de localización mitocondrial y ambos integrantes del par están asociado a α Sin o a sus variantes.
- Lograr una línea de células pluripotentes humanas editadas genómicamente mediante el sistema CRISPR/Cas9 interrumpiendo el gen SNCA de α Sin endógeno. Establecer el impacto de dicha edición sobre la homeostasis mitocondrial.
- Diferenciar dicha línea a neuronas.
- Sobreexpresar α Sin y variantes en la línea editada. Observar el impacto de la sobreexpresión sobre la morfología mitocondrial neural en cada caso.

2. Materiales y Métodos.

2. Materiales y Métodos.

2.1. Cultivo Celular.

2.1.1 Aislamiento de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF)

Ratones hembra preñados (día 12 o 13 de preñez) de la cepa CF1 fueron obtenidas del Bioterio de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Con el objetivo de obtener los embriones de ratón, las hembras fueron sacrificadas por dislocación cervical. En cabina de flujo vertical se procedió a limpiar el abdomen con etanol 70 % v/v, se abrió la cavidad peritoneal y se removieron los cuernos uterinos que contienen a los embriones. Los cuernos uterinos fueron colocados en una placa de Petri y lavados 3 veces con PBS (del inglés phosphate buffered saline) (NaCl 8 mg, KCl 200 mg, KH₂PO₄ 200 mg y Na₂HPO₄ 1,14 mg, por litro de solución, pH 7,4) con el objetivo de remover la sangre. Posteriormente, se separaron los embriones de las placentas y de sus membranas fetales y una vez libres de deciduas se colocaron en otra placa de Petri, lavando nuevamente 3 veces con PBS. Bajo lupa estereoscópica los embriones fueron decapitados y eviscerados, descartando luego este excedente. El remanente se colocó en una nueva placa de Petri y se lavó 2 veces con PBS. Los cuerpos de los embriones fueron homogeneizados mecánicamente utilizando hojas de bisturí; luego se agregó Tripsina/EDTA (0,25% v/v Tripsina 0,5mg/ml (Invitrogen) en PBS + 0,53 mM EDTA) y se continuó el tratamiento mecánico de los mismos hasta disgregar completamente el tejido. Se agregaron 5 ml de Tripsina/EDTA a la placa y se incubaron los preparados durante 30 minutos a 37° C. Luego se colocaron los embriones procesados en un tubo cónico de 50 ml y se agregaron aproximadamente 30 ml de medio DMEM (del inglés, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Gibco) suplementado con aminoácidos no esenciales (2mM concentración final) (Gibco), 50 U/ml Penicilina/Estreptomicina (P/E) (Gibco) y 200µM L-Glutamina (Gibco). A este medio suplementado se le agregó además 10% v/v SFB (Gibco). Se dejó decantar la preparación recuperando luego el sobrenadante, el cual contiene a los MEF. El volumen obtenido de sobrenadante se dividió en X botellas de cultivo T75 (X = Número de Embriones Obtenidos/3), completando el volumen de las mismas a 20 ml con DMEM suplementado. Esta siembra de células fue considerada pasaje cero. Se mantuvieron las botellas T75 durante 2 ó 3 días en incubadora a 37° C y atmósfera al 5% CO₂. Luego de que la monocapa de fibroblastos alcanzó un 100% de confluencia se procedió a su amplificación o a su criopreservación.

2.1.2 Irradiación de MEF

Los MEF irradiados (MEFi) se utilizan como capa nutricia (o *feeder layer* por su denominación en inglés) capaz de mantener a las CMEH en estado indiferenciado. La irradiación de estas células permite inactivarlas mitóticamente sin afectar su viabilidad. Esto es importante para el manejo de los co-cultivos con las CMEH. Para una botella T75: Se aspiró el medio de cultivo, se lavaron las células con PBS y se agregó 1 ml de Tripsina/EDTA. Las células disociadas fueron transferidas a un tubo cónico con 9 ml de medio DMEM 10% v/v SFB. La suspensión celular se homogeneizó con pipeta para evitar la presencia de agregados celulares. Posteriormente las células fueron irradiadas con 40-80 Gy por el servicio ofrecido por la empresa CEBIRSA S.A. (Centro de Irradiación, Fitz Roy 2455, Ciudad de Buenos Aires, Argentina). La suspensión con MEFi se centrifugó a 200 x g durante 5 minutos y el pellet celular se resuspendió en DMEM con suplementos y con 10% v/v SFB en un volumen final tal que permita transferir 1,0x10⁶ células/placa de cultivo adherente de 100 mm de diámetro (Corning), previamente tratadas durante al menos 1 hora con una solución estéril de gelatina bovina (0,1% v/v en PBS) (Sigma). Las placas sembradas fueron colocadas sobre un agitador mecánico durante 5 minutos para lograr una distribución uniforme de las células y luego se colocaron en incubadora a 37° C y 5% CO₂.

2.1.3 Cultivo de Células pluripotentes humanas.

La línea de células madre embrionarias humanas (CMEH) WAO9 (H9, *Wicell Research Institute*) fue obtenida por compra a Wicell por parte del Laboratorio de Investigaciones Aplicadas en Neurociencias perteneciente a la fundación lucha contra las enfermedades neurológicas de la Infancia (LIAN-FLENI). La línea de células pluripotentes humanas inducidas (CMPih) Craig Venter (CV, hiPSC SD2010-125, UCSD), fue obtenida bajo un acuerdo de transferencia de material a la UBA al Dr. Tomas Falzone del laboratorio de transporte axonal y enfermedades neurodegenerativas del Instituto de Biología Celular y Neurociencias Dr E. de Robertis (IBCN-UBA).

Las colonias de células pluripotentes, tanto las CMEH como las CMPih, fueron mantenidas y expandidas en platos adherentes p100 (Corning) con una capa nutricia de fibroblastos murinos embrionarios E13 irradiados (FMEI) a 37°C, 5% CO₂. Las células fueron expandidas semanalmente 1: 3, el medio de expansión en estado pluripotente, también llamado medio HES

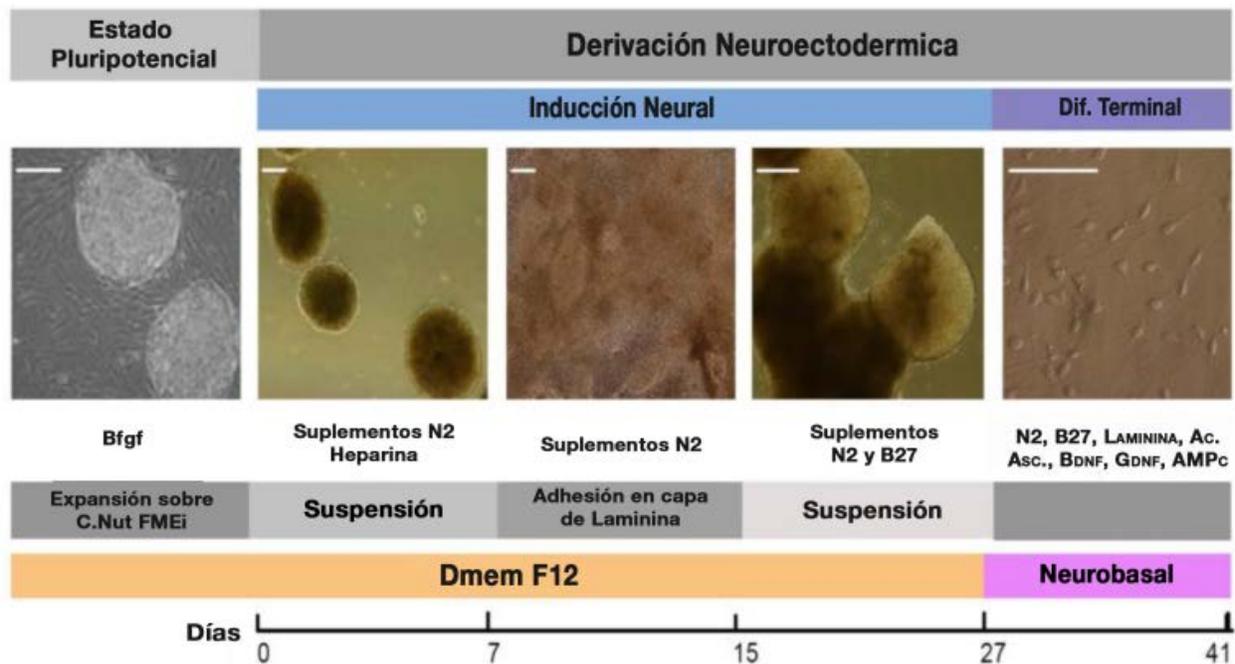
está constituido por: Medio base *Dulbecco's Eagle KO* modificado (KO-DMEM) suplementado con 10% *Knockout serum replacement* (KSR), 2mM aminoácidos no esenciales, 2mM L-glutamina, 100U/ml penicilina, 50µg/ml estreptomicina, 0.1mM β-mercaptoetanol y 4ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico (BFGF por sus siglas en ingles). Todos los reactivos se obtuvieron de *Life Technologies* (Carlsbad, CA, USA). El medio de cultivo fue renovado aproximadamente cada 24hs. Los pasajes de las CMEH se realizaron cuando las colonias, observadas al microscopio con un aumento de 100X, alcanzaban aproximadamente el tamaño de un campo. Para ello, las células se lavaron con PBS y luego se incubaron durante aproximadamente 20 minutos con 1ml de una solución 1 mg/ml de Colagenasa Tipo IV (Gibco); al confirmar bajo el microscopio la separación parcial de las colonias de la capa nutricia se inactiva la colagenasa por dilución, agregando 5 ml de medio HES. Para separar totalmente las colonias de su sustrato se utilizó una espátula plástica estéril. Luego se transfirió la suspensión celular a un tubo cónico de 15 ml. Luego de una centrifugación durante 5 minutos a 200 x g, se eliminó el sobrenadante, se agregó medio HES y se resuspendió suavemente de manera que las colonias se rompieran parcialmente. Este punto es de gran importancia ya que, si las colonias resultaran muy pequeñas, la cantidad de muerte celular resulta muy elevada.

2.1.4 Diferenciación Neural.

La derivación neural eficiente de las células fue lograda mediante la implementación de un protocolo previamente publicado y ampliamente aceptado como estándar de diferenciación neural (Zhang, *et al* 2009). A continuación, un breve resumen del procedimiento:

Las células pluripotentes fueron enzimáticamente tratadas para levantarlas de la capa nutricia sin perder la cohesividad de las colonias indiferenciadas utilizando Colagenasa IV 1mg/ml (Gibco) durante 25 min a 37°C. Tomando las colonias de 2 platos de cultivo p100, las células fueron suspendidas en 25 ml de medio de expansión sin BFGF en una botella de cultivo T75 (Gibco) y mantenidas en suspensión por un total de 4 días a 37°C, 5% CO₂, cambiando la mitad de volumen de medio de suspensión día por medio. Durante este periodo, los agregados celulares adquieren forma esférica. El quinto día, el medio es reemplazado por 25 ml de medio de inducción neural (MIN) compuesto por: DMEM/F12 suplementado con aminoácidos no esenciales (1:100, Invitrogen), suplementos N2 (1:100, Gibco), y 1 mg/ml Heparina a 37°C 5% CO₂. Luego de 2 días, en este medio, los cuerpos en flotación son adheridos en placas de 6 pocillos (Gibco) pretratados con una capa de laminina (20µg/ml, *life technologies*).

Aproximadamente 30 agregados por pocillo son mantenidos en MIN a 37°C, 5%CO₂, con cambio de medio día por medio durante 9 días. En esta etapa de adhesión, se observa la formación y crecimiento de estructuras de tipo tubo neural y rosetas neurales enriquecidas en progenitores neurales. El día 9 en adhesión, esas estructuras tridimensionales multilaminares fueron seleccionadas y diseccionadas bajo microscopio en flujo horizontal. Esos agregados fueron transferidos a botellas t25 con 15 ml de MIN suplementado con suplementos B27 (1:50, Gibco) con cambio de medio día por medio. Luego de 12 días en suspensión, las esferas enriquecidas en progenitores neurales fueron digeridas enzimáticamente con 500 µl Tripsina-



Esquema 2.1: Protocolo de diferenciación Neural utilizado con las WA09 CMEH las CMPih (Zhang *et al*, 2009), las imágenes en campo claro y contraste de fase representan la morfología observada en cada etapa del proceso. B.de escala: 50µm.

EDTA [0,25%] y Acutasa (1:1, Gibco) durante 3 min a 37°C. la reacción es entonces detenida por la adición de 500µl de inhibidor de Tripsina (0.5mg/ml, *Life technologies*) por 3 min a 37°C. Las células son entonces resuspendidas en medio de diferenciación Neural (MDN) compuesto por: medio base Neurobasal (Gibco), suplementos N2(1:100, Gibco, 17502- 048), suplementos B27 (1:50, Gibco, 17504-044), laminina 1 µg/ml (Invitrogen), dibutilil-cAMP 1µM (1:10000, Sigma), ácido ascórbico 200µg/mL (1:1000, Sigma), BDNF 100 µg/ml (1:10000, R&D), GDNF

100 µg/ml (1:10000, R&D). Luego de la disgregación mecánica de las esferas utilizando una p1000, las células fueron centrifugadas por 2 min a temperatura ambiente, adheridas en cubre-objetos de 13 mm de diámetro esterilizados y pre-tratados durante un mínimo de 2 hs con laminina 20ug/ml en una placa de 24 pocillos (Corning), en 600 µl de MDN. Las células son mantenidas en este medio a 37°C, 5% CO₂ con cambio de la mitad de volumen día por medio durante 14 días hasta obtener las células terminalmente diferenciadas

2.1.5 Cultivos de células madre neurales.

Para derivar las Células madre neurales, se toma un desvío del protocolo de Zhang *et al*, Brevemente: se toman 20-30 cuerpos de células enriquecidos en progenitores en suspensión en medio MIN luego de 7 días en suspensión. Se disgregan mecánicamente mediante aguja en flujo vertical a pequeños trozos, se transfieren a un tubo cónico de 15 ml, se centrifuga 2 min a 1000g y se cambia el medio por 600 µl de acuttasa/tripsina en relación 1:1, y se lleva a estufa durante 5 min. Previo al trabajo con las células, se debe preparar un plato de cultivo p600 (Corning) cubriéndolo con geltrex según indicaciones del vendedor durante 1 h en rocker. Terminada la centrifugación, se inhibe a la tripsina con 300µl de solución inhibidora de tripsina (Sigma) y se centrifuga 2 min a 1000g. Se retiran las enzimas y se resuspenden las células en 1 ml de medio de crecimiento: KO DMEM/F12, StemPro Neural supplement 2% (Gibco), Glutamax, BFGF y EGF (ambos 20ng/ml). y suavemente con micropipeta de 1000µl se disgrega pasando la suspensión 5 a 7 veces por el tip. Se siembran las células disgregadas en la p600 preparada con el recubrimiento y se cubre con 5 ml de medio de crecimiento en estufa a 37°C y 5%CO₂ , con cambio de medio día por medio.

2.1.6 Cultivo primario de células hipocampales murinas.

Ratones C57/BL6 fueron utilizados para obtener cultivos primarios de células hipocampales. Los ratones fueron criados en cuartos con luz/oscuridad y temperatura controlada y los procedimientos experimentales fueron aprobados bajo protocolos universitarios UBA (UBA CICUAL-456/2010). Brevemente: Regiones hipocampales de cerebros de 4 neonatos P1 C57/BL6 fueron diseccionados. Los hipocampos fueron incubados en buffer fosfato (PBS) + 45U de papaína enriquecido con 0.05% de DNAsa durante 20 minutos a 37°C. Luego, las células fueron

disgregadas mecánicamente de manera gentil y transferidas a cubreobjetos previamente tratados con poli-D-Lisina y cubiertas por medio neurobasal suplementado con L-Glutamina y suplementos B27 (*Life technologies*), cultivándolas a 37°C 5% CO₂.

2.1.7 Línea humana de neuroblastoma.

SHSY5Y (ATCC SHSY5Y) fueron mantenidas en platos de cultivo p100 con medio de crecimiento: 250 ml DMEM F12, 10% suero fetal bovino (Gibco), 2mM glutamax (*Life technologies*) y Pen/Strep (*Life technologies*) a 37°C 5% CO₂ y abiertas una vez por semana 1:5 usando tripsina. Para diferenciarlas, se toman los cultivos y se pasan a placa de 35 mm² adherentes 10⁵ células por plato (Corning), se incuban las células ON. Y una vez adheridas se les cambia el medio por uno de diferenciación: 250 ml DMEM F12, 1% suero fetal bovino (Gibco), 2mM glutamax (*Life technologies*) y Pen/Strep (*Life technologies*) durante 5 días con cambio de medio día por medio.

2.1.8 Extracción de ADN genómico

Se realizó una extracción de ADN genómico, utilizando el kit Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega). Las células a controlar fueron cosechadas removiendo el medio de cultivo, agregando 500ul de PBS y levantándolas de la placa con una espátula plástica. Las muestras fueron transferidas luego a un tubo de 1,5 ml. Se centrifugó a 14000 x g durante 10 segundos y se realizó un lavado con PBS. Finalmente, las células fueron resuspendidas en 600 µl de Solución de Lisis Nuclear, mezclando con pipeta automática. Luego se agregaron 3 µl de solución ARNasa al lisado y se mezcló nuevamente con pipeta automática. Se incubó a 37°C durante 30 minutos y se enfrió a temperatura ambiente. A continuación, se agregaron 200 µl de solución de Precipitación de Proteínas, mezclando en vórtex. Se dejó enfriar en hielo durante 5 minutos y se centrifugó a 14000 x g durante 4 minutos.

El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo conteniendo 600 µl de isopropanol a temperatura ambiente. Se mezcló suavemente por inversión, se centrifugó a 14000 x g durante 1 minuto y se descartó el sobrenadante, agregando luego 600 µl de etanol 70% v/v a temperatura ambiente. Se mezcló suavemente por inversión y se centrifugó a 14000 x g durante 1 minuto. Se removió el sobrenadante y se dejó secar el pellet al aire a temperatura ambiente por 30 minutos.

Al cabo de este tiempo se rehidrató el ADN en 100 µl de Solución de Rehidratación de ADN, incubando 1 hora a 65°C.

2.1.9 Detección de Micoplasma.

Semanalmente se controló que todas las líneas celulares y cultivos primarios utilizados se encuentren libres de *Mycoplasma sp.* Para ello se realizó una extracción de ADN genómico de las células a analizar, seguida de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando oligonucleótidos específicos (primers) que hibridan con secuencias presentes en el genoma de distintas especies del género *Mycoplasma* (*Mycoplasma hominis*; *Mycoplasma orale*; *Mycoplasma salivarium* y *Mycoplasma pneumoniae*).

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 µl. Se colocaron los siguientes componentes por tubo de PCR: 2,5 µl de Buffer de PCR (Tris-HCl 200mM [pH 8.4], KCl 500mM), 1 µl de MgCl₂ 50mM, 0,5 µl de una mezcla de los 4 deoxi-nucleótidos trifosfato (dNTPs) 10mM (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) (Invitrogen), 2,5 µl de oligonucleótido sentido (primer forward) 20µM, 2,5 µl de oligonucleótido anti-sentido (primer reverse) 20µM, 0,2 µl de la ADN polimerasa PlatinumTaq DNA Polimerasa 5U/µl (Invitrogen) y 2 µl de ADN genómico, y completando el volumen a 25 µl con agua libre de DNasas. Los primers degenerados para la detección de *Mycoplasma* se detallan a continuación:

- Sentido (5' → 3'): ACACCATGGGAGYTGGTAAT
- Anti-sentido (5' → 3'): CTTCWTCGACTTYCAGACCCAAGGCAT

El programa de PCR utilizado fue el siguiente:

1. Desnaturalización inicial y activación de la polimerasa: 5 minutos a 94°C
2. Desnaturalización del ADN molde: 30 segundos a 94 °C
3. Apareamiento: 30 segundos a 55 °C
4. Extensión: 40 segundos a 72 °C
5. Extensión Final: 5 minutos a 72 °C →

Los pasos 2 a 4 durante 35 ciclos

Al finalizar las reacciones de PCR, los productos de la amplificación fueron visualizados luego de una corrida electroforética en gel de agarosa 1,5% m/v en buffer TAE 1X (Tris-acético 0,04 M, EDTA 1mM) a 100V por 35 minutos. Cada muestra contenía 18 μ l del producto de la reacción de PCR y 2 μ l de buffer de carga 10X Orange G (para 50 ml: 30% v/v glicerol, 100 μ M EDTA, 10% v/v SDS y 2mg/ml Orange G). El gel fue teñido en una solución 0,5 μ g/ml de Bromuro de Etidio durante 30 minutos en oscuridad, visualizado y fotografiado en un transiluminador con luz UV Fotodyne Modelo 602107CE acoplado a PC, controlado por software Foto/Analyst PC Image v5.00, buscando la presencia o ausencia de bandas correspondientes a genes de *Mycoplasma* sp en las muestras analizadas. En el gel se sembraron además los productos de amplificación de las muestras de ADN provistas por el Kit (controles positivos).

2.1.10 Criopreservación de células pluripotentes

Luego de desprender las colonias de CMEH como se describió en el inciso anterior, las células fueron resuspendidas en medio de criopreservación: HES suplementado con 20% v/v SFB y 10% v/v DMSO cuidando de no disgregar las colonias por exceso de manipulación mecánica. Para descongelarlas se procedió, resuspendiendo el pellet final en medio HES y transfiriéndose las colonias a una placa de cultivo de 100 mm de diámetro, previamente tratada con gelatina bovina y sembrada con la capa nutricia de MEFi.

2.2 Electrofisiología.

Para los registros electrofisiológicos, las células cultivadas fueron perfundidas en 125 mM NaCl, 3 mM KCl, 3 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 5 mM HEPES Na, Dextrosa 315 mOsm y burbujeadas con 95% O₂/5% CO₂. Los registros *Whole cell* fueron realizados utilizando microelectrodos(5-6 M Ω) en buffer: 150mM gluconato de potasio, 4mM MgCl₂, 10mM HEPES buffer, 0.1mM EGTA, 1mM NaCl, 4mM ATP-tris, 0.3mM GTP-tris, 10mM phosphocreatina y 5 μ g/ml alexafluor 488 (Invitrogen); pH=7.3; 290mOsm. La evocación de picos de voltaje fue evaluada manteniendo un potencial de reposo de -60 mV en *current clamp* y sucesivos pasos incrementales de corriente despolarizante de 10pA con un tiempo de duración de 500 ms.

Las corrientes de Na⁺ y K⁺ dependientes de voltaje fueron medidas luego de la sustracción de la corriente *leak* utilizando un protocolo p/-6. Pudo detectarse la corriente entrante rápida para

Na⁺ y la tardía con *plateau* para K⁺. Típicamente, la resistencia en serie estuvo entre 10–20 MΩ, los experimentos fueron descartados si presentaban una resistencia mayor a 30MΩ . Las neuronas que fueron utilizadas para realizar las mediciones fueron visualmente identificadas por fluorescencia y videomicroscopia infrarroja DIC. Los registros fueron obtenidos utilizando el Axopatch 200B *amplifier* (Molecular Devices), digitalizados (Digidata 1322A; Molecular Devices), y adquiridos a 20 kHz a una computadora personal utilizando el pClamp9 software.

2.3 Inmunocitoquímica.

CMEH, neuronas diferenciadas, progenitores neurales, y neuronas hipocampales fueron analizadas por inmunofluorescencia. Brevemente, las células fueron lavadas con PBS frío y fijadas en PFA 4% + Sacarosa 4% en PBS durante 30 min. Luego de 2 lavados en PBS, las células fueron permeabilizadas y bloqueadas en 0.1% Triton X-100 en PBS con 10% Suero normal de Cabra durante 60 min, e incubadas con el anticuerpo primario correspondiente *Over night* (ON). Anticuerpos utilizados: anti-Oct-3/4 (mouse, clone C-10 SC), anti Pan-Ncam (mouse, 556324, BD Pharmingen), anti-Oligodendrocyte Marker 4 (mouse, MAB 345, Millipore), anti-Tuj1 (mouse, AB78078, Abcam), anti-Nanog (rabbit, clone H-155 SC), anti-Nestina (rabbit, Clone AB5922 Chemicon), anti-TH (Clone P40101, Peel Freez), anti-Pax6 (Ab 5790, Abcam), anti-Gfap (AB5804, Chemicon), αSin-mab (619786, BD-Biosciences), αSin-pab (AB5038, Chemicon), Tau (T6402, Sigma), pTau (CP13, Peter Davies), GFP (A11122, Invitrogen), Sox2 (S9072, Sigma), COX-I (A6405 Invitrogen).

Luego de tres lavados con PBS, se incubaron las células marcadas con anticuerpos secundarios asociados a cromóforo durante 2 hs en PBS con 10% Suero normal de Cabra para evidenciar los complejos antígeno/Ab primario formados en el paso anterior. Anticuerpos secundarios utilizados: Alexa Fluor 568 conjugado con anti-*mouse* o anti-*rabbit* IgG y Alexa Fluor488 conjugado con anti-*mouse* o anti-*rabbit* IgG de *Molecular Probes/Invitrogen*. Las células fueron co-teñidas con 4-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) o Hoescht Blue (*Molecular Probes/Invitrogen*, Carlsbad, CA, USA). Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio Nikon DXN1200F con cámara digital, controlado por el software de manejo de imágenes EclipseNet (versión 1.20.0 build 61) o utilizando un microscopio invertido Olympus IX71/IX81 y su software de control IX2-BSW.

2.4 Ensayo de actividad de Fosfatasa Alcalina

Para corroborar el estado indiferenciado de las CMEH se realizaron ensayos de actividad de la fosfatasa alcalina (FA), la cual disminuye conforme las CMEH se diferencian. Se utilizó el kit de actividad de la FA (Sigma). En primera instancia se realizó una solución conteniendo Fast Red Violet, Naftol y H₂O, en proporción 2:1:1, que vira a un color rojo violáceo en presencia de FA activa. Se dejó incubar la solución sobre una placa de CMEH durante 15 minutos y al cabo de este tiempo se lavó tres veces con PBS y se procedió a fotografiar los resultados utilizando una cámara digital Nikon.

2.4 Aislamiento de ARN total, RT-PCR y qPCR.

ARN total fue extraído de las CMEH utilizando Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Brevemente, las células fueron colectadas en Trizol, y luego de extraer con cloroformo (Merck), se precipitó el ARN con isopropanol (Merck), se lavó con etanol 75% y se resuspendió en agua deionizada libre de ribonucleasas. La concentración del ARN aislado (ng de ARN/ μ l de solución) se determinó utilizando un espectrofotómetro automático NanoDrop 1000 controlado por el software ND-1000. Se verificó también que la relación OD₂₆₀/OD₂₈₀ fuese de entre 1,7 y 2 para asegurar una elevada pureza del ARN total obtenido.

Para efectuar la transcripción reversa se utilizaron 1000ng de ARN total, 15 mM de oligonucleótidos al azar (random primers), dNTPs 1mM y (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 200U de la transcriptasa reversa MMLV (Promega Madison, WI, USA). Siguiendo el protocolo indicado por el fabricante de dicha enzima. Brevemente, se llevó el ARN de las distintas muestras a 10 μ l finales con agua deionizada libre de ARNasas y se desnaturalizó por calentamiento a 65°C durante 5 minutos en termocicladora. Luego, para evitar la renaturalización, las muestras se colocaron inmediatamente en hielo y se las incubó durante al menos un minuto. Finalmente, en cada tubo se agregaron 10 μ l de la mezcla conteniendo el resto de los reactivos mencionados anteriormente y se llevó a cabo la reacción utilizando el siguiente programa en termocicladora: 60 minutos a 37°C para que ocurra la retrotranscripción y 15 minutos a 70 °C con el fin de inactivar a la enzima. Finalmente, las muestras fueron diluidas 1/5 utilizando agua deionizada libre de ARNasas y almacenadas a - 20°C hasta su utilización en RT-PCR en tiempo real.

Los pares de oligonucleótidos específicos (primers) utilizados en este trabajo fueron diseñados con el programa Beacon Designer (Premier Biosoft internacional), definiendo como T_m

para los mismos una temperatura de 60° C. Para evitar la amplificación espuria de posible ADN geonómico contaminante en las muestras, los primers fueron diseñados de manera tal que cada miembro del par sentido y anti-sentido hibridara en un exón diferente del gen blanco correspondiente. Los primers fueron sintetizados por el servicio de la empresa Invitrogen en una escala de síntesis 25N. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados se indican en la tabla 2.1.

Las reacciones se realizaron en un volumen final de 20µl. Se colocaron los siguientes reactivos por tubo de PCR: 10µl de SYBR-Green master mix (Invitrogen); 0,4µl de ROX (Invitrogen); 3,6µl de primer sentido (5µM); 3,6µl de primer anti-sentido (5µM); 0.4µl de H₂O y 2µl de ADNc. Se utilizó el termociclador Step One Plus (Applied Biosystems). Cada muestra a analizar fue determinada por triplicado. En todos los casos el programa utilizado fue el siguiente:

1. Desnaturalización inicial y activación de la polimerasa: 10 minutos a 94°C
2. Apareamiento y extensión: 30 segundos a 60 °C
3. Desnaturalización: 40 segundos a 94 °C → Se realizaron 40 ciclos de los pasos
- 2-4. La lectura de la fluorescencia fue realizada al finalizar el paso 2 de cada ciclo.

Para cada uno de los ADNc analizados se realizaron curvas de temperatura de apareamiento para verificar la presencia de un único producto de amplificación. Esto fue confirmado al sembrar los productos de la reacción en geles de agarosa (2%) teñidos con bromuro de etidio, evidenciando una única banda.

qPCR Primers (5'-3'):		
Blanco	<i>Forward Primer (5' → 3')</i>	<i>Reverse Primer (5' → 3')</i>
Oct4	CTGGGTTGATCCTCGGACCT	CACAGAACTCATACGGCGGG
Nanog	AAAGAATCTTCACCTATGCC	GAAGGAAGAGGAGAGACAGT
Pax6	CACGTGTCCAACGATGTG	GTCGCTACTCTCCGTTTACTAC
Nestina	GGCGGTGGCTCCAAGACTTC	GGTAGCAGGCAAGGGTGAGG
Tuj1	TGGGCGACTCGGACTTGC	CCACTCTGACCAAAGATGAAATTG
TH	CGACCCTGACCTGGACTTGG	GGCGTGCGTGGCGTAGAG
Rpl7	AATGGCGAGGATGGCAAG	TGACGAAGGCGAAGAAGC

Tabla 2.1: Primers utilizados en la realización de este trabajo.

La proteína ribosomal 7(Rpl7) fue utilizada como control de carga, la cuantificación relativa fue evaluada por el método $\Delta\Delta\text{ct}$ asumiendo una eficiencia de amplificación del 100% ($2^{\Delta\Delta\text{ct}}$) (Livak K. 2001). Todos los valores fueron relativizados al estado indiferenciado en día 1 del protocolo.

2.5 Transfección.

Los plásmidos utilizados para transfección incluyen a las siguientes construcciones: vectores lentivirales plvBobi con promotor CMV conteniendo insertos WT, A30P o A53T αSin (Donación del Dr. Eliezer Masliah, UCSD, San Diego). pcDNA3 vector conteniendo EGFP, cherry, mito-GFP, o vacíos como control. Vectores pCI-Neo expresando GFP-FKBP-ActA, y pCI-Neo con proteína de fusión WT, A30P o A53T αSin -FRB.

Las neuronas humanas, progenitores neurales, neuronas hipocampales murinas y la línea SHSY5Y fueron transfectadas siguiendo el mismo protocolo. Brevemente: Se utilizo lipofectamina 2000 en OptiMEM en una relación reactivo: ADN de 2ul :1 μg . el medio de cultivo fue reemplazado por OptiMEM 30 min previo a la incubación. Los cultivos fueron mantenidos durante 2 hs en incubación con el mix lipofectamina/ADN y que luego fue aspirado y reemplazado por el medio de cultivo necesario. Los análisis fueron realizados con un mínimo de 24 hs post 7 día de transfección.

2.5.1 Eficiencia de transfección:

La eficiencia de transfección en neuronas humanas derivadas a partir de WAO9 fue del 5% o más baja según análisis de expresión de GFP vs Hoechst como contratinacion. La sobreexpresión de αSin fue evaluada por citometría de flujo, brevemente:

Las células fueron co-transfectadas con αSin -plvBobi y mcherry-pcDNA3 en una relación de ADN de 2ul :1 μg respectivamente, en dptx 1, 3 y 5 se levantaron las células, se fijaron en 4% PFA, se permeabilizaron y se marcaron con αSin -mab (619786, BD-Biosciences) permitiendo una incubación ON, luego se recuperó el anticuerpo, se lavaron las células 3 veces con PBS, se incubaron las células marcadas con anticuerpos secundarios α -mouse asociados a cromóforo Alexafluor®488 en PBS con 10% Suero normal de Cabra para evidenciar los complejos antígeno/Ab primario formados en el paso anterior y se midió la intensidad de fluorescencia en un

FACS Aria (Beckton and Dickinson). Para cada análisis se adquirieron entre 20.000 y 40.0000 eventos totales. Se evaluaron los histogramas del número de eventos en función de la intensidad de fluorescencia en el canal verde FL1 para la señal de Alexafluor@488 y en el canal FL2 para mCherry. Posteriormente se analizaron los datos con el software Flowing.

2.7 Transducción.

Las neuronas derivadas fueron transducidas con los vectores plv Bobi CMV-Egfp como control o plv Bobi CMV WT, A30P, o A53T α Sin (Dr. Eliezer Masliah, UCSD, San Diego) empaquetadas en partículas pseudovirales. Dichas partículas fueron obtenidas al co-transfectar células HEK-293T al 60% de confluencia con el vector plv Bobi de interés junto a construcciones codificantes para proteínas de empaquetamiento y proteínas de envoltura (CMV 8.9 y CMV-VSVg, respectivamente), utilizando el reactivo Lipofectamina Plus (Invitrogen). Dos días post transfección, los sobrenadantes de cultivo con partículas virales en suspensión fueron recolectados, tratados con DNasa I + 2mM MgCl₂, filtrados a través de un filtro de 0.45 μ m de poro y finalmente concentrados por ultracentrifugación a 100,000 g_{av} durante 90 min. Los títulos de los virus obtenidos fueron: 0.5-2x10⁹ TU/ml. Las alícuotas virales concentradas fueron guardadas a -80 grados hasta su utilización.

2.7.1 Titulación Viral

Se tomo una alícuota de 20 μ l del concentrado lentiviral y se infectaron células SHSY5Y 4.10⁴ células por well en 1 ml de medio dmem 10%SFB + 5 μ g/ml de polibrene, en diluciones seriadas para cada una de las alícuotas. Se centrifugó la placa a 700 Rcf, a 37° C durante 40 min. Y se llevo a estufa a 37° C + 5% CO₂ durante 18 h. Al otro día se cambia el medio por medio fresco y se mantiene a las células en cultivo durante 4 días para permitir la expresión de EGFP. Se analiza por citometría de flujo en citómetro de mesada Bd Accuri C6 (Beckton and Dickinson) y se realizó el análisis de la expresión EGFP usando el software asociado.

Utilizando un well que haya tenido un porcentaje de células positivas entre 1 y 20 % se determino el titulo viral aplicando la siguiente formula: $\text{Tit} = \{(F \times Cn) / V\} \times DF$

Donde:

F: La frecuencia de células EGFP positivas.

Cn: el número total de células blanco infectadas.

V: el volumen del inóculo.

DF: Factor de dilución del virus.

2.6 Imágenes en “*time lapse*”.

Utilizando un microscopio de epifluorescencia invertido (Olympus IX81) conectado a una cámara CCD (Olympus DP71, 12.5 megapixels) con un objetivo 60X (1.40 NA). Durante la adquisición de las imágenes, los cultivos adheridos en cubreobjetos de 13mm fueron transferidos desde el pocillo en la placa a un plato de cultivo de 35 mm con fondo de vidrio con MDF a 37°C y 5% CO₂ mediante un plato de calentamiento isotérmico y una cámara de CO₂ (Olympus). Las películas fueron tomadas en lapsos de 150 segundos (con intervalos de 3 segundos entre imágenes) de aproximadamente 20 axones mitoGFP⁺ en cada cubreobjetos en cada experimento independiente.

Las imágenes fueron deconvolucionadas y procesadas a archivos de video AVI por el software del microscopio (Olympus BSW *Software*). Las películas fueron transformadas a kimografías mediante el software *ImageJ* (NHI) y analizados utilizando el *plug-in* para múltiples kimografías. Los datos de tamaño y densidad mitocondrial fueron extraídos para su análisis. Para calcular parámetros de movimiento mitocondrial (proporciones de movimiento, velocidades, velocidades segmentales), se trazó una línea segmentada siguiendo la trayectoria de una mitocondria dada a lo largo de una neurita (Miller and Sheetz 2006; Niescier, R. F *et al.* 2016).

2.8 Potencial de membrana mitocondrial.

Las neuronas terminalmente diferenciadas fueron adheridas a cubreobjetos en placa de 24 pocillos (Corning) en la etapa final de la diferenciación. Las mismas fueron transducidas con una multiplicidad de infección (MOI por sus siglas en inglés) de 30 para cada construcción de α Sin o vector vacío como control negativo. 7 días post transducción los medios de diferenciación fueron reemplazados por un medio de diferenciación sin suplementos B27, dichos suplementos contienen glutatión y α -tocoferol o vitamina E, ya que ambos compuestos presentan una alta actividad antioxidante. Luego de dos días en este medio, los cultivos fueron incubados con la tinción JC-1 (1 μ M) (Invitrogen™, *Life technologies*) en PBS a 37°C, 5% CO₂ durante 15 minutos. JC1 es

una sonda mitocondrial colorimétrica que cambia su espectro de emisión cuando se produce la oligomerización en condiciones de potencial de membrana hiperpolarizantes, fue utilizada para analizar la función mitocondrial.

El tinte en cuestión exhibe una acumulación potencial-dependiente en la mitocondria que se indica por el cambio en el espectro de emisión de verde (~529 nm) hacia rojo (~590 nm). Consecuentemente la despolarización mitocondrial es indicada por la baja en la relación de fluorescencia Rojo/Verde. El ionoforo Carbonilcianuro-4-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP) (10µM) fue utilizado como control positivo y co-incubado con JC1. El exceso de tinte fue lavado una vez con PBS, el medio fue cambiado por MDF sin B27 hasta su visualización. Las células fueron observadas en una cámara con DMEM sin rojo de fenol, sobre placa térmica en cámara de CO₂ (Olympus). Las imágenes fueron adquiridas en dos canales diferentes: excitación en longitud de onda para lograr la emisión verde de JC1 (BP460-495) y excitación (BP530-550) para la emisión roja. La colocación de los dos canales fue evaluada y se calculó el coeficiente de correlación de Manders usando el *plug-in* JACOP del software abierto de análisis de imágenes *ImageJ* (NIH). El coeficiente de *Manders* representa el grado de co-localización de señales múltiples de la siguiente manera:

$$R = \frac{\sum_i S1_i \cdot S2_i}{\sqrt{\sum_i (S1_i)^2 \cdot \sum_i (S2_i)^2}}$$

Donde S1 representa la intensidad de señal de los pixeles en el canal 1, y S2 la intensidad de pixeles en el canal 2. Este coeficiente no es sensible a las limitaciones típicas de las imágenes por fluorescencia, tales como: eficacia de hibridación, *photobleaching* de la muestra eficiencia cuántica de la cámara. Sus valores se manejan en el rango 0 a 1.0. Si la imagen tiene un coeficiente de 0.5, implica que un 50% de las imágenes tienen un solapamiento de pixeles. Un valor de cero significa que no hay solapamiento de pixeles.

El control negativo fue utilizado para establecer los valores umbrales para cada canal para cada replica experimental de placa. La cuantificación de la señal fue obtenida adaptando el índice de colocación de Manders: los valores que resultan de la formula [1-Manders (Rojo o Verde)] que da una proporción de las mitocondrias exclusivamente verdes (despolarizadas) o rojas (hiperpolarizadas). Por ende, es esperable que el tratamiento con FCCP como control positivo, lleva a una proporción casi total de mitocondrias despolarizadas, o verdes.

2.9 Fraccionamiento subcelular.

Para evaluar la localización de α Sin en células de línea SHSY5Y, las mismas fueron transfectadas siguiendo el protocolo previamente presentado, con vector vacío o conteniendo las secuencias para la sobreexpresión de α Sin WT, A30P o A53T. Las células transfectadas fueron incubadas en DMEM completo por 72 hs y luego se realizó el fraccionamiento subcelular. Brevemente: Las células fueron lavadas una vez en PBS frío previo a la resuspensión en buffer de homogeneización H (10 mM Tris pH 7.4, 10 mM KCl, 2 mM EGTA, *cocktail* inhibidor de proteasas (Roche), 0.2mM NaF y Na₃VO₄, 300 mM sacarosa). Las células fueron suspendidas utilizando tripsina y tratadas mecánicamente en un homogeneizador Dounce de teflón. Se obtuvo así la fracción celular total, y 2/3 del volumen de homogenato fue centrifugado a 2000 g durante 10 min. El *pellet* (fracción nuclear) fue resuspendido en buffer H, y el sobrenadante fue centrifugado a 15000 g durante 15 min. La fracción enriquecida en mitocondrias presente en el pellet fue resuspendida en buffer H y el sobrenadante corresponde a la fracción citosólica. El contenido proteico de cada fracción fue cuantificado utilizando el método de BCA(Bio-Rad), las muestras fueron entonces crackeadas en Buffer de muestra y congeladas.

2.10 Western Blot

Las proteínas fueron extraídas utilizando buffer de lisis (10 mM Tris-HCl, PH 7.4, 0.8 M NaCl, 1mM EGTA, 0.1% tritón X100 y *cocktail* de inhibidores de proteasa) a 4°C. la concentración de proteína en cada muestra fue evaluada usando el método BCA (Bio-Rad). Se utilizaron cantidades equivalentes de proteína (20 μ g) en 20 μ l de buffer de carga (0.5 % azul de bromofenol; 10% glicerol; 10% 2-Mercaptoethanol) que fueron cargadas en geles SDS-poliacrilamida 12% (m/v) (30% Acrilamida y N, N'-Metilenbisacrilamida, SIGMA) y corridos a 100V en buffer Tris-glicina. Los geles fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa (Whatman, USA) utilizando el método de transferencia húmeda en buffer Tris-Glicina. Las membranas fueron luego bloqueadas en T-PBS (0,05% Tween 20) 5% (m/v) leche descremada (Sancor) durante 1 hora. Los anticuerpos primarios fueron incubados *over night* a 4°C. Anticuerpos utilizados: VDAC, Tub, α Sin (mono y policlonal), MFN1 (AF7880-SP, R&D Systems), DRP1 (ab56788, Abcam). Las membranas marcadas con Ab primario fueron lavadas 3 veces en T-TBS

para luego ser incubadas con el anticuerpo secundario *goat* conjugado con *Horse radish peroxidase* (HRP) apropiado para cada Ab primario durante 2 hs a temp. ambiente. Posteriormente se lavaron las membranas 3 veces en T-TBS y se revelaron incubándolas en ECL (Pierce), y se expusieron a film fotográfico (Agfa) en casetes durante diferentes tiempos de exposición. Luego de fijar los films en cuarto oscuro, se escanearon las imágenes para posteriormente ser analizadas utilizando el *software* Image-J.

2.11 Sistema de heterodimerización FKBP/FRB.

Vectores PCI-Neo con un inserto GFP-FKBP(x2)-ActA o con inserto HA-BICD-FRB fueron proveídos generosamente por el Dr. Hoogenrad (*Utrecht University*, Holanda). Los insertos de α Sin WT, A30P and A53T presentes en los plv BOBI fueron amplificados mediante PCR utilizando *primers* flanqueantes al sitio de clonado. Los mismos introdujeron en su secuencia sitios de restricción SalI and XbaI al producto de amplificación. El vector HA-BICD-FRB previamente digerido con SalI and XbaI fue utilizado para lograr el sub-clonado de HA- α Sin-FRB (WT, A30P y A53T). Los clones con ligación en marco de lectura fueron seleccionados por análisis de secuencia, *western blot* e inmunocitoquímica luego de la transfección. La localización mitocondrial de la construcción GFP-FKBP(x2)-ActA en neuronas transfectadas fue evaluada por análisis de colocalización con la sonda *Mitotracker Red* (*Life technologies*) (incubación 30 min 100nM en MDF). Luego de ser lavadas, las células fueron visualizadas en microscopio de fluorescencia en medio MDF. La incubación con rapalog fue ensayada a diferentes tiempos y concentraciones, no se observó citotoxicidad en el rango superior probado (500nM). La localización de α Sin-FRB en mitocondria fue observada en incubaciones desde los 120 min. El análisis de cambios en morfología mitocondrial para las células expresando α Sin-FRB se realizó luego de 6hs de incubación con Rapalog. Las células tratadas fueron posteriormente lavadas, fijadas y marcadas con Ab α - α Sin y α -GFP.

2.12 Edición Genómica Crispr/Cas9.

La edición genómica del gen de α Sin, SNCA en exón 2, con el objetivo de disrumpir el dominio N-terminal de α Sin fue llevado a cabo utilizando una estrategia Crispr/Cas9 de corte específico de DNA y reparación por *Non Homologous end joining* (NHEJ). Brevemente: Un ARN

guía (ARNg) con secuencia homóloga a una secuencia génica entre las dos α -hélices presente en el exón 2, fue diseñada utilizando el *CrispR Design Tool* de las herramientas web del laboratorio de Zhang. Esta secuencia de 19 nucleótidos GGGTGGTCTCTATGTAGGT sin la secuencia de corte (secuencia PAM) se incluyó en un templado ARNg, que consiste en un promotor U6, un esqueleto base de ARNg y una señal de terminación. Esta secuencia entera fue sintetizada como un ADNdc de 450 pb y clonado en un vector plasmídico *pBlueScript*. El control de especificidad de sitio de corte para cada secuencia de ARNg obtenida fue realizada mediante el ensayo de *surveyor* en células HEKs. Para expresar la nucleasa Cas9 y la selección de células transfectadas se utilizó un vector pCAG con la expresión de Cas9-2A-GFP. Células CMPih (CV hiPSC SD2010-125, UCSD) (en pasaje menor a 40) fueron levantadas con acutasa (*life technologies*) y sometidas a electroporación con el vector Cas9-2A-GFP y cada uno de los ARNgs, mediante un kit nucleofector para células madre humanas usando un *Amaya Nucleofector system* (Lonza, USA). Inmediatamente después de la electroporación, las células fueron adheridas a p100 para permitir la expresión de Cas9-2A-GFP durante un día. Las células fueron luego disgregadas por tratamiento enzimático con acutasa y sorteadas según señal verde positiva. Se plaquearon dichas células en una concentración de 1000 células en plato de p100.

Las colonias en crecimiento fueron levantadas manualmente en flujo horizontal, y plaqueadas individualmente en multiplaca de 96 pocillos. Cada clon fue testeado para eventos in/del mediante amplificación por PCR con *primers* flanqueantes a la secuencia blanco de los ARNg. Diferentes clones con cambios en los tamaños de producto de amplificación fueron seleccionados para su secuenciación. Se seleccionó el clon MS06 por presentar cambios en ambos alelos de SNCA. Los protocolos de diferenciación para la obtención de células madre neurales y neuronas terminalmente diferenciadas implementados fueron los mismos presentados previamente.

2.13 Análisis de imágenes y Estadística:

El análisis del tamaño, morfología intensidad de señal de fluorescencia y cuantificación de barras de *Western Blot* fueron realizados utilizando el programa informático *Image J*. La herramienta de kimografías múltiples fue utilizada para generar las kimografías a partir de las películas en *time lapse*. La herramienta *JACOP* para el análisis de co-localización y la herramienta *3D object counter* para las mediciones mitocondriales en tres dimensiones. El análisis estadístico y

los gráficos fueron realizados mediante el *software* Prism 6 (GraphPad Software) y Mathematica 9. Se utilizó el test de *Student* para la comparación de dos muestras con distribución Gaussiana. ANOVA de un factor seguido de un post-test Dunnet. ANOVA de dos factores seguido de una comparación corregida de Sidak del coeficiente de Mander. Test no paramétricos fueron utilizados en los casos en los que no se haya alcanzado una normalidad, analizado por un test de Mann Withney o Kruskal-Wallis. Kolmogorov-Smirnoff fue utilizado para los análisis de distribución de densidad de probabilidad.

3. Resultados

3. Resultados

3.1 Las células madre embrionarias indiferenciadas, presentan fenotipo pluripotente:

En una primera instancia se comprobó la naturaleza pluripotente de las células WAO9 en expansión sobre capa nutricia de MEFi en medio HES suplementado con BFGF. Mediante inmunofluorescencia y RT-qPCR se midieron marcadores específicos del estado indiferenciado (Oct4, Sox2, Nanog) y se comprobó su presencia en los cultivos en expansión (Fig. 3.1 A). Asimismo, se evaluó la actividad de la fosfatasa alcalina, como rasgo funcional de células madre indiferenciadas y la línea resulto positiva para el ensayo (Fig. 3.1B). Observamos además como la transcripción de los genes maestros de pluripotencia Oct4 y Nanog disminuye a través del proceso de diferenciación y maduración neural durante el protocolo de diferenciación implementado. (Fig. 3.1C).

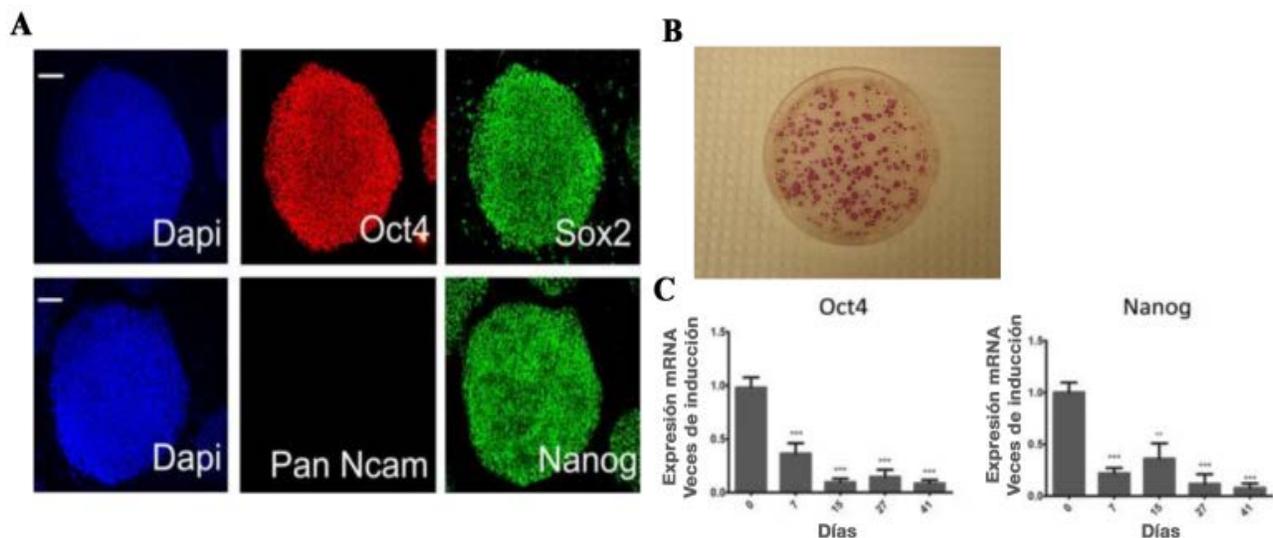
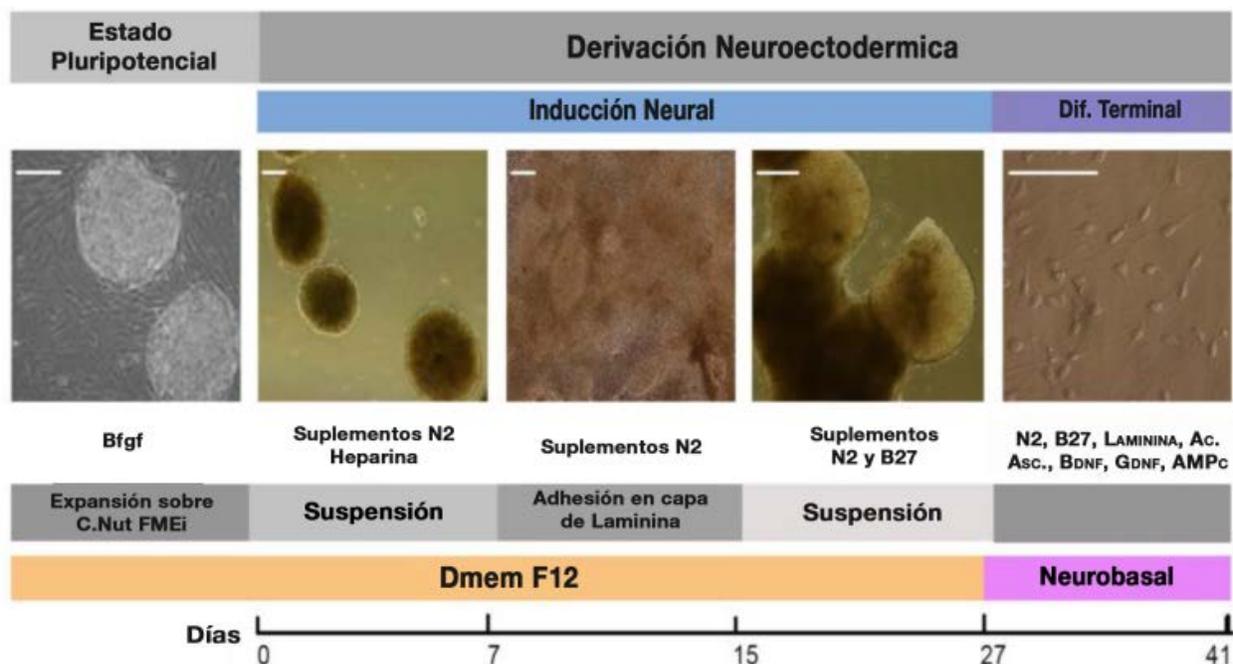


Figura 3.1: Evaluación del estado indiferenciado de las células WAO9 en expansión sobre capa nutricia de FEM irradiados. (A) Inmunofluorescencia evidenciando presencia de marcadores de pluripotencia Oct4, Nanog, Sox2 y la ausencia de marcador neuroectodérmico intermedio Pan-Ncam en colonias WAO9 expandidas sobre capa nutricia de MEFi. Barra de escala; 50 μ m. (B) Ensayo de actividad de Fosfatasa Alcalina, fotografía de placa mostrando el punteado de colonias positivas para el ensayo. (C) Perfil transcripcional de marcadores de pluripotencia Oct4 y Nanog medidos mediante RT-qPCR en diferentes etapas del protocolo de diferenciación. Datos representados como la media \pm SEM, n=4, Análisis estadístico: ANOVA de un factor (*p<0.05) seguido de un test de *Dunnet*. ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05.

3.2 El protocolo de diferenciación implementado, es capaz de generar neuronas humanas maduras a nivel morfológico y funcional.

Con el fin de estudiar los roles fisiológicos y patológicos de α Sin respecto a las dinámicas mitocondriales en un contexto que recapitula parámetros de la EP en humanos, obtuvimos cultivos de tipo neuroectodérmico enriquecidos en neuronas, polarizadas y funcionales a partir de la derivación de CMEH aplicando un protocolo clásico *Zhang et al, 2010*, de diferenciación neuroectodérmica (Esquema 1).



Esquema 2.1: Protocolo de diferenciación Neural utilizado con las HUES9 hESCs y las CMPih (*Zhang et al, 2009*), las imágenes en campo claro y contraste de fase representan la morfología observada en cada etapa del proceso. Barra de escala: 50 μ m.

Las diferentes etapas del proceso, desde las colonias indiferenciadas con capacidad pluripotente hasta las neuronas terminalmente diferenciadas fueron evaluadas por cuantificación de mRNA y expresión proteica mediante RT-qPCR e inmunofluorescencias respectivamente (Fig. 3.2). Las inmunofluorescencias en neuronas diferenciadas evidenciaron una expresión conspicua de Tuj1 y una débil expresión de Nestina. Los marcadores neuronales, incluyendo Tuj1, pan-NCAM y tirosina hidroxilasa (TH) presentaron un aumento en sus ARNm durante la diferenciación hacia el punto final. (Fig. 3.2, A y B respectivamente).

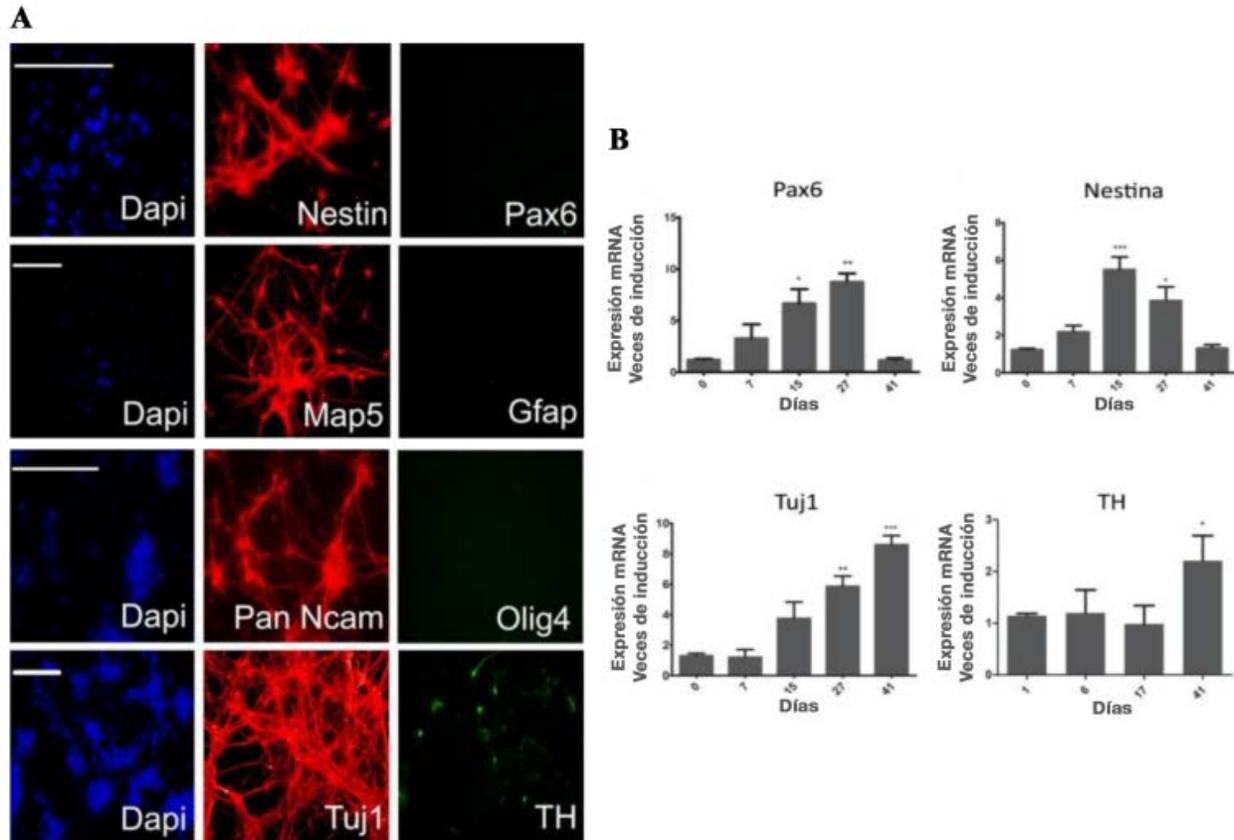


Figura 3.2: (A) Inmunofluorescencia de cultivos diferenciados (DIV14 en medio de diferenciación, DIV41 del protocolo) positivos para marcadores de diferenciación neural tardía; Tuj1, Map5, TH; intermedios: Nestina y Pan-Ncam, y ausencia de marcadores gliales GFAP, Olig4 y el marcador de diferenciación neuroectodérmica temprana Pax6. Barra de escala; 50 μ m. (B) Perfil transcripcional de marcadores neuroectodérmicos temprano e intermedio Pax6, Nestina y marcadores neurales tardíos Tuj1 y TH, medidos mediante RT-qPCR en diferentes etapas del protocolo de diferenciación. Datos representados como la media \pm SEM, n=4, Análisis estadístico: ANOVA de un factor (*p<0.05) seguido de un test de *Dunnet*. ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05.

Se evaluó la capacidad funcional de las neuronas derivadas a los 7, 14 y 18 días de cultivo *in vitro* (DIV) en la última etapa del protocolo en el medio de diferenciación neuronal (DIV 7, 14 y 18). Se midieron las corrientes de Na⁺/K⁺ (*voltage clamp*: -70mV, pulsos cuadrados de voltaje: 10 mV). Se observaron los típicos trazos de corriente de células de tipo neural. Utilizando los datos obtenidos, se realizaron los gráficos de I (pA) vs V(mV) que también evidenciaron una dinámica clásica de tipo neuronal maduro. Para evaluar la capacidad de transmisión de diferencias de potencial, se midieron los cambios en el potencial de membrana al realizar un *clamp* y pulsos cuadrados de corriente (*current clamp*: -60 mV, pulsos cuadrados de corriente: 10 pA). Se observó la capacidad de evocar disparos de Potenciales de Acción (PA) que presentan las células

diferenciadas y la maduración a mayor tiempo *in vitro* evidenciada en la aparición de múltiples disparos formando “trenes” de PA (Fig. 3.3).

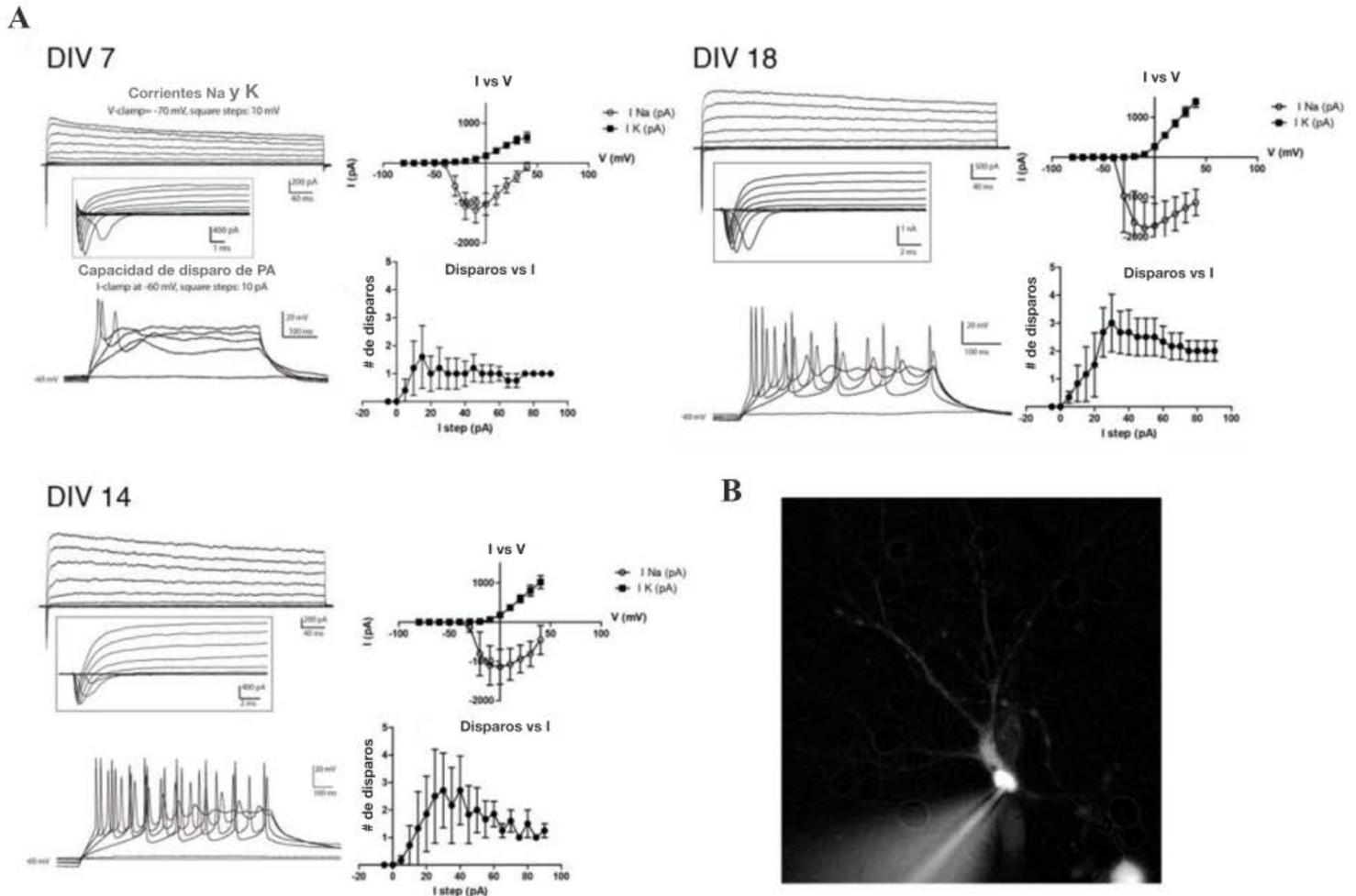


Figura 3.3: Maduración electrofisiológica de las neuronas diferenciadas. (A). Corrientes de Na⁺/K⁺ (*voltage clamp*: -70mV, pulsos cuadrado de voltaje: 10 mV) y gráficos de I (pA) vs V(mV). Se midieron además los potenciales de acción evocados (*current clamp* -60 mV, pulsos cuadrado de corriente: 10 pA) Se observa la capacidad de disparo de PA que presentan las células diferenciadas y la maduración temporal en la aparición de “trenes” de PA. Los datos en los gráficos representan a la media \pm EMS de mínimo n= 10 células. (B) Micrografía mostrando un *whole cell patch* en una neurona DIV 14 teñida con Alexa Green.

3.3 Sobreexpresión de α Sin en neuronas derivadas a partir de CMEH.

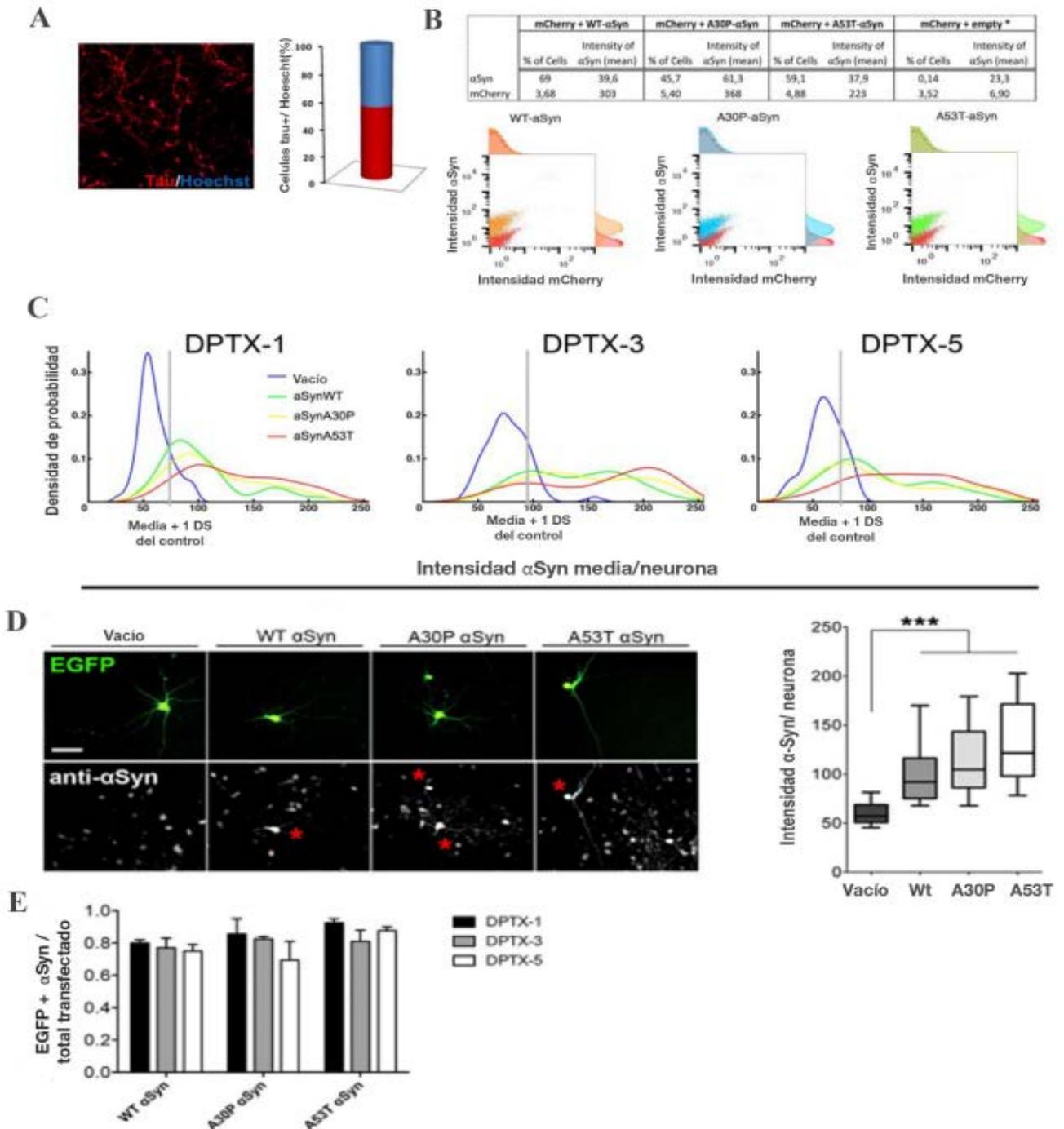


Figura 3.4: Niveles de expresión de las variantes de α Sin luego de los ensayos de transfección en los cultivos derivados. Neuronas derivadas de 21 días en medio de diferenciación teñidas con anticuerpo α -Tau (rojo) y co-tinción de núcleos con *Hoescht*. (A) Porcentaje de células Tau⁺ (rojo) con morfología neuronal del total de células presentes (*Hoescht*). Las neuronas representaron 55.17 % \pm 2.2 en cuantificaciones de baja magnificación (10x) de 3 protocolos

de diferenciación independientes. (B) Análisis de citometría de flujo para neuronas co-transfectadas con *mCherry* (canal rojo) y las variantes WT, A30P y A53T de α Sin en contraste con un control *mcherry* + vector vacío. (C) Neuronas co-transfectadas con EGFP y WT, A30P o A53T α Sin, y fijadas luego de 1, 3 y 5 días post transfección (DPTX). Una inmunofluorescencia contra α Sin fue realizada, para el análisis cuantitativo de la media de intensidad de fluorescencia α Sin solo se tomaron las células EGFP⁺. Para determinar un nivel basal de sobreexpresión de α Sin, se tomó arbitrariamente un valor umbral de fluorescencia definido como la media de intensidad + 1 desvío estándar del tratamiento control en inmunofluorescencias con Ab α - α Sin (rojo). (D) Inmunofluorescencias de α Sin en neuronas mEGFP⁺ para neuronas co-transfectadas con cada variante de α Sin (asterisco) y control (pl. Egef + plásmido vacío). Barra de escala: 50 μ m. (D) sector izq. Cuantificación de intensidad de marca de α Sin en cada condición. Datos representados como la mediana más un rango Inter-cuartil. Análisis estadístico: ANOVA Kruskal-Wallis (p <0.05). (n=80 neuronas por condición de 2 experimentos independientes). (E) Supervivencia neuronal en condiciones de sobreexpresión de α Sin a DPTX 1, 3 y 5. Tasa obtenida como el número de neuronas α Sin⁺ (con valor de fluorescencia por encima del umbral determinado en 4C) sobre el total de neuronas EGFP⁺ (con valores por encima y debajo del umbral α Sin determinado) (n=20 imágenes por condición, más de 5 neuronas por campo de 2 experimentos independientes).

Se determinó el enriquecimiento en células neuronales en los cultivos a punto final mediante el análisis del porcentaje de células Tau⁺, como marcador neuronal, respecto a los núcleos presentes en las placas (FIG 3.4 A). Los cultivos diferenciados fueron transfectados con vectores lentivirales pLV-CMV- α Sin codificantes para la forma *wild-type* (WT) de α Sin o las mutaciones asociadas con EP familiar A30P y A53T. Basados en los perfiles electrofisiológicos de las células neurales y la expresión robusta de marcadores neuronales, las transfecciones fueron llevadas a cabo el día 14 *in vitro* (DIV14). Para distinguir la sobreexpresión de α Sin de la expresión endógena, las neuronas fueron co-transfectadas con vectores codificantes para EGFP junto con los vectores α Sin WT, A30P, o A53T en una relación 3:1 y luego analizados por inmunofluorescencia (Fig. 3.4D). La cuantificación de la fluorescencia asociada a la expresión de α Sin reveló un aumento en señal de 2 a 3 veces en neuronas transfectadas para las tres variables de α Sin evaluadas (WT, A30P, o A53T) respecto a la expresión endógena de la proteína (Fig. 3.4D izquierda). La sobreexpresión de α Sin fue además validada por análisis de citometría de flujo de neuronas co-transfectadas con vectores codificantes para *mCherry* y las variables WT, A30P, o A53T de α Sin (Figura 3.4B, C), dando la pauta que el método utilizado es válido para tomarlo como modelo de sobreexpresión de α Sin en los cultivos neuronales diferenciados. No se observó efecto neurotóxico en respuesta a la sobreexpresión de α Sin y sus mutantes durante la ventana temporal analizada (Fig. 3.4 E).

El patrón de expresión de α Sin observado en los cultivos fue difuso con una distribución punteada en neuritas positivas para Tau fosforilada (p-Tau). (Fig. 3.5 D). La progresión de perfiles electrofisiológicos, incluyendo la posibilidad de disparo múltiple de potenciales de acción

dependientes de las corrientes de Na^+ y K^+ (Figs. 5E, 3A), recapitulando características clave en el desarrollo neuronal.

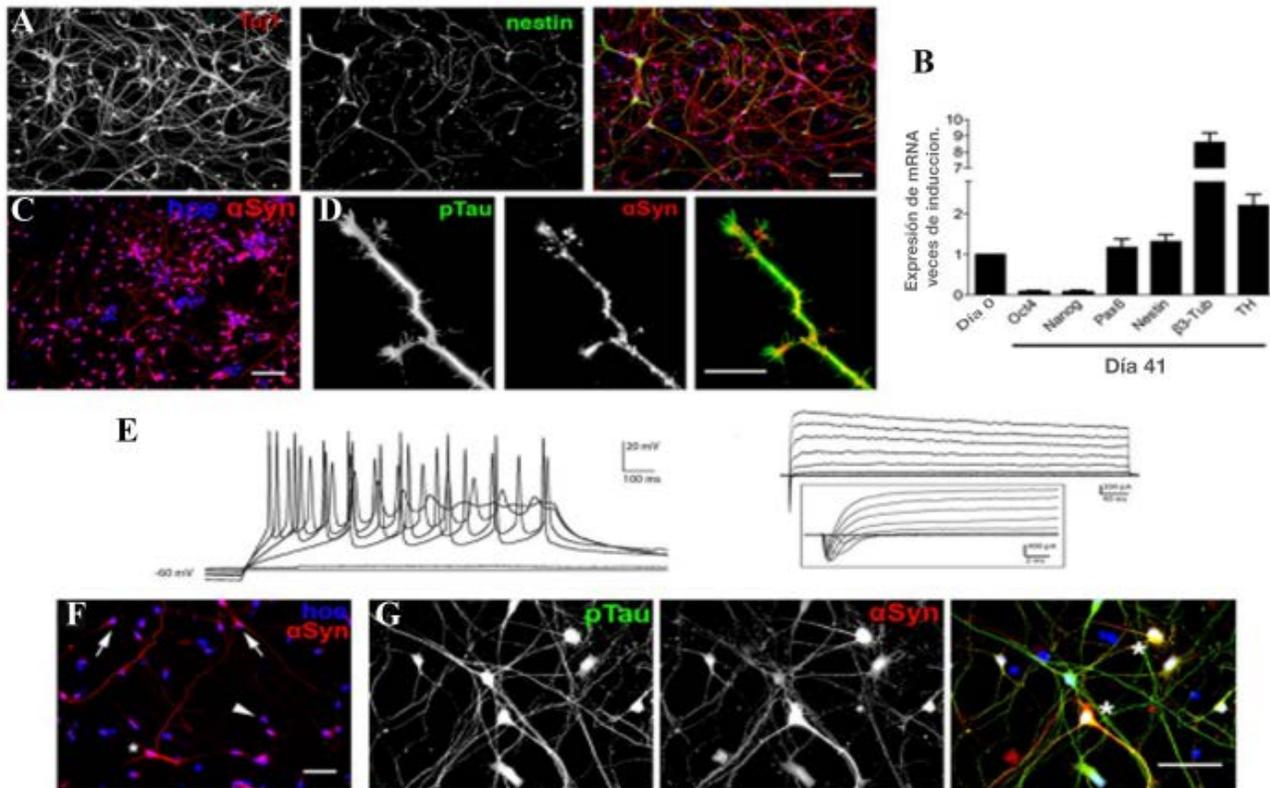


Figura 3.5: Sobreexpresión de α Sin en cultivos neurales funcionales derivados a partir de CMEH. (A) Expresión alta de los marcadores neuronales, β 3-tubulina(Tuj-1), y expresión baja del marcador precursor Nestina (Barra de escala, 100 μm). (B) Análisis del perfil transcripcional de los cultivos a día 41 del protocolo de diferenciación mediante RT-qPCR. Se observa la disminución de los ARNm para marcadores de pluripotencia (Oct4, Nanog), marcadores neuroectodérmicos tempranos e intermedios (Pax6, Nestina), y marcadores neuronales específicos (Tuj1, TH) relativos a los cultivos indiferenciados de CMEH (media \pm EMS, n = 4 experimentos independientes). (C) Expresión endógena de α Sin, nótese su ubicación citosólica. Núcleos marcados con Hoechst Azul (Barra de escala, 100 μm). (D) Localización de α Sin enriquecida en procesos neurales, se observan agregados puntuales α Sin en neuritas de células p-Tau⁺. Barra de Escala 20 μm . (E) Trazos representativos de los PAs generados por pasos cuadrados de corriente de 0 a 40 pA en incrementos de 10pA. Las células DIV14 fueron mantenidas a en *current clamp* a -60 mV. Izquierda: Trazos representativos de corrientes de Na^+ y K^+ dependientes de voltaje evocados por sucesivos pasos de voltaje despolarizante con incrementos de 10 mV. Las células fueron mantenidas a -70 mV mediante *voltage clamp*. Neuronas humanas sobre-expresando α Sin (F) Inmunofluorescencia de α Sin en células transfectadas (asterisco) y neuronas no transfectadas (flechas) en cultivos DIV 14 de diferenciación. Barra de escala: 50 μm . (g) Neuronas transfectadas con α Sin muestran un incremento en los niveles de pTau observada por inmunofluorescencia. Barra de escala: 50 μm .

Un aumento en la expresión y agregación puntual de α Sin fue observado en neuronas transfectadas p-Tau-positivas (Fig. 3.5 D, F). La hiperfosforilación del filamento intermedio Tau, es considerado como un hito temprano en la evolución de enfermedades neurodegenerativas.

3.4 La sobreexpresión de α Sin induce defectos en el transporte mitocondrial axonal.

La homeostasis neuronal es fuertemente dependiente en la distribución subcelular apropiada de organelas, incluyendo a la mitocondria (Falzone, T. L. *et al.* 2009; 2012). La expresión de α Sin ha demostrado influir en el transporte mitocondrial axonal, que a su vez impacta sobre las tasas de fusión/fisión de la organela (Krebiehl, G. *et al.* 2010; Yang, Y. *et al.* 2008; Volpicelli-Daley, L. A. *et al.* 2014; Roy, B. & Jackson 2014).

Para probar el efecto de la sobre-expresión de α Sin sobre el transporte axonal de las mitocondrias en nuestro modelo de neuronas derivadas de células pluripotenciales de origen humano, se llevó a cabo un análisis de imágenes en vivo de células co-transfectadas con un vector que expresa GFP fusionado a una secuencia de localización mitocondrial junto con cada uno de los vectores codificantes para α Sin (WT, A30P y A53T) (Figs. 3.6A, B).

Películas realizadas en *Time-lapse* de axones transfectados fueron transformados a Kimogramas para seguir y cuantificar el movimiento mitocondrial (Fig. 3.6B, C). El transporte mitocondrial de las células transfectadas con WT, A30P, o A53T α Sin (Fig. 3.2C) mostraron iguales proporciones de movimiento total en sentido anterógrado, retrogrado y estacionario al comparar con el control de células neurales transfectadas con *mCherry* (Fig. 3.6D). Sin embargo, el análisis detallado de la cinética mitocondrial, discriminando velocidades segmentales y tiempo durante el movimiento (Fig. 3.6E, F), revelaron una diferencia en las neuronas control que presentaron una mayor velocidad en sentido anterógrado al comparar con el flujo retrogrado.

Esta asimetría, que es importante para la manutención de la distribución distal de mitocondrias en el axón, fue perdida en las células sobreexpresando α Sin. Las neuronas sobreexpresando α SinWT y A53T mostraron velocidades mitocondriales segmentales similares en sentido retrogrado y anterógrado (Fig. 3.6F). La sobreexpresión de la variante A53T de α Sin también impacto en el tiempo de movimiento en uno y otro sentido (Fig. 3.6E). Estos resultados revelan impedimentos en el flujo mitocondrial en axones transfectados, siendo A53T la variante de α Sin con efecto más pronunciado sobre los parámetros analizados. Esto indica que la sobreexpresión de α Sin conlleva a un desbalance en la distribución mitocondrial en el axón con respecto al estado de expresión endógena.

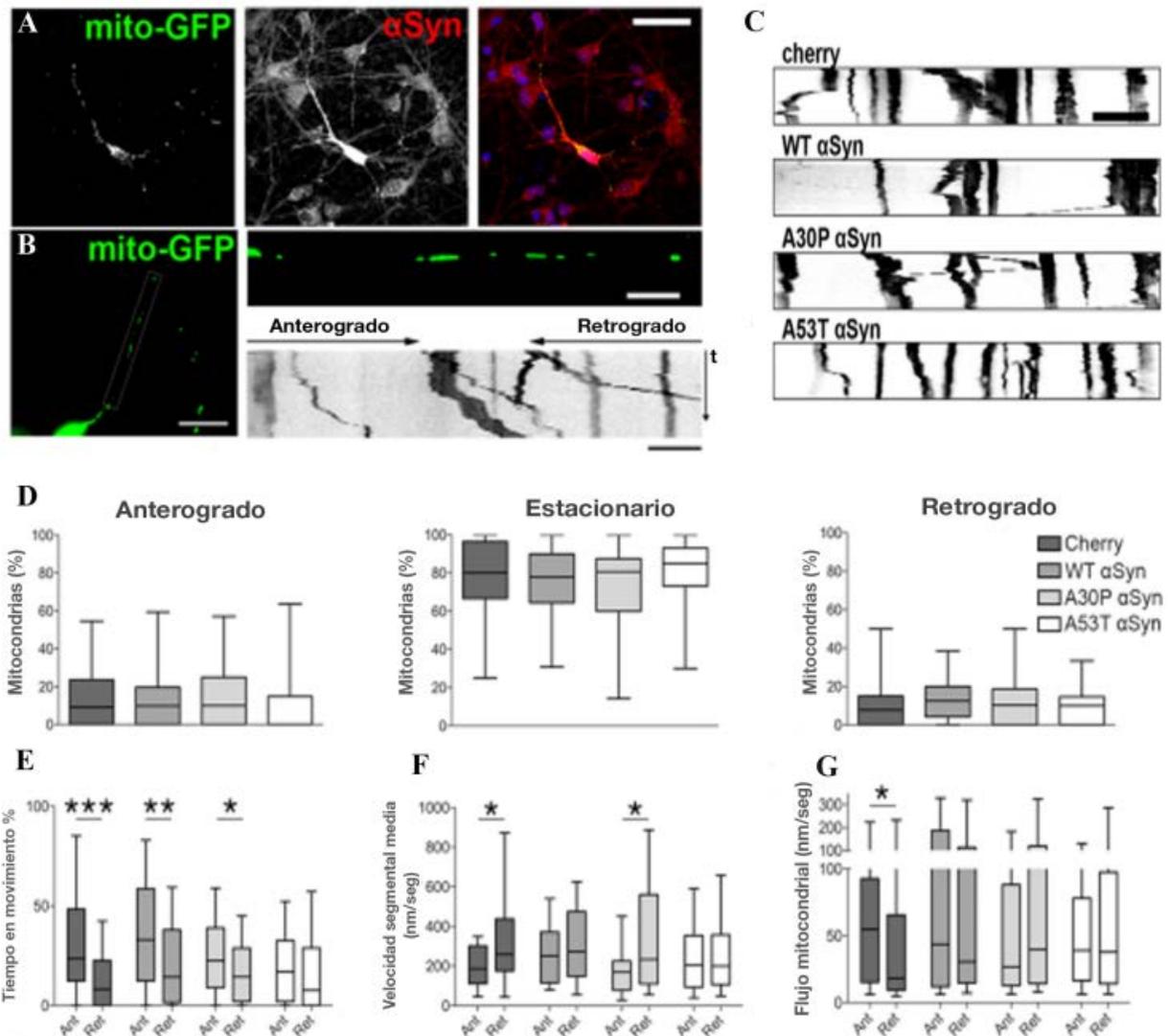


Figura 3.6: El transporte axonal es afectado de manera diferencial por las variantes de α Sin. (A) Neuronas co-transfectadas con mito-GFP y α Sin WT. Barra de escala: 100 μ m. (B) Mitocondrias (mito-GFP) en proyecciones axonales de una neurona transfectada, Proyección magnificada y representación gráfica de kimograma asociado al movimiento de las mitocondrias, en una grabación de tipo *time lapse* durante 150s con captura a intervalos de 3s. Barra de escala panel izquierdo: 30 μ m, horizontal: 10 μ m. (C) Kimografías representativas de neuronas transfectadas con diferentes variantes de α Sin, barra de escala: 10 μ m. (D) La proporción de movimiento mitocondrial anterógrado, retrogrado o estacionario no presentó cambios en un contexto de sobreexpresión de α Sin. Datos representados como la mediana más rango intercuartil (n > 50 axones por condiciones de 10 experimentos independientes). Análisis estadístico: ANOVA Kruskal-Wallis para cada tipo de movimiento ($p > 0.05$). (E) El tiempo en movimiento en sentido anterógrado y retrogrado no presento diferencias entre uno y otro sentido en neuronas transfectadas α SinA53T, si se observaron diferencias temporales para las variables α SinWT y A30P. (F) Las diferencias en velocidad segmental media para cada sentido de movimiento no se observan para las células sobreexpresando variantes α SinWT y A53T (n = 60 mitocondrias por condición de 10 experimentos independientes) (G) Flujo mitocondrial anterógrado y retrogrado (distancia recorrida por mitocondria normalizada a un tiempo de adquisición dado (nm/seg)) es modificado por todas las versiones de α Sin sobre-expresadas al comparar con el ctrl.(n = 60 mitocondrias por condición de 10 experimentos independientes). Datos representados como mediana más rango intercuartil. Test de Mann-Whitney U entre movimiento anterógrado y retrogrado para cada parámetro. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

Para probar si estas diferencias en el flujo mitocondrial están relacionadas a otros efectos de α Sin sobre la homeostasis de dicha organela, se evaluó el potencial de membrana mitocondrial en neuronas transducidas con partículas lentivirales de WT, A30P, o A53T pLV-CMV- α Sin (Figs. 3.7 y 3.8).

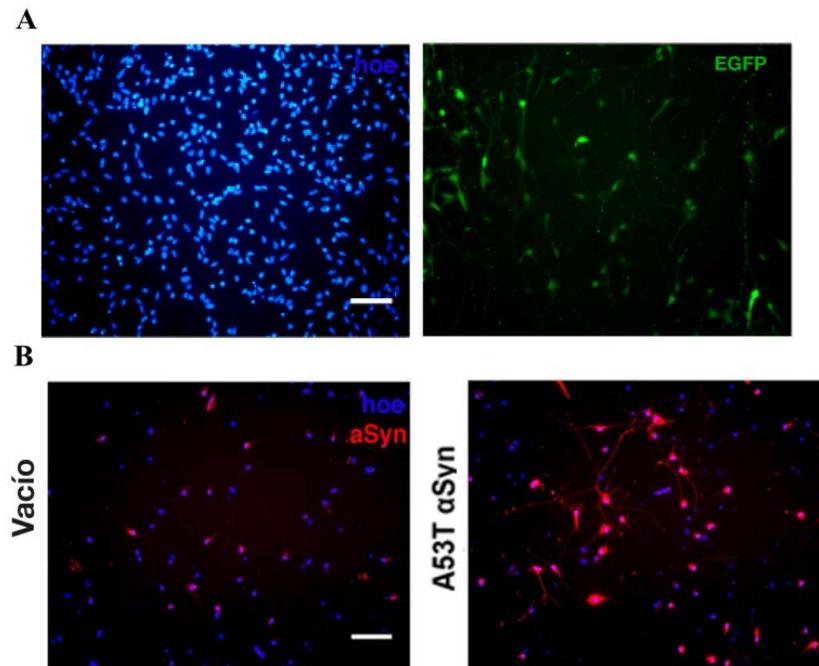


Figura 3.7: Transducción de neuronas derivadas a partir de CMEH WA09. (A): Ctrl de calidad de partículas virales obtenidas, evidenciando la expresión de EGFP codificado en plásmido plv-CMV-EGFP. (B): Comparación por inmunofluorescencia utilizando un Ab primario α - α Sin y un Ab secundario α -isotipo primario asociado a cromóforo fluorescente, se observa una expresión de α Sin más pronunciada en los cultivos infectados con partículas virales plv-CMV- A53T α Sin frente a la observada para el control de infección con partícula viral vacía. Barra de escala: 50 μ m.

Para evaluar el estado de polarización de las mitocondrias, se trató a las células con la tinción JC1 y a posteriori se realizó un análisis de co-localización de señales usando el coeficiente de correlación de *Manders* para las intensidades de las emisiones verde y roja de las imágenes obtenidas. Dicho análisis no mostró evidencia de cambios significativos en el potencial de membrana mitocondrial para ninguna de las neuronas transducidas (Fig. 3.8).

Los resultados entonces indican que el impacto de la sobreexpresión de WT y A53T α Sin sobre el flujo axonal no es causado por la despolarización de la mitocondria. Por ende, los efectos observados no parecen deberse a un efecto en el corto plazo sobre el estado redox mitocondrial.

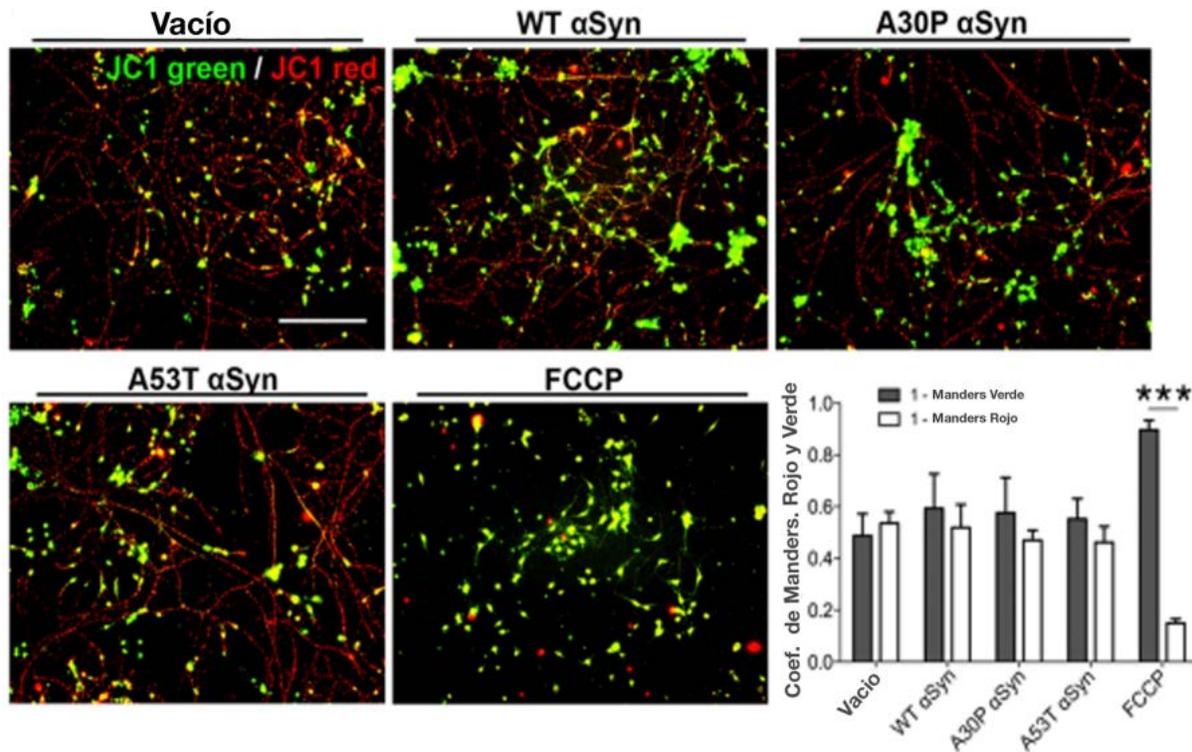


Figura 3.8: Imágenes de cultivos neurales DIV14 infectadas con partículas lentivirales, y tratadas con JC1 a día 7 post infección. Se observa que no hay cambio en el estado mitocondrial para los tratamientos respecto al control vacío. Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP), un agente desacoplante fue utilizado como control positivo de la técnica. Barra de escala: 200 μ m.

3.5 Fragmentación mitocondrial axonal en neuronas que sobreexpresan A53T α Sin.

Para probar si los cambios en el flujo mitocondrial observados en neuronas sobreexpresando α Sin promueven la fragmentación mitocondrial, como fue previamente descrito en modelos celulares y animales (Butler, E. K. *et al.* 2012; Kamp, F. *et al.* 2010; Xie, W. & Chung, K. 2012), se analizó la morfología de las mitocondrias axonales en las neuronas humanas co-transfectadas con mito-GFP y los vectores de α Sin (Fig. 3.9).

Las neuronas control y aquellas sobreexpresando α Sin WT y A30P mostraron una longitud mitocondrial axonal similar. Sin embargo, la transfección con la mutante A53T α Sin resultó en una disminución significativa en dicho parámetro y un aumento significativo en el número de mitocondrias presentes en el axón (Fig. 3.9A). Para confirmar este resultado, se realizaron análisis de inmunofluorescencia complementarios usando como marcador mitocondrial a la subunidad 1 de la citocromo-C oxidasa (COX-I) en las neuronas co-transfectadas con el vector A53T α Sin (Fig.3.9B).

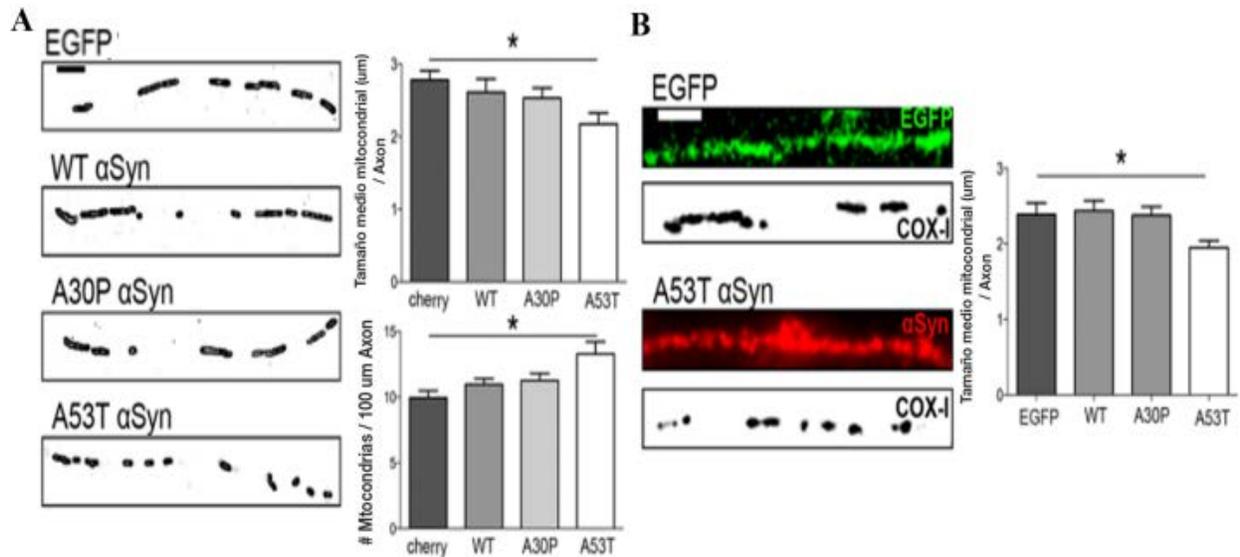


Figura 3.9: Análisis morfológico de mitocondrias axonales sobreexpresando α Sin (A) Tamaño medio mitocondrial y densidad mitocondrial axonal en neuronas co-transfectadas con WT, A30P, o A53T α Sin y mito-GFP en relación 2:1 ($n = 60$ mitocondrias por condición de 10 experimentos independientes). Barra de escala, 5 μ m. (B) Las reducciones en el tamaño mitocondrial por sobreexpresión de A53T α Sin fue confirmada por inmunofluorescencia, usando un Ab α -COX-I en neuronas transfectadas. Datos representados como media \pm SEM, ANOVA de un factor seguido de Dunnett's post-test, * $p < 0.05$ ($n = 40$ mitocondrias de 4 experimentos independientes) Barra de escala: 5 μ m.

Nuevamente, se observó que la sobreexpresión de A53T α Sin llevó a una disminución significativa del tamaño mitocondrial frente al control vacío. El tamaño mitocondrial total se vio disminuido en el caso de la sobreexpresión del vector WT α Sin además del mutante A53T (Fig. 3.10A). Para probar si los niveles de expresión de α Sin correlacionaban con el fenotipo de fragmentación, las neuronas co-transfectadas fueron analizadas para tamaño mitocondrial e intensidad de señal de α Sin (Fig.3.10B).

Aquellas neuronas con una menor expresión de α Sin (α Sin bajo) mostraron una fragmentación significativa respecto al control vacío solo en el caso de α SinA53T, mientras que las neuronas α Sin-alto evidenciaron un aumento en la fragmentación mitocondrial para las construcciones α Sin A53T y WT, pero no demostraron diferencia alguna para A30P al compararlas con el control.

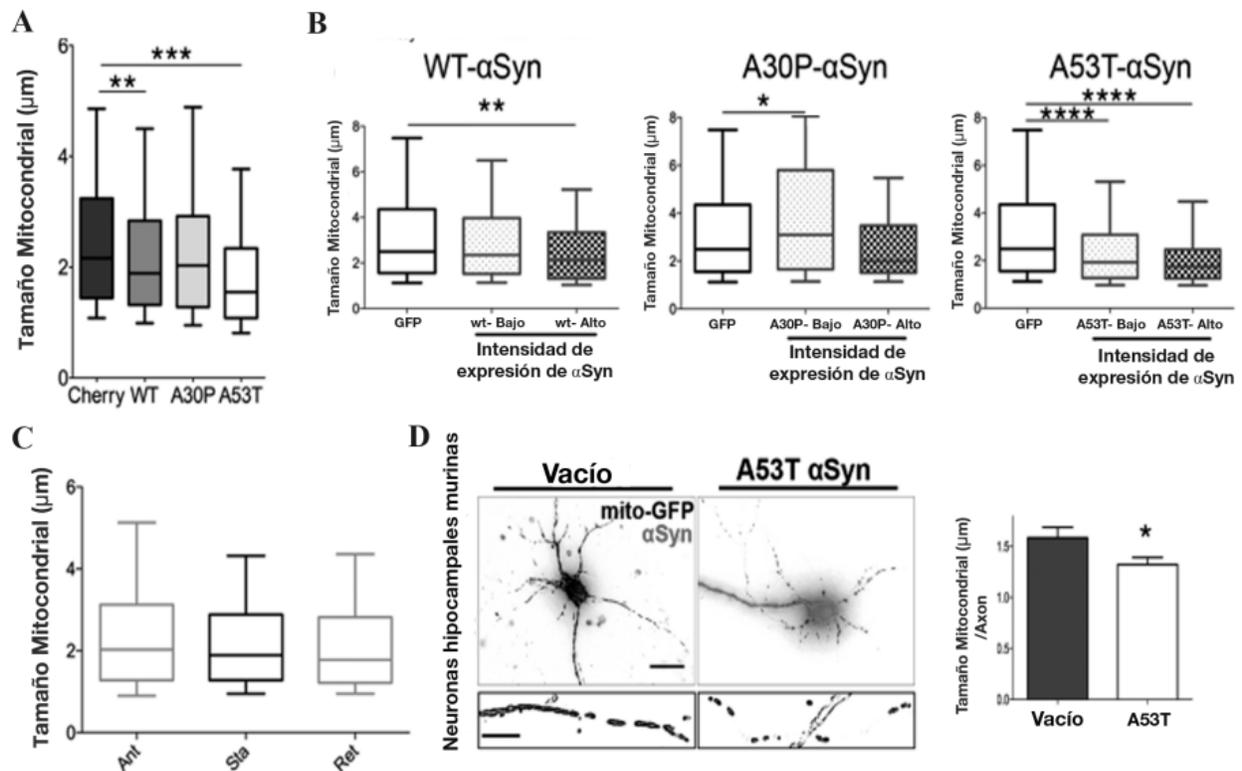


Figura 3.10: Análisis morfológico de mitocondrias en contexto de sobreexpresión de αSin . (A) A53T y en un menor grado WT αSin reducen el tamaño mitocondrial. Datos presentados como mediana más un rango intercuartil. (B) Medianas y percentiles correspondientes al tamaño mitocondrial categorizando las organelas según baja o alta intensidad de fluorescencia αSin (sobre el máximo de intensidad de fluorescencia αSin en células ctrl transfectadas con mito EGFP + plásmido vacío) en cada tratamiento. Se realizó un análisis de ANOVA Kruskal-Wallis para las variables de intensidad en cada tratamiento comparado con el control ($p < 0.05$) ($n = 20$ neuronas). (C) Tamaño medio mitocondrial para cada condición tomado en *pool* analizando el conjunto de mitocondrias en cada sentido: anterógrado, retrogrado y estacionario. Datos representados como mediana, y cajas del 75 del percentil, con barras del 10 y 90 del percentil. No se hallaron diferencias significativas. ANOVA Kruskal-Wallis ($p > 0.05$). ($n = 2000$ mitocondrias de 10 experimentos independientes). (D) Los efectos de A53T αSin sobre el tamaño mitocondrial son observables en otros modelos, como el de neuronas hipocampales murinas co-transfectadas con mito-GFP + vector vacío o αSin A53T. magnificación de un axón. Barra de escala: $30 \mu\text{m}$, Barra de escala de magnificación: $10 \mu\text{m}$. Cuantificación del tamaño medio mitocondrial en axones murinos sobreexpresando A53T αSin comparados con el control vacío ($n = 30$ axones de 3 experimentos independientes).

Estos resultados demuestran que diferentes variantes de αSin inducen un aumento en la fragmentación mitocondrial de manera dosis dependiente. Se consideró entonces válido el cuestionar si el tamaño mitocondrial correlaciona con el movimiento de la organela, teniendo en cuenta los cambios observados en el flujo mitocondrial y la posibilidad de que mitocondrias más pequeñas puedan ser más propensas al movimiento. Sin embargo, no se observó una asociación entre el tamaño mitocondrial y el perfil de movimiento de dicha organela (Fig. 3.10C).

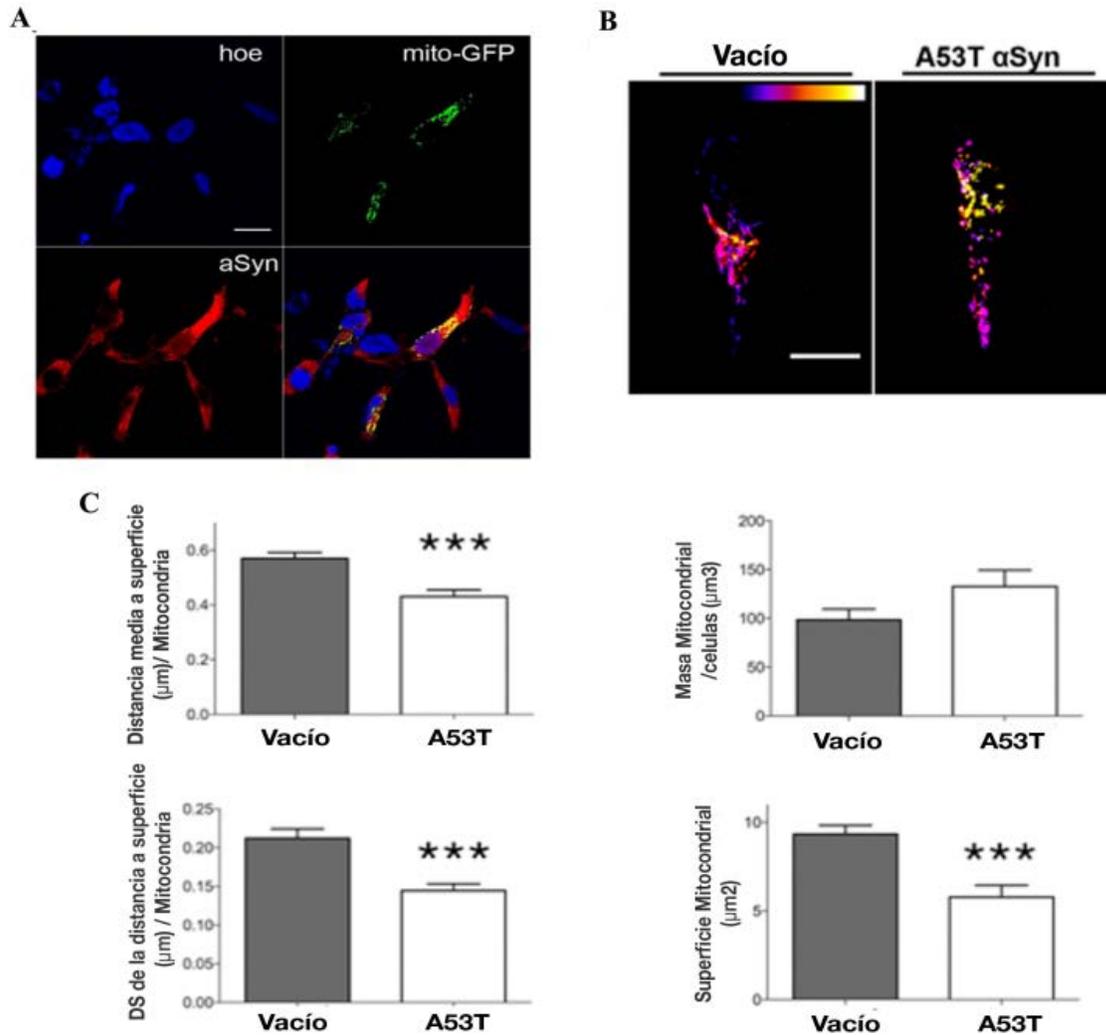


Figura 3.11: (A) Microfotografías de inmunofluorescencia de CMNH derivadas a partir de CMPih Craig venter sobreexpresando A53T α Sin. Las condiciones de sobreexpresión son las mismas utilizadas en neuronas diferenciadas (co-transfección EGFP/ α Sin en relación 2:1). Barra de escala: 10 μm (B) Análisis morfológico tridimensional de las mitocondrias en CMNHs co-transfectadas con EGFP y vector vacío o A53T α Sin. Barra de código de color muestra la localización mitocondrial en el eje espacial Z.(C) Los gráficos de Barra muestran una reducción en la superficie mitocondrial, la media de tamaño mitocondrial y la desviación standard en la distancia a superficie sin cambios en la masa total mitocondrial en condiciones de sobreexpresión de A53T α Sin (n = 15 células de 2 experimentos independientes). Barra de escala: 20 μm . Los datos son representados como la media \pm SEM. Test pareado de *Student*, ***p < 0.001, *p < 0.05.

Para determinar si el efecto de α SinA53T sobre el tamaño mitocondrial era específico para células neurales humanas diferenciadas, dicha variante fue sobreexpresada en cultivos primarios de ratón y en células madre neurales humanas (CMNH). De manera consistente con los resultados previos, la co-transfección de mito-GFP y α SinA53T en células hipocampales de ratón, resulto en una reducción significativa en el largo axonal al comparar con el control (Fig. 3.10D). Asimismo,

una disminución significativa en el tamaño mitocondrial fue evidente en el caso de las neuronas derivadas para el caso de la sobreexpresión de α SinA53T (Fig. 3.10A).

El análisis de la reconstrucción estructural tridimensional de la mitocondria en CMNH transfectadas, demostró que α Sin A53T no solo lleva a una disminución en tamaño (superficie y distancia media a superficie), sino que también resulta en alteraciones en la morfología. Favoreciendo una forma más esférica (Desvío standard de la distancia, Fig. 3.11C). Cabe agregar que la masa total mitocondrial no se vio alterada, indicando un aumento compensatorio en el número mitocondria presentes en la célula (Fig.3.9A). Tomando en cuenta ambos resultados, resulta evidente que α SinA53T incide sobre la homeostasis mitocondrial, induciendo cambios morfológicos y favoreciendo su fragmentación tanto en células neuronales como en precursores de las mismas.

3.6 La expresión direccionada de α Sin WT y A53T, pero no de A30P, reduce el tamaño mitocondrial.

La localización de mutaciones de α Sin en el dominio N-terminal de la proteína en combinación con la conocida interacción biofísica de dicho dominio con membranas lipídicas, llevó a la pregunta de si α Sin A53T presenta una mayor afinidad por la asociación a membrana que las otras variables (Perlmutter, J. D, *et al.* 2009, Jensen, P. H., *et al.* 1998). Para determinar si las variantes de α Sin se asocian de manera diferencial a la mitocondria, se tomaron fracciones subcelulares (total citosólica y mitocondrial) de la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y transfectada con vectores que codifican para α Sin WT, A30P, o A53T (Fig.3.12A). La cuantificación de la distribución subcelular de α Sin, fue calculada como la tasa normalizada de la intensidad de señal mitocondrial/citosólica. Dicha tasa demostró que α SinWT presenta una asociación baja a la mitocondria, disminuyendo para el caso de α SinA30P y aumentando en el caso de A53T al contrastar con el control. Este resultado indica que existen características estructurales diferenciales entre las variables de α Sin que determinan su tendencia a la asociación de la proteína con la mitocondria y consecuentemente el nivel de defecto mitocondrial evocado.

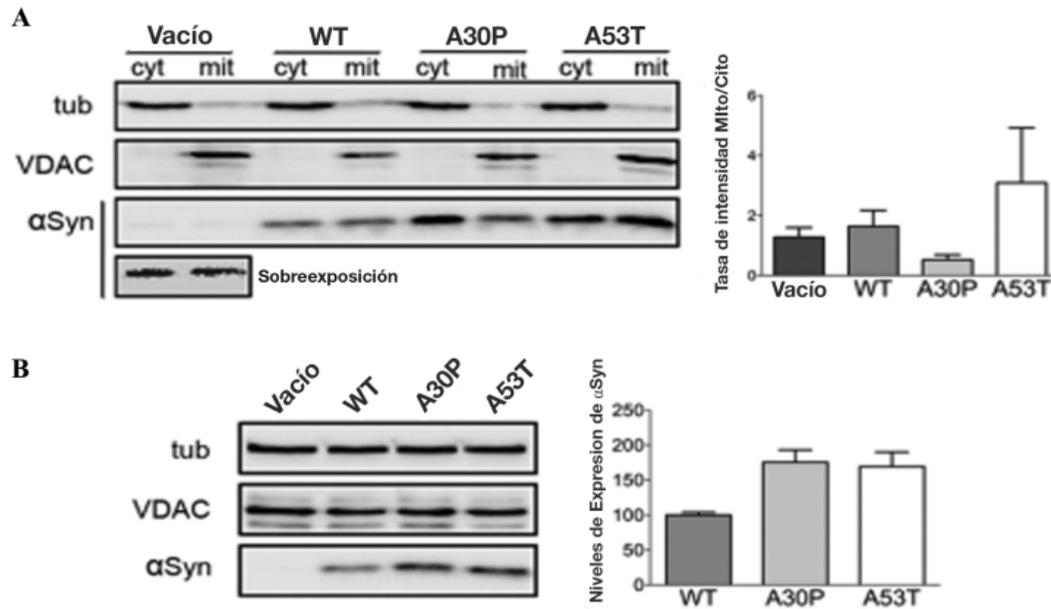


Figura 3.12: Asociación diferencial de α Sin a la mitocondria. (A) Fracciones citosólicas y mitocondriales aisladas por centrifugación diferencial de extractos de células SHSY5Y transfectadas con vector vacío, WT, A30P, o A53T α Sin. El enriquecimiento de α Sin se cuantificó como la tasa de expresión mitocondrial/citosólica para el control (vacío), WT, A30P, o A53T α Sin normalizados al nivel basal de expresión de α Sin en la línea (magnificación: sobreexposición en control). (B) Tubulina y VDAC1 fueron utilizados como controles para las fracciones citosólicas y mitocondriales respectivamente.

Para probar si el efecto estructural sobre el tamaño mitocondrial requiere de la asociación directa de la proteína con las membranas mitocondriales, se decidió forzar la interacción de α Sin con la mitocondria, mediante el subclonado de cada una de las variantes de α Sin en un sistema de entrega dependiente de la dimerización del sistema FKBP-FRB en presencia del análogo de la rapamicina Rapalog (Van Spronsen, M. *et al.* 2013).

Brevemente, las secuencias de α Sin WT, A30P, y A53T fueron subclonadas en nuevos plásmidos en marco con dominios FRB (α Sin WT, A30P, o A53T-FRB) que dimeriza con dominios FKBP solo en presencia de un agente heterodimerizador (rapalog). La proteína inductora del ensamblaje de actina (ActA) fue fusionada con los dominios FKBP con el objetivo de dar una señal de localización en la membrana externa mitocondria (MEM), asimismo el plásmido FKBP presenta una secuencia del reportero GFP. En presencia de rapalog, los complejos heterodiméricos GFP/FKBP-FRB son así direccionados a la membrana externa de la mitocondria (MEM) (Fig. 13A). Mediante este esquema de trabajo, se estudió la distribución de las construcciones α Sin-FRB en presencia o ausencia de rapalog (Fig. 3.13B).

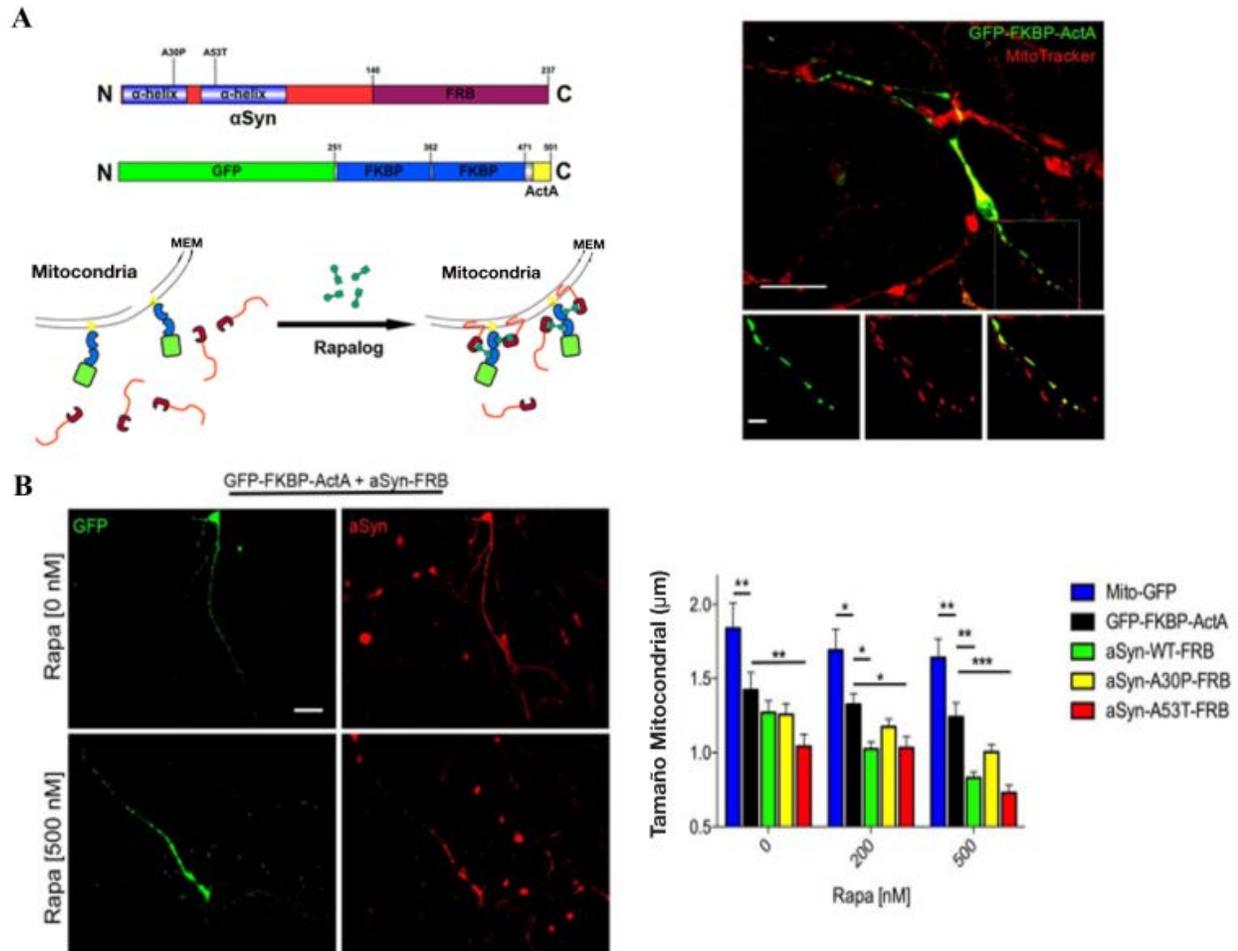


Figura 3.13: (A) Izquierda: Esquema de estrategia utilizada. Derecha: GFP-FKBP-ActA es expresada en mitocondria de manera correcta, Neuronas transfectadas con GFP-FKBP-ActA fueron incubadas con la sonda mitocondrial mitotracker (Rojo). Microfotografías demostrando co-localización de lo expresado por el vector y la mitocondria. Barra de escala panel superior: 50 μ m, inferior: 10 μ m. (B) Derecha: Neuronas co-transfectadas con α Sin-FRB y GFP-FKBP-ActA, en presencia de 0 o 500 nM rapalog. Barra de escala: 30 μ m. Izquierda: Tamaño mitocondrial medio en axón de cultivos neuronales transfectados con mito GFP como control o co-transfectadas con GFP-FKBP-ActA y vector vacío, WT, A30P o A53T α Sin-FRB. Incubación con rapalog (0, 200 o 500 nM) para cada condición. Los datos son representados como media \pm SEM (n=15). Análisis estadístico: ANOVA de 2 factores seguida de un Post test *Dunnet*, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Dos concentraciones de rapalog fueron probadas (200 y 500 nM) para poder tomar en cuenta y analizar posibles respuestas dosis dependientes. De manera consistente con los resultados previos, solo α SinA53T-FRB llevó a una reducción significativa en el tamaño mitocondrial en ausencia de rapalog, o sea, sin necesidad de ser reclutada a la MEM (Fig. 3.13B der; Fig. 3.14C).

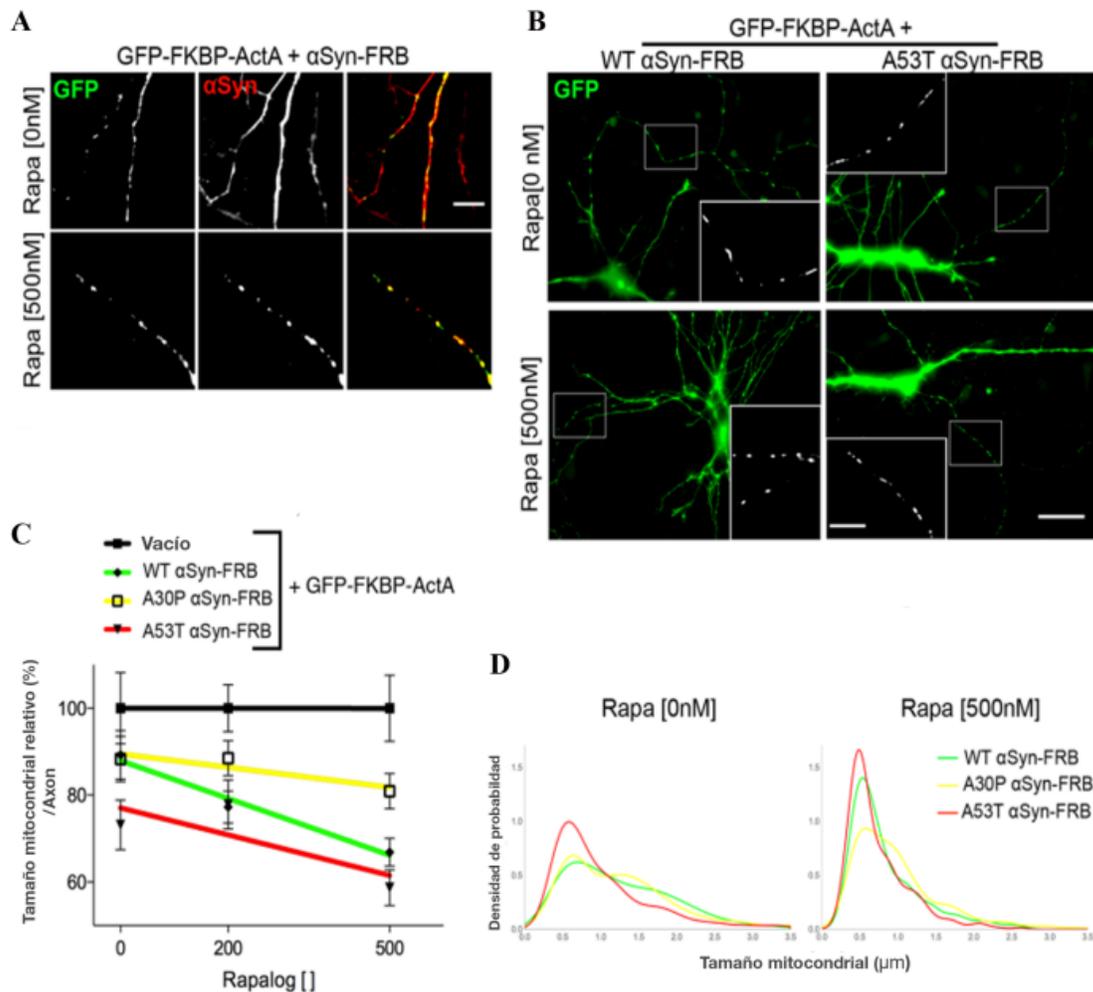


Figura 3.14: (A) Neuronas humanas co-transfectadas con GFP-FKBP-ActA y α Sin-FRB fueron inmunomarcadas mediante uso de Ab α - α Sin. Se observó la expresión citosólica de la proteína en condición de 0 nM y la localización mitocondrial en 500nM de Rapalog durante 6 h (Barra de escala: 10 μ m). (B) Neuronas co transfectadas con WT o A53T α Sin-FRB junto a GFP-FKBP-ActA en presencia de 0 o 500 nM Rapalog. Magnificación: segmento axonal. Barra de escala: 30 μ m; Magnificación: 10 μ m. (C) Cuantificación del tamaño mitocondrial medio por axón en 0, 200 o 500 nM de rapalog durante 6 h, normalizados a control transfectado con vector vacío como control. Regresión lineal, pendientes y desviación del cero fueron evaluadas (WT α Sin-FRB: -0.043 , $p < 0.001$; A30P α Sin-FRB: -0.015 , $p > 0.05$; A53T α Sin-FRB: -0.031 , $p < 0.05$). Los datos son representados como la media \pm SEM ($n = 15$ axones por condición de 3 experimentos independientes). (D) Distribución de la función de probabilidad de tamaño medio del total del *pool* mitocondrial medido en neuronas en condiciones WT, A30P, o A53T α Sin-FRB junto a GFP-FKBP-ActA con 0 o 500 nM Rapalog. ($n > 300$ mitocondria de 3 experimentos independientes).

La incubación con rapalog en neuronas α SinA53T-FRB resultó en una reducción más pronunciada en el largo de mitocondrias axonales. Fue muy interesante el observar que en presencia de 500 nM rapalog, la variable α SinWT-FRB llevó a una reducción en el tamaño mitocondrial notoria y significativa, similar a la observada para α SinA53T-FRB (Fig. 3.13B der; Fig. 3.14C, B). Contrastando con estos resultados, la construcción α SinA30P-FRB no tuvo un

efecto tan pronunciado sobre el tamaño mitocondrial en ausencia o presencia de rapalog, incluso en la dosis más alta del compuesto al comparar con las variantes WT y A53T de α Sin (Fig. 3.14C). De manera consistente a estos resultados, el análisis de la función de probabilidad de tamaño mitocondrial arrojó un comportamiento similar entre α SinWT-FRB y α SinA30P-FRB α Sin en ausencia de rapalog. En el caso de las células tratadas con una pre-incubación de rapalog (500nM) durante 6h, se observó que la similitud de distribución de probabilidades de tamaño mitocondrial se da entre α SinWT-FRB y α SinA53T-FRB (Fig.3.14D). Estos resultados, sugieren entonces un efecto que sería de naturaleza biofísica de α Sin sobre la fragmentación mitocondrial, y dicho efecto requiere una interacción directa con la MEM en las neuronas.

3.7 La integridad del dominio N-terminal de α Sin es necesaria para el control de la morfología mitocondrial neuronal.

Con el objetivo de probar si cambios en la estructura del dominio N-terminal de α Sin controla la interacción de dicha proteína con la membrana mitocondrial, y esto a su vez impacta sobre la morfología de las mitocondrias axonales, se disruptió la integridad de α Sin en neuronas derivadas a partir de CMPih.

Para ello se utilizó un enfoque de edición genómica dirigida mediante CRISP-R/Cas9 sobre la línea comercial de CMPih Craig Venter (CV). Se obtuvieron líneas isogénicas con interrupciones en la conformación de α Sin usando pequeños ARN guías (gARN) con blanco en el exón 2, posición 39 en la secuencia (Fig. 3.15). Para identificar clones positivos se utilizó una estrategia de PCR utilizando *primers* específicos para el exón 2 de α Sin fue utilizada para identificar clones positivos con inserciones genómicas (Fig. 3.15A).

Un putativo clon CMPih-CV CRISPR/Cas9-modificado(MS06) presentó dos alelos modificados, uno con una inserción nucleotídica que corrió el marco de lectura, generando un codón stop prematuro y el otro con una inserción de 18 aminoácidos en marco respecto al resto de la secuencia original, dando lugar a una variación de α Sin de mayor peso molecular (Fig.3.15B, 3.16 A, B).

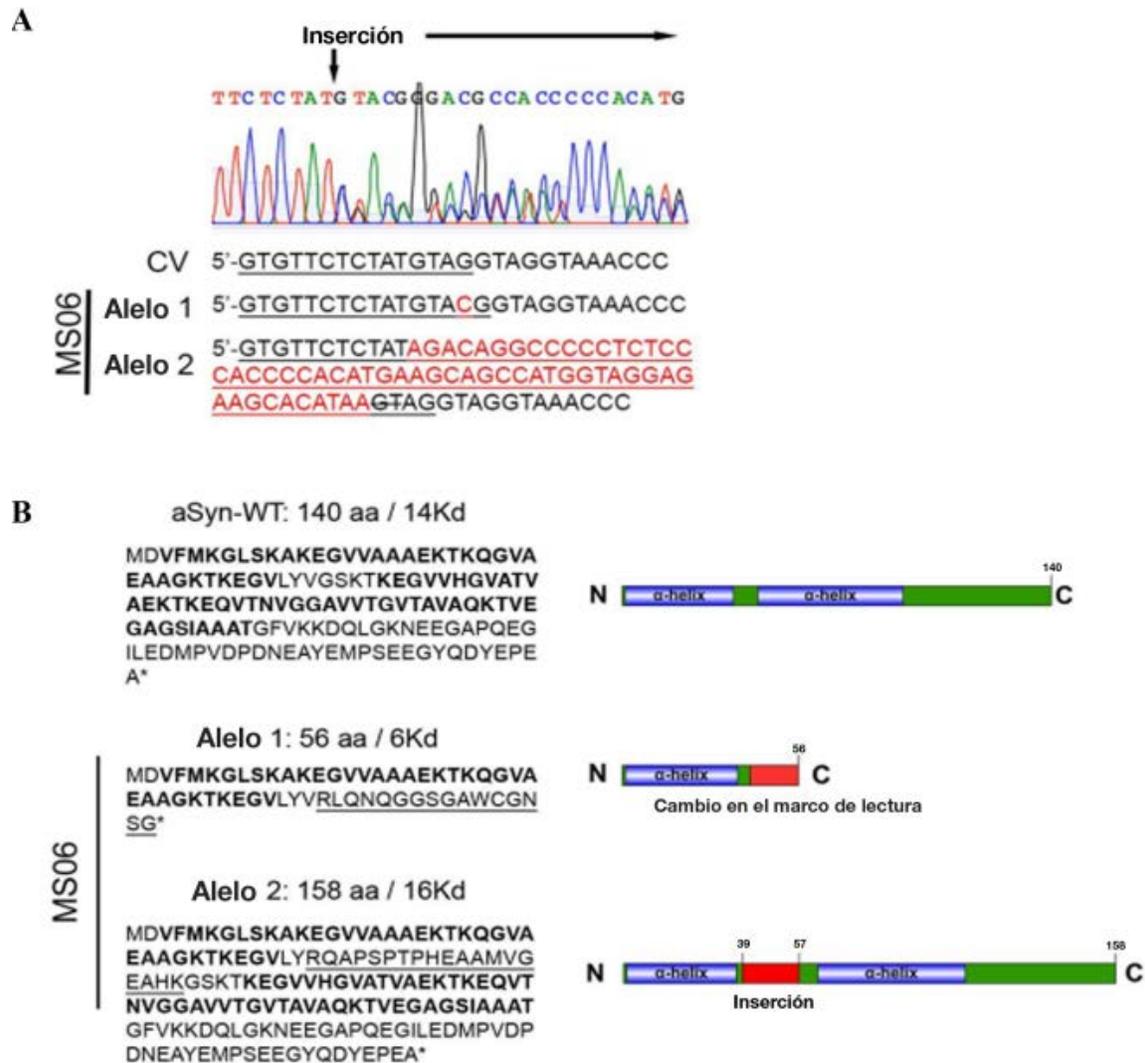


Figura 3.15: Disrupción de la secuencia de α Sin mediante CRISPR/Cas9 en células CV. (A) Secuenciación genómica de MS06, reveló inserciones en ambos alelos (secuencia marcada en rojo). La secuencia blanca sobre el Exon2 esta subrayada. En un alelo se observó una inserción puntual antes del último nucleótido de la secuencia blanco llevando a un cambio en marco de lectura y stop prematuro, mientras que el otro alelo presentó inserción de 56 nucleótidos, y delección de 2 (tachados). (B) Secuencia aminoacídica de WT α Sin y de alelos modificados del clon modificado mediante Crispr-Cas9 MS06. En negrita se remarcan los aminoácidos que corresponden a los 2 dominios α -hélice de α Sin. Se subraya el cambio en marco de lectura para el primer alelo y la inserción en el segundo (en rojo en el esquema gráfico).

Cabe agregar, que dicha inserción se dio entre las α -hélices de α Sin, alejando ambos dominios por extensión de péptido *linker*, viéndose así modificada la dimerización N-terminal de la proteína. La expresión de α Sin en células madre neurales y en neuronas diferenciadas derivadas de las CMPih CV clon MS06 revelaron un aumento de 2 kDa en el peso molecular de α Sin, al comparar con la proteína obtenida de controles isogénicos y de neuronas hipocampales murinas.

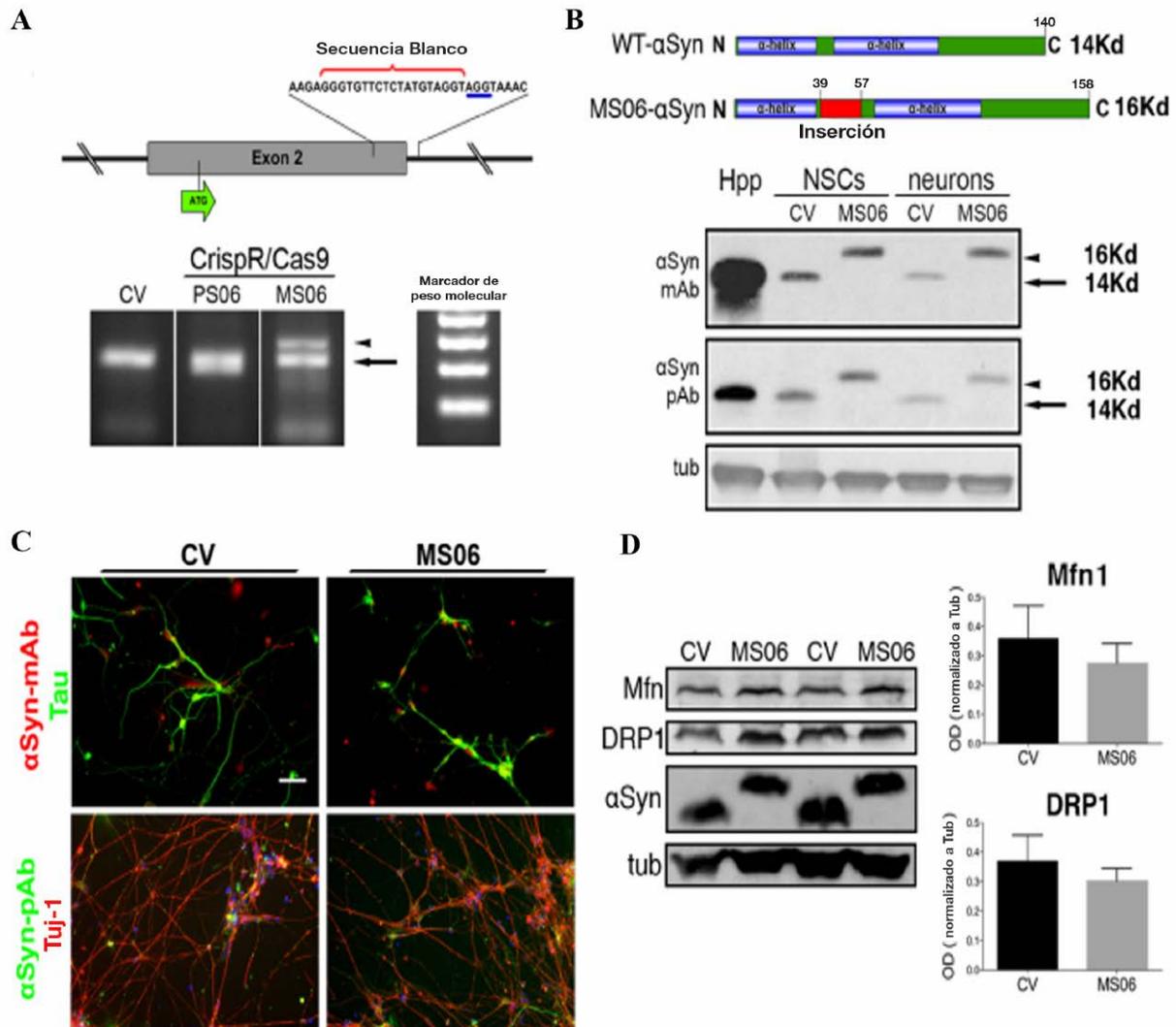


Figura 3.16: Disrupción del dominio α -hélice de α Sin, análisis de expresión de α Sin editada en neuronas derivadas de CMPih CV (A) Panel superior: secuencia del exón 2 de α Sin y blanco del ARN guía (Llave en rojo) seguida de la secuencia PAM (subrayada en azul) para el corte del ADN mediado por la endonucleasa de CRISPR/Cas9. Panel inferior: PCR genómico para la búsqueda y selección de clones CV CMPih. Dos clones, PS06 (Banda de menor tamaño) y MS06 (tamaño mayor, punta de flecha) se muestran junto a la amplificación de una línea CV WT (flecha completa). (B) *Western Blots* de homogenatos de neuronas hipocámpicas de ratón (Hpp) y células madre neurales de CV control y el clon MS06 utilizando dos Abs α - α Sin o demuestran una α Sin de mayor PM en MS06 debido a la inserción en marco en el Alelo2. Se utilizó un Ab anti α Sin monoclonal (antígeno aa 15–123) y uno policlonal (antígeno aa 111–131). (C) Expresión de α Sin en neuronas terminalmente diferenciadas derivadas de CMPih-CV (control) o MS06. Tinción inmunofluorescente utilizando anticuerpo monoclonal y policlonal anti α Sin en neuronas MS06 versus control CV. Barra de escala: 50 μ m. (D) *Western blot* de extractos proteicos totales de homogenatos obtenidos de neuronas CV o MS06. Se cuantificaron MFN1 y Drp1 y normalizados a tubulina como control de carga (n = 3 experimentos independientes).

Utilizando anticuerpos anti- α Sin monoclonales (antígeno aa 15–123) y policlonales (antígeno aa 111–131), se confirmó la estabilidad de la modificación de α Sin, que interrumpió la proximidad de los dos dominios hélice presente en el extremo N-terminal de la proteína

(Fig. 3.16B). La diferenciación neuronal, adquisición de polaridad y niveles de expresión de α Sin fueron evaluados en neuronas diferenciadas a partir del clon MS06 en contraste con neuronas derivadas a partir de CMPih-CV control (Fig. 3.16C). Para determinar si la modificación de α Sin impacta directamente sobre los niveles de proteínas asociadas a los procesos de fusión/fisión mitocondrial, como, por ejemplo: mitofusina 1 (MFN1) y proteína 1 relacionada a dinamina (DRP1), se realizaron análisis *Western blot* en neuronas MS06 y neuronas CV control. La cuantificación de niveles de proteína reveló niveles similares entre las líneas (Fig.3.16D), Sin embargo, este experimento no descarta que el fenotipo de fragmentación sea dirigido por la actividad de MFN1 o DRP1.

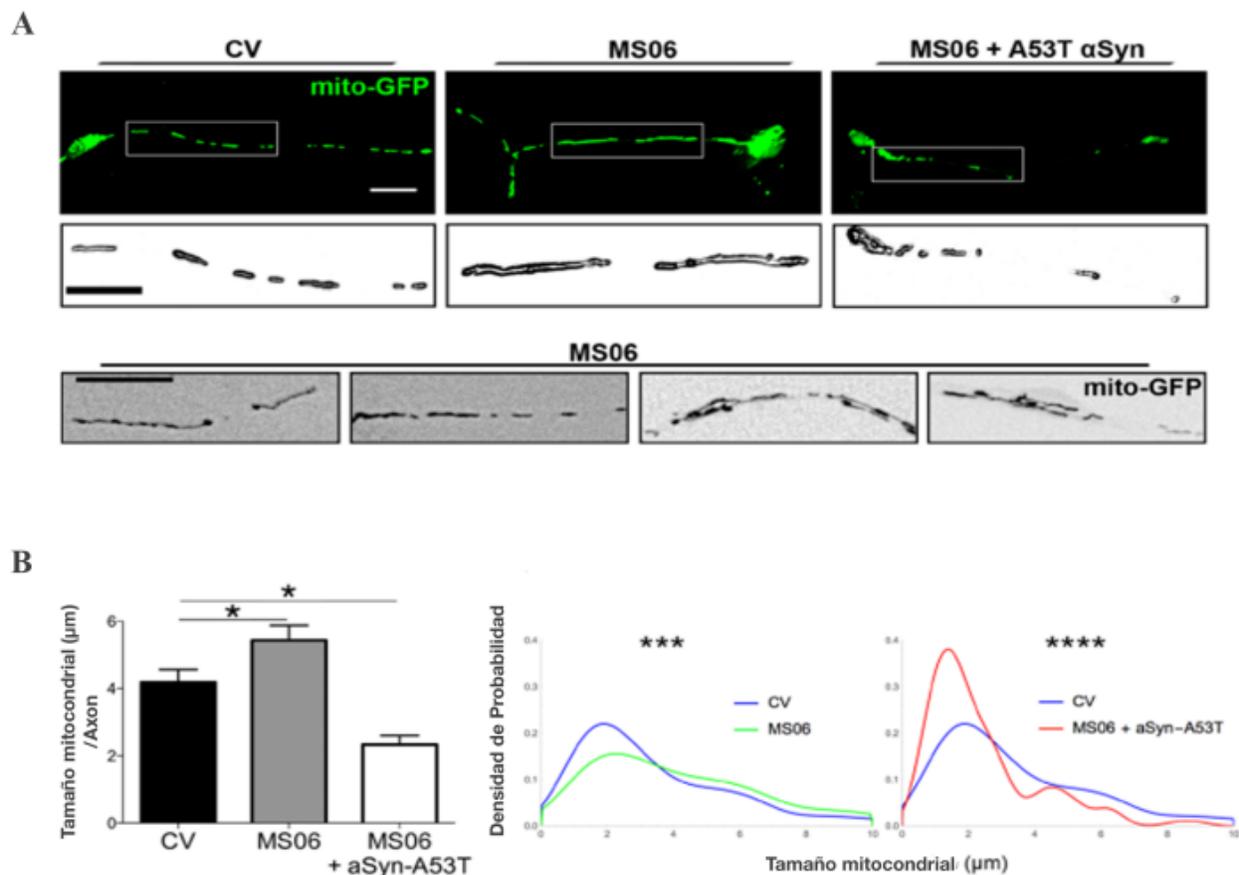


Figura 3.17: Análisis de la morfología mitocondrial en neuronas derivadas del clon MS06 y el control CMPih-CV. (A) Imágenes representativas de neuronas transfectadas con mito-GFP. Se analizaron neuronas derivadas del clon MS06, control CMPih-CV y MS06 transfectadas con A53T α Sin. Magnificación: mitocondrias axonales. Barra de escala:30 μm , magnificación: 20 μm . Panel inferior: imágenes obtenidas de neuronas MS06, donde se observan mitocondrias axonales anormales, elongadas, agregadas e interconectadas. Barra de escala:30 μm (G) Se observó un aumento significativo en el tamaño medio de las mitocondrias por axón en las neuronas MS06 frente al control CMPih-CV, dicho aumento fue revertido por la sobreexpresión de A53T α Sin en las neuronas MS06. Los datos están

representados como mean \pm SEM (n = 25 axones por condición de 2 experimentos independientes). Análisis estadístico: ANOVA de un factor seguido de un test de *Dunnet* *p < 0.05. La distribución de la densidad de probabilidad por tamaño se analizó tomando el pool de mitocondrias medidas para MS06, MS06 + A53T α Sin y CMPih-CV. Análisis estadístico: Test de *Kolmogórov-Smirnov* para cada comparación ***p < 0.001, ****p < 0.0001 (n > 280 mitocondria por condición de 2 experimentos independientes).

Luego de 14 días en cultivo en medio de diferenciación neuronal, las neuronas derivadas a partir del clon MS06 y de las CMPih-CV control fueron transfectadas con mito-GFP, con el objetivo de analizar la morfología mitocondrial. Las neuronas MS06, presentaron morfologías mitocondriales axonales elongadas (Fig.3.17A). Las mitocondrias axonales presentaron un aumento significativo del 35% en la longitud media mitocondrial con una distribución anormal en neuronas MS06 al comparar con neuronas control (Fig. 3.17B).

Adicionalmente, en neuronas MS06, pudieron observarse morfologías mitocondriales anormales, principalmente en forma de ramificaciones e interconexiones entre dichas organelas (Fig.3.17A, panel inferior). Para probar si estos cambios morfológicos dependen de un rol fisiológico de α Sin sobre la homeostasis mitocondrial, se sobreexpresó α SinA53T en neuronas MS06. Cabe destacar que dicha sobreexpresión llevó a una reducción significativa en el largo mitocondrial en neuronas MS06 que resultaron incluso más pequeñas que las del control CMPih-CV (Fig. 3.17 B). Vale recordar que un resultado previamente presentado, demostró que los cambios en tamaño en las neuronas MS06 mediados por eventos de fusión/fisión es promovida sin cambios en la expresión de proteínas de control de integridad mitocondrial MFN1 y DRP1 (Fig. 3.16D). Sin embargo, no puede ni debe descartarse un rol dependiente de la modulación de la actividad de las mitofusinas 1 y 2 o de DRP1 supeditada a los niveles de α Sin asociada a membrana en un momento dado.

Los resultados, tomados como un conjunto soportan la idea de un rol fisiológico de α Sin en el control de la morfología mitocondrial, que podría estar asociado a una interacción directa del dominio N-terminal de α Sin con la membrana de la mitocondria.

4. Discusión.

4. Discusión.

4.1. El protocolo de diferenciación utilizado es capaz de generar neuronas terminalmente diferenciadas para ser utilizadas como modelo experimental.

A fin de lograr un mayor entendimiento de la patología de la EP y avanzar en el desarrollo de terapias para el tratamiento de la misma, es importante entender las consecuencias de las diferentes mutaciones asociadas a la enfermedad. Los análisis post mortem son informativos de las etapas finales de la patología, pero entender los cambios moleculares tempranos asociados con la iniciación de la EP es fundamental para el diseño de terapias efectivas. El uso de células pluripotentes humanas de origen embrionario o somático en el caso de las células humanas pluripotentes inducidas representa una excelente herramienta para la investigación de enfermedades neurodegenerativas. Un estudio llevado a cabo por Cooper *et al.* (2012), demostró como células pluripotentes inducidas generadas a partir de células somáticas de pacientes con EP, pueden ser usadas para obtener neuronas con el objetivo de probar una gama de posibles compuestos terapéuticos. Sus datos mostraron que algunos compuestos lograban respuestas positivas sobre las neuronas diferenciadas que exhibían rasgos de la enfermedad, pero dichas respuestas dependían en gran medida del genotipo particular del paciente. Esto provee un ejemplo de cómo las neuronas derivadas a partir de la reprogramación de células somáticas de pacientes pueden ser una herramienta muy útil en la selección de tratamientos personalizados y en el reclutamiento de pacientes para ensayos clínicos, excluyendo a genotipos no respondedores reduciendo así el tamaño de corte requerido, y el costo final de los mismos.

En el presente trabajo, se logró diferenciar exitosamente cultivos de células pluripotentes embrionarias e inducidas a neuronas y a células madre neurales. Dichas células fueron empleadas como plataforma para modelar la sobreexpresión de α Sin y las mutaciones puntuales asociadas al Parkinson familiar A53T y A30P.

Las ventajas del modelo ya han sido establecidas a lo largo del presente trabajo, sin embargo, aún quedan varios aspectos por resolver ¿Cuáles son las desventajas que presenta esta herramienta de cultivo? En primera instancia es el tiempo de diferenciación que plantea el protocolo utilizado desde el estado pluripotente hasta el punto final, asimismo, gran parte de dicho proceso se realiza en ausencia de antibióticos, lo cual significa que, incluso logrando una producción de tipo línea continua, pueden haber eventos de contaminación que impacten muy

negativamente sobre los cronogramas de trabajo. Una opción para disminuir estos tiempos de cultivo es la derivación de células madre neurales que retienen un potencial replicativo activo y ya están comprometidas a linaje, lo que permite la expansión y diferenciación a punto final en menos tiempo.

Otro inconveniente con el que nos encontramos fue que tanto las células pluripotentes indiferenciadas, las células madre neurales y las neuronas son muy refractarias a las herramientas moleculares de transfección y transducción, lo cual dificulta el ingreso y expresión de ADN foráneo a dichas células. Las bajas eficiencias obtenidas permitieron el análisis por imágenes, pero para hacer estudios de tipo bioquímico, tuvimos que utilizar otras células más permeables a la transfección como la línea de neuroblastoma humano SHSY5Y. Frente a esta dificultad, hicimos pruebas con diversos productos de tipo lípido catiónicos, infecciones con partículas lentivirales junto con adyuvantes de infección como el versene y aplicación de fuerza centrífuga (*Spinfection*) y nucleofecciones (transfecciones mediadas por electroporación). Los diferentes productos de transfección mediada por lípidos catiónicos mantuvieron una eficiencia de transfección baja y similar entre sí.

Las transducciones mediadas por lentivirus lograron un aumento en la cantidad de células expresando reporteros y sobreexpresando los genes de interés, sin embargo, el análisis bioquímico de los niveles de α Sin en células tratadas no difirió significativamente de los controles con vector vacío. En el caso de la nucleofección tuvimos resultados mixtos, que dependieron fundamentalmente de la plataforma tecnológica utilizada. En el LIAN se utilizó el NEON de *life technologies* para intentar nucleofectar células madre embrionarias indiferenciadas WA09 y células madre neurales derivadas a partir de WA09 previo a su diferenciación a punto final. Las células neurales diferenciadas no pueden ser cultivadas en suspensión así que es un estadio en el que no se puede pasar las células por cuba de electroporación. Lamentablemente, un buffer electroactivo del kit para electroporación conteniendo polialcoholes y fundamental en el proceso de nucleofección, resultó sumamente tóxico para las células utilizadas. Debido al hecho que el pulso eléctrico *per se* genera estrés y consecuente muerte celular, las células tratadas en el NEON no lograron una recuperación luego del tratamiento. Incluso al tratar de minimizar el tiempo de exposición de las células al buffer en cuestión. Sin embargo, el Dr. Pozo Devoto, si logró nucleofectar las células pluripotentes reprogramadas comerciales Craig Venter en la Universidad

de San Diego con las construcciones de CRISPR/Cas9 utilizadas. En ese caso se utilizó otro electroporador y otro Kit de buffers, el Amaxa *nucleofector system* de Lonza.

A pesar de estas dificultades, pudimos obtener resultados consistentes con previos reportes e implementar un enfoque novedoso en el estudio del impacto de la sobreexpresión de α Sin sobre la homeostasis mitocondrial en cultivos neurales humanos. Así que, si bien el modelo es técnicamente dificultoso, es muy útil para el modelaje de enfermedades neurodegenerativas *in vitro* y su desarrollo tiene un gran potencial en cuanto a los alcances del mismo.

4.2 La sobreexpresión de las diferentes variantes de α Sin tiene un efecto diferencial sobre la morfología mitocondrial.

La fragmentación mitocondrial ha sido descrita en diferentes modelos de EP utilizando diversas variantes de α Sin, aunque el efecto de las mutaciones en cuestión no ha sido consistente entre los trabajos publicados (Kamp, F. *et al*, 2010; Nakamura, K. *et al*, 2011; O'Donnell, K. C. *et al*, 2014– Chinta, S. J., *et al*, 2010). Esto podría atribuirse a una falta de modelos celulares apropiados para estudiar tanto los efectos de las mutaciones de α Sin como los de abundancia citoplasmática y localización sobre la homeostasis mitocondrial y los procesos de dinámica mitocondrial, sostenidos sobre el equilibrio entre la fragmentación y fusión de dicha organela. Dado el enriquecimiento en α Sin presente en el tejido neural, se han propuesto diversos roles para dicha proteína en el mantenimiento de la homeostasis celular, incluyendo el control de la liberación de vesículas sinápticas (Snead, D. & Eliezer, 2014), modulación de vías de señalización secretorias (Wang, T. & Hay, J. C., 2015) y regulación del transporte vesicular (Jensen, P. H., *et al*. 1998). Sin embargo, el rol fisiológico de α Sin endógena sobre la homeostasis y control de calidad de la mitocondria neural todavía no ha sido totalmente dilucidado. Ratones KO para α Sin, demuestran una mayor resistencia a neurotoxinas mitocondriales utilizadas para el modelaje de EP *in vivo* (Dauer, W. *et al*. 2002). También, se ha demostrado que el *knockdown* de α Sin, suprime fenotipos de fisión mitocondrial inducidos por estrés, lo cual también sugiere un rol de α Sin en la regulación fisiológica de dinámicas mitocondriales (Norris, K. L. *et al*. 2015).

En el presente trabajo se utilizaron exitosamente neuronas derivadas a partir de células pluripotentes humanas para caracterizar los efectos de la sobreexpresión de α Sin wt y dos versiones de la misma portando mutaciones asociadas con la EP familiar, A53T y A30P, sobre las mitocondrias axonales. La sobreexpresión de la mutación A53T llevó a reducciones significativas

en el tamaño de las mitocondrias axonales. Un efecto más moderado se observó en un contexto de sobreexpresión de la versión WT de α Sin, sin embargo, no se observó dicho efecto en el tamaño y la fragmentación mitocondrial para la sobreexpresión de la variante A30P.

El efecto significativamente mayor, observado para la mutación A53T, al comparar con α Sin WT sobre el aumento de la fragmentación mitocondrial sugiere un mecanismo del tipo ganancia de función, mientras que la falta de efecto observado para la variante A30P, incluso en contextos celulares de sobreexpresión de la misma, sugiere una pérdida de función.

4.3 La sobreexpresión de α Sin induce defectos en el transporte mitocondrial.

La asociación de la dinámica mitocondrial con motores moleculares (Utton, M. A., *et al.* 2005; Prots, I. *et al.* 2013) y la acumulación de cuerpos de agregación de α Sin sugiere que dicha proteína cumple un rol central en la inducción de defectos en el transporte axonal (Roy, B. & Jackson, 2014; Saha, A. R. *et al.* 2004). De manera consistente con esta idea, se logró demostrar que la sobreexpresión de α Sin WT o la mutante A53T de dicha proteína en las neuronas utilizadas resultaron en un aumento significativo en defectos en el flujo mitocondrial anterógrado/retrógrado, lo cual está directamente asociado a la distribución anormal de mitocondrias en los axones. La inducción de defectos en la dinámica y transporte mitocondrial observados por sobreexpresión de α Sin WT y α Sin A53T, también han sido reportados en líneas celulares y en neuronas murinas (Xie, W. & Chung, 2012).

Cambios en la movilidad mitocondrial axonal, impulsan cambios en las tasas de fusión/fisión que controlan la morfología mitocondrial (Misko, A., Jiang, *et al.* 2010) y se ha sugerido que este efecto es recíproco cuando los eventos de fusión/fisión son modificados (Fukumitsu, K. *et al.* 2016). Esta relación cruzada entre la dinámica y el flujo axonal mitocondrial está influenciada además por el potencial de membrana (PM) de dicha organela. El PM actúa como un sensor de integridad mitocondrial y favorece el transporte retrógrado sobre el anterógrado (Wang, X. *et al.* 2011). Los defectos en el transporte axonal observados al sobre-expresar α Sin son consistentes con el fenotipo de fragmentación que presentaron las neuronas tratadas. Sin embargo, el potencial de membrana mitocondrial de las neuronas sobre-expresando α Sin y variantes, permaneció sin cambios frente al control (vector vacío) en la ventana temporal en la que las células fueron tratadas y analizadas. Estos resultados coinciden con los observados por Nakamura, K. *et al.* (2011) en un modelo murino, donde la sobreexpresión de α Sin y variantes A30P, A53T, y E46K

produjeron cambios en la morfología mitocondrial, aumentando la tasa de fisión, y dichos cambios se dieron en ausencia de citotoxicidad o signos de disfunción mitocondrial. Se concluye entonces que un potencial de membrana normal es compatible con el aumento en la fragmentación de la organela. Esto abre la puerta a futuras investigaciones sobre los efectos de la sobreexpresión a largo plazo de α Sin en el transporte y función mitocondrial.

4.4 Localización de α Sin e interacción con membranas mitocondriales.

Para determinar si las diferencias observadas estaban relacionadas con una asociación directa de α Sin con las membranas de la mitocondria, se realizaron fraccionamientos subcelulares en células de línea de neuroblastoma humano SHSY5Y sobre-expresando las distintas versiones de α Sin. La localización de α Sin A53T en la fracción mitocondrial fue más pronunciada al comparar con α Sin WT, mientras que α Sin A30P demostró una localización mitocondrial menor. Estos resultados sugieren que α Sin podría ejercer una regulación funcional directa sobre la morfología mitocondrial que podría estar relacionada con el tipo de mutación presente. Las propiedades intrínsecas de α Sin permiten la interacción con membranas lipídicas, mediando una función fisiológica no sólo en la mitocondria sino también en el anclado e interacción de membranas sinápticas con la membrana plasmática en el espacio sináptico (Abeliovich, A. *et al*, 2000; Nemani, V. M. *et al*, 2010). Se ha propuesto que la asociación de α Sin con la membrana mitocondrial dependería de la secuencia aminoacídica de la estructura α hélice, localizada en el dominio N-terminal de α Sin (Robotta, M. *et al.*, 2014). Las mutaciones de α Sin asociadas a la aparición temprana de la EP estudiadas, están localizadas dentro de este dominio, e impactan directamente en la afinidad de unión de la proteína con membranas lipídicas en solución micelar. Siendo la mutación α Sin A53T responsable de un aumento en la afinidad de unión a membranas y A30P de la disminución de dicha afinidad en comparación con α Sin WT (Perlmutter, J. D. *et al*, 2009). Estas propiedades correlacionan con los resultados obtenidos en el presente trabajo en cuanto al impacto diferencial de la sobreexpresión de cada una de estas tres variantes de α Sin sobre el tamaño y morfología mitocondrial y con reportes previos que sugieren efectos mutación-dependientes sobre la fragmentación mitocondrial y la maquinaria de tránsito vesicular en modelo murino (Bender, A. *et al.* 2013).

En general, la curvatura espontánea de los lípidos que componen una membrana es un factor significativo en la determinación de sus propiedades fusogénicas (Chernomordik, L., *et*

*al.*1995). La curvatura de una bicapa puede ser alterada por la unión de proteínas, que pueden aumentar o disminuir el estrés de curvatura (McMahon, H. T., and Gallop, J. L., 2005). El estrés de curvatura es causado por una discrepancia entre la forma intrínseca de parte de los componentes lipídicos de la membrana y la forma de la membrana como un todo. De manera consistente con estos conceptos, se ha introducido la teoría de que la fusión de membranas disminuye o alivia dicho estrés de membrana, esto es especialmente importante considerando que los agregados de α Sin en cerebros de pacientes con enfermedades neurodegenerativas son observados principalmente sobre el RE, la mitocondria, y vesículas pre y post sinápticas (Kamp, F., y Beyer, K. 2006; Nuscher, B. *et al* 2004).

Tomando estos antecedentes y los resultados obtenidos, es lógico el pensar que α Sin, cumple una función fundamental en el mantenimiento y regulación del estrés de curvatura de las bicapas presentes en dichas organelas y vesículas. La sobreexpresión de la proteína en su forma WT o las mutaciones puntuales asociadas al Parkinson Familiar cambian la asociación de la proteína con dichas bicapas, y por ende la dinámica de regulación del estrés de curvatura en membrana y su impacto en las propiedades fusogénicas de vesículas sinápticas y mitocondrias.

Teniendo en cuenta que la curvatura de la membrana es dependiente de su composición proteo-lipídica, es esperable que la misma sea dinámica en el tiempo de acuerdo con el estado del microambiente celular. (Auluck, P. K., Caraveo, G. & Lindquist, 2010, Chan, E. Y. L. & McQuibban, 2012). La acumulación de productos de oxidación y daño proteico tanto por desgaste celular cronológico o por insulto químico, como en los casos de la 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y MPTP, van a tener un impacto en la asociación proteica con las membranas y por ende sobre la dinámica de fusión de éstas.

La morfología de la mitocondria también depende de la recuperación de proteínas presentes en membranas enriquecidas en elementos de la maquinaria de fusión/fisión que se hallan en membranas del retículo endoplasmático (RE) asociado a mitocondria (MAM) (Friedman, J. R. *et al.* 2011). Cuando se sobreexpresa α Sin, se modula la interacción mitocondria-MAM, lo que afecta la transferencia de calcio desde el RE hacia la mitocondria en líneas celulares (Calì, T., Ottolini, *et al.* 2012; Paillusson, S. *et al.* 2017). Mutaciones patogénicas de α Sin, que promueven su localización en las MAM reducen la interacción mitocondria-RE e inducen la fragmentación mitocondrial (Guardia-Laguarta, C. *et al.* 2014).

La presencia de α Sin en terminales y vesículas sinápticas también puede ser explicada por su asociación con la MAM, ya que las vesículas sinápticas son balsas de lípidos (*rafts*) (Lv *et al.*, 2008) y las conexiones entre el RE y la mitocondria junto a marcadores específicos de la MAM (McNulty 1980, Mavlyutov *et al.*, 2012) han sido encontrados en yuxtaposición con membranas sinápticas. Este tráfico es altamente probable que se dé vía MAM, ya que la mayor cantidad de componentes de la maquinaria de transporte de calcio (por ej, receptores IP3 y receptor σ -1) entre estas organelas se localizan en la MAM (Hayashi *et al.*, 2009). La relación entre la α Sin y la MAM es perturbada en situaciones patogénicas, tanto A30P como A53T se asocian en menor medida a la MAM, pero por dos razones diferentes, en el caso de A30P, la menor localización se da porque la mutación disrumpe la interacción de α Sin con las balsas de lípidos (Fortin *et al.*, 2004). Sin embargo, la distribución celular de A53T entre el citosol y la MAM es similar al observado para la versión WT de α Sin, y la mutación *per se*, no presenta deficiencias en su asociación a membranas. El motivo más plausible para justificar la menor presencia de la mutación A53T en las MAM puede deberse a que la diferencia de carga introducida por la mutación en las repeticiones KTKEGV de las α -hélices de la proteína, podrían dar lugar a una mayor desestabilización de la forma soluble de α Sin y favorecer su agregación al comparar con la mutación WT (Guardia-Laguarta, C. *et al.* 2014)

4.5 Expresión de α Sin dirigida a mitocondria.

La asociación de α Sin con la membrana externa mitocondrial ha sido descrita en neuronas murinas (Li, W.-W. *et al.*, 2007). Dicha asociación parece estar incrementada en condiciones experimentales que inducen caídas del pH intracelular en líneas celulares sobre-expresando α Sin y variantes. (Cole, N. B *et al.*, 2008). Para determinar si la interacción específica de α Sin con la mitocondria es responsable de la fragmentación mitocondrial, se utilizó un sistema de dimerización dependiente de la presencia de un análogo de la rapamicina, rapalog, capaz de dirigir las diferentes variantes de α Sin a la membrana externa mitocondrial (MEM). Este sistema experimental fue diseñado de manera tal que el dominio N-terminal de la proteína quedara libre para permitir así su interacción con la MEM. De manera interesante la asociación de α Sin WT y α Sin A53T a la MEM resultó en un aumento del fenotipo de fragmentación mitocondrial y este efecto fue dependiente de la dosis de Rapalog utilizada. Dicho impacto sobre la fragmentación de la organela fue más pronunciado que el debido únicamente a la sobreexpresión ubicua de las variantes de α Sin en el

medio citoplasmático (sobreexpresión en ausencia de Rapalog). En contraste con estos resultados, la mutación A30P no alteró el tamaño mitocondrial, incluso en un medio con alta dosis de Rapalog. Estos resultados son consistentes con reportes previos, que demostraron la incapacidad de esta variante para inducir fragmentación mitocondrial e impactar sobre la homeostasis mitocondrial, pero sí la capacidad de disminuir la fusión de micelas *in vitro* (Kamp, F. *et al*, 2010; Auluck, P. K., Caraveo, G. & Lindquist, 2010).

Al sobre-expresar α Sin, la asociación de la proteína a la MEM por asociación directa o mediada por una interacción proteína/proteína podría llevar a una disminución en la tasa de fusión (Kamp, F. *et al*, 2010). Consecuentemente la fragmentación mitocondrial es favorecida, llevando en algunos casos a la mitofagia (Choubey, V. *et al*, 2011; Itoh, K., Nakamura, K., Iijima, M. & Sesaki, 2013). Tomando en cuenta los resultados obtenidos, estos sugieren que el efecto de α Sin sobre la fragmentación mitocondrial depende de una asociación directa de la proteína con la mitocondria.

4.6 El dominio N-terminal de α Sin es clave en la interacción con la membrana mitocondrial.

El dominio N-terminal de α Sin ha sido implicado en el control de la fragmentación mitocondrial (Nakamura, K. *et al*. 2011; Robotta, M. *et al*. 2014). Para comprobar que el dominio N-terminal de α Sin es responsable de su interacción con membranas, siendo clave en la regulación de la morfología mitocondrial, se realizó un experimento de edición genómica mediada por CRISPR/Cas9 sobre el exón 2 del gen de α Sin, SNCA en células pluripotentes inducidas humanas. Por recombinación no homologa de los extremos (NHEJ) se obtuvo un clon con sus dos alelos editados en heterocigosis (MS06), uno de ellos presentó un cambio en el marco de lectura dando lugar a un codón stop prematuro, y el otro una inserción entre los dominios α -hélice que aumentó la distancia del péptido *linker* entre dichos dominios. Esto repercutió en cambios en la morfología mitocondrial, favoreciendo la elongación y ramificación de estas organelas en las proyecciones axonales de las neuronas derivadas a partir de MS06. Dichos cambios no correlacionaron con modificaciones en los niveles de proteínas asociadas a eventos de fusión/fisión como la mitofusina 1 o la proteína relacionada con la dinamina 1 respectivamente, sin embargo se debería continuar investigando el efecto de la sobreexpresión α Sin sobre la actividad de las mitofusinas 1 y 2 y DRP1 y la GTPasa mitocondrial *dynamina like 1* (OPA1) para terminar de caracterizar la interacción

entre α Sin y dichos efectores de la biodinámica mitocondrial. Es importante el resaltar que el fenotipo de fragmentación fue rescatado por la transfección y sobreexpresión de α Sin y α Sin A53T en estas células editada. Apoyando la noción de que el rol fisiológico de α Sin en la regulación de la dinámica mitocondrial depende en gran medida del dominio N-terminal de interacción con membrana.

4.7 Perspectivas Futuras:

Tanto el Laboratorio de Investigaciones Aplicadas a la Neurociencia (LIAN-FLENI), así como el Laboratorio de Transporte Axonal y Enfermedades Neurodegenerativas (IBCN-UBA), continuaran sus líneas de estudio utilizando como plataforma de cultivo a las células pluripotenciales humanas y derivados neuroectodérmicos con el objetivo de profundizar el estudio de enfermedades neurodegenerativas. En el caso de las α -sinucleinopatías, los próximos pasos a seguir estarían centrados en la obtención de líneas proliferantes estables sobre-expresando α Sin, y la caracterización de los flujos de Ca^{2+} y el impacto de dicha sobre-expresión en la regulación de dicho catión en las células tratadas. Asimismo, se utilizará α Sin recombinante soluble para poder estudiar el efecto contagio y las dinámicas de agregación en un contexto de cultivo controlado. Cabe agregar que esta plataforma de cultivo donde pueden utilizarse neuronas derivadas a partir de células pluripotentes de líneas embrionarias, o de células de pacientes reprogramadas (por ejemplo: sangre periférica o fibroblastos dérmicos) también puede ser empleada para el modelado y estudio de otras proteinopatías tales como la enfermedad de Alzheimer donde se observan depósitos del péptido β -amiloide, cambiando el foco de α Sin por el péptido β -amiloide.

Los alcances de estas células como modelo de estudio de patologías del sistema nervioso central, y plataforma de prueba para fármacos, recién está comenzando a ser explorada y todavía ofrece muchas promesas hacia el futuro.

Conclusión.

Conclusión.

La disfunción mitocondrial es reconocida desde hace tiempo como un posible factor causante de la enfermedad de Parkinson (Schapira *et al*, 2008). Varios genes asociados con la EP convergen en la mitocondria como un factor etiológico crucial en la iniciación y el desarrollo temprano de la enfermedad. PINK1, Parkina, y DJ-1 interactúan dentro de vías de señalización similares que regulan la mitofagia, el transporte y la dinámica de la mitocondria (Krebiehl, G. *et al*. 2010; Ziviani, E., *et al*. 2010; Yang, Y. *et al*. 2008). LRRK y VPS35, son proteínas involucradas con la regulación de la morfología mitocondrial mediante la interacción con la proteína de fisión DRP1, que lleva a un aumento en la actividad de DRP1 y por consiguiente en la tasa de fisión de la organela (Tang, F.-L. *et al*. 2015; Su, Y.-C. & Qi, X. 2013).

Sin embargo, los mecanismos que subyacen al inicio y progreso de esta enfermedad neurodegenerativa todavía plantean múltiples incógnitas. Esto está dado en gran parte por la falta de modelos experimentales que permitan representar de manera exacta a un sistema tan complejo como lo es el sistema nervioso central humano.

Con esa premisa en mente, se decidió desarrollar una plataforma de cultivo capaz de generar neuronas humanas derivadas de células pluripotentes como una opción para el estudio “*in vitro*” de esta patología. Enfocando al análisis sobre el rol de la proteína α Sin, una proteína ubicua en el SNC, que forma agregados fibrilares a juzgar por los resultados obtenidos en autopsias de cerebros de pacientes de Parkinson y Demencia de Lewis; es capaz de servir como vector de contagio de tipo priónico entre células nerviosas y además ha demostrado disrumpir la función mitocondrial fisiológica en caso de sobreexpresión. En el presente trabajo, utilizando un modelo neuronal humano, hemos provisto evidencia novedosa que apoya las siguientes conclusiones:

- (i) Las variantes de secuencia WT, A30P y A53T de α Sin presentaron un efecto diferencial sobre el transporte y morfología mitocondrial en neuronas humanas. Estos efectos están asociados, por un lado, a las mutaciones presentes en las variantes estudiadas, y por otro a los niveles de expresión y localización de la proteína dentro del citoplasma respecto a la mitocondria.
- (ii) La fragmentación mitocondrial dependiente de α Sin requiere de una interacción directa entre la proteína y/o agregados de la misma con la membrana externa mitocondrial.

(iii) La disrupción del dominio N-terminal de α Sin induce cambios en la morfología mitocondrial, lo que soporta un rol fisiológico de la proteína mediado por dicho dominio en la regulación del tamaño mitocondrial.

(iv) Este mecanismo no está restringido solo a un modelo de neuronas derivadas de células pluripotentes humanas, ya que también fue observado en progenitores neurales , en cultivos primarios de neuronas hipocampales murinas y en la línea de neuroblastoma humano SHSY5Y.

A pesar de las dificultades operativas en la manipulación de las células pluripotentes con la caja de herramientas de biología molecular clásica, día a día se desarrollan nuevas estrategias y productos para mejorar el cultivo de alto rendimiento y lograr la potencialidad de implementación de estos tipos celulares tanto a nivel de ciencia básica como en clínica .

Los hallazgos presentados en este estudio proveen mayor evidencia para sugerir un rol fisiológico de α Sin en el control del transporte y morfología mitocondrial axonal en neuronas derivadas de células pluripotentes humanas. Los efectos de α Sin a su vez pueden modularse por mutación o dosis génica. El rol fisiológico y patológico de α Sin en la homeostasis mitocondrial axonal evidenciado, aporta al objetivo de un camino etiológico común subyacente a la patología de la EP, que en última instancia es fundamental para el entendimiento de las enfermedades neurodegenerativas y es una herramienta muy útil para el diseño de estrategias terapéuticas y/o preventivas para el tratamiento de las mismas.

Bibliografía:

- Abedini, A., & Raleigh, D. P. (2009). A critical assessment of the role of helical intermediates in amyloid formation by natively unfolded proteins and polypeptides. *Protein Engineering, Design & Selection*, 22(8), 453-459.
- Abedini, A., & Raleigh, D. P. (2009). A role for helical intermediates in amyloid formation by natively unfolded polypeptides? *Physical biology*, 6(1), 015005.
- Abeliovich, A., Schmitz, Y., Fariñas, I., Choi-Lundberg, D., Ho, W. H., Castillo, P. E., ... & Hynes, M. (2000). Mice lacking α -synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron*, 25(1), 239-252.
- Anunciado, D., Rai, D. K., Qian, S., Urban, V., & O'Neill, H. (2015). Small-angle neutron scattering reveals the assembly of alpha-synuclein in lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1854(12), 1881-1889.
- Auluck, P. K., Caraveo, G., & Lindquist, S. (2010). α -Synuclein: membrane interactions and toxicity in Parkinson's disease. *Annual review of cell and developmental biology*, 26, 211-233.
- Badger, J. L., Cordero-Llana, O., Hartfield, E. M., & Wade-Martins, R. (2014). Parkinson's disease in a dish—using stem cells as a molecular tool. *Neuropharmacology*, 76, 88-96.
- Barceló-Coblijn, G., Golovko, M. Y., Weinhofer, I., Berger, J., & Murphy, E. J. (2007). Brain neutral lipids mass is increased in α -synuclein gene-ablated mice. *Journal of neurochemistry*, 101(1), 132-141
- Bartels, T., Choi, J. G., & Selkoe, D. J. (2011). α -Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. *Nature*, 477(7362), 107.
- Basketter, D. A., Clewell, H., Kimber, I., Rossi, A., Blaauboer, B. J., Burrier, R., ... & Hasiwa, N. (2012). A roadmap for the development of alternative (non-animal) methods for systemic toxicity testing-t4 report. *ALTEX-Alternatives to Animal Experimentation*, 29(1), 3-91.
- Bayer, T. A., Jäkälä, P., Hartmann, T., Havas, L., McLean, C., Culvenor, J. G., ... & Beyreuther, K. (1999). α -Synuclein accumulates in Lewy bodies in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies but not in Alzheimer's disease β -amyloid plaque cores. *Neuroscience letters*, 266(3), 213-216.
- Beal, M. F. (2005). Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. *Annals of neurology*, 58(4), 495-505.
- Bender, A., Desplats, P., Spencer, B., Rockenstein, E., Adame, A., Elstner, M., ... & Pham, E. (2013). TOM40 mediates mitochondrial dysfunction induced by α -synuclein accumulation in Parkinson's disease. *PloS one*, 8(4), e62277.
- Bender, A., Krishnan, K. J., Morris, C. M., Taylor, G. A., Reeve, A. K., Perry, R. H., ... & Taylor, R. W. (2006). High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nature genetics*, 38(5), 515.
- Bennett, M. C. (2005). The role of α -synuclein in neurodegenerative diseases. *Pharmacology & therapeutics*, 105(3), 311-331.
- Bernadó, P., Bertocini, C. W., Griesinger, C., Zweckstetter, M., & Blackledge, M. (2005). Defining long-range order and local disorder in native α -synuclein using residual dipolar couplings. *Journal of the American Chemical Society*, 127(51), 17968-17969.
- Bertocini, C. W., Jung, Y. S., Fernandez, C. O., Hoyer, W., Griesinger, C., Jovin, T. M., & Zweckstetter, M. (2005). Release of long-range tertiary interactions potentiates aggregation of natively unstructured α -

- synuclein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(5), 1430-1435.
- Betarbet, R., Sherer, T. B., MacKenzie, G., Garcia-Osuna, M., Panov, A. V., & Greenamyre, J. T. (2000). Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nature neuroscience*, 3(12), 1301.
- Biedler, J. L., Helson, L., & Spengler, B. A. (1973). Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer research*, 33(11), 2643-2652.
- Biedler, J. L., Roffler-Tarlov, S., Schachner, M., & Freedman, L. S. (1978). Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer research*, 38(11 Part 1), 3751-3757.
- Borland, M. K., Trimmer, P. A., Rubinstein, J. D., Keeney, P. M., Mohanakumar, K. P., Liu, L., & Bennett, J. P. (2008). Chronic, low-dose rotenone reproduces Lewy neurites found in early stages of Parkinson's disease, reduces mitochondrial movement and slowly kills differentiated SH-SY5Y neural cells. *Molecular neurodegeneration*, 3(1), 21.
- Bratc, I., & Trifunovic, A. (2010). Mitochondrial energy metabolism and ageing. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1797(6-7), 961-967.
- Breydo, L., Wu, J. W., & Uversky, V. N. (2012). α -Synuclein misfolding and Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1822(2), 261-285.
- Buell, A. K., Galvagnion, C., Gaspar, R., Sparr, E., Vendruscolo, M., Knowles, T. P., ... & Dobson, C. M. (2014). Solution conditions determine the relative importance of nucleation and growth processes in α -synuclein aggregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(21), 7671-7676.
- Burns, R. S., Markey, S. P., Phillips, J. M., & Chiueh, C. C. (1984). The neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine in the monkey and man. *Canadian Journal of Neurological Sciences*, 11(S1), 166-168.
- Burré, J., Sharma, M., Tsetsenis, T., Buchman, V., Etherton, M. R., & Südhof, T. C. (2010). α -Synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science*, 329(5999), 1663-1667.
- Butler, E. K., Voigt, A., Lutz, A. K., Toegel, J. P., Gerhardt, E., Karsten, P., ... & Schulz, J. B. (2012). The mitochondrial chaperone protein TRAP1 mitigates α -Synuclein toxicity. *PLoS genetics*, 8(2), e1002488.
- Büttner, S., Habernig, L., Broeskamp, F., Ruli, D., Vögtle, F. N., Vlachos, M., ... & Ring, J. (2013). Endonuclease G mediates α -synuclein cytotoxicity during Parkinson's disease. *The EMBO journal*, 32(23), 3041-3054.
- Cabin, D. E., Shimazu, K., Murphy, D., Cole, N. B., Gottschalk, W., McIlwain, K. L., ... & Lu, B. (2002). Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking α -synuclein. *Journal of Neuroscience*, 22(20), 8797-8807.
- Cali, T., Ottolini, D., Negro, A., & Brini, M. (2012). α -Synuclein controls mitochondrial calcium homeostasis by enhancing endoplasmic reticulum-mitochondria interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 287(22), 17914-17929.
- Cao, S., Gelwix, C. C., Caldwell, K. A., & Caldwell, G. A. (2005). Torsin-mediated protection from cellular stress in the dopaminergic neurons of *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Neuroscience*, 25(15), 3801-3812.
- Castagnet, P. I., Golovko, M. Y., Barceló-Coblijn, G. C., Nussbaum, R. L., & Murphy, E. J. (2005). Fatty acid incorporation is decreased in astrocytes cultured from α -synuclein gene-ablated mice. *Journal of neurochemistry*, 94(3), 839-849.

- Cervera, R. P., & Stojkovic, M. (2007). Human embryonic stem cell derivation and nuclear transfer: impact on regenerative therapeutics and drug discovery. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 82(3), 310-315.
- Chan, E. Y., & McQuibban, G. A. (2012). Phosphatidylserine decarboxylase 1 (Psd1) promotes mitochondrial fusion by regulating the biophysical properties of the mitochondrial membrane and alternative topogenesis of mitochondrial genome maintenance protein 1 (Mgm1). *Journal of Biological Chemistry*, 287(48), 40131-40139.
- Chandra, S., Chen, X., Rizo, J., Jahn, R., & Südhof, T. C. (2003). A broken α -helix in folded α -synuclein. *Journal of Biological Chemistry*, 278(17), 15313-15318.
- Chartier-Harlin, M. C., Kachergus, J., Roumier, C., Mouroux, V., Douay, X., Lincoln, S., ... & Waucquier, N. (2004). α -synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *The Lancet*, 364(9440), 1167-1169.
- Chernomordik, L., Kozlov, M. M., & Zimmerberg, J. (1995). Lipids in biological membrane fusion. *The Journal of membrane biology*, 146(1), 1-14.
- Chinta, S. J., Mallajosyula, J. K., Rane, A., & Andersen, J. K. (2010). Mitochondrial alpha-synuclein accumulation impairs complex I function in dopaminergic neurons and results in increased mitophagy in vivo. *Neuroscience letters*, 486(3), 235-239.
- Choubey, V., Safiulina, D., Vaarmann, A., Cagalinec, M., Wareski, P., Kuum, M., ... & Kaasik, A. (2011). Mutant A53T α -synuclein induces neuronal death by increasing mitochondrial autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, 286(12), 10814-10824.
- Ciron, C., Lengacher, S., Dusonchet, J., Aebischer, P., & Schneider, B. L. (2012). Sustained expression of PGC-1 α in the rat nigrostriatal system selectively impairs dopaminergic function. *Human molecular genetics*, 21(8), 1861-1876.
- Cole, N. B., DiEuliis, D., Leo, P., Mitchell, D. C., & Nussbaum, R. L. (2008). Mitochondrial translocation of α -synuclein is promoted by intracellular acidification. *Experimental cell research*, 314(10), 2076-2089.
- Cole, N. B., Murphy, D. D., Grider, T., Rueter, S., Brasaemle, D., & Nussbaum, R. L. (2002). Lipid droplet binding and oligomerization properties of the Parkinson's disease protein α -synuclein. *Journal of Biological Chemistry*, 277(8), 6344-6352.
- Conway, K. A., Lee, S. J., Rochet, J. C., Ding, T. T., Williamson, R. E., & Lansbury, P. T. (2000). Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both α -synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: implications for pathogenesis and therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(2), 571-576.
- Cooper, O., Seo, H., Andrabi, S., Guardia-Laguarta, C., Graziotto, J., Sundberg, M., ... & Hargus, G. (2012). Pharmacological rescue of mitochondrial deficits in iPSC-derived neural cells from patients with familial Parkinson's disease. *Science translational medicine*, 4(141), 141ra90-141ra90.
- da Costa, C. A., Ancolio, K., & Checler, F. (2000). Wild-type but not Parkinson's disease-related ala-53 \rightarrow Thr mutant α -synuclein protects neuronal cells from apoptotic stimuli. *Journal of Biological Chemistry*, 275(31), 24065-24069.
- Dauer, W., & Przedborski, S. (2003). Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*, 39(6), 889-909.
- Dauer, W., Kholodilov, N., Vila, M., Trillat, A. C., Goodchild, R., Larsen, K. E., ... & Rocha, M. (2002). Resistance of α -synuclein null mice to the parkinsonian neurotoxin MPTP. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(22), 14524-14529.
- Daum, G. (1985). Lipids of mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, 822(1), 1-42.

- Davidson, W. S., Jonas, A., Clayton, D. F., & George, J. M. (1998). Stabilization of α -synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 273(16), 9443-9449.
- De Brito OM, Scorrano L. *Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria*. *Nature*. 2008 Dec 4;456(7222):605-10.
- Dedmon, M. M., Lindorff-Larsen, K., Christodoulou, J., Vendruscolo, M., & Dobson, C. M. (2005). Mapping long-range interactions in α -synuclein using spin-label NMR and ensemble molecular dynamics simulations. *Journal of the American Chemical Society*, 127(2), 476-477.
- Denton, R. M. (2009). Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1787(11), 1309-1316.
- Desplats, P., Lee, H. J., Bae, E. J., Patrick, C., Rockenstein, E., Crews, L., ... & Lee, S. J. (2009). Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of α -synuclein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(31), 13010-13015.
- Dev, K. K., Hofele, K., Barbieri, S., Buchman, V. L., & van der Putten, H. (2003). Part II: α -synuclein and its molecular pathophysiological role in neurodegenerative disease. *Neuropharmacology*, 45(1), 14-44.
- Devi, L., Raghavendran, V., Prabhu, B. M., Avadhani, N. G., & Anandatheerthavarada, H. K. (2008). Mitochondrial import and accumulation of α -synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *Journal of Biological Chemistry*, 283(14), 9089-9100.
- Dhungel, N., Eleuteri, S., Li, L. B., Kramer, N. J., Chartron, J. W., Spencer, B., ... & Lashuel, H. (2015). Parkinson's disease genes VPS35 and EIF4G1 interact genetically and converge on α -synuclein. *Neuron*, 85(1), 76-87.
- Di Maio, R., Barrett, P. J., Hoffman, E. K., Barrett, C. W., Zharikov, A., Borah, A., ... & Hastings, T. G. (2016). α -Synuclein binds to TOM20 and inhibits mitochondrial protein import in Parkinson's disease. *Science translational medicine*, 8(342), 342ra78-342ra78.
- Drolet, R. E., Behrouz, B., Lookingland, K. J., & Goudreau, J. L. (2004). Mice lacking α -synuclein have an attenuated loss of striatal dopamine following prolonged chronic MPTP administration. *Neurotoxicology*, 25(5), 761-769.
- Dunker, A. K., Lawson, J. D., Brown, C. J., Williams, R. M., Romero, P., Oh, J. S., ... & Ausio, J. (2001). Intrinsically disordered protein. *Journal of molecular graphics and modelling*, 19(1), 26-59.
- Eliezer, D., Kutluay, E., Bussell Jr, R., & Browne, G. (2001). Conformational properties of α -synuclein in its free and lipid-associated states1. *Journal of molecular biology*, 307(4), 1061-1073.
- Eschbach, J., Von Einem, B., Müller, K., Bayer, H., Scheffold, A., Morrison, B. E., ... & Otto, M. (2015). Mutual exacerbation of peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α deregulation and α -synuclein oligomerization. *Annals of neurology*, 77(1), 15-32.
- Falzone, T. L., & Stokin, G. B. (2012). Imaging amyloid precursor protein in vivo: an axonal transport assay. In *Neurotrophic Factors* (pp. 295-303). Humana Press.
- Falzone, T. L., Stokin, G. B., Lillo, C., Rodrigues, E. M., Westerman, E. L., Williams, D. S., & Goldstein, L. S. (2009). Axonal stress kinase activation and tau misbehavior induced by kinesin-1 transport defects. *Journal of Neuroscience*, 29(18), 5758-5767.
- Fares, M. B., Ait-Bouziad, N., Dikiy, I., Mbefo, M. K., Jovičić, A., Kiely, A., ... & Lashuel, H. A. (2014). The novel Parkinson's disease linked mutation G51D attenuates in vitro aggregation and membrane binding of α -synuclein, and enhances its secretion and nuclear localization in cells. *Human molecular genetics*, 23(17), 4491-4509.

- Fauvet, B., Mbefo, M. K., Fares, M. B., Desobry, C., Michael, S., Ardah, M. T., ... & Eliezer, D. (2012). α -Synuclein in central nervous system and from erythrocytes, mammalian cells, and *Escherichia coli* exists predominantly as disordered monomer. *Journal of Biological Chemistry*, 287(19), 15345-15364.
- Feany, M. B., & Bender, W. W. (2000). A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature*, 404(6776), 394.
- Ferreon, A. C. M., Gambin, Y., Lemke, E. A., & Deniz, A. A. (2009). Interplay of α -synuclein binding and conformational switching probed by single-molecule fluorescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(14), 5645-5650.
- Flagmeier, P., Meisl, G., Vendruscolo, M., Knowles, T. P., Dobson, C. M., Buell, A. K., & Galvagnion, C. (2016). Mutations associated with familial Parkinson's disease alter the initiation and amplification steps of α -synuclein aggregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(37), 10328-10333.
- Fortin, D. L., Troyer, M. D., Nakamura, K., Kubo, S. I., Anthony, M. D., & Edwards, R. H. (2004). Lipid rafts mediate the synaptic localization of α -synuclein. *Journal of Neuroscience*, 24(30), 6715-6723.
- Franssens, V., Boelen, E., Anandhakumar, J., Vanhelmont, T., Büttner, S., & Winderickx, J. (2010). Yeast unfolds the road map toward α -synuclein-induced cell death. *Cell death and differentiation*, 17(5), 746.
- Friedman, J. R., Lackner, L. L., West, M., DiBenedetto, J. R., Nunnari, J., & Voeltz, G. K. (2011). ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science*, 334(6054), 358-362.
- Fuchs, J., Nilsson, C., Kachergus, J., Munz, M., Larsson, E. M., Schüle, B., ... & Gasser, T. (2007). Phenotypic variation in a large Swedish pedigree due to SNCA duplication and triplication. *Neurology*, 68(12), 916-922.
- Fukumitsu, K., Hatsukano, T., Yoshimura, A., Heuser, J., Fujishima, K., & Kengaku, M. (2016). Mitochondrial fission protein Drp1 regulates mitochondrial transport and dendritic arborization in cerebellar Purkinje cells. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 71, 56-65.
- Galvagnion, C., Brown, J. W., Ouberai, M. M., Flagmeier, P., Vendruscolo, M., Buell, A. K., ... & Dobson, C. M. (2016). Chemical properties of lipids strongly affect the kinetics of the membrane-induced aggregation of α -synuclein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(26), 7065-7070.
- Galvagnion, C., Buell, A. K., Meisl, G., Michaels, T. C., Vendruscolo, M., Knowles, T. P., & Dobson, C. M. (2015). Lipid vesicles trigger α -synuclein aggregation by stimulating primary nucleation. *Nature chemical biology*, 11(3), 229.
- Gegg, M. E., & Schapira, A. H. (2016). Mitochondrial dysfunction associated with glucocerebrosidase deficiency. *Neurobiology of disease*, 90, 43-50.
- Gerard, M., Debyser, Z., Desender, L., Kahle, P. J., Baert, J., Baekelandt, V., & Engelborghs, Y. (2006). The aggregation of alpha-synuclein is stimulated by FK506 binding proteins as shown by fluorescence correlation spectroscopy. *The FASEB journal*, 20(3), 524-526.
- Golovko, M. Y., Rosenberger, T. A., Feddersen, S., Færgeman, N. J., & Murphy, E. J. (2007). α -Synuclein gene ablation increases docosahexaenoic acid incorporation and turnover in brain phospholipids. *Journal of neurochemistry*, 101(1), 201-211.
- Greene, L. A., & Tischler, A. S. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(7), 2424-2428.
- Greten-Harrison, B., Polydoro, M., Morimoto-Tomita, M., Diao, L., Williams, A. M., Nie, E. H., ... & Chandra, S. S. (2010). $\alpha\beta\gamma$ -Synuclein triple knockout mice reveal age-dependent neuronal dysfunction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(45), 19573-19578.

- Grey, M., Dunning, C. J., Gaspar, R., Grey, C., Brundin, P., Sparr, E., & Linse, S. (2015). Acceleration of α -synuclein aggregation by exosomes. *Journal of Biological Chemistry*, 290(5), 2969-2982. Grey M, Linse S, Nilsson H, Brundin P, Sparr E (2011) *Membrane interaction of α -synuclein in different aggregation states*. *J Parkinsons Dis* 1(4):359–371.
- Guardia-Laguarta, C., Area-Gomez, E., Rüb, C., Liu, Y., Magrané, J., Becker, D., ... & Przedborski, S. (2014). α -Synuclein is localized to mitochondria-associated ER membranes. *Journal of Neuroscience*, 34(1), 249-259.
- Hamamichi, S., Rivas, R. N., Knight, A. L., Cao, S., Caldwell, K. A., & Caldwell, G. A. (2008). Hypothesis-based RNAi screening identifies neuroprotective genes in a Parkinson's disease model. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(2), 728-733.
- Haque, F., Pandey, A. P., Cambrea, L. R., Rochet, J. C., & Hovis, J. S. (2010). Adsorption of α -synuclein on lipid bilayers: Modulating the structure and stability of protein assemblies. *The Journal of Physical Chemistry B*, 114(11), 4070-4081.
- Hasegawa, K., Yasuda, T., Shiraishi, C., Fujiwara, K., Przedborski, S., Mochizuki, H., & Yoshikawa, K. (2016). Promotion of mitochondrial biogenesis by necdin protects neurons against mitochondrial insults. *Nature communications*, 7, 10943.
- Hashimoto, M., Rockenstein, E., Mante, M., Mallory, M., & Masliah, E. (2001). β -Synuclein inhibits α -synuclein aggregation: a possible role as an anti-parkinsonian factor. *Neuron*, 32(2), 213-223.
- Hatten, M. E. (1985). Neuronal regulation of astroglial morphology and proliferation in vitro. *The Journal of cell biology*, 100(2), 384-396.
- Hatten, M. E., & Liem, R. K. (1981). Astroglial cells provide a template for the positioning of developing cerebellar neurons in vitro. *The Journal of cell biology*, 90(3), 622-630.
- Hayashi, T., & Fujimoto, M. (2010). Detergent-resistant microdomains determine the localization of σ -1 receptors to the endoplasmic reticulum-mitochondria junction. *Molecular pharmacology*, 77(4), 517-528.
- Hovius, R., Thijssen, J., van der Linden, P., Nicolay, K., & de Kruijff, B. (1993). Phospholipid asymmetry of the outer membrane of rat liver mitochondria. *FEBS letters*, 330(1), 71-76. Hughes AJ, Daniel SE, Lees AJ. *Improved accuracy of clinical diagnosis of Lewy body Parkinson's disease*. *Neurology* 2001; 57:1497-9. 5.
- Hyslop, L. A., Armstrong, L., Stojkovic, M., & Lako, M. (2005). Human embryonic stem cells: biology and clinical implications. *Expert Rev Mol Med*, 7(19), 1-21.
- Ibáñez, P., Lesage, S., Janin, S., Lohmann, E., Durif, F., Destée, A., ... & Agid, Y. (2009). α -Synuclein gene rearrangements in dominantly inherited parkinsonism: Frequency, phenotype, and mechanisms. *Archives of neurology*, 66(1), 102-108.
- Israeli, E., & Sharon, R. (2009). β -Synuclein occurs in vivo in lipid-associated oligomers and forms hetero-oligomers with α -synuclein. *Journal of neurochemistry*, 108(2), 465-474..
- Itoh, K., Nakamura, K., Iijima, M., & Sesaki, H. (2013). Mitochondrial dynamics in neurodegeneration. *Trends in cell biology*, 23(2), 64-71.
- Iwai, A., Yoshimoto, M., Masliah, E., & Saitoh, T. (1995). Non-A. beta. Component of Alzheimer's Disease Amyloid (NAC) is Amyloidogenic. *Biochemistry*, 34(32), 10139-10145.
- Jao, C. C., Hegde, B. G., Chen, J., Haworth, I. S., & Langen, R. (2008). Structure of membrane-bound α -synuclein from site-directed spin labeling and computational refinement. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(50), 19666-19671.

- Jensen, P. H., Nielsen, M. S., Jakes, R., Dotti, C. G., & Goedert, M. (1998). Binding of α -synuclein to brain vesicles is abolished by familial Parkinson's disease mutation. *Journal of Biological Chemistry*, 273(41), 26292-26294.
- Jo, E., Darabie, A. A., Han, K., Tandon, A., Fraser, P. E., & McLaurin, J. (2004). α -Synuclein-synaptosomal membrane interactions. *The FEBS Journal*, 271(15), 3180-3189.
- Jo, E., McLaurin, J., Yip, C. M., George-Hyslop, P. S., & Fraser, P. E. (2000). α -Synuclein membrane interactions and lipid specificity. *Journal of Biological Chemistry*, 275(44), 34328-34334.
- Kamp, F., & Beyer, K. (2006). Binding of α -synuclein affects the lipid packing in bilayers of small vesicles. *Journal of Biological Chemistry*, 281(14), 9251-9259.
- Kamp, F., Exner, N., Lutz, A. K., Wender, N., Hegemann, J., Brunner, B., ... & Eimer, S. (2010). Inhibition of mitochondrial fusion by α -synuclein is rescued by PINK1, Parkin and DJ-1. *The EMBO journal*, 29(20), 3571-3589.
- Kayed, R., Head, E., Thompson, J. L., McIntire, T. M., Milton, S. C., Cotman, C. W., & Glabe, C. G. (2003). Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science*, 300(5618), 486-489.
- Keeney, P. M., Xie, J., Capaldi, R. A., & Bennett, J. P. (2006). Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled. *Journal of Neuroscience*, 26(19), 5256-5264.
- Kim, H. J., Lee, D., Lee, C. H., Chung, K. C., Kim, J., & Paik, S. R. (2006). Calpain-resistant fragment (s) of α -synuclein regulates the synuclein-cleaving activity of 20S proteasome. *Archives of biochemistry and biophysics*, 455(1), 40-47.
- Kim, W. S., Kågedal, K., & Halliday, G. M. (2014). Alpha-synuclein biology in Lewy body diseases. *Alzheimer's research & therapy*, 6(5), 73.
- Klivenyi, P., Siwek, D., Gardian, G., Yang, L., Starkov, A., Cleren, C., ... & Beal, M. F. (2006). Mice lacking alpha-synuclein are resistant to mitochondrial toxins. *Neurobiology of disease*, 21(3), 541-548.
- Krebiel, G., Ruckerbauer, S., Burbulla, L. F., Kieper, N., Maurer, B., Waak, J., ... & Riess, O. (2010). Reduced basal autophagy and impaired mitochondrial dynamics due to loss of Parkinson's disease-associated protein DJ-1. *PloS one*, 5(2), e9367.
- Krüger, R., Kuhn, W., Leenders, K. L., Sprengelmeyer, R., Müller, T., Woitalla, D., ... & Schöls, L. (2001). Familial parkinsonism with synuclein pathology Clinical and PET studies of A30P mutation carriers. *Neurology*, 56(10), 1355-1362.
- Krüger, R., Kuhn, W., Müller, T., Woitalla, D., Graeber, M., Kösel, S., ... & Riess, O. (1998). Ala50Pro mutation in the gene encoding α -synuclein in Parkinson's disease. *Nature genetics*, 18(2), 106-108.
- Kuwahara, T., Koyama, A., Gengyo-Ando, K., Masuda, M., Kowa, H., Tsunoda, M., ... & Iwatsubo, T. (2006). Familial Parkinson mutant α -synuclein causes dopamine neuron dysfunction in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(1), 334-340.
- Langston, J. W., Ballard, P., Tetrud, J. W., & Irwin, I. (1983). Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*, 219(4587), 979-980.
- Lee, H. J., Choi, C., & Lee, S. J. (2002). Membrane-bound α -synuclein has a high aggregation propensity and the ability to seed the aggregation of the cytosolic form. *Journal of Biological Chemistry*, 277(1), 671-678.
- Leist, M., Kadereit, S., & Schildknecht, S. (2008). Food for Thought... on the Real Success of 3R Approaches. *Altex*, 25(1), 17-24.

- Leist, M., Lidbury, B. A., Yang, C., Hayden, P. J., Kelm, J. M., Ringeissen, S., ... & Stolper, G. (2012). Novel technologies and an overall strategy to allow hazard assessment and risk prediction of chemicals, cosmetics, and drugs with animal-free methods. *Altex*, 29(4), 373-388.
- Leng, Y., Chase, T. N., & Bennett, M. C. (2001). Muscarinic receptor stimulation induces translocation of an α -synuclein oligomer from plasma membrane to a light vesicle fraction in cytoplasm. *Journal of Biological Chemistry*, 276(30), 28212-28218.
- Lerou, P. H., & Daley, G. Q. (2005). Therapeutic potential of embryonic stem cells. *Blood reviews*, 19(6), 321-331.
- Li, J., Uversky, V. N., & Fink, A. L. (2002). Conformational behavior of human α -synuclein is modulated by familial Parkinson's disease point mutations A30P and A53T. *Neurotoxicology*, 23(4-5), 553-567.
- Li, W. W., Yang, R., Guo, J. C., Ren, H. M., Zha, X. L., Cheng, J. S., & Cai, D. F. (2007). Localization of α -synuclein to mitochondria within midbrain of mice. *Neuroreport*, 18(15), 1543-1546.
- Li, Y., Wan, O. W., Xie, W., & Chung, K. K. (2011). p32 regulates mitochondrial morphology and dynamics through parkin. *Neuroscience*, 199, 346-358.
- Lin, M. T., & Beal, M. F. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, 443(7113), 787.
- Liu, G., Zhang, C., Yin, J., Li, X., Cheng, F., Li, Y., ... & Yu, S. (2009). α -Synuclein is differentially expressed in mitochondria from different rat brain regions and dose-dependently down-regulates complex I activity. *Neuroscience letters*, 454(3), 187-192.
- Lokappa, S. B., & Ulmer, T. S. (2011). α -Synuclein populates both elongated and broken helix states on small unilamellar vesicles. *Journal of Biological Chemistry*, 286(24), 21450-21457.
- Lopes, F. M., Schröder, R., da Frota Júnior, M. L. C., Zanotto-Filho, A., Müller, C. B., Pires, A. S., ... & Moreira, J. C. F. (2010). Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies. *Brain research*, 1337, 85-94.
- Lowe, R., Pountney, D. L., Jensen, P. H., Gai, W. P., & Voelcker, N. H. (2004). Calcium (II) selectively induces α -synuclein annular oligomers via interaction with the C-terminal domain. *Protein Science*, 13(12), 3245-3252.
- Lv, J. H., He, L., & Sui, S. F. (2008). Lipid rafts association of synaptotagmin I on synaptic vesicles. *Biochemistry (Moscow)*, 73(3), 283-288.
- Madine, J., Doig, A. J., & Middleton, D. A. (2006). A study of the regional effects of α -synuclein on the organization and stability of phospholipid bilayers. *Biochemistry*, 45(18), 5783-5792.
- Martín, E. D., González-García, C., Milán, M., Fariñas, I., & Ceña, V. (2004). Stressor-related impairment of synaptic transmission in hippocampal slices from α -synuclein knockout mice. *European Journal of Neuroscience*, 20(11), 3085-3091.
- Martin, L. J., Pan, Y., Price, A. C., Sterling, W., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., ... & Lee, M. K. (2006). Parkinson's disease α -synuclein transgenic mice develop neuronal mitochondrial degeneration and cell death. *Journal of Neuroscience*, 26(1), 41-50.
- Martinez, J. H., Alaimo, A., Gorjod, R. M., Alcon, S. P., Fuentes, F., Leskow, F. C., & Kotler, M. L. (2018). Drp-1 dependent mitochondrial fragmentation and protective autophagy in dopaminergic SH-SY5Y cells overexpressing alpha-synuclein. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 88, 107-117.
- Masalha, R., Herishanu, Y., Alfahel-Kakunda, A., & Silverman, W. F. (1997). Selective dopamine neurotoxicity by an industrial chemical: an environmental cause of Parkinson's disease?. *Brain research*, 774(1-2), 260-264.

- Masliah, E., Rockenstein, E., Adame, A., Alford, M., Crews, L., Hashimoto, M., ... & Games, D. (2005). Effects of α -synuclein immunization in a mouse model of Parkinson's disease. *Neuron*, 46(6), 857-868.
- Mavlyutov, T. A., Epstein, M. L., Liu, P., Verbny, Y. I., Ziskind-Conhaim, L., & Ruoho, A. E. (2012). Development of the sigma-1 receptor in C-terminals of motoneurons and colocalization with the N, N'-dimethyltryptamine forming enzyme, indole-N-methyl transferase. *Neuroscience*, 206, 60-68.
- McLean, P. J., Kawamata, H., Ribich, S., & Hyman, B. T. (2000). Membrane Association and Protein Conformation of α -Synuclein in Intact Neurons EFFECT OF PARKINSON' S DISEASE-LINKED MUTATIONS. *Journal of Biological Chemistry*, 275(12), 8812-8816.
- McMahon, H. T., & Gallop, J. L. (2005). Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature*, 438(7068), 590.
- McNulty, J. A. (1980). Ultrastructural observations on synaptic ribbons in the pineal organ of the goldfish. *Cell and tissue research*, 210(2), 249-256.
- Meuvis, J., Gerard, M., Desender, L., Baekelandt, V., & Engelborghs, Y. (2010). The conformation and the aggregation kinetics of α -synuclein depend on the proline residues in its C-terminal region. *Biochemistry*, 49(43), 9345-9352.
- Miller, K. E., & Sheetz, M. P. (2006). Direct evidence for coherent low velocity axonal transport of mitochondria. *The Journal of cell biology*, 173(3), 373-381.
- Mishizen-Eberz, A. J., Guttman, R. P., Giasson, B. I., Day, G. A., Hodara, R., Ischiropoulos, H., ... & Lynch, D. R. (2003). Distinct cleavage patterns of normal and pathologic forms of α -synuclein by calpain I in vitro. *Journal of neurochemistry*, 86(4), 836-847.
- Misko, A., Jiang, S., Wegorzewska, I., Milbrandt, J., & Baloh, R. H. (2010). Mitofusin 2 is necessary for transport of axonal mitochondria and interacts with the Miro/Milton complex. *Journal of Neuroscience*, 30(12), 4232-4240.
- Mosharov, E. V., Larsen, K. E., Kanter, E., Phillips, K. A., Wilson, K., Schmitz, Y., ... & Sulzer, D. (2009). Interplay between cytosolic dopamine, calcium, and α -synuclein causes selective death of substantia nigra neurons. *Neuron*, 62(2), 218-229.
- Mudo, G., Mäkelä, J., Di Liberto, V., Tselykh, T. V., Olivieri, M., Piepponen, P., ... & Aguirre, J. A. (2012). Transgenic expression and activation of PGC-1 α protect dopaminergic neurons in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(7), 1153-1165.
- Munishkina, L. A., Henriques, J., Uversky, V. N., & Fink, A. L. (2004). Role of protein-water interactions and electrostatics in α -synuclein fibril formation. *Biochemistry*, 43(11), 3289-3300.
- Nakamura, K., Nemani, V. M., Azarbal, F., Skibinski, G., Levy, J. M., Egami, K., ... & Sesaki, H. (2011). Direct membrane association drives mitochondrial fission by the Parkinson disease-associated protein α -synuclein. *Journal of Biological Chemistry*, 286(23), 20710-20726.
- Nakamura, K., Nemani, V. M., Wallender, E. K., Kaehlcke, K., Ott, M., & Edwards, R. H. (2008). Optical reporters for the conformation of α -synuclein reveal a specific interaction with mitochondria. *Journal of Neuroscience*, 28(47), 12305-12317.
- Nath, S., Goodwin, J., Engelborghs, Y., & Pountney, D. L. (2011). Raised calcium promotes α -synuclein aggregate formation. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 46(2), 516-526
- Necula, M., Chirita, C. N., & Kuret, J. (2003). Rapid anionic micelle-mediated α -synuclein fibrillization in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 278(47), 46674-46680.

- Nemani, V. M., Lu, W., Berge, V., Nakamura, K., Onoa, B., Lee, M. K., ... & Edwards, R. H. (2010). Increased expression of α -synuclein reduces neurotransmitter release by inhibiting synaptic vesicle reclustering after endocytosis. *Neuron*, *65*(1), 66-79.
- Nielsen, M. S., Vorum, H., Lindersson, E., & Jensen, P. H. (2001). Ca^{2+} binding to α -synuclein regulates ligand binding and oligomerization. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(25), 22680-22684.
- Niescier, R. F., Kwak, S. K., Joo, S. H., Chang, K. T., & Min, K. T. (2016). Dynamics of mitochondrial transport in axons. *Frontiers in cellular neuroscience*, *10*, 123.
- O'Donnell, K. C., Lulla, A., Stahl, M. C., Wheat, N. D., Bronstein, J. M., & Sagasti, A. (2014). Axon degeneration and PGC-1 α -mediated protection in a zebrafish model of α -synuclein toxicity. *Disease models & mechanisms*, *7*(5), 571-582.
- Ohno, S., Emori, Y., Imajoh, S., Kawasaki, H., Kisaragi, M., & Suzuki, K. (1984). Evolutionary origin of a calcium-dependent protease by fusion of genes for a thiol protease and a calcium-binding protein?. *Nature*, *312*(5994), 566.
- Olanow, C. W., Kieurtz, K., & Schapira, A. H. (2008). Why have we failed to achieve neuroprotection in Parkinson's disease?. *Annals of neurology*, *64*(S2).
- O'sullivan, S. S., Williams, D. R., Gallagher, D. A., Massey, L. A., Silveira-Moriyama, L., & Lees, A. J. (2008). Nonmotor symptoms as presenting complaints in Parkinson's disease: a clinicopathological study. *Movement Disorders*, *23*(1), 101-106.
- Påhlman, S., Ruusala, A. I., Abrahamsson, L., Mattsson, M. E., & Esscher, T. (1984). Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol ester-induced differentiation. *Cell differentiation*, *14*(2), 135-144.
- Paillusson, S., Gomez-Suaga, P., Stoica, R., Little, D., Gissen, P., Devine, M. J., ... & Miller, C. C. (2017). α -synuclein binds to the ER-mitochondria tethering protein VAPB to disrupt Ca^{2+} homeostasis and mitochondrial ATP production. *Acta neuropathologica*, *134*(1), 129-149.
- Pandey, A. P., Haque, F., Rochet, J. C., & Hovis, J. S. (2011). α -Synuclein-induced tubule formation in lipid bilayers. *The Journal of Physical Chemistry B*, *115*(19), 5886-5893.
- Panov, A., Dikalov, S., Shalbuyeva, N., Taylor, G., Sherer, T., & Greenamyre, J. T. (2005). Rotenone Model of Parkinson Disease Multiple Brain Mitochondria Dysfunctions after Short Term Systemic Rotenone Intoxication. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(51), 42026-42035.
- Parihar, M. S., Parihar, A., Fujita, M., Hashimoto, M., & Ghafourifar, P. (2009). Alpha-synuclein overexpression and aggregation exacerbates impairment of mitochondrial functions by augmenting oxidative stress in human neuroblastoma cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*, *41*(10), 2015-2024.
- Payton, J. E., Perrin, R. J., Clayton, D. F., & George, J. M. (2001). Protein-protein interactions of alpha-synuclein in brain homogenates and transfected cells. *Molecular brain research*, *95*(1-2), 138-145.
- Perier, C., Bove, J., Dehay, B., Jackson-Lewis, V., Rabinovitch, P. S., Przedborski, S., & Vila, M. (2010). Apoptosis-inducing factor deficiency sensitizes dopaminergic neurons to parkinsonian neurotoxins. *Annals of neurology*, *68*(2), 184-192.
- Perlmutter, J. D., Braun, A. R., & Sachs, J. N. (2009). Curvature dynamics of α -synuclein familial Parkinson disease mutants molecular simulations of the micelle-and bilayer-bound forms. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(11), 7177-7189.
- Perrin, R. J., Woods, W. S., Clayton, D. F., & George, J. M. (2001). Exposure to long chain polyunsaturated fatty acids triggers rapid multimerization of synucleins. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(45), 41958-41962.

- Perrin, R. J., Woods, W. S., Clayton, D. F., & George, J. M. (2000). Interaction of human α -synuclein and Parkinson's disease variants with phospholipids structural analysis using site-directed mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 275(44), 34393-34398.
- Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., ... & Stenroos, E. S. (1997). Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *science*, 276(5321), 2045-2047.
- Ponnappan, U., Zhong, M., & Trebilcock, G. U. (1999). Decreased proteasome-mediated degradation in T cells from the elderly: a role in immune senescence. *Cellular immunology*, 192(2), 167-174.
- Post, M. R., Lieberman, O. J., & Mosharov, E. V. (2018). Can Interactions Between α -Synuclein, Dopamine and Calcium Explain Selective Neurodegeneration in Parkinson's Disease? *Frontiers in neuroscience*, 12, 161.
- Pountney, D. L., Lowe, R., Quilty, M., Vickers, J. C., Voelcker, N. H., & Gai, W. P. (2004). Annular α -synuclein species from purified multiple system atrophy inclusions. *Journal of neurochemistry*, 90(2), 502-512.
- Pountney, D. L., Voelcker, N. H., & Gai, W. P. (2005). Annular alpha-synuclein oligomers are potentially toxic agents in alpha-synucleinopathy. Hypothesis. *Neurotoxicity research*, 7(1-2), 59-67.
- Prots, I., Veber, V., Brey, S., Campioni, S., Buder, K., Riek, R., ... & Winner, B. (2013). α -Synuclein oligomers impair neuronal microtubule-kinesin interplay. *Journal of Biological Chemistry*, 288(30), 21742-21754.
- Puschmann, A., Ross, O. A., Vilariño-Güell, C., Lincoln, S. J., Kachergus, J. M., Cobb, S. A., ... & Widner, H. (2009). A Swedish family with de novo α -synuclein A53T mutation: Evidence for early cortical dysfunction. *Parkinsonism & related disorders*, 15(9), 627-632.
- Ramakrishnan, M., Jensen, P. H., & Marsh, D. (2006). Association of α -synuclein and mutants with lipid membranes: spin-label ESR and polarized IR. *Biochemistry*, 45(10), 3386-3395.
- Rao, J. N., Jao, C. C., Hegde, B. G., Langen, R., & Ulmer, T. S. (2010). A combinatorial NMR and EPR approach for evaluating the structural ensemble of partially folded proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 132(25), 8657-8668.
- Rideout, H. J., Dietrich, P., Savalle, M., Dauer, W. T., & Stefanis, L. (2003). Regulation of α -synuclein by BFGF in cultured ventral midbrain dopaminergic neurons. *Journal of neurochemistry*, 84(4), 803-813.
- Robotta, M., Gerding, H. R., Vogel, A., Hauser, K., Schildknecht, S., Karreman, C., ... & Drescher, M. (2014). Alpha-Synuclein Binds to the Inner Membrane of Mitochondria in an α -Helical Conformation. *Chembiochem*, 15(17), 2499-2502.
- Roy, B., & Jackson, G. R. (2014). Interactions between Tau and α -synuclein augment neurotoxicity in a Drosophila model of Parkinson's disease. *Human molecular genetics*, 23(11), 3008-3023.
- Saha, A. R., Hill, J., Utton, M. A., Asuni, A. A., Ackerley, S., Grierson, A. J., ... & Hanger, D. P. (2004). Parkinson's disease α -synuclein mutations exhibit defective axonal transport in cultured neurons. *J Cell Sci*, 117(7), 1017-1024.
- Schapira, A. H. (2008). Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *The Lancet Neurology*, 7(1), 97-109.
- Schapira, A. H. V., Mann, V. M., Cooper, J. M., Dexter, D., Daniel, S. E., Jenner, P., ... & Marsden, C. D. (1990). Anatomic and disease specificity of NADH CoQ1 reductase (complex I) deficiency in Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry*, 55(6), 2142-2145.

- Sharon, R., Bar-Joseph, I., Frosch, M. P., Walsh, D. M., Hamilton, J. A., & Selkoe, D. J. (2003). The formation of highly soluble oligomers of α -synuclein is regulated by fatty acids and enhanced in Parkinson's disease. *Neuron*, 37(4), 583-595.
- Shenghui, H. E., Nakada, D., & Morrison, S. J. (2009). Mechanisms of stem cell self-renewal. *Annual Review of Cell and Developmental*, 25, 377-406.
- Shibatani, T., Nazir, M., & Ward, W. F. (1996). Alteration of rat liver 20S proteasome activities by age and food restriction. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 51(5), B316-B322.
- Singleton, A. B., Farrer, M., Johnson, J., Singleton, A., Hague, S., Kachergus, J., ... & Lincoln, S. (2003). α -Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science*, 302(5646), 841-841.
- Smits, S. M., Burbach, J. P. H., & Smidt, M. P. (2006). Developmental origin and fate of meso-diencephalic dopamine neurons. *Progress in neurobiology*, 78(1), 1-16.
- Snead, D., & Eliezer, D. (2014). Alpha-synuclein function and dysfunction on cellular membranes. *Experimental neurobiology*, 23(4), 292-313. _ Sohal, R.S. and Orr, W.C. (2012) *The redox stress hypothesis of aging*. *Free Radical Biology and Medicine*, 52, 539-555.
- Spillantini, M. G., Crowther, R. A., Jakes, R., Hasegawa, M., & Goedert, M. (1998). α -Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(11), 6469-6473.
- Stojkovic, M., Lako, M., Stojkovic, P., Stewart, R., Przyborski, S., Armstrong, L., ... & Murdoch, A. (2004). Derivation of human embryonic stem cells from day-8 blastocysts recovered after three-step in vitro culture. *Stem Cells*, 22(5), 790-797.
- Su, Y. C., & Qi, X. (2013). Inhibition of excessive mitochondrial fission reduced aberrant autophagy and neuronal damage caused by LRRK2 G2019S mutation. *Human molecular genetics*, 22(22), 4545-4561.
- Suzuki, K., Imajoh, S., Emori, Y., Kawasaki, H., Minami, Y., & Ohno, S. (1988). Regulation of activity of calcium activated neutral protease. *Advances in enzyme regulation*, 27, 135-151.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *cell*, 131(5), 861-872.
- Tang, F. L., Liu, W., Hu, J. X., Erion, J. R., Ye, J., Mei, L., & Xiong, W. C. (2015). VPS35 deficiency or mutation causes dopaminergic neuronal loss by impairing mitochondrial fusion and function. *Cell reports*, 12(10), 1631-1643.
- Ulmer T. S., Bax A., Cole N. B. and Nussbaum R. L. (2005) Structure and dynamics of micelle-bound human alpha-synuclein. *J. Biol. Chem.* 280, 9595–9603
- Ulmer, T. S., Bax, A., Cole, N. B., & Nussbaum, R. L. (2005). Structure and dynamics of micelle-bound human α -synuclein. *Journal of Biological Chemistry*, 280(10), 9595-9603.
- Utton, M. A., Noble, W. J., Hill, J. E., Anderton, B. H., & Hanger, D. P. (2005). Molecular motors implicated in the axonal transport of tau and α -synuclein. *Journal of cell science*, 118(20), 4645-4654.
- Uversky, V. N. (2008). α -synuclein misfolding and neurodegenerative diseases. *Current Protein and Peptide Science*, 9(5), 507-540.
- Uversky, V. N. (2011). Intrinsically disordered proteins may escape unwanted interactions via functional misfolding. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1814(5), 693-712.
- Uversky, V. N., Li, J., & Fink, A. L. (2001). Evidence for a partially folded intermediate in α -synuclein fibril formation. *Journal of Biological Chemistry*, 276(14), 10737-10744.

- Uversky, V. N., Li, J., Souillac, P., Millett, I. S., Doniach, S., Jakes, R., ... & Fink, A. L. (2002). Biophysical Properties of the Synucleins and Their Propensities to Fibrillate INHIBITION OF α -SYNUCLEIN ASSEMBLY BY β -AND γ -SYNUCLEINS. *Journal of Biological Chemistry*, 277(14), 11970-11978.
- Vacha, R., Linse, S., & Lund, M. (2014). Surface effects on aggregation kinetics of amyloidogenic peptides. *Journal of the American Chemical Society*, 136(33), 11776-11782.
- Vamvaca, K., Volles, M. J., & Lansbury Jr, P. T. (2009). The first N-terminal amino acids of α -synuclein are essential for α -helical structure formation in vitro and membrane binding in yeast. *Journal of molecular biology*, 389(2), 413-424.
- van der Staay, F. J., Arndt, S. S., & Nordquist, R. E. (2009). Evaluation of animal models of neurobehavioral disorders. *Behavioral and Brain Functions*, 5(1), 11.
- van Rooijen, B. D., Claessens, M. M., & Subramaniam, V. (2009). Lipid bilayer disruption by oligomeric α -synuclein depends on bilayer charge and accessibility of the hydrophobic core. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1788(6), 1271-1278.
- van Spronsen, M., Mikhaylova, M., Lipka, J., Schlager, M. A., van den Heuvel, D. J., Kuijpers, M., ... & Jaarsma, D. (2013). TRAK/Milton motor-adaptor proteins steer mitochondrial trafficking to axons and dendrites. *Neuron*, 77(3), 485-502.
- Varkey, J., Isas, J. M., Mizuno, N., Jensen, M. B., Bhatia, V. K., Jao, C. C., ... & Langen, R. (2010). Membrane curvature induction and tubulation are common features of synucleins and apolipoproteins. *Journal of Biological Chemistry*, 285(42), 32486-32493.
- Vekrellis, K., Xilouri, M., Emmanouilidou, E., Rideout, H. J., & Stefanis, L. (2011). Pathological roles of α -synuclein in neurological disorders. *The Lancet Neurology*, 10(11), 1015-1025.
- Volles, M. J., & Lansbury, P. T. (2003). Zeroing in on the pathogenic form of α -synuclein and its mechanism of neurotoxicity in Parkinson's disease. *Biochemistry*, 42(26), 7871-7878.
- Volpicelli-Daley, L. A., Gamble, K. L., Schultheiss, C. E., Riddle, D. M., West, A. B., & Lee, V. M. Y. (2014). Formation of α -synuclein Lewy neurite-like aggregates in axons impedes the transport of distinct endosomes. *Molecular biology of the cell*, 25(25), 4010-4023.
- Wang, T., & Hay, J. C. (2015). Alpha-synuclein toxicity in the early secretory pathway: how it drives neurodegeneration in Parkinson's disease. *Frontiers in neuroscience*, 9, 433.
- Wang, W., Perovic, I., Chittuluru, J., Kaganovich, A., Nguyen, L. T., Liao, J., ... & Ju, S. (2011). A soluble α -synuclein construct forms a dynamic tetramer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(43), 17797-17802.
- Wang, X., Winter, D., Ashrafi, G., Schlehe, J., Wong, Y. L., Selkoe, D., ... & Schwarz, T. L. (2011). PINK1 and Parkin target Miro for phosphorylation and degradation to arrest mitochondrial motility. *Cell*, 147(4), 893-906.
- Waxman, E. A., & Giasson, B. I. (2011). Induction of intracellular tau aggregation is promoted by α -synuclein seeds and provides novel insights into the hyperphosphorylation of tau. *Journal of Neuroscience*, 31(21), 7604-7618.
- Weinreb, P. H., Zhen, W., Poon, A. W., Conway, K. A., & Lansbury, P. T. (1996). NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. *Biochemistry*, 35(43), 13709-13715.
- West, A. B., Moore, D. J., Choi, C., Andrabi, S. A., Li, X., Dikeman, D., ... & Dawson, T. M. (2007). Parkinson's disease-associated mutations in LRRK2 link enhanced GTP-binding and kinase activities to neuronal toxicity. *Human molecular genetics*, 16(2), 223-232.

- Whittaker, H. T., Qui, Y., Bettencourt, C., & Houlden, H. (2017). Multiple system atrophy: genetic risks and alpha-synuclein mutations. *F1000Research*, 6.
- Winner, B., Jappelli, R., Maji, S. K., Desplats, P. A., Boyer, L., Aigner, S., ... & Tzitzilonis, C. (2011). In vivo demonstration that α -synuclein oligomers are toxic. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(10), 4194-4199.
- Wood, S. J., Wypych, J., Steavenson, S., Louis, J. C., Citron, M., & Biere, A. L. (1999). α -Synuclein fibrillogenesis is nucleation-dependent implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. *Journal of Biological Chemistry*, 274(28), 19509-19512.
- Xie, W., & Chung, K. K. (2012). Alpha-synuclein impairs normal dynamics of mitochondria in cell and animal models of Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry*, 122(2), 404-414.
- Yang, Y., Ouyang, Y., Yang, L., Beal, M. F., McQuibban, A., Vogel, H., & Lu, B. (2008). Pink1 regulates mitochondrial dynamics through interaction with the fission/fusion machinery. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(19), 7070-7075.
- Ye, W., Shimamura, K., Rubenstein, J. L., Hynes, M. A., & Rosenthal, A. (1998). FGF and Shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate. *Cell*, 93(5), 755-766.
- Yu, S., Li, X., Liu, G., Han, J., Zhang, C., Li, Y., ... & Uéda, K. (2007). Extensive nuclear localization of α -synuclein in normal rat brain neurons revealed by a novel monoclonal antibody. *Neuroscience*, 145(2), 539-555.
- Zhang, L., Zhang, C., Zhu, Y., Cai, Q., Chan, P., Uéda, K., ... & Yang, H. (2008). Semi-quantitative analysis of α -synuclein in subcellular pools of rat brain neurons: an immunogold electron microscopic study using a C-terminal specific monoclonal antibody. *Brain research*, 1244, 40-52.
- Zhang, X. Q., & Zhang, S. C. (2009). Differentiation of neural precursors and dopaminergic neurons from human embryonic stem cells. In *Human Embryonic Stem Cell Protocols* (pp. 355-366). Humana Press.**
- Zheng, B., Liao, Z., Locascio, J. J., Lesniak, K. A., Roderick, S. S., Watt, M. L., ... & Grünblatt, E. (2010). PGC-1 α , a potential therapeutic target for early intervention in Parkinson's disease. *Science translational medicine*, 2(52), 52ra73-52ra73.
- Zhu, M., & Fink, A. L. (2003). Lipid binding inhibits α -synuclein fibril formation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(19), 16873-16877. M. Zhu, J. Li, A.L. Fink, *The association of alpha-synuclein with membranes affects bilayer structure, stability, and fibril formation*, J. Biol. Chem. 278 (2003) 40186–40197.
- Zhu, M., Qin, Z. J., Hu, D., Munishkina, L. A., & Fink, A. L. (2006). α -synuclein can function as an antioxidant preventing oxidation of unsaturated lipid in vesicles. *Biochemistry*, 45(26), 8135-8142.
- Ziviani, E., Tao, R. N., & Whitworth, A. J. (2010). Drosophila parkin requires PINK1 for mitochondrial translocation and ubiquitinates mitofusin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(11), 5018-5023.