



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Paper de la proteïna p27 en la regulació de l'expressió de l' α -sinucleïna: Implicacions en la malaltia de Parkinson

Carla Domuro Soriano

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Barcelona, Octubre 2019

Departament de Biomedicina
Programa de Doctorat de Biomedicina
Facultat de Medicina i Ciències de la Salut
Universitat de Barcelona

PAPER DE LA PROTEÏNA p27 EN LA REGULACIÓ DE L'EXPRESSION DE L' α -SINUCLEÏNA: IMPLICACIONS EN LA MALALTIA DE PARKINSON

Tesi presentada per
Carla Domuro Soriano
Per optar al grau de
Doctora en Biomedicina

Aquesta tesi ha estat realitzada sota la direcció del **Dr. Oriol Bachs Valdenuu** i la **Dra. M^a Jesús Pujol Sobrevia**, en el Departament de Biomedicina de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de la Universitat de Barcelona



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

*A mis padres
y a mi hermano Eric*

AGRAÏMENTS

En realidad, me gustaría agradecer esta tesis a todo el mundo que ha confiado en mí y en mis capacidades para desarrollarla. En primer lugar, agradecer a **Xus** y a **Oriol** por brindarme la oportunidad de empezar en este mundo cuando aún estaba en la carrera. Cuando llegó el momento de pedir becas y proyectos, me ofrecisteis la oportunidad de empezar en un campo nuevo para vosotros y para mí, y, aunque al principio daba un poco de cosilla alejarse del ciclo celular y del cáncer, creo que fue todo un acierto aceptar esta aventura. También quiero agradecer a **Joan** por la enorme ayuda y consejo que me has proporcionado a lo largo de este camino, ya que sin ello no habría sido posible conseguir todo lo que hemos conseguido en estos años. También quiero mencionar a **Jou, Rosa** y al grupo de la Dra. **Fariñas**, por toda ayuda tanto técnica como personal que me habéis proporcionado.

Por supuesto agradecer en general a todo el laboratorio 31, han sido unos 6 años en los que he conocido gente maravillosa. Muchísimas gracias a **Serena, Edurne, Tula, Judit, Anna, Atila, David, Jonatan, Rodrigo, Julia, Edgar** y los alumnos de TFG y TFM, que han ido dando bocanadas de aire fresco a todos. Pero en especial gracias a **Laura**, por ser mi hermanita mayor, mi referente en muchos aspectos de la vida, si algo he aprendido de ti es que, aunque la vida te juegue malas pasadas, nunca hay que dejar de sonreír y de tirar hacia adelante.

Como no agradecer a mis amigas del colegio (**Andrea, Bea, Helena, Marta**), me encanta vernos crecer a cada una en nuestro territorio personal y profesional después de tantísimos años, pero conservando nuestras tonterías de cuando éramos pequeñas. A mis amigos de la Uni (**Amalia, David, Debora, Olatz** y **Juanma**) alguno ya doctorado, otros en vías de hacerlo y todos en general haciendo lo que nos gusta, que es lo más importante, gracias por estar siempre ahí. Mis amigos de los perritos (**Borja, David, Valerio, Joshu, Eli**) gracias por esa amistad tan sincera desde el principio, y por aceptarme en vuestro grupo, aunque no tuviera perrito 🐶. También muchas gracias a **Anais** que, pese a no vernos por la distancia, hemos compartido nuestros momentos de agobio y nuestras alegrías siempre. Por vosotros y por muchos más que no puedo mencionar a falta de dejarme a alguien, por aquellas amistades que, aunque a día de

hoy no son tan fuertes siguen ahí, por aquellas amistades que tristemente se han perdido y por todas aquellas nuevas que he ido haciendo a lo largo de los años.

Y finalmente agradecer a mi familia el siempre, siempre, siempre, haber confiado en mí. Creo que confiáis en mis capacidades más que nadie y por supuesto más que yo misma, e indudablemente siempre creéis que puedo con todo. Millones y millones de gracias a mis padres, **José Antonio** y **Rosa Mari** por siempre impulsarme a cumplir mi sueño, y hacérmelo todo más sencillo para que llegara a ello. Y mira que no es fácil aguantarme cuando me enfado o las cosas no salen como yo quiera. Y también **Eric** mi hermanito pequeño muchas gracias a ti, por aguantar cada vez que te chincho, para ti tengo un mensaje, lucha para conseguir lo que quieres, y te comerás el mundo. Finalmente, **Sergio** gracias a ti también, aunque me conociste ya en la fase final de esta aventura, he tenido la oportunidad de vivir contigo este sprint final, en el que has tenido que aguantar días buenos y días malos, pero cada día que paso contigo, tengo la suerte de que sé que al menos sonreiré un par de veces antes de irme a dormir.

Y me repito otra vez, muchísimas gracias a todos y cada uno de vosotros. Soy la persona que soy hoy en día gracias a cada uno de los pedacitos de recuerdos vividos con cada uno.

Carla

TAULA DE CONTINGUTS

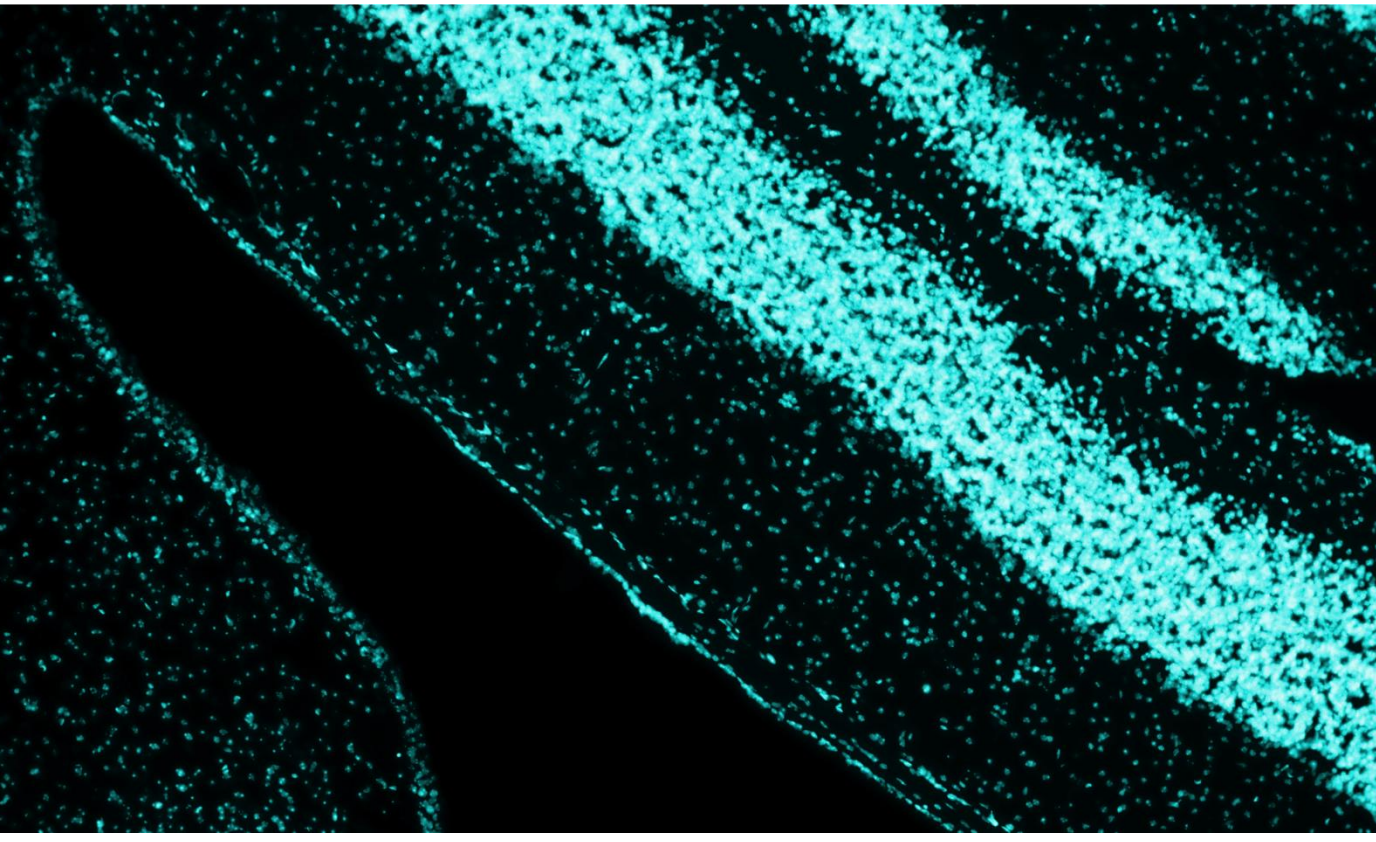
| | |
|---|----|
| INTRODUCCIÓ | 15 |
| 1. CICLE DE DIVISIÓ CEL·LULAR | 15 |
| 1.1 El Cicle de divisió cel·lular..... | 15 |
| 1.2 Regulació del cicle cel·lular | 16 |
| 2. p27, ESTRUCTURA I FUNCIONS | 20 |
| 2.1 p27, aspectes generals | 20 |
| 2.2 p27 com a regulador del cicle cel·lular..... | 23 |
| 2.3 p27 com a regulador transcripcional | 23 |
| 3. LA MALALTIA DE PARKINSON | 28 |
| 3.1 Característiques generals | 28 |
| 3.2 Genètica de la MP | 30 |
| 3.3 Patologia..... | 31 |
| 3.4 Models animals i cel·lulars en la recerca de la MP..... | 35 |
| 4. α -SINUCLÈÏNA..... | 38 |
| 4.1 Aspectes generals..... | 38 |
| 4.2 Proteòstasi de l' α -sinucleïna | 39 |
| 4.3 Degradació de l' α -sinucleïna | 40 |
| 4.4 Propagació de l' α -sinucleïna | 41 |
| 4.5 Modificacions post-traduccionals de l' α -sinucleïna | 43 |
| 4.6 Regulació transcripcional de l' α -sinucleïna..... | 43 |
| HIPÒTESI I OBJECTIUS | 49 |
| 5. HIPÒTESI DE TREBALL..... | 49 |
| 6. OBJECTIUS DEL TREBALL | 49 |
| MATERIALS I MÈTODES | 53 |
| 7. CLONATGES | 53 |
| 7.1 Plasmidis utilitzats..... | 53 |
| 8. CULTIUS CEL·LULARS | 54 |
| 8.1 Condicions de manteniment dels cultius cel·lulars..... | 54 |
| 8.2 Congelació | 55 |

| | | |
|------|--|----|
| 8.3 | Tractament de les cèl·lules amb Roscovitina per a la inhibició de l'activitat quinasa..... | 55 |
| 8.4 | Transfecció de cèl·lules..... | 56 |
| 8.5 | Obtenció de cultius knockdown de p27, p130 ,C/EBPδ i CDK5..... | 57 |
| 8.6 | Obtenció de cultius KO per p27 i E2F4..... | 57 |
| 8.7 | Obtenció de lisats cel·lulars i quantificació de proteïna..... | 58 |
| 9. | ELECTROFORESI, ELECTROTRANSFERÈNCIA I IMMUNODETECCIÓ DE PROTEÏNES..... | 59 |
| 9.1 | Electroforesi de proteïnes (SDS-PAGE)..... | 59 |
| 9.2 | Electrotransferència..... | 60 |
| 9.3 | Immunodetecció (Western Blot)..... | 60 |
| 10. | OBTENCIÓ DE PROTEÏNES RECOMBINANTS. EXPRESSIÓ I PURIFICACIÓ DE en <i>E.Coli</i> | 61 |
| 10.1 | Protocol de transformació bacteriana..... | 62 |
| 10.2 | Obtenció de proteïnes recombinants..... | 62 |
| 10.3 | Expressió de proteïnes de fusió amb IPTG..... | 63 |
| 10.4 | Purificació de proteïnes recombinants..... | 64 |
| 10.5 | Diàlisi de la proteïna recombinant..... | 65 |
| 11. | ANÀLISI DE LA INTERACCIÓ ENTRE PROTEÏNES PER CROMATOGRAFIA D'AFINITAT..... | 65 |
| 12. | IMMUNOPRECIPITACIÓ DE PROTEÏNES..... | 67 |
| 13. | IMMUNOPRECIPITACIÓ DE CROMATINA (ChIP)..... | 68 |
| 14. | TÈCNiques DE LOCALITZACIÓ DE PROTEÏNES..... | 70 |
| 14.1 | Congelació i obtenció de talls de cervell de ratolí..... | 70 |
| 14.2 | Immunohistoquímica (IHQ)..... | 71 |
| 14.3 | Immunofluorescència (IF)..... | 72 |
| 14.4 | Proximity Ligation Assay (PLA)..... | 73 |
| 15. | ANÀLISI D'EXPRESSIÓ..... | 75 |
| 15.1 | Extracció RNA..... | 75 |
| 15.2 | Retrotranscripció..... | 76 |
| 15.3 | RT-PCR..... | 76 |

| | | |
|-----------------|--|-----|
| 15.4 | Assaig luciferasa | 77 |
| 16. | EINES DE BIOINFORMÀTICA | 78 |
| 16.1 | Anàlisi de motius d'unió al DNA dels factors de transcripció | 78 |
| RESULTATS | | 83 |
| 17. | ANÀLISI DEL PAPER DE P27 EN L'EXPRESSION D' α -SYN EN MEFS. | 83 |
| 17.1 | Les MEFs p27KO presenten nivells elevats d' α -SYN en comparació amb les MEFs WT. | 83 |
| 17.2 | Les MEFs p130KO i p130/p27 DKO presenten nivells elevats d' α -SYN en comparació amb les MEFs WT. | 83 |
| 17.3 | Estudi de l'especificitat de l'anticòs d' α -SYN | 84 |
| 18. | ESTUDI DE L'EXPRESSION D' α -SYN EN SECCIONS DE CERVELLS DE RATOLÍ I EN NEURONES DE RATOLÍ EN CULTIU. | 85 |
| 18.1 | Els nivells d' α -SYN es troben augmentats en seccions de cervell de ratolins p27KO | 85 |
| 18.2 | Creació de línies cel·lulars C17.2 KO de p27 o E2F4 mitjançant la tecnologia CRISPR/Cas9. Efectes sobre l'expressió d' α -SYN | 86 |
| 18.3 | P27 i E2F4 s'uneixen a regions promotores del gen SNCA..... | 89 |
| 19. | ESTUDI DE L'EXPRESSION D' α -SYN EN CÈL·LULES NEURALS HUMANES SH-SY5Y | 92 |
| 20. | PAPER DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓ C/EBP δ EN LA REGULACIÓ DE L'EXPRESSION D' α -SYN. RELACIÓ ENTRE P27 I C/EBP δ | 95 |
| 21. | P27 COM ELEMENT CLAU DE LA MALALTIA DE PARKINSON..... | 97 |
| 21.1 | La disminució de p27 podria estar implicada en el desencadenament de la MP..... | 97 |
| 21.2 | Els astròcits de malalts de Parkinson portadors de la mutació de LRRK2 (G2019S) presenten nivells més baixos de p27 i més elevats d' α -SYN | 98 |
| 21.3 | En el Locus Coeruleus de pacients mutants de LRRK2 (G2019S) hi ha disminució dels nivells de p27..... | 99 |
| 21.4 | Paper de CDK5 en la regulació de l'expressió i agregació de l' α -SYN . | 102 |
| 21.5 | p27 interactua amb E2F1 pel seu extrem carboxi terminal | 106 |
| DISCUSSIÓ | | 111 |

| | |
|--------------------|-----|
| CONCLUSIONS | 131 |
| BIBLIOGRAFIA | 135 |
| PUBLICACIÓ | 145 |

INTRODUCCIÓ



INTRODUCCIÓ

1. CICLE DE DIVISIÓ CEL·LULAR

1.1 El Cicle de divisió cel·lular

La primera vegada que es va fer servir el terme “cicle de divisió cel·lular” va ser a l’any 1882, en la publicació de Walther Flemming “*cell substance, nucleus and cell division*”¹

Actualment, definim el cicle cel·lular com el conjunt d’esdeveniments que es produeixen de manera seqüencial a la cèl·lula i que tenen com a objectiu la duplicació de tot el material cel·lular, donant com a resultat dues cèl·lules filles genèticament idèntiques a la mare. Aquest procés està evolutivament molt conservat. A les cèl·lules eucariotes, aquest procés es divideix en dues fases principals: la interfase i la Mitosi (M). De la mateixa manera, la interfase es subdivideix en la fase G1, la fase S i la fase G2.^{2,3}

Una cèl·lula pot estar aturada en G1 durant hores, dies o fins i tot anys, és el que s’anomena estat de quiescència o G0. Quan l’entorn és favorable i una cèl·lula en G0 rep un senyal mitogenic, comença el procés de divisió cel·lular.⁴ Durant la fase G1 (GAP1), les cèl·lules augmenten de mida i sintetitzen tot un conjunt de RNAs i proteïnes necessàries per a la replicació del DNA. Un cop la cèl·lula ha acabat de sintetitzar tot el material necessari durant la fase G1, aquesta entra a la fase S. Just abans d’entrar a la fase S hi ha un punt de control anomenat punt de restricció. Un cop les cèl·lules creuen aquest punt, queden compromeses a acabar el cicle cel·lular i per tant a dividir-se. Durant la fase S o fase de síntesi de DNA, les cèl·lules han de duplicar tot el seu material genètic. Quan la cèl·lula ha acabat la fase S, entra a la fase G2 (GAP2) on la cèl·lula es prepara per a la fase M.³

La Fase M compren dos processos: La Mitosi i la citocinesi. La mitosi és un procés continu mitjançant el qual les cromàtides germanes, es condensen i es separen, mentre que la citocinesi es el procés de separació de la cèl·lula en dues cèl·lules filles. La Mitosi, es divideix en 5 fases principals: Profase, Prometafase, Metafase, Anafase i Telofase. A l’inici de la profase, el DNA es condensa formant els cromosomes mitòtics que es poden visualitzar pel microscopi. En aquesta fase, la coberta nuclear es manté

INTRODUCCIÓ

intacta. En el citoplasma s'inicia la formació del fus mitòtic a partir dels dos centrosomes. La Prometafase comença amb el trencament de la coberta nuclear i llavors, els cromosomes poden interactuar amb els microtúbuls del fus mitòtic. Una vegada tots els cromosomes s'han unit als microtúbuls del fus, s'alineen en l'equador de la cèl·lula formant la denominada placa equatorial que es la característica fonamental de la metafase. A l'Anafase els cromosomes se separen, de manera que cada cromàtide germana passa a estar en un dels pols oposats de la cèl·lula. Un cop separats tots els cromosomes, té lloc la Telofase, on es desacoblen els microtúbuls del fus mitòtic, els cromosomes es descondensen i es reorganitza la coberta nuclear. En el cas de les cèl·lules de mamífer, durant la telofase també esdevé la citocinesi, on la cèl·lula divideix el seu citoplasma donant lloc a les dues cèl·lules filles genèticament iguals.³

En les cèl·lules humanes, el cicle cel·lular de les cèl·lules que s'estan dividint contínuament, té una durada aproximada de unes 24 hores. La fase G1 compren aproximadament unes 9 hores, la fase S 10 hores, la fase G2 4 hores i la mitosi 1 hora. Com ja s'ha comentat, existeix un punt de regulació de l'entrada a la fase S anomenat punt de restricció que, un cop superat aquest punt, la cèl·lula ja no pot aturar la continuació del cicle cel·lular.^{5,6} De la mateixa manera, també existeixen altres punts de control durant el cicle cel·lular, els denominats sistemes de vigilància o *checkpoints*, que s'encarreguen de que tots els esdeveniments es produeixin de manera adequada.

1.2 Regulació del cicle cel·lular

Com ja hem comentat a l'apartat anterior, el cicle cel·lular és un fenomen altament complex que requereix d'una regulació molt fina de tots els seus esdeveniments. Dues famílies de proteïnes són les encarregades d'aquesta regulació: les quinases dependents de ciclins (CDKs) i les subunitats reguladores d'aquestes, les ciclins. Per a l'activació de les CDKs és imprescindible que aquestes quinases estiguin unides a una subunitat ciclina. No obstant això, la regulació fina de l'activitat de les CDKs implica també mecanismes de fosforilació, d'acetilació i d'unió de proteïnes inhibidores denominades CKIs.

La progressió del cicle cel·lular està controlada per l'activació seqüencial de diferents complexos ciclins/CDKs. Les CDKs són una família de serina/treonina quinases

formada per 20 membres que van des de la CDK1 fins a la CDK20. La seva expressió durant el cicle cel·lular és més o menys constant, i només tenen activitat catalítica quan s'expressen les diferents ciclines durant el cicle i es forma l'hererodímer ciclina/CDK, adquirint la capacitat de fosforilar els seus substrats. En general, les CDKs participen en dues funcions cel·lulars principals, que poden estar combinades, les quals les classifiquen en dos grups: les que participen en la regulació del cicle cel·lular (subfamílies CDK1, CDK4 i CDK5) i les involucrades en la transcripció (subfamílies CDK7, CDK9, CDK11 i CDK20). Les CDKs més conegudes que participen activament en el control del cicle cel·lular són CDK1, CDK2, CDK4 i CDK6. Les cèl·lules neurals, que són cèl·lules quiescents per definició, presenten també nivells elevats de CDK5. CDK5 s'activa principalment per 2 proteïnes, p35 i p39, que s'expressen en cervell. També té la capacitat d'unir-se a les ciclines tipus D, E i I encara que aquests complexos no tenen activitat quinasa.^{7,8}

La família de les ciclines és una mica més extensa, amb 29 membres, encara que no totes estan relacionades amb el cicle cel·lular. La ciclina és la subunitat reguladora de la CDK, i per contra, la seva expressió està altament regulada, s'expressen només en el moment del cicle que són necessàries. Les ciclines D1, D2 i D3 són les primeres en expressar-se, quan la cèl·lula rep senyals mitogèniques i regulen les CDKs de G1 (CDK4 i CDK6). (**Figura 1**)

Les principals dianes d'aquestes CDKs de G1 són les proteïnes anomenades "*pocket*" o proteïnes de la família del Retinoblastoma (pRb, p107 i p130)⁹. Aquestes proteïnes són les encarregades de formar els complexos repressors en associació als factors de transcripció de la família E2F, a remodeladors de la cromatina i a histones deacetilases.¹⁰ D'aquesta manera es regula la transcripció dels gens de la fase G1, així com l'expressió de la ciclina E, necessària per activar a CDK2 i acabar la G1. En la fase G1 trobem dos tipus de complexos, el p130/E2F4 i el pRb/E2F1. E2F4 és un repressor transcripcional, mentre que E2F1 és un activador transcripcional que quan està unit a pRb és inactiu.

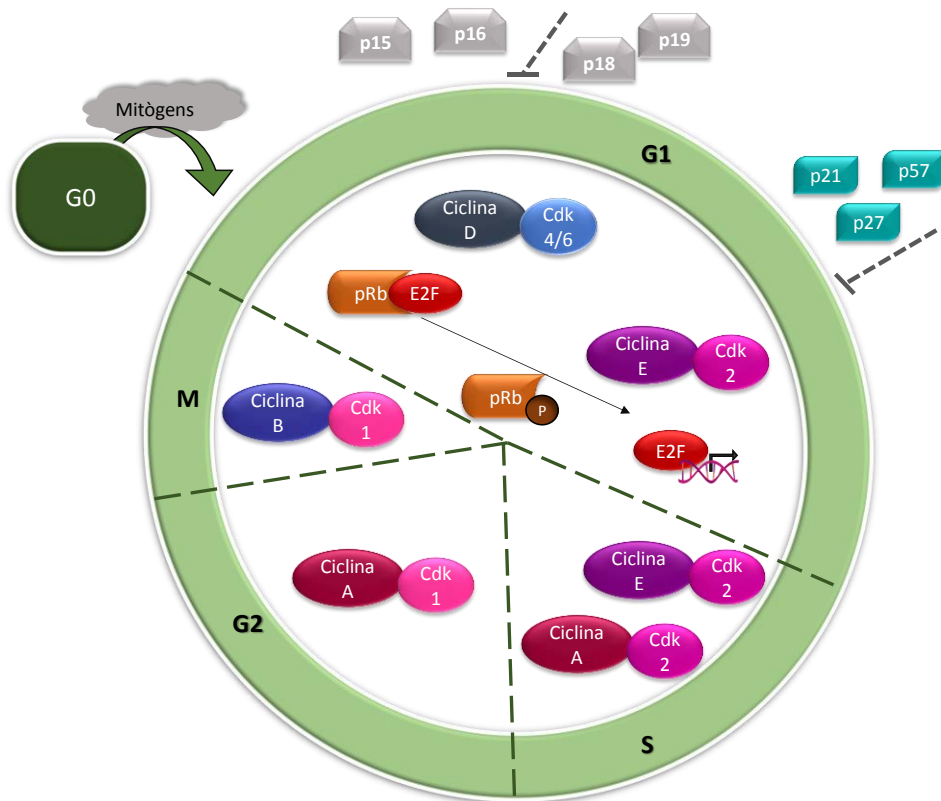


Figura 1. Esquema de les principals fases del cicle cel·lular. La progressió al llarg del cicle cel·lular depèn de la formació de complexos específics ciclina-CDKs. La fosforilació de pRb pels complexos CDK4/6-CiclinaD i CDK2-CiclinaE és necessària per a l'entrada en fase S,. Les CDKs són regulades per les CKI de la família INK (p15, p16, p18 i p19) o la família Cip/kip (p21, p27 i p57)

Al començament de la fase G1, els complexos CDK4/6-CiclinaD són els encarregats fosforilar p130 i pRb. Posteriorment, la CDK2-CiclinaE hiper-fosforilarà a aquestes proteïnes. La hiper-fosforilació de p130 allibera E2F4 de la seva unió a les regions reguladores dels gens i com a conseqüència, s'allunya d'aquestes regions. Per altra banda, la hiper-fosforilació de pRB permet que E2F1 quedi unit a aquestes regions de forma activa, fet que permet que pugui efectuar la seva funció com a activador transcripcional dels gens involucrats en la fase S, entre els que trobem la ciclina A.¹¹ Durant la fase S la ciclina A forma parella amb la CDK2 i controlen la progressió de la replicació del DNA. En la transició G2/M la ciclina A s'associa a la CDK1 i promou la entrada de la cèl·lula en mitosi. De la mateixa manera, durant la mitosi la ciclina B s'uneix a CDK1 i finalitza aquest procés.¹²

Tot i així, la simple unió de les ciclines no és suficient per a l'activació complerta de les CDKs. La majoria d'elles tenen un residu treonina conservat, que ha de ser fosforilat pel complex CAK (CiclinaH-CDK7 i Mat1) per tal de que la CDK tingui la seva activitat quinasa complerta.¹³ De la mateixa manera, també trobem fosforilacions inhibidores, les quinases Wee1 i Myt1 inhibeixen les CDKs fosforilant els residus T14 i Y15. També estan les fosfatases Cdc25 que s'encarreguen d'alliberar a les CDKs d'aquestes fosforilacions a T14 i Y15 i per tant, re-activen les CDKs. L'acetilació de les CDKs en alguns residus específics també inhibeix la seva activitat.¹⁴ Per altra banda, l'activitat de les CDKs també es regula mitjançant la unió a proteïnes inhibidores anomenades CKIs.

1.1.1 CKIs: Inhibidors dels complexos ciclines-CDKs

Les CKIs són un grup de proteïnes inicialment identificades per la seva capacitat d'inhibir la activitat dels complexos ciclina-CDK. Es classifiquen en dues famílies: La INK4 que compren p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4C} i p19^{INK4D} i la família Cip/Kip que conté p21^{CIP1}, p27^{KIP1} i p57^{KIP2}.¹⁵ (Taula 1)

Les proteïnes de la família INK4 inhibeixen l'activitat de CDK4/6 unint-se a les pròpies quinases i impedingent la unió de les ciclines D. Per contra, les proteïnes de la família Cip/Kip formen un complex amb l'heterodímer ciclina-CDK, és a dir, s'uneixen a les dues subunitats, resultant en un complex trimèric. Aquestes proteïnes tenen la capacitat d'unir-se als complexos formats per la CDK2, però també són necessàries per regular l'activitat dels complexos CDK4/6. Per últim, aquestes proteïnes també regulen altres processos cel·lulars com la resposta al dany al DNA, la diferenciació cel·lular, diferents tipus d'estrès, l'apoptosi, la dinàmica del citoesquelet i la regulació de la transcripció.^{16,17}

Recentment, s'ha demostrat que tant les CDKs, com les ciclines, com les CKI tenen altres funcions que són independents a la regulació del cicle cel·lular en mamífers, tals com control de la transcripció, regulació epigenètica, regulació del metabolisme, renovació de les cèl·lules mare, funcions neuronals i espermatogènesi.¹⁸

INTRODUCCIÓ

En aquesta tesi, ens centrem principalment en les diferents funcions de la proteïna p27^{kip1}.

| Fase | Ciclina | CDK | CDKI |
|------|------------|-----------|--|
| G1 | Ciclina D1 | CDK4/CDK6 | p16, p15, p18, p19 (INKS) p21, p27, p57 (CIP/KIP) |
| | Ciclina E | CDK2 | p21, p27, p57 (CIP/KIP) |
| S | Ciclina E | CDK2 | p21, p27 (CIP/KIP) |
| | Ciclina A | CDK2 | p21, p27 (CIP/KIP) |
| G2 | Ciclina A | CDK1 | p21, p27 (CIP/KIP) |
| M | Ciclina B | CDK1 | p21, p27 (CIP/KIP) |

Taula 1. Resum dels complexos ciclina-CDK i dels seus corresponents inhibidors en cada fase del cicle.

2. p27, ESTRUCTURA I FUNCIONS

2.1 p27, aspectes generals

La proteïna p27^{kip1} (p27), és una proteïna de 27 KDa, codificada en humans en el locus 12p13 en el gen CDKN1B i conté 3 exons que codifiquen per a una proteïna de 198 aminoàcids (aa). Va ser clonada per primera vegada a l'any 1994^{19,20}. Un tret característic és la seva expressió ubiqua en tots els teixits, a més de que encara que és un inhibidor del cicle cel·lular, la seva expressió no desapareix en les diferents fases del cicle, fet que indica que les funcions de p27 van més enllà de la regulació del cicle cel·lular.²¹

Donada la seva estructura terciària es classifica com a una proteïna intrínsecament desordenada,²² encara que conté algunes regions estructurades en la seva regió amino-terminal (NH₂). Aquesta característica proporciona a p27 la capacitat d'unir-se a múltiples lligands.

A la seva regió NH₂ trobem el domini KID (*Kinase Inhibitory Domain*) que és una regió conservada entre els membres de la família Cip/Kip. En el domini KID (aa 28-89) trobem a la vegada 3 subdominis: El subdomini d'unió a la ciclina (domini D1), el subdomini d'unió a la CDK (domini D2) i una regió que fa de pont entre els altres dos

(subdomini LH, *linker hèlix*, aa 38-60) que és un domini que tendeix a formar estructures helicoidals . Entre els aa 32-46 també trobem una senyal NES (*Nuclear Export Signal*), que junt amb la S10 i la R90 s'encarrega de reclutar les proteïnes necessàries per a l'exportació de p27 al citoplasma.^{23,24}

Per tal d'inhibir l'activitat de les CDKs, una porció del subdomini D2 de la p27 s'introdueix en el centre catalític de la CDK, competint d'aquesta manera amb l'ATP i bloquejant la transferència del fosfat als substrats. Els subdominis D1 i D2 es troben habitualment desestructurats i només es pleguen quan interactuen amb els complexos ciclins-CDK.²⁵

El domini central de la p27 és un domini ric en prolines (aa 90-96), regió típica d'interacció amb les proteïnes que contenen dominis SH3 (*Src homology 3*), amb la capacitat d'unir-se a una gran varietat de proteïnes com per exemple Grb2, un activador de la via de Ras que afavoreix la progressió de la fase G1.²⁶

Finalment, la regió carboxi-terminal (COOH) també és una regió intrínsecament desordenada, amb la capacitat d'unió a una gran varietat de proteïnes tals com RhoA, Rac, Estatmina i 14-3-3 i que també conté una senyal NLS (*Nuclear Localization Signal*), en els aa 152-168, d'importació al nucli cel·lular.²⁷ (**Figura 2**)

La regulació dels nivells i de l'activitat de p27 a la cèl·lula és altament diversa i compren regulacions transcripcionals i post-transcripcionals. Els nivells més alts de p27 els trobem en G0 i inicis de G1 i va disminuint la seva expressió després d'una estimulació mitogènica. Encara que la regulació transcripcional de p27 no té un gran importància a l'hora de controlar els nivells de p27 a la cèl·lula, un gran nombre de factors de transcripció tenen la capacitat de regular l'expressió de p27. Per exemple: FKHR-L1, AFX, FOXO, Sp1, E2F1 i Menin són activadors transcripcionals de p27, per altra banda c-myc, Id3 i Ap1 serien repressors transcripcionals. En el cas de c-myc, a més de reprimir el promotor del gen CDKN1B activa proteïnes com Ciclina D1, Cullin 1, i CSKB1 que incrementen la proteòlisi de p27.²⁸

En general, els nivells de p27 a la cèl·lula són principalment controlats per diverses modificacions post-transcripcionals, sent la més important la seva degradació per proteòlisi depenent d'ubiquitinització, la qual requereix que la p27 estigui fosforilada o acetilada en residus específics. Quan la p27 és al nucli, la fosforilació de la T187 a

INTRODUCCIÓ

càrrec dels complexos ciclina-CDK2 fa que la p27 sigui reconeguda per la proteïna Skp2, una subunitat de la SCF E3 ubiquitina ligasa (*S-phase kinase associated protein 1/ Cullin/Fbox*)(SCFSKP2) complex que fa que p27 es pugui ubiquitinitzar i es degradi via proteasoma.²⁹ També l'acetilació de p27 en el residu K100 a meitat de la fase G1 del cicle cel·lular, portada a terme per PCAF (*acetyl transferase p300/CBP associating factor*), indueix la seva ubiquitinització i degradació proteasomal al nucli.³⁰

Per altra banda, la fosforilació dels residus Y74 i Y88 del subdomini D2 de la p27 per diferents tirosina quinases com Src, provoquen un canvi conformacional en p27 que permet que la CDK sigui parcialment activa i que aquesta pugui fosforilar en la T187 i desencadenar la seva degradació.³¹

Una altra manera de regular la degradació i l'activitat de p27 és modificant la seva localització a través de la fosforilació en la S10. Aquesta fosforilació pot ser produïda per diferents quinases com MIRK, CDK5, AKT, Kis o ERK i facilita la unió de la proteïna CRM1 (exportin 1) encarregada de transportar p27 del nucli al citoplasma. La unió de CRM1 i p27 es produeix a la fase G1, quan p27 s'ha separat dels complexos ciclina/CDK ja que CMR1 interacciona amb p27 a través d'una regió similar a la de les CDKs. Un cop al citoplasma la p27 es pot quedar retinguda per les fosforilacions per part de quinases com AKT, SGK o AMPK a la T157 i T198, que fa que les proteïnes 14-3-3 mantinguin a p27 en el citosol. En aquest compartiment la p27 pot ser estabilitzada o degradada per les ubiquitina ligases KPC1 i KPC2.^{25,28,29}

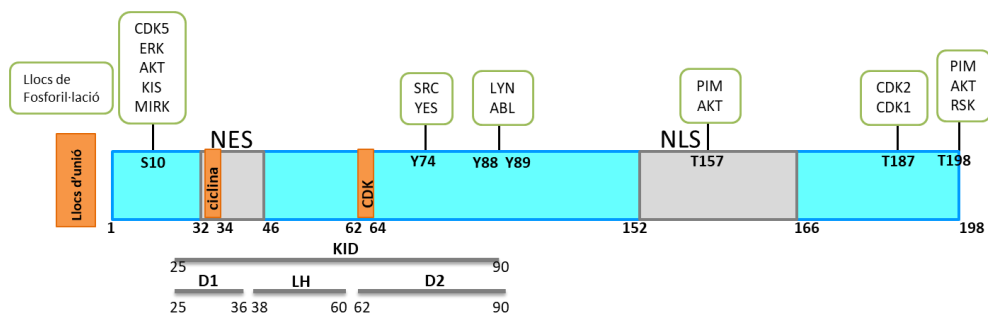


Figura 2. Esquema de la proteïna p27. Esquema dels principals dominis estructurals de p27, les principals proteïnes que interaccionen, els llocs d'unió i les possibles modificacions post-traduccionals per fosforilació.

La localització citoplasmàtica de la p27 té efectes tant en la reorganització de l'esquelet, la migració cel·lular a través de la seva interacció amb RhoA³² com en la

regulació de l'expressió gènica. Per això, una desregulació de la localització de p27 està relacionat amb l'aparició de malalties com càncer o malalties neurodegeneratives.

2.2 p27 com a regulador del cycle cel·lular

Com ja hem comentat en apartats anteriors, la p27 és considerada com un inhibidor del cycle cel·lular, encara que també, tal com comentarem a continuació, està clarament implicada en la promoció del cycle cel·lular.

Si una cèl·lula en G0 rep un senyal mitogenic, s'indueix la síntesi de les ciclines D i es promou la formació dels complexos Ciclina D-CDK4, i la cèl·lula entra en G1. En aquest cas la unió de p27 serveix com a xaperona, ja que ajuda a mantenir la unió de les dues subunitats, encara que aquest complex és inactiu fins que p27 sigui fosforilada per les tirosina quinases de la família SRC al residus Y74, Y88 i Y89. Aquestes fosforilacions faran que la CDK pugui tenir activitat i per que pugui fosforilar els seus substrats i induir la progressió del cycle cel·lular.³³

Durant la transició G1/S els complexos ciclinaE-CDK2 s'activaran i fosforilaran les "pocket proteins" induint l'entrada a la fase S.³⁴

Per tant, p27 actua com a regulador del cycle cel·lular, ja que en una primera fase inhibeix l'activitat dels complexos ciclina D-CDK4/6, però més endavant, una vegada fosforilada als residus específics, permet que aquests complexos ciclina D-CDK4 siguin actius i per tant puguin fosforilar els seus substrats i induir la progressió del cycle cel·lular.

2.3 p27 com a regulador transcripcional

Diferents evidències, com per exemple la seva localització nuclear i la interacció amb proteïnes que s'uneixen a la cromatina, ens porten a pensar que p27 pot jugar un paper com a regulador transcripcional.

En primer lloc, com que p27 inhibeix els complexos ciclina-CDK i aquests complexos fosforilen a les proteïnes de la família de pRB que reprimeixen l'expressió de gens

INTRODUCCIÓ

regulats per els factors de transcripció E2F, p27 està regulant a través d'aquest mecanisme la transcripció d'aquests gens.¹⁷

També s'ha vist que p27 pot unir-se a factors de transcripció (FT), com per exemple Myc i Sp1, impeding la interacció dels mateixos amb el promotor hTERT (*human telomerase reverse transcriptase*) i per tant inhibint l'expressió d'aquest gen en cèl·lules de glioma.²⁸

p27 pot promoure la diferenciació cel·lular en diferents teixits i això ho fa mitjançant la unió al FT Sp1 en el promotor del gen MBP (*myelin basic protein*) i promou la seva activació.³⁵ També estabilitza el FT Ngn-2 (neurogenin-2) i permet la transcripció de gens que promouen la diferenciació neural en el còrtex cerebral.³⁶ Per altra banda també està implicat en la repressió transcripcional del gen Sox2, un dels 4 FTs implicat en la obtenció de cèl·lules mare pluripotents induïdes (iPSCs) i en general en el manteniment i diferenciació de les cèl·lules mare neurals.³⁷

Per altra banda, en el nostre laboratori s'ha fet un extens treball per tal de identificar els possibles llocs d'unió de p27 a la cromatina. Es van realitzar experiments de ChIP-on-Chip en cèl·lules NIH3T3, que van permetre identificar 427 promotors gènics que associaven p27. Aquestes associacions es van confirmar mitjançant immunoprecipitacions de cromatina (ChIPs) seguits de PCR quantitativa (qPCR) per alguns gens en concret. La classificació funcional d'aquests gens que tenien promotors que s'associaven a p27 van permetre identificar una sèrie de funcions tals com: cicle cel·lular, respiració cel·lular, traducció de proteïnes, processament del RNA i *splicing* i transport de vesícules que podrien estar regulades per p27.³⁸

Posteriorment, es van realitzar anàlisis d'expressió gènica, mitjançant *microarrays*, en fibroblasts embrionaris de ratolí (MEFs) procedents d'animals WT i p27KO amb la finalitat de trobar quins gens es troben desregulats en absència de p27. Els resultats van revelar que un gran nombre dels gens identificats com possibles dianes de p27 en els anàlisis de ChIP-on-ChIP estan efectivament desregulats (principalment sobreexpressats) en els MEFs p27KO, reforçant la idea de que p27 pot comportar-se com un regulador transcripcional.³⁹

Adicionalment, experiments amb MEFs p27 Δ 51 (deleció en els 51 primers aa de p27) i p27CK- (mutant de la regió d'unió als complexos ciclina-CDK) també mostraren que

alguns dels gens diana estan sobre-expressats. No obstant, en els MEFs p27CK- també es troba un grup de gens amb una expressió disminuïda. Això ens indica que la funció de p27 com a regulador transcripcional és a través de diferents mecanismes i en alguns casos depèn de la seva capacitat de regular l'activitat dels complexos ciclines-CDKs.³⁸

Analitzant més en profunditat com p27 pot regular la transcripció, es van efectuar experiments de CHIP-seq, en el que es fa un CHIP de p27 i totes les seqüències que se n'obtenen s'anoten al gen més proper. En aquests experiments, es van detectar uns 1900 llocs d'unió de p27 a la cromatina. D'aquests, un 60% estaven anotats a gens que codifiquen per proteïnes, entre un 23-28% estaven anotats a ncRNAs (*non-coding RNAs*) i entre un 12-18% estaven anotats a pseudogens. Aquests llocs d'unió es distribueixen de la següent manera: entre un 64-74% eren zones inter-gèniques distals, entre un 24-31% corresponien a zones intròniques i només entre un 0.3% i un 0.8% són zones promotores properes als gens.^{40,41}

2.3.1 Factors de transcripció que s'associen a p27

Com que no hi ha cap evidència de que p27 tingui una unió directa al DNA, la unió de p27 a la cromatina ha de ser a través de proteïnes intermediàries. Per tal d'identificar aquestes proteïnes, es van analitzar les seqüències de les regions promotores que unien p27 en els experiments de CHIP-on-chip i es va observar que p27 s'uneix a regions de la cromatina que contenen motius d'unió a FTs com E2F4, i membres de la família Ets, com Ets1. La associació directa de p27 a aquests FTs va ser confirmada amb experiments d'interacció entre les proteïnes. Així doncs, p27 s'associa a aquests FTs en regions reguladores de determinats gens i d'aquesta manera p27 participaria en la regulació de la seva transcripció.³⁸ Posteriorment s'ha determinat la unió de p27 a altres factors de transcripció com Pax4, Pax5, AHR, Ap2 α , Ap2 γ , Ngn2 i MyoD.^{40,41}

En el nostre grup es va treballar intensament en la identificació del mecanisme a través del qual p27 regula la transcripció en col·laboració amb E2F4. E2F4 s'associa amb p130 en cèl·lules quiescents per a formar un complex repressor transcripcional, juntament amb altres co-repressors com HDACs i mSin3A, en els promotors dels gens involucrats en el cicle cel·lular.⁴² En aquestes regions E2F4 es troba unit al DNA. Tot i

INTRODUCCIÓ

que p130 no té unió directa al DNA, es necessita de la presència de p130 per a que E2F4 es pugui unir en aquestes regions³⁸. D'aquesta manera, durant la fase G1 els gens necessaris per a la replicació del DNA i les següents fases del cicle es troben reprimits i només s'activen quan es progressa en el cicle o en situacions de dany al DNA. Com ja hem comentat abans, durant la progressió del cicle cel·lular la fosforilació i hiperfosforilació de p130 i pRB per part dels complexos ciclina-CDK fa que es perdi aquesta interacció i s'activa la transcripció d'aquests gens.⁴³ També hi ha altres gens que es troben regulats pels complexos E2F4/p130, que no estan relacionats amb el cicle cel·lular, com per exemple Sox2, un gen essencial per el manteniment de l'estat de pluripotència d'una cèl·lula mare.⁴⁴

S'ha demostrat que p27 interactua amb E2F4, p130, HDACs i mSin3A. En cèl·lules p130KO, E2F4 no es troba unit a les regions repressores i p27 tampoc pot interactuar en aquestes regions. Concretament p27 interactua amb E2F4/p130 per la seva regió COOH, participant en la regulació transcripcional d'aquests gens. Per altra banda, l'extrem NH₂ de p27 interacciona amb els complexos ciclina-CDK. Això porta a pensar que p27 fa de proteïna *scaffold*, és a dir, s'encarrega de reclutar les ciclins-CDK en els complexos repressors, al inici de la G1, afavorint que quan p27 sigui fosforilada en els residus Y74 i Y88 i les CDKs siguin actives, aquestes puguin fosforilar a p130.⁴³

2.3.2 Programes transcripcionals regulats per p27

L'associació de p27 als complexos E2F4/p130, i a altres FTs, obren un gran ventall de programes transcripcionals que poden ser regulats per p27.³⁸ Els resultats d'un *microarray* d'expressió realitzat en cèl·lules quiescents MEFs p27KO vs MEFs WT ens van permetre determinar els programes transcripcionals regulats per aquesta proteïna. Es van identificar 4022 gens desregulats en les cèl·lules deficientes en p27. D'aquests 1844 presentaven una expressió incrementada i 2178 reduïda. La classificació funcional d'aquests gens van revelar els mateixos resultats que els experiments ChIP-on-chip: gens implicats en funcions com el processament del mRNA i *splicing*, la divisió cel·lular, l'organització mitocondrial i la respiració i transport de vesícules. A més gens implicats en processos d'adhesió cel·lular, diferenciació neural, senyalització cèl·lula-cèl·lula i transport d'ions també van ser identificats en aquests

anàlisis. Per altra banda, la classificació dels gens per vies de senyalització (anàlisi de *KEGG Pathways*) va revelar possibles vies en les que podria estar implicada la p27. Aquestes vies de senyalització estan implicades en el metabolisme: energètic, del glutatí, dels àcids grassos, del piruvat o d'aminoàcids. Altres vies com el desplaçament axonal, i mecanismes de reparació del DNA (*mismatch repair* i *nucleotide excision repair*) també poden estar regulades per p27. En quant a patologies, els resultats van revelar que p27 està implicat en diferents patologies com el càncer i també en malalties neurodegeneratives com Alzheimer, Parkinson i Huntington.³⁹

En el cas concret de la malaltia de Parkinson (MP), els resultats del *microarray* d'expressió ens mostren que un nombre significatiu de gens relacionats amb aquesta malaltia es troben alterats en absència de p27. Sorprenentment, es va detectar un increment important de l'expressió del gen SNCA, que codifica per a la proteïna α -sinucleïna (α -SYN). L' α -SYN és una proteïna molt important en la MP, ja que la seva agregació i acumulació és un dels trets distintius (*hallmarks*) d'aquesta malaltia. Els resultats també mostren una disminució de l'expressió d'un nombre important de gens components de diferents subunitats de la cadena respiratòria, sobre tot del complex I (Ndufs), fet que implicaria una disfunció mitocondrial i per tant generació d'estrès oxidatiu en les cèl·lules deficientes en p27. La disfunció mitocondrial i l'estrès oxidatiu és un altre tret característic de la MP. Finalment, en aquestes cèl·lules deficientes en p27 es troba incrementada l'expressió d'un grup de citoquines (per exemple CXCL1 i CXCL5) que podrien generar reaccions inflamatòries, una altra característica bàsica de la MP (Figura 3).

| α -SYN (Patologia de Lewy) | | | Respiració i biogènesi mitocondrial (Estrès oxidatiu i disfunció mitocondrial) | | | Quimiocines (Neuroinflamació) | | |
|--------------------------------------|-----------|-------------|---|-----------|-------------|----------------------------------|-----------|-------------|
| Gen | Regulació | Fold change | Gen | Regulació | Fold change | Gen | Regulació | Fold change |
| Snca | Up | 8,52 | Ndufb9 | Down | 1,95 | Lect1 | Up | 66,48 |
| | | | Ndufb4 | Down | 1,86 | Cxcl15 | Up | 54,82 |
| | | | Ndufa1 | Down | 1,81 | Cxcl1 | Up | 17,51 |
| | | | Ndufs6 | Down | 1,70 | Cxcl5 | Up | 7,09 |
| | | | Ndufa8 | Down | 1,62 | | | |
| | | | Ndufa9 | Down | 1,56 | | | |
| | | | Ndufs3 | Down | 1,51 | | | |

Figura 3. Llista de gens implicats en la MP desregulats en cèl·lules p27KO. Gens relacionats amb cadascun dels *Hallmarks* de la MP que estan desregulats en les MEFs KOp27 i en quin nivell (*fold change*) es troben sobreexpressats (vermell) o reduïts (verd)

Així doncs, en resum la pèrdua de p27 genera canvis en l'expressió gènica que portaria a canvis moleculars semblants en els observats en els pacients de MP.

3. LA MALALTIA DE PARKINSON

3.1 Característiques generals

La MP va ser descrita per primera vegada per James Parkinson a l'any 1817, a la publicació "*Essay on the Shaking Palsy*".⁴⁵ Encara que no va ser fins l'any 1872 quan Jean-Martin Charcot i els seus estudiants van caracteritzar i descriure l'espectre clínic de la malaltia, i van fer servir per primera vegada el nom de "malaltia de Parkinson".⁴⁶

La MP està dins del que denominem malalties neurodegeneratives, és a dir, malalties que cursen amb una pèrdua progressiva de neurones del sistema nerviós. En aquest cas les neurones que degeneren són les neurones dopaminèrgiques d'una regió molt concreta del cervell, la *Substancia nigra pars compacta* (SNpc). Aquesta zona és una porció heterogènia del mesencèfal i un element important del sistema de ganglis basals, encarregats del control de les accions i del comportament dirigit a objectius. S'ha de tenir en compte però que moltes altres regions del cervell també es troben afectades.

És la segona malaltia neurodegenerativa més comú, només darrere de la malaltia d'Alzheimer. Encara que fa més de 200 anys que es va començar a caracteritzar aquesta malaltia, a dia d'avui continua sent una malaltia crònica, progressiva i incurable. Epidemiològicament, afecta entre un 2-3% de la població major de 65 anys. Només un 10% de malalts de Parkinson són considerats malalts d'origen genètic, és a dir, l'alteració o mutació d'un únic gen els hi provoca la malaltia, i cursen amb uns signes i símptomes molt concrets. Com que la majoria de malalts de Parkinson és d'origen idiopàtic, es considera una malaltia multifactorial i amb gran influència de l'ambient. Això també explica l'ampli espectre clínic que presenta aquesta malaltia.⁴⁷

L'edat d'aparició de la malaltia de Parkinson és sobre els 50-60 anys. Quan aquesta apareix abans dels 45 anys s'ha de considerar que no sigui MP d'origen genètic. La característica clínic bàsica de la MP és la bradicinèsia (alentiment del moviment), acompanyada de tremolor i rigidesa. Aquests símptomes motors avancen amb la malaltia i deriven en postura anormal, inestabilitat postural i bloqueig motor. Encara que els símptomes motors són el tret principal de la malaltia i són causats per la pèrdua

de neurones de la SNpc, hi ha un gran nombre de símptomes no motors que apareixen abans que els motors, fins i tot una dècada abans, i que poden ser bones eines de diagnòstic primerenc de la malaltia. Aquests símptomes són, depressió, dolor, discapacitat cognitiva (demència, al·lucinacions, dèficits de memòria), símptomes sensorials (hipòsmia i visió del color deteriorada), trastorns de la son (trastorn de la conducta del son REM) i disfunció autonòmica (restrenyiment, hiperreflexió de la bufeta, disfunció erèctil i hipotensió ortostàtica) (Figura 4).⁴⁸

La progressió de la malaltia és caracteritzada per l'empitjorament dels símptomes motors, ja que només hi ha tractaments simptomàtics que no aturen la progressió de la malaltia. El tractament *Gold Standard* és la L-DOPA, precursor de la dopamina que compensa la dopamina perduda per la mort de les neurones de la SNpc. Els símptomes no-motors no es veuen afectats amb aquest tractament.⁴⁸

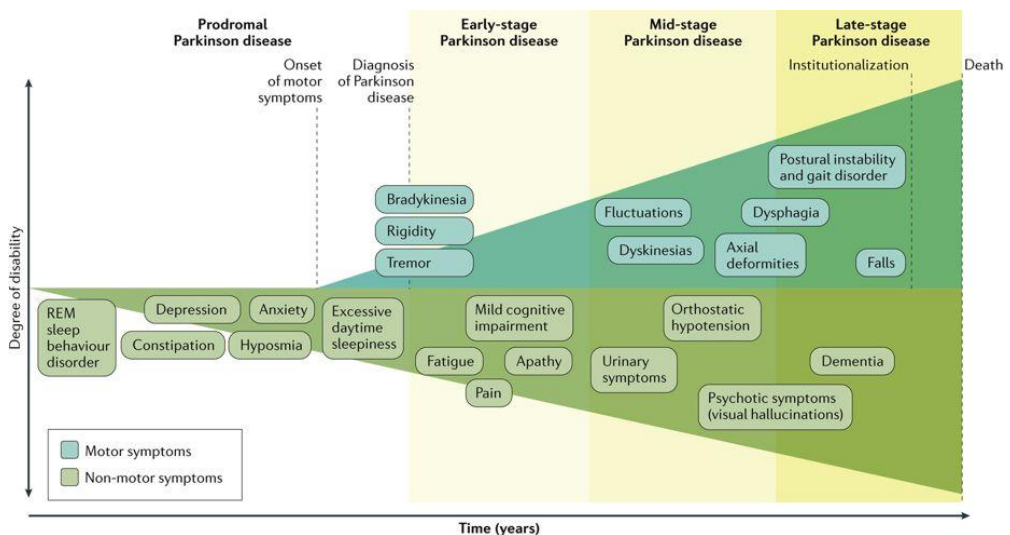


Figura 4. Síntomes clínics associats a la malaltia de Parkinson i la seva aparició en el temps. El diagnòstic de la MP normalment té lloc durant l'aparició dels símptomes motors (*Early-stage Parkinson disease*) entre els 50-60 anys, però pot ser precedit per una fase prodròmica que pot ser d'uns anys o fins i tot dècades, que es caracteritza per uns símptomes no-motors específics (*Prodromal Parkinson disease*). Al llarg de la malaltia, els símptomes no-motors són cada cop més freqüents i evidents, però poden estar presents en un grau variable al llarg de totes les etapes de la MP. La discapacitat progressiva de la malaltia de Parkinson ve donada per la combinació d'aquests problemes no-motors amb la severitat creixent de les característiques motrius, el desenvolupament de complicacions motores induïdes per la L-DOPA (*Mid-stage Parkinson disease*) i la evolució de les discapacitats motores que no responen al tractament amb la L-DOPA, com ara la inestabilitat postural, problemes de la marxa i la disfàgia (*Late-stage Parkinson disease*). REM: *Rapid Eye Movement*.

INTRODUCCIÓ

La mortalitat no es veu incrementada durant els primers 10 anys des de el seu diagnòstic, però després comença a incrementar arribant a ser el doble comparat amb la població general. Generalment, la mortalitat acaba sent donada pels símptomes no motors o la demència. Els símptomes no motors també avancen amb la malaltia i acaben sent els majors determinants del empitjorament i de la discapacitat, entre aquests destaquem la demència, que ocorre en un 83% dels pacients després de 20 anys de duració de la malaltia.^{47,49}

Tot i que hi ha un gran nombre de signes i símptomes per al diagnòstic de la MP, el *Gold Standard* en el diagnòstic és post-mortem. Anatomopatològicament, els cervells dels malalts presenten la degeneració de la SNpc i la patologia de Lewy.⁵⁰

El principal factor de risc de la MP és la edat. També hi ha altres factors de risc com el sexe masculí, amb una ratio home-dona de 3:2, algunes ètnies tenen més predisposició a altres, tenir antecedents de Parkinson a la família, antecedents de melanoma o lesions cerebrals traumàtiques. També s'ha vist per estudis de GWAS (*Genome Wide Association Studies*) com certes mutacions o alteracions donen una predisposició o una protecció a la malaltia. Per altra banda, els factors ambientals juguen un paper molt important. L'exposició a pesticides com el paraquat o la rotenona, així com a solvents com el percloretilè o el tricloroetilè provoquen una disfunció de l'activitat mitocondrial i suposen un increment del risc de patir la malaltia. Per últim, el descobriment d'un producte que es produeix en l'elaboració del fàrmac meperidina, anomenat MPTP (*1-Metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina*), causa parkinsonisme irreversible, amb tota la clínica de la MP. El MPTP és un inhibidor del complex I de la cadena respiratòria.

També hi ha una sèrie de factors que en estudis longitudinals han resultat ser factors associats a una disminució del risc de MP, consum de tabac, consum d'alcohol, consum de cafeïna, factors genètics, activitat física i ús de AINES (Anti-Inflamatoris No Esteroidals).^{50,51}

3.2 Genètica de la MP

Fins a un 10% de malalts de Parkinson presenten una herència mendeliana que pot ser autosòmica dominant o recessiva. Dins d'aquest grup, trobem diferents gens afectats que donen fenotips diferents dintre de l'ampli espectre que es considera com a MP. A

dia d'avui s'han identificat fins a 28 regions cromosòmiques diferents relacionades amb la MP, i 6 gens que es troben mutats. La identificació d'aquests gens i la caracterització de la MP d'origen monogènic, també és crucial en el descobriment de l'origen de la malaltia de tots els malalts considerats esporàdics. Els gens identificats són: SNCA (α -sinucleïna) i LRRK2 per a les formes autosòmiques dominants i PINK1, PARK7 (DJ-1), ATPasa tipus 13A2 (ATP13A2) i PARK2 (Parkina) que segueixen una herència autosòmica recessiva.^{48,51}

En el cas de les mutacions a PINK1, DJ-1 i Parkina, totes tres tenen una repercussió en mecanismes involucrats en l'estrès oxidatiu, i presenten una clínica molt semblant. Es presenta pèrdua neuronal i gliosis, però no compten amb Patologia de Lewy. En contrast, les mutacions al gen SNCA provoquen una MP d'aparició i progressió més ràpida, amb una presència abundant de Cossos de Lewy. D'altra banda les mutacions a LRRK2 tenen una penetrància d'entre el 30-70%, a on els pacients arriben a debutar fins i tot als 80 anys, i no acostuma a cursar amb demència. La majoria d'aquests malalts presenta patologia de Lewy. Finalment les mutacions a ATP13A2 causen una forma atípica de MP amb demència anomenat també síndrome Kufor-Rakeb.⁵¹

3.3 Patologia

Com ja hem comentat en l'apartat anterior, la MP i els seus símptomes es produeixen per una pèrdua progressiva de neurones dopaminèrgiques de la SNpc. En talls post-mortem de pacients de Parkinson, es pot apreciar uns cúmuls citoplasmàtics denominats Cossos de Lewy, que presenten uns alts nivells d' α -sinucleïna (α -SYN). En els Cossos de Lewy també trobem grans quantitats de ubiquitina, proteïnes d'unió a la ubiquitina i p62.⁵² En un treball molt recent es descriu que els Cossos de Lewy contenen en el seu interior fragments de membranes lipídiques i orgànuls com els mitocondris o autofagosomes distorsionats, conjuntament amb formes no fibril·lars d' α -SYN. Això suggereix que l'alteració del tràfic intracel·lular d'orgànuls pot ser un element clau en la etiologia de la MP.⁵³ S'ha vist que l' α -SYN s'acumula també en els processos neuronals i en les neurites (neurites de Lewy). La pèrdua de neurones nigroestriatal és un fet comú en diferents patologies parkinsonianes, que poden cursar amb o sense agregació d' α -SYN. D'altra banda, la presència de Cossos de Lewy

inhibitòria, el que resulta en un retràs en l'inici de l'activitat motora. (Figura 5)

En estadis primerencs de la malaltia, la pèrdua de les neurones dopaminèrgiques es troba només en la regió ventrolateral de la SN, i aquesta es va propagant a altres regions de neurones dopaminèrgiques del mesencèfal. A mesura que la MP avança s'afecten també les neurones del *Locus Coeruleus* (noradrenèrgiques), del nucli rafe (serotoninèrgiques) i dels nuclis basals i en nucli dorsal motor del vague (colinèrgiques).

Segons el model proposat per Braak que està representat a la **Figura 6**⁴⁸ la patologia de Lewy progressa en el temps i l'espai. Comença pel sistema nerviós perifèric i progressivament s'afecten zones del sistema nerviós central en direcció caudal-rostral. Aquesta progressió correlaciona amb l'evolució clínica dels pacients. En els estadis 1-2 és quan comencen els símptomes pre-motors, en l'estadi 3 trobem afectació motora deguda a la falta de dopamina nigroestriatal i en els estadis 4-6 apareixen els símptomes no motors i els problemes cognitius.⁵⁶ A més, postula que la MP té dos orígens, un al bulb olfactori i l'altre al sistema gastrointestinal i que van avançant fins arribar al sistema nerviós central (SNC).

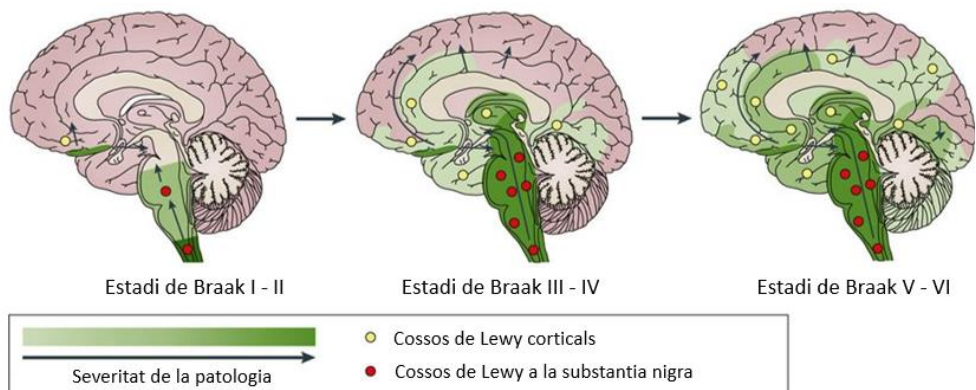


Figura 6. Representació de la teoria de Braak de la progressió i agregació de l'α-SYN. En els estadis de Braak I-II, les inclusions d'α-SYN es troben en les neurones colinèrgiques i monoaminèrgiques del tronc cerebral inferior i es correspon amb els casos asimptomàtics. En els estadis III-IV es troben infiltrats a neurones similars al cervell mitjà i al cervell anterior, i es correspon amb aquelles persones amb símptomes motors de la MP. En els estadis V-VI es troben aquestes estructures en regions cerebrals límbiques i neocorticals, també correlaciona amb la progressió de la malaltia.

INTRODUCCIÓ

La patologia de Lewy és un bon marcador de neurodegeneració en la MP. Es creu que aquests Cossos de Lewy poden ser la causa de la pèrdua neuronal, encara que no és l'únic tret característic de la malaltia i també hi ha altres components que poden ocasionar aquesta mort. De fet, hi ha una sèrie de característiques principals de la MP.⁵¹ Aquestes característiques o *hallmarks* són les següents:

- Patologia de Lewy, causada per una disfunció en l'agregació de l' α -SYN. Els Cossos de Lewy són formacions heterogènies. Els Cossos de Lewy clàssics són formacions citoplasmàtiques, d'entre uns 8-30 μ m de diàmetre, amb un centre eosinofílic. En una tinció hematoxilina/eosina els Cossos de Lewy es veuen com un centre dens envoltat d'un halo. També hi ha altres dos tipus de Cossos de Lewy, els corticals i els denominats *pale bodies* (cossos pàl·lids), que es creuen que són els precursors dels Cossos de Lewy.⁵⁷
- Disfunció lisosomal i proteasomal, aquests mecanismes són essencials en l'eliminació de proteïnes mal plegades, mecanismes controlats per Parkina i PINK-1. La alteració de la degradació de l' α -SYN provoca la seva acumulació en els orgànuls cel·lulars. D'altra banda el receptor lisosomal ATP13A2 també és molt important en el procés d'acidificació lisosomal i també disminueix la degradació de les proteïnes.⁵⁸
- Disfunció mitocondrial, causat sobretot per una disminució de l'activitat del complex I de la cadena respiratòria que pot provocar un increment d'estrès oxidatiu. Evidències d'això és l'exposició a pesticides i el MPTP. Parkina, DJ-1 i PINK1 són molt importants en la resposta a l'estrès oxidatiu i en el manteniment dels mitocondris. La disfunció mitocondrial també dona pas a fenòmens de mort cel·lular per apoptosi.^{48,51}
- Neuro-inflamació: La neuro-inflamació també juga un paper molt important en el desenvolupament de la MP, encara que no se sap si es causa o conseqüència de la mateixa. La micròglia és una població del sistema nerviós central que s'encarrega de la resposta immune innata. Quan hi ha un estrès lleu, la micròglia s'activa i s'alliberen citocines antiinflamatòries i factors de creixement. Quan l'estrès és més greu, s'alliberen citocines pro-inflamatòries que recluten altres cèl·lules del sistema immune i altres factors per aconseguir eliminar el patògen. Això produeix un increment de l'estrès oxidatiu i la mort cel·lular.⁵¹

- Homeòstasi del calci, ferro i altres ions: Les neurones dopaminèrgiques són de les neurones que requereixen més energia i han de ser capaces de mantenir el balanç energètic, això les fa extremadament vulnerables a la homeòstasi del calci. Mutacions a PINK1 fan que s'alteri el potencial de membrana, i es veu afectada la supervivència cel·lular. A més, les neurones dopaminèrgiques són extremadament sensibles a increments oscil·latoris de calci.⁵¹

En el cas del ferro, se sap que les neurones dopaminèrgiques apoptòtiques contenen molts radicals lliures que interaccionen amb el ferro, produint els radicals lliures d'oxigen (ROS) que més dany cel·lular causen, els radicals hidroxil. Addicionalment, la SN és la regió del cervell on hi ha més quantitat de ferro, degut a que la neuromelanina té capacitat d'unir-se al ferro. Aquest fet les fa més vulnerables.⁵¹

Com ja hem comentat en l'apartat anterior, els resultats previs del nostre laboratori mostren que una disminució dels nivells de la proteïna p27 poden produir alteracions moleculars semblants a les produïdes en el procés de la MP: expressió i agregació d' α -SYN, disfunció mitocondrial i neuro-inflamació.

En aquesta tesi ens centrem en el paper de p27 en la regulació de la transcripció del gen SNCA i en l'agregació de l' α -SYN.

3.4 Models animals i cel·lulars en la recerca de la MP

Un dels majors reptes en la recerca de la MP, és trobar un model animal que reproduïxi fidelment tota la simptomatologia i les alteracions observades en la malaltia. La possibilitat de tenir un model animal que recapituli tots els passos de la malaltia és essencial per a la obtenció d'un bon tractament de la mateixa.

Els models animals es classifiquen en diferents subtipus. Tenim els models basats en neurotoxines, entre els que destaquen la 6-OHDA (*6-hydroxydopamine*) i el MPTP. La 6-OHDA és un compost que no travessa la barrera hematoencefàlica i per tant ha de ser injectat directament en la zona del cervell d'interès. Aquest compost provoca una pèrdua de fins al 60% de les neurones TH (tirosina hidroxilasa) positives, però no dona la patologia de Lewy. El MPTP és considerat el *Gold Standard* com a model en la

INTRODUCCIÓ

recerca de la MP, ja que recapitula molts dels *hallmarks* de la malaltia, estrès oxidatiu, espècies reactives d'oxigen (ROS) i neuro-inflamació en micos i ratolins, encara que no en rates, ja que són resistents a aquesta toxina. No obstant, els animals tractats amb aquest tòxic no presenten la Patologia de Lewy. El MPTP creua la barrera hematoencefàlica i els astròcits el metabolitzen a MPP+ que és el compost que inhibeix el complex I de la cadena respiratòria mitocondrial.^{59,60}

També hi ha models basats en pesticides/herbicides com la rotenona i el paraquat. El paraquat (*N,N'*-dimetil-4-4'-bipitidinium) és un herbicida àmpliament utilitzat en agricultura i té una estructura molt similar a la del MPP+, no obstant aquest compost només s'ha vist que incrementa l'estrès oxidatiu i els radicals lliures d'oxigen, encara que en ratolins no queda clar si arriba a degenerar les neurones dopaminèrgiques de la SNpc. Hi ha molts pocs casos de MP deguda a aquest compost. La rotenona és herbicida i insecticida, és capaç de creuar la barrera hematoencefàlica com el MPTP i recapitula més *hallmarks* de la MP, bloqueig del complex I, neuro-inflamació, agregació de l' α -SYN, formació de Cossos de Lewy, alteracions en la conducta, estrès oxidatiu i problemes gastrointestinals. L'únic problema de la rotenona és que encara que augmenta l'estrès oxidatiu de les neurones dopaminèrgiques, no causa la mort de les mateixes i els dèficits de dopamina característics de la malaltia. A més, no hi ha cap cas documentat de MP deguda a la rotenona en humans.^{59,60}

Tots aquests models són molt útils per buscar fàrmacs que frenin la mort neuronal o fàrmacs per tractar els símptomes de la malaltia. No obstant, són models on la mort neuronal és produeix de manera aguda i molt ràpida, i no recapitula la patologia molecular de la MP, ja que en cap d'ells, excepte en el cas de la utilització de la rotenona hi apareixen Cossos de Lewy. En general, no són bons models per a la identificació de fàrmacs que puguin retardar o revertir la malaltia.

Addicionalment hi ha altres tipus de models animals, basats en provocar neuro-inflamació (LPS agut i crònic) i models genètics en diferents espècies, utilitzats sobretot en la investigació de la MP d'origen genètic, però cap d'ells s'arriben a reproduir amb fidelitat tots els *hallmarks* de la MP.⁵⁹

En comparació amb els models animals, amb els models cel·lulars podem arribar a desenvolupar la patologia de manera més ràpida i més econòmica. L'estudi de les

neurones dopaminèrgiques és molt important per arribar a entendre com es produeix la malaltia, però també la intervenció d'altres tipus cel·lulars com la glia o els astròcits han de ser considerats. En els models cel·lulars podem induir la degeneració de neurones dopaminèrgiques o la formació d'agregats d' α -SYN.

La línia cel·lular SH-SY5Y que prové d'un neuroblastoma humà i la línia PC12 de rata, han sigut molt utilitzades i encara es fan servir en l'actualitat. Produeixen l'alliberament de catecolamines i es poden diferenciar a neurones, adquirint les seves propietats. Com són línies cel·lulars immortalitzades són fàcilment cultivables i genèticament manipulables amb shRNAs o altres tècniques de silenciament o sobre-expressió gènica. Són bones opcions per estudiar l'efecte directe de fàrmacs o per trobar els orígens de la malaltia. Concretament, la línia SH-SY5Y encara que prové d'un tumor, manté intacta la majoria de les vies moleculars alterades en la MP, són cèl·lules que tenen un perfil adrenèrgic i dopaminèrgic. Aquestes característiques i el fet de que són d'origen humà és el que fa que siguin àmpliament utilitzades com a model en la recerca de la MP.^{61,62}

La línia cel·lular LUHMES (*Lund human mesencephalic*) és un subclon de la línia MES2.10 generada a partir de teixit mesencefàlic humà. Aquesta línia porta un vector que expressa l'oncogen myc sota el control de tetraciclina. Sense la tetraciclina, les cèl·lules proliferen degut a l'expressió de myc, al afegir tetraciclina es diferencien a neurones que no tenen capacitat de dividir-se i presenten característiques dopaminèrgiques.⁶³

Una alternativa a les línies immortalitzades són els cultius primaris, de neurones de ratolins o rates, d'embrions o d'animals acabats de néixer. Aquests cultius són una barreja de neurones entre les que s'obté un 5-10% de neurones dopaminèrgiques. Aquestes cèl·lules es poden mantenir en cultiu encara que per un temps limitat i també poden ser manipulades genèticament. Hi ha la opció d'obtenir directament les cèl·lules de ratolins modificats genèticament.⁶³

L'ús de cèl·lules progenitores diferenciades ofereix avantatges respecte als cultius primaris ja que es poden generar a més escala que les neurones primàries i a més podem utilitzar cèl·lules d'origen humà. Per contra, els models de neurones primàries són més semblants a la situació *in vivo* ja que a més de les neurones dopaminèrgiques

INTRODUCCIÓ

en aquests cultius tenim altres tipus cel·lulars, presents en el teixit, i que interaccionen amb aquestes neurones modulant les seves funcions.

Donada la importància dels Cossos de Lewy i de l'agregació de l' α -SYN en la MP, la generació d'agregats o de les diferents conformacions de l' α -SYN i Cossos de Lewy en cultius cel·lulars suposa un bon model per estudiar la patogènesi tant de la MP com d'altres sinucleinopaties, així com per estudiar possibles teràpies dirigides a les mateixes.

4. α -SINUCLÈINA

4.1 Aspectes generals

L' α -SYN és una proteïna petita, soluble i altament conservada entre espècies. Es troba codificada en el gen SNCA en 4q22.1 en humans i en el cromosoma 6, (B3|29.15 cM) en ratolí. La isoforma més predominant d'aquesta proteïna consta de 140 aminoàcids i té un pes molecular d'uns 14 kDa. Té la capacitat d'adoptar diferents conformacions depenent de l'ambient on es trobi i això li proporciona la capacitat d'interactuar amb diferents proteïnes i lípids. Es localitza majoritàriament en el sistema nerviós central, concretament en les terminacions pre-sinàptiques. També es troba present en els glòbuls vermells i en altres regions fora del sistema nerviós central. Encara que la seva funció no està del tot establerta, està involucrada en diferents processos com el manteniment de les sinapsis, l'homeòstasi mitocondrial, la funcionalitat del proteasoma, el metabolisme de la dopamina i l'activitat xaperona.^{50,64}

L' α -SYN pertany a la família de les sinucleïnes, on trobem l' α -sinucleïna, la β -sinucleïna i la γ -sinucleïna. L' α -SYN consta de 3 dominis, un domini NH₂ (aa 1-60), un domini central NAC (aa 61-95) i un domini COOH (96-140). El domini NH₂ conté 6 repeticions del motiu KTK(E/Q)GV, que són dominis d'unió a lípids i formen hèlix amfipàtiques. Les mutacions conegudes fins a la data del gen de SNCA sempre són en aquest domini NH₂. El domini NAC té un alt contingut d'aminoàcids hidrofòbics, donant-li a l' α -SYN la seva capacitat d'agregació. En aquest domini trobem la regió entre els residus 71-82 que és específica de l' α -SYN i és l'element clau en el procés d'agregació, concretament en la fibril·lació. Aquest motiu no és present en els altres dos membres de la família.

Finalment, el domini COOH conté seqüències riques en prolina, aspartat i glutamina, sent aquesta la part menys conservada entre espècies.⁶⁴ (Figura 7)

Les mutacions o alteracions de l' α -SYN són molt variades i les mutacions en el gen SNCA causen una forma autosòmica dominant de parkinsonisme. Les alteracions de l' α -SYN es recullen en un conjunt de malalties anomenades sinucleinopaties entre les que destaca la MP, però també la atròfia multisistèmica, la malaltia de Parkinson amb demència (PDD) i la demència de Cossos de Lewy.

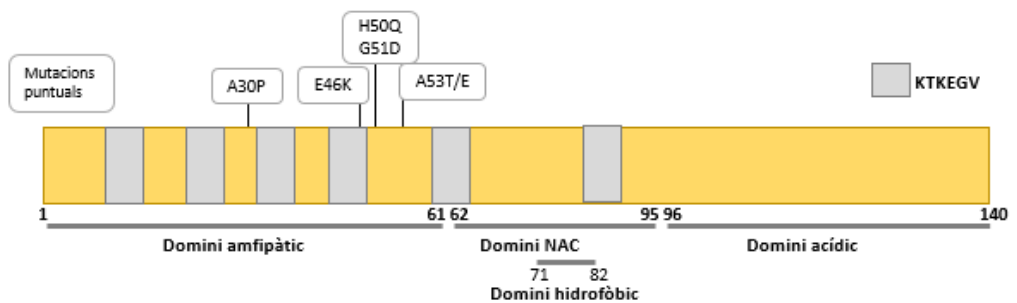


Figura 7. Esquema de la proteïna l' α -SYN. Esquema dels principals dominis estructurals de l' α -SYN i les principals mutacions del gen que provoquen MP d'origen genètic. Els quadres de color gris representen el motiu que forma les hèlix alfa.

4.2 Proteòstasi de l' α -sinucleïna

L' α -SYN existeix en un balanç dinàmic entre la seva estructura monomèrica i oligomèrica, normalment en forma de tetràmer, encara que la seva capacitat de formar fibril·les no és gaire elevada en situacions fisiològiques. Les mutacions patològiques del gen SNCA afecten a aquesta dinàmica d'agregació. Per tant qualsevol factor que pugui actuar contra la proteòstasi de l' α -SYN podria promoure la seva fibril·lació, i acabar formant els Cossos de Lewy.

L' α -SYN adquireix propietats neurotòxiques quan es passa de la forma soluble als oligòmers, i posteriorment aquests es combinen per a formar proto-fibril·les i finalment les fibril·les insolubles que acaben donant pas a la patologia de Lewy (Figura 8)⁶⁵. Aquesta ruptura del balanç i la proteòstasi de l' α -SYN pot ser donada per un excés en la producció d' α -SYN, així com per mutacions puntuals que afecten al seu

INTRODUCCIÓ

plegament, oligomerització o altres mecanismes moleculars encarregats de degradar l' α -SYN nativa o mal plegada. De manera progressiva amb l'edat, hi ha un declivi en els processos de proteòstasi que també juga un paper principal en l'acumulació de l' α -SYN.^{48,65}

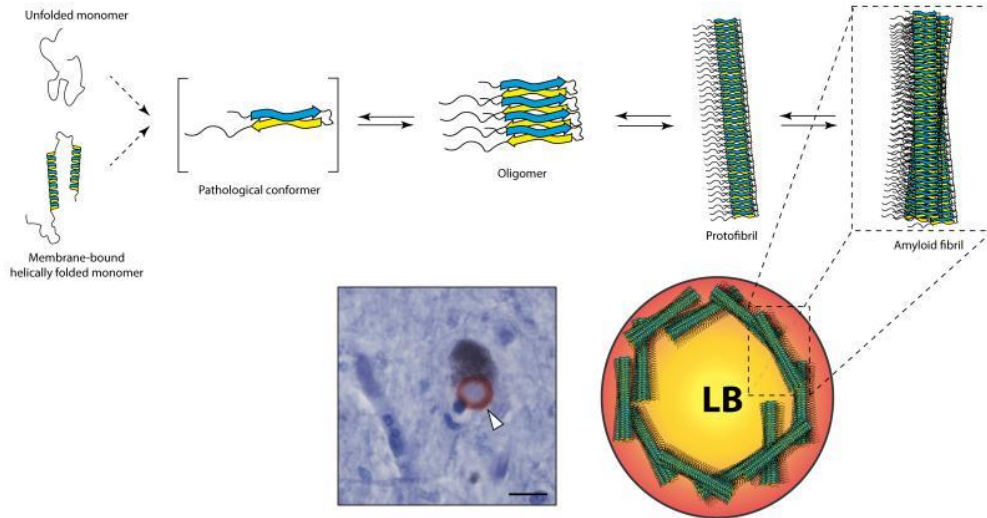


Figura 8. Resum esquemàtic de la via d'agregació de l' α -SYN. L' α -SYN existeix en diferents formes conformacionals. Com a mínim existeixen dues isoformes estructurals: la forma nativa sense plegament i la forma rica en hèlix que presenta unió a membranes. Les dues isoformes poden patir canvis estructurals que resulten en la formació i ensablament de làmines β . A partir d'estudis *in vitro*, hi ha evidències de que l' α -SYN es troba en un equilibri dinàmic on el monòmer es pot agrupar primer en diversos tipus d'espècies oligomèriques petites que es poden estabilitzar mitjançant interaccions de làmines β i després en protofibrils insolubles de pes molecular més gran i poden polimeritzar-se en les fibrilles amiloidegèniques que s'assemblen a les que es troben en els Cossos de Lewy. No obstant, el mecanisme que provoca aquests canvis conformacionals encara és desconegut. En la fotomicrografia s'il·lustra un Cos de Lewy (en vermell) en una neurona de malalt de MP (fletxa blanca). Barra d'escala = 5 μ m

4.3 Degradació de l' α -sinucleïna

L'increment d' α -SYN agregada que s'observa en la MP, suggereix que una deficiència en els mecanismes de degradació d'aquesta proteïna pot contribuir a la seva patogènesi. L' α -SYN es degrada per dues vies principals, el sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) i el sistema d'autofàgia lisosomal (LAS). Sembla ser que el UPS s'encarrega d'eliminar les formes normals i solubles de l' α -SYN, mentre que el LAS és més important en el cas de l'eliminació dels oligòmers d' α -SYN. Dins del LAS trobem

dos sistemes de degradació, l'autofàgia mediada per xaperones i la macroautofàgia. L' α -SYN conté un motiu VKKDQ que permet la interacció amb Hsc70 i li dona la capacitat de trascolar-se als lisosomes mitjançant la proteïna receptora LAMP2a. Ambdós sistemes són importants en el cas de l' α -SYN, ja que la inhibició de qualsevol d'ells produeix un augment dels nivells d' α -SYN.⁶⁶

Hi ha moltes evidències que suporten la importància d'aquests mecanismes en la MP. L'envelliment està estretament relacionat amb una disminució dels sistemes de degradació, tant LAS com UPS. També s'ha observat que com a conseqüència de l'envelliment els nivells d' α -SYN incrementen en la SNpc en cervells sans. En models experimentals s'ha vist que la estimulació farmacològica de la macroautofàgia redueix els nivells de l' α -SYN. Per altra banda, en la SNpc de pacients de MP també s'observa una disminució dels enzims lisosomals, sobretot en les neurones que tenen incusions d' α -SYN, en les que també hi ha una disminució de l'autofàgia mediada per xaperones i els autofagosomes s'acumulen. També s'ha vist que els oligòmers d' α -SYN inhibeixen el UPS, que l'acumulació d' α -SYN inhibeix la macroautofàgia i que diferents formes d' α -SYN també redueixen l'autofàgia mediada per xaperones. Tot això provoca l'establiment d'un circuit que propicia l'acumulació i l'agregació de l' α -SYN, impedit la seva degradació.^{58,66}

4.4 Propagació de l' α -sinucleïna

Una altra particularitat de l' α -SYN és la capacitat de propagar-se entre les neurones de manera anterògrada, tal i com ho fan els prions. En 2008, 3 estudis independents van descriure que les neurones mesencefàliques embrioniques transplantades a l'estriat de pacients de Parkinson, presentaven Cossos de Lewy.⁶⁷⁻⁶⁹ Això va obrir pas a creure que els agregats d' α -SYN es podien transmetre entre cèl·lules. També s'ha vist que inoculant en animals Cossos de Lewy purificats de la SNpc de pacients de MP o fibril·les recombinants obtingudes *in vitro*, els animals presenten patologia de Lewy.⁷⁰ D'aquí sorgeix la hipòtesi *prion-like*, que postula que un cop l' α -SYN es troba agregada en una neurona, es pot transmetre de manera intra-axonal a altres regions del cervell, i aquesta α -SYN pot ser alliberada també al medi extracel·lular i ser captada per les

INTRODUCCIÓ

neurones veïnes.⁷¹ Estudis en cultius cel·lulars també veuen que si alteres el sistema LAS s'observa un increment de secreció d' α -SYN al medi extracel·lular a través d'exosomes i que les cèl·lules veïnes la capten per endocitosi.⁷²

Aquesta idea de la propagació de l' α -SYN és altament consistent amb la hipòtesi de Braak, ja que l' α -SYN podria començar a agregar-se en l'intestí o en el bulb olfatori, explicant els primers símptomes de la malaltia i d'aquesta manera propagar-se fins a arribar a la SNpc, on apareixerien els símptomes motors i finalment a altres zones del cervell.⁷¹A la **Figura 9**⁴⁸ es presenta un diagrama de totes les vies moleculars alterades en la MP i la seva interrelació en el desenvolupament de la mateixa.

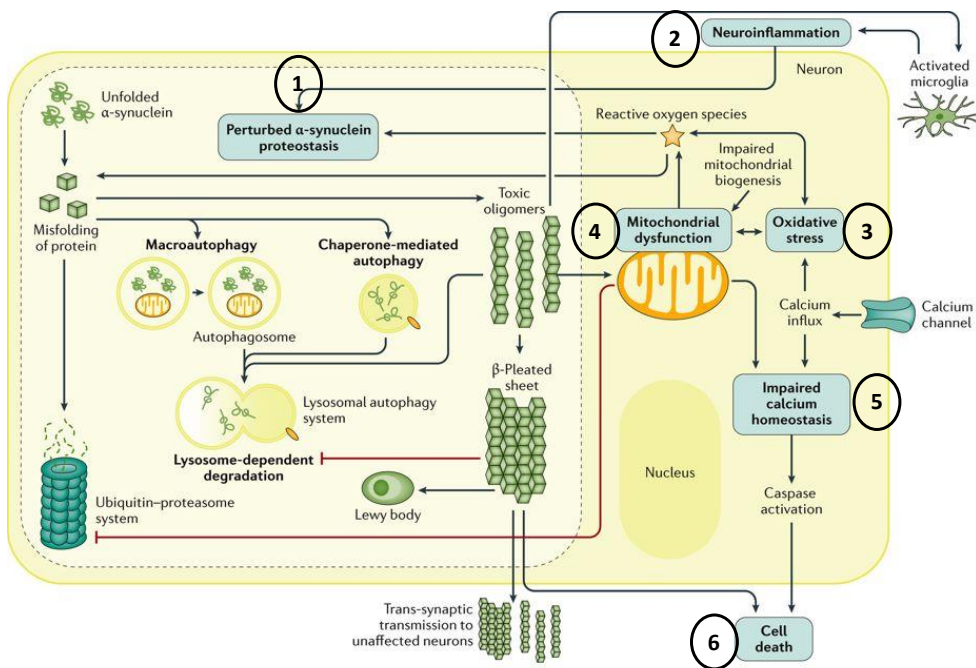


Figura 9. Diagrama esquemàtic de les interaccions entre les grans vies moleculars implicades en la patogènesi de la MP. 1: La presència de malplegament en l' α -SYN propicia la formació d'oligòmers tòxics per a la cèl·lula que acaben donant plegament de làmina β . El plegament en forma de làmina β bloqueja la degradació de l' α -SYN per 3 mecanismes diferents (macroautofàgia, autofàgia mediada per xaperones i degradació via lisosomal) per altra banda, aquestes formes acaben formant els Cossos de Lewy i també es poden alliberar i transmetre a les neurones veïnes sanes. 2: La microglia activada promou la formació d'oligòmers tòxics d' α -SYN, alterant la seva proteòstasi. 3: L'estrès oxidatiu promou la formació de ROS que alteren la proteòstasi de l' α -SYN i provoquen disfunció mitocondrial. 4: La disfunció mitocondrial promou la formació de ROS, també inhibeix el sistema de degradació proteica via proteasomal i causa un desequilibri en la homeòstasi del calci. 5: Una entrada de calci a la cèl·lula promou l'estrès oxidatiu i el desequilibri en la homeòstasi del calci provoca la activació de les caspases que acaba provocant la mort cel·lular. 6: La mort cel·lular en aquestes cèl·lules ve donada per l'activació de les caspases i també per les formes tòxiques de l' α -SYN.

4.5 Modificacions post-traduccionals de l' α -sinucleïna

L'anàlisi dels Cossos de Lewy, també ens han mostrat diferents modificacions post-traduccionals que poden estar associades a l' α -SYN patològica. La més estudiada és la fosforilació en la S129. Aquesta α -SYN fosforilada és majoritària en els Cossos de Lewy, pràcticament tota l' α -SYN (90%) es troba fosforilada en aquest residu, encara que no se sap si està directament implicada en el procés de fibril·lació, ja que hi ha estudis contradictoris al respecte.⁶⁴ També s'han trobat fosforilacions en la S87 i en la Y39, que també semblen ser rellevants en la patologia. Una altra modificació es la nitrificació, característica també dels pacients de Parkinson i d'altres sinucleopaties. Altres formes oxidades de l' α -SYN també han demostrat afavorir l'agregació així com formes truncades en l'extrem COOH demostren més tendència a la fibril·lació i a la toxicitat *in vitro*.⁶⁴

4.6 Regulació transcripcional de l' α -sinucleïna

Un altre mecanisme que condueix a la patogènesi de la MP és l'augment de la transcripció del gen SNCA, que codifica per l' α -SYN. A banda de les mutacions puntuals que pot patir la proteïna, també hi ha altres formes familiars de MP que cursen amb una ampliació del locus del gen, fet que indica que la mera sobreexpressió de l' α -SYN també és capaç de provocar la malaltia. Estudis de GWAS revelen la importància del gen SNCA també en les formes esporàdiques de la MP. Un gran nombre de polimorfismes en les regions 3'UTR i 5'UTR també estan associats amb un increment o disminució del risc de MP. Per altra banda, els *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) també poden afectar la unió de diferents factors de transcripció o d'altres elements reguladors.^{73,74}

Tot i així, encara hi ha poc coneixement de la regulació transcripcional del gen SNCA. El FT millor caracteritzat és el *transcription factor zinc finger and SCAN domain containing 21* (ZSCAN21). Aquest s'uneix a una regió del primer intró i pot activar o reprimir l'expressió del gen SNCA, tant en models cel·lulars com en teixit cerebral

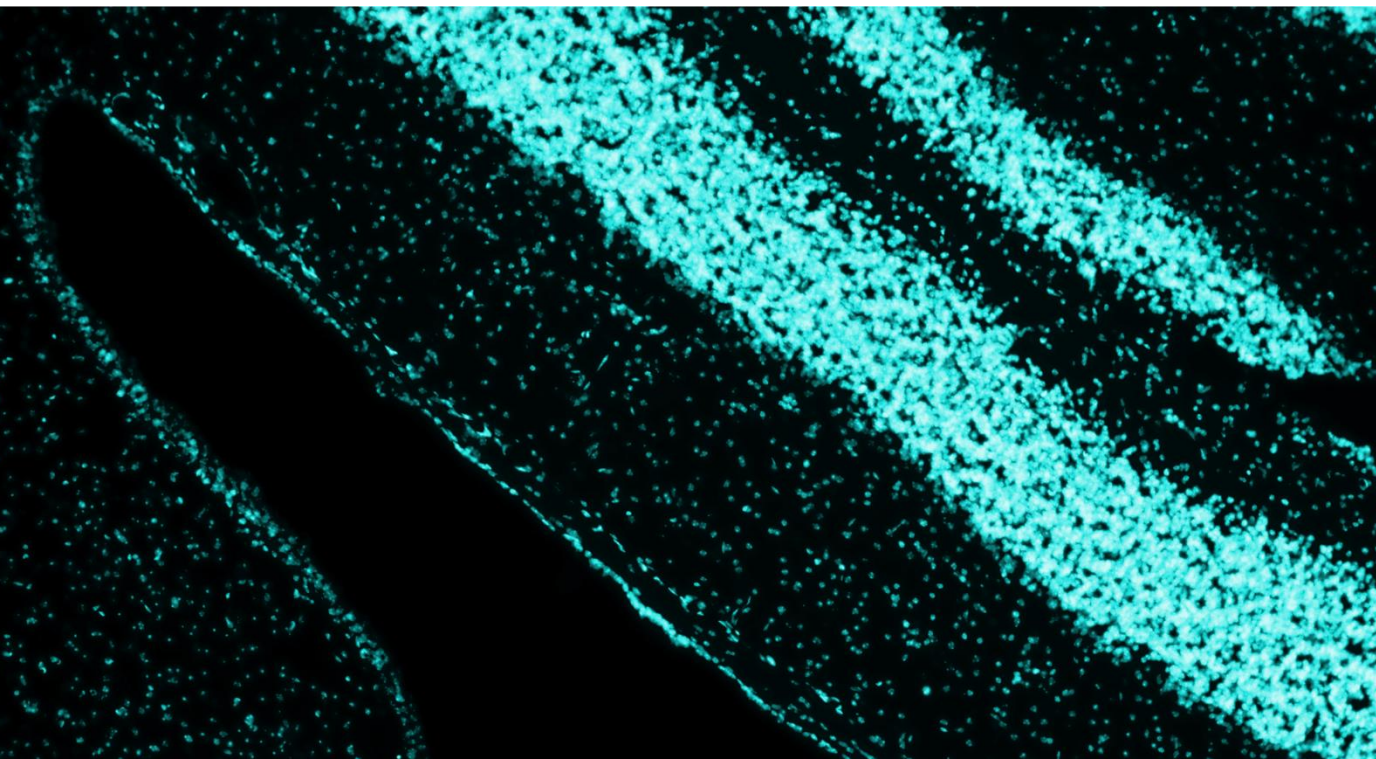
INTRODUCCIÓ

humà. GATA2 també s'ha demostrat que s'uneix en regions reguladores del gen SNCA, concretament en l'intró 2 i activa l'expressió del gen SNCA. Ambdós FT (GATA2 i ZSCAN21) estan altament units a la regió del gen SNCA en teixit humà cerebral, indicant la seva importància en aquest teixit.

Per altra banda, s'han descrit fins a 8 possibles regions reguladores que corresponen amb el factor de transcripció C/EBP β en la línia cel·lular SH-SY5Y. La sobre-expressió d'aquest factor de transcripció també provoca un increment dels nivells d' α -SYN. No obstant, no està encara del tot clar si C/EBP β regula de manera directa l'expressió del gen SNCA o fa d'*enhancer* dels factors de transcripció GATA2.

Adicionalment també s'ha descrit que ZNF219 s'uneix a una regió 5'UTR i pot actuar com a repressor o activador transcripcional, p53 també activa l'expressió de SNCA unint-se a una regió reguladora 970 bp *upstream* del inici de transcripció en cèl·lules SH-SY5Y. També s'ha vist que EMX2/NKX6-1 reprimeix l'expressió del gen SNCA unint-se en una regió *enhancer* del intró 4 i que PARP1 regula negativament la transcripció de SNCA unint-se a una regió microsatèl·lit anomenada NACP-Rep1 a 9kb del inici de transcripció del gen, aquesta regió està associada a un increment del risc de MP.^{75,76}

HIPÒTESI I OBJECTIUS



HIPÒTESI I OBJECTIUS

5. HIPÒTESI DE TREBALL

Els resultats preliminars en el nostre laboratori indiquen que la reducció dels nivells de p27 en les cèl·lules indueix una sèrie d'alteracions moleculars molt semblants a les observades en la MP. Per tant, es postula que la MP esporàdica podria sorgir d'una pèrdua progressiva de p27 en les neurones. Aquesta reducció de p27 induiria aquestes alteracions moleculars que provocarien l'apoptosi de les neurones dopaminèrgiques de la SNpc, que serien les més sensibles a aquestes alteracions, resultant en la simptomatologia associada a aquesta malaltia. La hipòtesi també planteja que al menys algunes formes genètiques de la malaltia també podrien conduir a una disminució de p27 com element clau de la etiologia de la malaltia. Per tant, es crucial caracteritzar els mecanismes a través dels quals p27 regula l'expressió i agregació de l' α -SYN així com els mecanismes moleculars que poden provocar una disminució de p27 en el malalts de Parkinson.

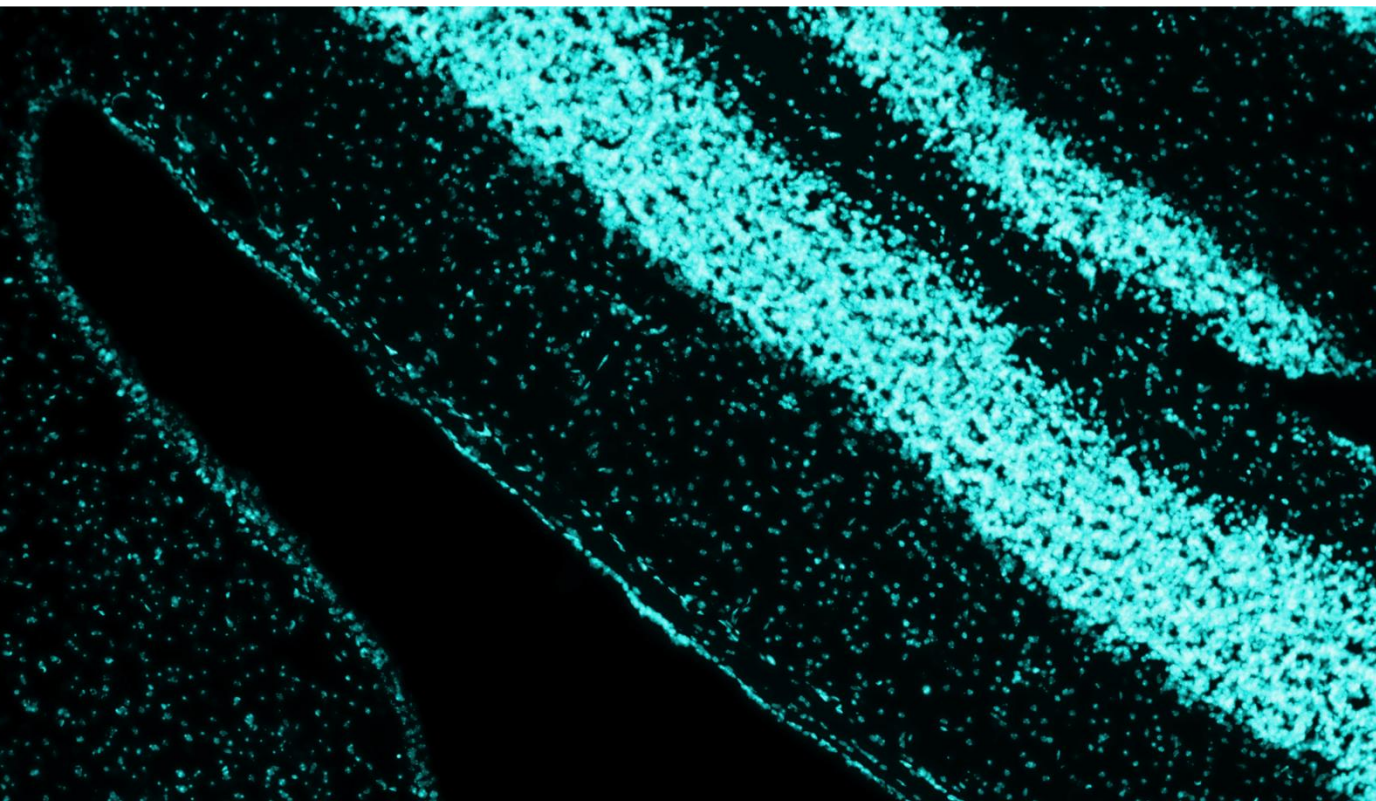
6. OBJECTIUS DEL TREBALL

L'objectiu general del projecte és demostrar que p27 regula l'expressió de l' α -sinucleïna, definir els mecanismes d'aquesta regulació i els mecanismes implicats en la reducció dels nivells de p27 que condueixen a l'increment de l'expressió d' α -SYN i a la seva agregació a les cèl·lules neurals. També volem valorar la possible implicació de p27 en l'etiologia de la MP.

Els objectius específics són:

- 1) Anàlisi del paper de p27 en l'expressió d' α -SYN en MEFs.
- 2) Estudi de l'expressió d' α -SYN en cervells de ratolins p27KO i en cèl·lules neurals de ratolí en cultiu.
- 3) Estudi de l'expressió d' α -SYN en cèl·lules neurals humanes SH-SY5Y.
- 4) Estudi del paper de C/EBP δ en la regulació de l'expressió d' α -SYN. Anàlisi de la relació entre p27 i C/EBP δ .
- 5) Estudi del possible paper de p27 en l'etiologia de la MP.

MATERIALS I MÈTODES



MATERIALS I MÈTODES

7. CLONATGES

7.1 Plasmidis utilitzats

pEV833: Vector d'expressió lentiviral, per a la infecció de cèl·lules eucariotes, amb l'objectiu de sobreexpressar proteïnes. Aquest plasmidi conté un gen *reporter* que codifica per GFP. Aquest plasmidi ha estat cedit pel Dr. Eric Verdin (Gladstone Institutes, San Francisco).

pVSVG (Clontech): Plasmidi que codifica per la glicoproteïna VSVG (*Vesicular stomatitis virus G protein*) de la càpside dels virus.

PCMV Δ 8.91: plasmidi que codifica els gens virals de la poliproteïna *Gag* (*Major structural protein of HIV virus*), la *transcriptasa inversa pol* i la proteïna Rev, la qual conté una seqüència de localització nuclear. Aquests gens són necessaris per a la producció de les partícules víriques quan fem servir vectors lentivirals. Aquest plasmidi va ser cedit per Dr. Didier Trono.

PLKO.1-puro (Sigma-Aldrich): vector lentiviral per a l'expressió de shRNA (*short hairpin RNA*). La seqüència que codifica per al shRNA es troba regulada pel promotor U6 humà de la RNA-polimerasa III. Aquest plasmidi conté un gen de resistència a puromicina, essencial per a la selecció de les cèl·lules eucariotes que han incorporat el plasmidi correctament i un gen de resistència a ampicil·lina, per a seleccionar cultius bacterians.

pGL3-promoter vector: vector luciferasa per a l'expressió en cèl·lules eucariotes. El seu pes molecular és de 5.01Kb. Aquest plasmidi té un promotor viral constitutivament actiu (SV40) seguit del gen que codifica per a la luciferasa.

pCMV: vector que expressa el gen de la β -galactosidasa, que ens serveix per a quantificar la taxa de transfecció dels vectors.

PGEX-4T1 (Addgene): Vector bacterià per a expressar proteïnes de fusió amb GST. Aquest plasmidi s'utilitza per l'expressió bacteriana de proteïnes amb l'objectiu de

poder-les purificar, unides a GST o no. Per tal d'alliberar el GST de la proteïna pot realitzar una digestió amb proteases específiques.

8. CULTIUS CEL·LULARS

Per a la realització d'aquesta Tesi, s'han fet servir els següents models cel·lulars:

MEFs WT: Línia cel·lular primària obtinguda de fibroblasts embrionaris de ratolí.

MEFs KOp27: Línia cel·lular primària obtinguda de fibroblasts embrionaris de ratolí *knock out* (KO) p27.

MEFs KOp130: Línia cel·lular primària obtinguda de fibroblasts embrionaris de ratolí KOp130.

MEFs DKOp27/p130: Línia cel·lular primària obtinguda de fibroblasts embrionaris de ratolí doble KOp130/p27.

HEK293T: Línia cel·lular immortalitzada a partir de ronyó embrionari humà.

C17.2: Línia cel·lular immortalitzada de progenitors neurals de cerebel de ratolí.

SH-SY5Y: Línia cel·lular immortalitzada a partir de neuroblastoma humà.

8.1 Condicions de manteniment dels cultius cel·lulars

| |
|---|
| <u>PBS:</u> 10 mM tampó fosfat pH 7.2 i 150 mM NaCl |
|---|

Tots els cultius cel·lulars utilitzats s'han mantingut en incubadors a 37 °C i pressió parcial de CO₂ al 5%. Els cultius cel·lular s'han manipulat en campanes de flux laminar i amb material d'ús exclusiu per a cultius i degudament autoclavats per tal de garantir les màximes condicions d'esterilitat.

El medi de cultiu o medi de creixement, emprat en els cultius cel·lulars és el medi Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM). Aquest medi s'ha suplementat amb 2 mM de L-glutamina (Merk), 1% d'aminoàcids no essencials (Biological Industries), 1 mM d'àcid pirúvic (Sigma), antibiòtics: 50 unitats/ml de penicil·lina i 50 µg/ml

d'estreptomicina (Biological Industries) i 10% de Fetal Bovine Serum (FBS) (Biological Industries). La línia cel·lular SH-SY5Y requereix un 15% de FBS.

Les plaques de cultiu cel·lular, un cop arribades a una confluència del 80-90%, s'han amplificat. Per a fer els corresponents passes, els medis s'aspiren, es fan de dos a tres rentats exhaustius amb PBS (Phosphate Buffered Saline). Posteriorment, per desenganxar les nostres cèl·lules de la placa de cultiu afegim Tripsina-EDTA 1X, la quantitat suficient per a cobrir la superfície de la placa i la deixem actuar de 2 a 5 minuts a 37 °C. Un cop desenganxades, per neutralitzar la tripsina, s'afegeix medi fresc i es transfereixen les cèl·lules a plaques noves a baixa confluència.

8.2 Congelació

Per al manteniment de les línies cel·lulars a llarg termini és necessari congelar alguns vials a passes primerencs per garantir la integritat i supervivència de les línies cel·lulars.

Per a congelar les cèl·lules es tripsinitzen, per tal de tenir una suspensió cel·lular. Es compten les cèl·lules/ml amb la cambra de Neubauer. Finalment, les cèl·lules es centrifuguen a 2000 rpm durant 5 minuts i es resuspenen en un volum necessari per tenir entre 1.5-2 milions de cèl·lules / ml en cada vial. Per a congelar fem servir el mateix medi de les cèl·lules o FBS amb un 10% de DMSO (Sigma), per evitar la formació de cristalls al interior de les cèl·lules. Els vials es guarden a -80°C durant uns 3 dies y després es guarden en nitrogen líquid.

Per a descongelar les cèl·lules, aquestes es resupenen amb 10ml de medi de cultiu a 37°C i es centrifuga a 2000 rpm 5 minuts per a treure les restes de DMSO. Finalment aquestes cèl·lules es cultiven en medi de cultiu fresc en una placa de cultiu.

8.3 Tractament de les cèl·lules amb Roscovitina per a la inhibició de l'activitat quinasa

La Roscovitina o Seliciclib és un inhibidor selectiu de l'activitat de les CDKs, poc sensible a altres tipus de quinases. La roscovitina competeix directament amb el lloc

d'unió d'ATP de la quinasa. És altament selectiu per a CDK1-ciclinaB (IC_{50} = 450nM) CDK2 (IC_{50} = 700nM) i CDK5-p35 (IC_{50} = 160nM)

Afegim roscovitina (Sigma-Aldrich) 20 μ M als cultius i ho deixem actuar durant 18 hores. Posteriorment recollim o fixem les cèl·lules per analitzar-les amb les diferents tècniques.

8.4 Transfecció de cèl·lules

Amb aquesta tècnica aconseguim expressar una proteïna concreta en la línia cel·lular d'interès. Això es fa mitjançant la introducció d'un plasmidi amb el cDNA de la proteïna en qüestió. En el nostre cas el fem servir per a re-introduir la proteïna p27 en els clons p27KO, mitjançant el vector pEV833p27 i emprant el pEV833Ø com a control de la transfecció.

Fem servir el reactiu Lipofectamina 2000 (Invitrogen) seguint les instruccions del fabricant per tal d'introduir aquest plasmidi en les nostres cèl·lules. Aquest reactiu forma liposomes que envolten al DNA i aquests en contactar amb les cèl·lules es fusionen amb la membrana plasmàtica alliberant el contingut al citoplasma de la cèl·lula.

- Cultivar les cèl·lules a 70-80 % de confluència i deixar-les en medi de cultiu sense antibiòtic.
- Preparar en medi DMEM sense suplementar, dues solucions per separat, una conté el DNA (2.5 μ g en el cas d'una placa p35) i l'altre el reactiu Lipofectamina segons indica el protocol de Lipofectamina 2000. Barrejar les dues solucions i deixar uns 20 minuts a que es formin els liposomes.
- Afegir les solucions preparades a les nostres plaques de cultiu.
- A les 4-6 hores, canviar el medi de cultiu de les plaques.
- Es pot comprovar com ha anat la transfecció, observant les plaques al microscopi de fluorescència Axiovert 200M (Zeiss) ja que els vectors contenen un gen fluorescent (GFP).
- Entre les 24 i les 48 hores de la transfecció, coincidint amb la màxima expressió de la proteïna, recollir les cèl·lules per al seu anàlisi.

8.5 Obtenció de cultius knockdown de p27, p130, C/EBP δ i CDK5

Per tal d'obtenir cultius cel·lulars amb una disminució de l'expressió de les nostres proteïnes d'interès, en aquest cas p27, p130, C/EBP δ i CDK5, hem d'infectar la nostra línia cel·lular SH-SY5Y amb plasmidis que contenen shRNAs específics per a les proteïnes abans esmentades. Els plasmidis emprats són els següents: pLKO.1-puro-control (shCntrl), pLKO.1-puro-p27 (shp27), pLKO.1-puro-p130 (shp130), pLKO.1-puro-C/EBP δ (shC/EBP δ), pLKO.1-puro-CDK5 (shCDK5). Aquests plasmidis són transfectats, junt amb vectors per a produir partícules lentivirals, a la línia HEK293T, per tal d'obtenir els lentivirus que contenen els shRNAs. Un cop infectem els nostres cultius amb les partícules virals, els mantenim amb medi de cultiu amb puromicina (10 μ g/ml). S'analitzarà per Western Blot la disminució dels nivells endògens de les proteïnes en qüestió.

Producció i infecció lentiviral:

- Transfectar les HEK293T (10 μ g del shRNA d'interès, 15 μ g pCMV Δ R8.91 i 5 μ g pVSVG) juntament amb la quantitat recomanada pel fabricant de solució de calci i HBS2X del CalPhos™ Mammalian Transfection Kit (Takara). A les 6-8 hores canviem el medi de cultiu.
- A les 48 hores recollir el medi que conté els virus i es filtra (0,45 μ m, Millex).
- Afegir el medi filtrat a les nostres cèl·lules (50% medi de virus, 50% medi de cultiu) junt amb Polybrene (5 μ g/ml, Sigma-Aldrich).

8.6 Obtenció de cultius KO per p27 i E2F4

Per tal de eliminar l'expressió de p27 i E2F4 a la nostra línia cel·lular c17.2, hem fet servir la tecnologia CRISPR/Cas9. Amb aquesta tècnica aconseguim fer un tall en el DNA genòmic, i per tant podem insertar canvis en la seqüència o generar cèl·lules *Knockout* d'un gen específic. Aquest sistema consta d'una seqüència que és complementària a la del nostre gen, seguit d'unes seqüències de tall de l'endonucleasa Cas9. Així aconseguim en el nostre gen, generar un tall i fer que aquest no s'expressi o resulti en una proteïna aberrant.

MATERIALS I MÈTODES

- Transfectar, mitjançant Lipofectamine 2000 (Invitrogen) , els vectors de CRISPR/Cas9-GFP, seguint el protocol del kit.
- A les 48 hores, seleccionar mitjançant FACS les cèl·lules GFP positives i sembrar cada cèl·lula positiva en un pou d'una placa de 96 pouets.
- Esperar a que cada cèl·lula ompli el pou i amplificar fins a aconseguir un gran nombre de cèl·lules per clon.

Aquests clons seran analitzats, per comprovar si són KO, de la proteïna d'interès.-Ens assurem de que no expressin la proteïna per la tècnica de Western Blot, d'aquesta manera també detectem assurem quins clons expressen formes truncades de la proteïna per tal de descartar-los.

8.7 Obtenció de lisats cel·lulars i quantificació de proteïna

Per tal de recollir i obtenir els nostres cultius cel·lulars seguim la següent metodologia:

- Retirar el medi de cultiu i rentar dos vegades amb PBS.
- Afegir tripsina (Gibco), el volum necessari per a cobrir la placa de cultiu i deixar la placa 3 minuts a 37°C per a que les cèl·lules es desenganxin.
- Neutralitzar la tripsina afegint medi de cultiu, recollir tot el volum de la placa i centrifugar 5 minuts a 4°C a 2000 rpm.
- Rentar el pèl·let de cèl·lules amb PBS dos vegades.
- Aquest pèl·let ja es pot guardar a -80 °C per a fer-ho servir per a diferents tècniques.

| |
|--|
| <p><u>Buffer B:</u> 1 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Tritò X-100, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 25 mM β-glicerol fosfat, 50 mM NaF, 0.2 mM Na_2VO_3</p> |
|--|

Els pèl·lets de cèl·lules en els que volem analitzar el seu patró d'expressió proteic es processen de la següent manera.

- Lisar els pèl·lets amb un volum adequat de tampó de lisi o Buffer B, afegir *Protease Inhibidor Cocktail* (PIC) abans de lisar. Deixar les mostres 1 hora a 4 °C en agitació.

- Centrifugar les mostres 10 minuts a 14000 rpm a 4°C per tal de sedimentar les restes cel·lulars no solubilitzades, així com el DNA. El sobrenedant es passa a un tub de microcentrífuga i es guarda a -20°C.
- Quantificar la quantitat de proteïna obtinguda mitjançant l'assaig de Bradford, fent dos lectures, una a 595 nm i una altra a 450 nm amb els lector de plaques Synergy 2 (Biotek).

9. ELECTROFORESI, ELECTROTRANSFERÈNCIA I IMMUNODETECCIÓ DE PROTEÏNES

| |
|--|
| <u>Tampó de mostra:</u> 60 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 0.5 mg/ml DTT, 10% glicerol, 0.1 mg/ml blau de bromofenol |
| <u>Tampó Electròlit:</u> 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 0.1% SDS, 76,8 mM Glicina |
| <u>Tampó Transferència:</u> 25 mM Tris-HCl pH 8.3, 192 mM Glicina, 0.02% SDS, 20% Etanol |
| <u>TBS-Tween (TBST):</u> 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1 % Tween 20 |

9.1 Electroforesi de proteïnes (SDS-PAGE)

Amb la finalitat de poder separar proteïnes segons la seva mida o pes molecular, es fan servir gels de SDS-poliacrilamida en condicions desnaturalitzants. Seguint el mètode descrit per Laemmli⁷⁷ aconseguim separar les proteïnes, prèviament desnaturalitzades i carregades negativament, segons la seva mobilitat electroforètica dins d'un camp elèctric. El SDS és un detergent iònic, que s'intercala entre les proteïnes conferint múltiples carregues negatives de manera proporcional a la seva mida, assegurant la mateixa relació massa/càrrega. Així doncs, les proteïnes són atretes cap al pol positiu amb la mateixa força, i la seva migració depèn exclusivament de la seva mida. Les proteïnes més petites migren més ràpid i arriben abans al final del gel, i les més grans migraran més lentament.

Les mostres lisades i quantificades, per a que totes les mostres tinguin la mateixa quantitat de proteïna total, es preparen amb Tampó de Mostra 4X. Abans de carregar-les en els gels SDS-PAGE s'han de bullir 5 minuts a 95 °C per acabar de desnaturalitzar i trencar els ponts di-sulfur de les proteïnes.

Els gels es posen en una cubeta d'electroforesi amb tampó Electròlit. Un cop carregada la mostra, es corren els gels a 35 mA entre 60 i 90 minuts.

9.2 Electrotransferència

Amb aquesta tècnica aconseguim passar les proteïnes retingudes en el gel d'acrilamida a una membrana de nitrocel·lulosa (BioRad), conservant el patró de bandes generat en l'electroforesi.

Es posa el gel d'acrilamida en contacte amb la membrana i, mitjançant un camp elèctric, les proteïnes migren del pol negatiu a on tenim el gel, a la membrana, que està en el pol positiu.

L'electrotransferència per defecte es fa a 4°C a 70V durant 90 minuts en una cubeta amb tampó de Transferència. El temps i el voltatge es pot modificar segons la mida de les proteïnes que volem detectar.

9.3 Immunodetecció (Western Blot)

Per tal de detectar la nostra proteïna d'interès, fem servir un sistema de doble anticòs. Un anticòs primari que reconeix de manera específica els epítops de la nostra proteïna i un anticòs secundari que detecta les immunoglobulines de l'espècie utilitzada per a produir l'anticòs primari. Els anticossos secundaris emprats en aquesta tesi estan conjugats a Peroxidasa (HRP, Horseradish peroxidase) Amb aquest mètode obtenim una amplificació de la senyal de l'anticòs primari.

- Tenir la membrana de nitrocel·lulosa transferida amb Ponceau S (Sigma-Aldrich) durant 5 minuts, per tal de comprovar si la transferència ha anat correctament.
- Bloquejar les membranes amb TBST i un 5 % de llet desnatada en pols durant 1 hora a 25 °C. Amb el bloqueig prevenim les unions inespecífiques dels anticossos que farem servir a continuació.
- Els anticossos primaris es preparen segons les dilucions recomanades i es deixen 18 hores a 4°C en agitació o 1 hora a 25°C.
- Rentar tres cops amb TBST.

- Incubar amb l'anticòs secundari conjugat HRP, a una dilució 1: 2000-1:3000 durant 45 minuts a 25°C en agitació.
- Rentar tres cops amb TBST.
- Detectar la luminescència que produirà HRP al reaccionar amb el substrat EZ-ECL (Chemiluminescence Detection Kit for HRP, Biological Industries). El substrat s'aboca sobre la membrana i aquesta s'exposa sobre un film fotogràfic (Hyperfilm ECL, Amersham). Passat un temps d'exposició, el film serà revelat i les bandes obtingudes indiquen la presència de la proteïna d'interès.

A la **Taula 2** trobem els anticossos que s'han fet servir en el desenvolupament

| Antigen | Origen | Casa Comercial | Referència | Tècnica |
|--------------------------------|--------|---------------------|----------------------|-----------|
| p27 | Ratolí | BD Trasduction Labs | 610242 | WB |
| | Conill | Santa Cruz | sc-528 (C-19) | IP/ChIP |
| α-SYN | Ratolí | BD Biosciences | 610787 | WB/IHQ/IF |
| | Ratolí | Thermo Scientific | #MS-1572 (syn211) | PLA |
| E2F4 | Ratolí | Abcam | ab4071 | WB |
| | Conill | Santa Cruz | sc-866 (C-20) | ChIP |
| C/EBP6 | Ratolí | Santa Cruz | sc-515028 (D1) | WB |
| | Conill | Rockland | 600-401-A61 | IP/ChIP |
| p130 | Conill | Santa Cruz | sc-317 (C-20) | WB |
| Tubulina | Conill | Sigma Aldrich | T9026 | WB |
| CDK5 | Ratolí | Santa Cruz | sc-249 (CD17) | WB |
| | Conill | Abcam | Ab40773 (EP715Y) | IP/IF |
| GST | Ratolí | Sigma Aldrich | SAB4200237 (2H3-D10) | WB |

Taula 2. Llista dels anticossos primaris utilitzats en aquesta tesi.

d'aquesta Tesi.

10. OBTENCIÓ DE PROTEÏNES RECOMBINANTS. EXPRESSIÓ I PURIFICACIÓ DE en *E.Coli*

| |
|---|
| <u>LB (Luria-Bertani):</u> 0.01% Triptona, 0.01% NaCl ,0.05% llevat |
|---|

NET10X: 0.2 M Tris-HCl pH 8, 1M NaCl, , 10 mM EDTA

NETN: NET 1X i 0,5% Nonidet-P40 (Igepal®, Sigma)

Tampó Elució: 50 mM Tris-HCl pH 9.6, 120 mM NaCl i 20 mM de Glutatió reduït

Tampó Coupling: 0.1 M Bicarbonat Sòdic pH 8.3, 0.5 M NaCl

10.1 Protocol de transformació bacteriana

- Descongelar els bacteris competents en gel.
- Afegir 0,5-1 µg de DNA plasmídic en 100 µl de cèl·lules competents; la mescla s'incuba en gel durant 30 min.
- Realitzar un xoc tèrmic sotmetent la mostra a 42°C durant 45 segons i, acte seguit, es diposita en gel durant 2 min.
- Afegir 1 ml de medi LB sense antibiòtic a la mostra i incubar durant 1h a 37°C, en agitació.
- Centrifugar la mostra durant 1 min a 6000 rpm en una microfuga i eliminar 900 µl del sobrenedant. Amb la resta del medi es resuspenen les cèl·lules i es plaquegen en medi LB-agar amb l'antibiòtic adequat, segons sigui la resistència del plasmidi transformat.
- Incubar la placa durant la nit, preferiblement a 37°C, esperant la formació de colònies bacterianes resistents, les quals probablement contindran el plasmidi d'interès. Paral·lelament, és convenient realitzar una placa control, en la qual haurem sembrat cèl·lules competents sense transformar amb DNA plasmídic.

10.2 Obtenció de proteïnes recombinants

Per a realitzar part d'aquest treball s'han utilitzat proteïnes recombinants fusionades amb GST, com ara E2F4 i E2F1.

Per a l'obtenció de proteïnes recombinants s'ha seguit el mètode de D.B. Smith⁷⁸ i J.V. Frangioni⁷⁹. L'expressió de proteïnes en *E.coli* s'ha realitzat pel sistema de proteïnes de fusió amb Glutatió-S-Transfersasa (GST).

Aquest sistema requereix l'ús del vector pGEX i permet la purificació ràpida de proteïnes fusionades amb GST, degut a l'afinitat que té aquest enzim pel glutatió reduït. Per tal de separar la proteïna d'interès de les altres proteïnes bacterianes en solució, utilitzem una reïna que està covalentment unida a glutatió reduït, de manera que la proteïna que volem purificar (la qual està fusionada a GST) s'uneix amb molta afinitat al glutatió reduït. Un cop la proteïna que volem aïllar s'uneix al glutatió, es realitza l'elució afegint un excés de glutatió reduït lliure, que desplaçarà la proteïna de fusió de la reïna, deixant-la en suspensió, de manera que la podrem recuperar.

10.3 Expressió de proteïnes de fusió amb IPTG

Per expressar la proteïna d'interès en bacteris cal clonar el seu cDNA al vector pGEX, en pauta de lectura amb el GST. Tot seguit, transformem el plasmidi en bacteris BL21 (DE3) pLys competents. S'utilitza aquesta soca de *E.coli* perquè és deficient en determinades proteases i expressa lisozim, de manera que es minimitza la degradació de la proteïna expressada i es facilita la lisi dels bacteris.

Un cop obtingudes les colònies bacterianes transformades, s'inocula una d'elles en 5 ml de medi LB amb ampicil·lina i cloramfenicol. Es deixa créixer l'inòcul durant tota la nit, a 37°C i en agitació.

Al dia següent, s'amplifica el cultiu fins al volum necessari segons la quantitat de proteïna purificada que volem obtenir. Normalment s'utilitzen volums de 0,5 o 1 litre de medi LB, afegint ampicil·lina i cloramfenicol per seleccionar els bacteris transformats. El cultiu es deixa créixer fins que assoleix la fase exponencial ($D.O.600nm=0,6-0,8$).

Per induir l'expressió de la proteïna de fusió s'afegeix al medi 0.3 mM IPTG (Isopropil- β -D-tiogalactopirinosid) (Genaxis Biotechnology) i es deixa incubar 4-5h a 30°C, en agitació. L'IPTG és el substrat del promotor que regula l'expressió de la proteïna de fusió; afegint-lo al medi, fem que activi el promotor i la proteïna d'interès s'expressa.

Després de la inducció proteica, es sedimenten els bacteris per centrifugació a 5000 rpm durant 15 min i a 4°C, utilitzant un rotor GSA (Sorvall). Ens quedem amb el

sediment, després de descartar el sobrenedant; es pot congelar per utilitzar-lo en un altre moment.

10.4 Purificació de proteïnes recombinants

- Lisar els bacteris amb tampó NTEN complementat amb els inhibidors de proteases: 1 mM PMSF, 1 μ M Aprotinina i 10 μ M Leupeptina.
- Sonicar el lisat en 4 cicles de 20 segons, a 4°C.
- Centrifugar el lisat durant 20 min i a 15000 rpm, utilitzant un rotor SS34 (Sorvall); ens quedem el sobrenedant. Afegim 1ml de reïna *Glutathione-Sepharose-4B* (Amersham Pharmacia Biotech) per cada litre de cultiu inicial, al sobrenedant obtingut en la darrera centrifugació. S'incuba durant 1h a 4°C i en agitació. En aquest pas, el GST fusionat a la proteïna d'interès interacciona amb el glutatió reduït, que està unit a les partícules de Sepharosa de la reïna.
- Rentar 2 cops amb 40 ml de tampó NTEN i després un rentat amb 40 ml de PBS, amb la finalitat de descartar les proteïnes bacterianes que s'han unit inespecíficament a la reïna.
- Eluir la proteïna de fusió afegint 5 ml de tampó d'elució) i incubant en agitació, durant 30-60 min i a 4°C.
- Centrifugar la reïna a 1000xg durant 5 min i recuperem el sobrenedant, que és on es troba la proteïna que volem obtenir. Es podria fer una segona elució.

Normalment, es dialitza la proteïna per bescanviar el tampó d'elució pel tampó requerit segons l'experiment a realitzar. La proteïna purificada es guarda a -80°C.

Per a comprovar que la proteïna d'interès ha estat expressada i correctament purificada, es fa un gel de SDS-poliacrilamida. En aquest gel es carreguen mostres provinents de bacteris induïts i, com a control, mostres de bacteris no induïts. També es carrega el sobrenedant de la solubilització, els rentats i els eluïts dialitzats. La visualització de les proteïnes es fa per tinció amb Blau de Coomassie.

Per acabar, es mesura la concentració de la proteïna obtinguda pel mètode de Bradford.

10.5 Diàlisi de la proteïna recombinant

Per a dialitzar proteïna recombinant, farem servir sacs de diàlisi (Sigma Aldrich).

- Rentar els sacs de diàlisi amb aigua corrent durant 3-4 hores, per eliminar la glicerina que contenen.
- Tractar els sacs durant 1 minut amb una solució 0,3% de sulfit de sodi a 70 °C per eliminar els compostos sulfur.
- Rentar durant 2 minuts amb aigua a 60 °C.
- Acidificar els sacs amb una solució 0,2% d'àcid sulfúric.
- Rentar durant 2 minuts amb aigua a 60 °C.
- Un cop tenim els sacs tubs de diàlisi preparats, introduïm la mostra dins dels sacs, tanquem els sacs hermèticament, i els submergim en 5L del tampó adequat, en el que volem la mostra. En aquest cas Tampó Coupling.
- Deixar en agitació, 18 hores a 4 °C .
- Passat aquest temps, canviar el sac de diàlisi a un altre recipient amb 2-3L de tampó de diàlisi nou i deixar-ho 2-3 hores a 4 °C.
- Recollir el contingut dels sacs de diàlisi, que contindrà la proteïna purificada i guardar a -80°C fins al moment d'utilitzar-la en les columnes d'afinitat.

11. ANÀLISI DE LA INTERACCIÓ ENTRE PROTEÏNES PER CROMATOGRAFIA D'AFINITAT

| |
|--|
| <u>Tampó Equilibració/ Rentat 50 mM:</u> 50 mM Hepes pH 7.6 , 50 mM KCl, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl ₂ |
| <u>Tampó Rentat 125 mM :</u> 50 mM Hepes pH 7.6 , 125 mM KCl, 1 mM EGTA , 1 mM MgCl ₂ |
| <u>Tampó Elució:</u> 50 mM Hepes pH 7.6 , 1.5 M KCl, 1 mM EGTA , 1 mM MgCl ₂ |
| <u>Tampó Àcid:</u> 0.1 M acetat sòdic, 0.5 M NaCl, pH 4.5. |
| <u>Tampó Regeneració:</u> 50 mM Hepes pH 7.6 , 3 M KCl, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl ₂ |

Amb la finalitat d'analitzar la unió directa entre proteïnes, s'ha fet servir la tècnica de cromatografia d'afinitat, emprant una reïna de CNBr-activated Sepharose 4B.

MATERIALS I MÈTODES

S'han generat diferents columnes cromatogràfiques d'aproximadament 1 ml de volum, unint de manera covalent, els pèptids sintètics de p27 o diferents fragments de p27 a una reïna de CNBr-activated Sepharose 4B, segons el protocol indicat per la casa comercial (Amersham).

Per aquestes columnes es passa la proteïna d'interès, en el nostre cas E2F1, per saber si interactua amb la proteïna unida a la Sepharosa 4B.

- Primerament, rentar les columnes amb 10 volums de tampó Equilibració.
- Carregar entre 5-10 µg (0.5-1 ml) de proteïna purificada dissolta en tampó Equilibració. Deixar-ho 45 minuts a 4 °C en agitació suau per tal de que es produeixi la unió.
- Recollir la fracció no unida (*Flowthrough*) i guardar-la.
- Rentar les columnes amb uns 15-20 volums de tampó Rentat 125 mM. Fer un últim rentat amb 1 ml de tampó i recollir per tal de comprovar el procés de rentat.
- Eluir amb 2 ml de tampó Elució a elevades concentracions de sal (1.5 M KCl) i després amb 2 ml de tampó Acetat a pH àcid.
- Rentat amb tampó de Regeneració per eliminar restes de proteïna no eluïda .
- Rentat amb tampó Rentat 50 mM o Equilibració.
- Guardar les columnes en PBS-Azida Sòdica 0.1% a 4°C.
- Precipitació de les mostres amb àcid tricloroacètic (TCA). La detecció de les proteïnes eluïdes es realitza mitjançant electroforesis seguides d'un WB.

Precipitació de les mostres amb TCA

Les mostres eluïdes de les columnes d'afinitat i el últim rentat han de ser precipitades i re- suspeses per a poder-les carregar en gel SDS-PAGE.

- Afegir TCA (àcid tricloroacètic) a concentració final 10% en les mostres.
- Agitar en un vòrtex i deixar-ho en gel durant 15 minuts.
- Centrifugar 15 minuts a 14000 rpm a 4°C.
- Eliminar el sobrenedant i re-suspendre el pèl·let en 1 ml d'acetona freda.
- Agitar en un vòrtex i deixar-ho en gel durant 15 minuts.
- Centrifugar 15 minuts a 14000 rpm a 4 °C.

- Descartar el sobrenedant i deixar evaporar l'acetona abans de resuspendre amb Tampó de mostres 1X. La detecció de les proteïnes eluïdes es realitza per tècniques d'electroforesis seguides d'un WB.

12. IMMUNOPRECIPITACIÓ DE PROTEÏNES

Tampó Co-IP: en PBS, 1 mM EDTA, 100 μ M Na₃VO₄, 0.5% Tritó X-100, 20 mM β -Glicerol fosfat, 0.2 mM PMSF

La immunoprecipitació de proteïna ens permet detectar interaccions entre proteïnes en un lisat cel·lular mitjançant la unió d'una d'elles amb un anticòs específic.

- Lisar els nostres pèl·lets cel·lulars amb Tampó Co-IP, durant 15 minuts a 25°C amb DNAsa i 45 minuts més a 4 °C en agitació.
- Centrifugar durant 5 minuts a 3000 rpm a 4 °C.
- Recollir el sobrenedant i quantificar la concentració de proteïna amb el mètode Bradford.
- Incubar 1 mg de proteïna amb 4 μ g d'anticòs o IgG (control) i afegir tampó Co-IP fins els 500-600 μ l per tub. Deixar en agitació suau 18 h a 4°C. Addicionalment, separar un tub amb l'input, que contindrà entre 50-60 μ g de la mostra, afegir Tampó de Mostra i guardar a -20 °C.
- Afegir a les mostres 20 μ l de *beads* magnètiques (Dynabeads, Invitrogen), prèviament rentades amb PBS, unides a proteïna A/G. Incubar durant 1 hora en agitació a 4°C.
- Posar les mostres al imant 2 minuts i guardar el sobrenedant com a fracció no unida (*Not Bound*).
- Rentar les boles 5 cops amb Tampó Co-IP.
- Eluir les proteïnes unides a les *beads* amb 30 μ l de una solució de citrat 2.5 M durant 2 minuts.
- Afegir 10 μ l de Tampó de Mostra 4X, la mostra es tornarà groga degut al pH àcid.
- Afegir 1-2 μ l de 1M Tris fins que la mostra torni al color blau.

Tant l'input com les mostres es carreguen en un gel SDS-PAGE. Posteriorment es farà la immunodetecció per detectar la unió de les nostres proteïnes d'interès.

13. IMMUNOPRECIPITACIÓ DE CROMATINA (ChIP)

| |
|--|
| <u>Buffer 5X</u> : 250 mM Hepes pH 8, 500 mM NaCl, 5 mM EDTA, 2.5 mM EGTA |
| <u>Solució Crosslink</u> : Buffer 5X, 1 % formaldehid |
| <u>Solució STOP</u> : 10 mM Tris pH 8, 1.5 M glicina |
| <u>Tampó de Lisis (ChIP)</u> : 10 mM Tris pH 8, 0.4% Tritó X-100, 10 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 10 mM Butirat sòdic, 20 mM β -glicerol fosfat, 0.1 mM Na_3VO_4 |
| <u>Tampó de Sonicació</u> : 10 mM Tris pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM, EGTA, 10 mM butirat sòdic, 20 mM β -glicerol fosfat, 0.1 mM Na_3VO_4 |
| <u>Tampó RIPA</u> : 10 mM Tris pH 8, 0.1% deoxicolat sòdic (DOC), 140 mM NaCl, 1% Tritó X-100, 0.1% SDS, 1 mM EDTA, 0.25 mM EGTA, 10 mM butirat sòdic, 20 mM β -glicerol fosfat, 0.1 mM Na_3VO_4 |
| <u>Tampó Liti</u> : 10 mM Tris pH 8 , 250 mM LiCl, 1% NP-40, 1% DOC, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10 mM, butirat sòdic, 0.1 mM Na_3VO_4 |
| <u>Tampó TE</u> : 10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA |

La immunoprecipitació de cromatina és una tècnica que ens permet determinar les regions d'unió al DNA genòmic que té la nostra proteïna d'interès. Per tant, ens serveix per detectar si una proteïna es troba en una regió reguladora d'un gen, com promotors i *enhancers* o dintre del propi gen.

Fixació dels cultius cel·lulars (Crosslink)

La quantitat de plaques inicials depèn molt del tipus cel·lular, en el nostre cas partim de 5-6 plaques p150 de C17.2 confluents.

- Afegir la solució Crosslink (1:10) a les plaques. Deixar 10 minuts en agitació a 25 °C.
- Afegir la solució STOP (1:10) a les plaques. Deixar 10 minuts en agitació a 25 °C.
- Rentar 2 vegades amb PBS estèril (Sigma)
- Afegir 2 ml de PBS estèril + EDTA 5mM + PIC per placa. Amb l'ajuda d'un *scraper* recollir les cèl·lules, en gel.
- Rentar 3 vegades amb PBS estèril, centrifugant a 3000 rpm, disgregant bé el pèl·let de cèl·lules.

- Descartar el sobrenedant. Aquest pèl·let es pot congelar a -80°C o continuar amb el protocol.

Lisis i sonicació

- Afegir 200 μl de Tampó de Lisis per cada 10^6 de cèl·lules i deixar-ho 30 minuts a 4°C en agitació.
- Fer 3 rentats de PBS esteril, centrifugant a 3000 rpm, disgregant bé el pèl·let. Aquest pèl·let conté les proteïnes unides al DNA.
- Afegir uns 400 μl de Tampó de Sonicació + PIC i SDS al 1% per 10^6 de cèl·lules lisades.
- Sonicar la mostra durant 20 minuts a amplitud alta, en cicles de 30 segons, amb 30 segons de descans entre cicles, en el Biorupor Sonicator (Diagenode). Aquestes condicions són adequades per tal d'obtenir fragments de DNA entre 0,5-1 Kb.
- Comprovar mitjançant un gel d'agarosa al 1%, el resultat de la sonicació. Els fragments de DNA han de tenir al voltant de 1000 pb.

Incubació

- Mesurar la concentració de DNA a l'espectrofotòmetre Nanodrop 1000 (Thermo Scientific).
- Incubar 250 μg de cromatina amb 4 μg d'anticòs, fer una incubació control sense anticòs. Separar un 25 μg de mostra per a l'input i guardar-ho a -20°C .
- Reconvertir el tampó de Sonicació en tampó RIPA, afegint la quantitat necessària de DOC, Tritò X-100 i SDS.
- Afegir 20 μl de Magna CHIP Protein A/G *beads* magnètiques (Millipore). Incubar 18 hores en agitació a 4°C .
- Rentar 3 vegades amb Tampó RIPA durant 2 minuts a 4°C en agitació.
- Rentar 3 vegades amb Tampó RIPA 1M NaCl durant 2 minuts a 4°C en agitació.
- Rentar 2 vegades amb Tampó Liti durant 2 minuts a 4°C en agitació.
- Rentar 2 vegades amb Tampó TE durant 2 minuts a 4°C en agitació.

De-crosslinking i Elució

Per obtenir i purificar el DNA immunoprecipitat, es segueixen les instruccions del kit IPure (Diagenode). Les mostres es guarden a -20°C per al posterior anàlisi per PCR a temps real (RT-PCR), emprant els següents primers. (Taula 3)

| Primers ChIP | | Seqüència (5'-3') |
|------------------|---------|-----------------------|
| E2F4 Regió 1 | Forward | CAGGCCTGGCAAAACATTAT |
| | Reverse | AGGCTTCAGCCTTTTCCTTC |
| E2F4 Regió 2 | Forward | CTCTCTGGTGTGGCATCTGG |
| | Reverse | GTGAGGGCTGTGGGTATCTG |
| C/EBP61(-7249bp) | Forward | ACCTCTTGGTCCAGGCTTCT |
| | Reverse | TGGGGTTTGGAGGAATGTAA |
| C/EBP62(-6456bp) | Forward | GGACCAGAATGGTTGGTCAT |
| | Reverse | GCCAAAGCAATTGTCCATGT |
| C/EBP63(-5304bp) | Forward | GGCAATCGTTTCAATGCTACT |
| | Reverse | AAAAGGAGCATGTCCAGCAG |
| C/EBP64(-4018bp) | Forward | TATTGGCAGCTTCTCTGCTG |
| | Reverse | CATGAGACATGTGCTGCTGA |
| C/EBP65(-2358bp) | Forward | GGCCAGACTGTGTGACTGAA |
| | Reverse | GGTACTGGTCAGGGTGTTC |
| C/EBP66(-1660bp) | Forward | CAGGCCTGGCAAAACATTAT |
| | Reverse | AGGCTTCAGCCTTTTCCTTC |

Taula 3. Seqüència dels primers utilitzats en la RT-PCR dels experiments de ChIP

14. TÈCNiques DE LOCALITZACIÓ DE PROTEÏNES

14.1 Congelació i obtenció de talls de cervell de ratolí

Solució A: 0.2 M Fosfat sòdic monobàsic

Solució B: 0.2 M Fosfat sòdic dibàsic

Tampó fosfat 0.1M: 10% Solució A i 40 % Solució B

Els ratolins que s'han fet servir per l'elaboració de la tesi doctoral han estat cedits per la Dra. Isabel Fariñas, de la Universitat de València. Els cervells prèviament fixats amb paraformaldehid es van incloure en una solució de tampó Fosfat i sucrosa al 30% durant 24-48 hores. Posteriorment, els cervells es congelen envoltant-los en neu carbònica durant 5 minuts, evitant el contacte directe del gel amb els cervells. Un cop congelats es guarden a -80 °C.

Una vegada congelats, es procedeix a obtenir les seccions d'interès. En el nostre cas, fent servir el criòstat (Leica) es van tallar seccions frontals de 20 µm de les zones que corresponen a Nucli Estriat, *Substancia Nigra* i *Locus Coeruleus*/Cerebel. Els talls es col·loquen de manera ordenada en plaques de 48 pous, en una solució de tampó fosfat 0.1M amb 0.01% d'azida sòdica, i es guarden a 4°C. En el nostre cas fem servir cervells dels ratolins KO per p27 i ratolins WT.

14.2 Immunohistoquímica (IHQ)

| |
|---|
| <u>Solució de bloqueig</u> : 0.3% Tritò X-100, 1% BSA, en PBS |
|---|

Una manera de detectar la localització de proteïnes dins d'una cèl·lula, és a través de les tècniques d' IHQ utilitzant anticossos que reconeixen específicament la proteïna d'interès. Posteriorment, s'incuba el tall amb un anticòs secundari conjugat a un enzim com la HRP o una molècula fluorescent, que ens permetrà detectar la localització de la proteïna en qüestió. En aquest cas el senyal de l'anticòs secundari s'amplifica mitjançant un sistema de Avidina-Biotina-Estreptavidina. El revelat es fa afegint un substrat de la HRP, la diaminobenzidina (DAB) que dona un precipitat marró allà on s'ha produït la reacció..

- Recollir els talls que es vol analitzar en portaobjectes prèviament gelatinitzats.
- Deixar assecar els talls sobre els portaobjectes un mínim de 30 minuts.
- Incubar els talls a 37 °C durant 30 minuts. Així aconseguim que s'enganxin al portaobjectes degut a la gelatina.
- Rentar amb PBS.

MATERIALS I MÈTODES

- Inactivar la peroxidasa endògena, amb una solució de PBS que conté 0.3% de H₂O₂, 10% metanol i 0.5% de TritóX-100
- Rentar 3 vegades amb PBS-Tritó 0.5%.
- Bloquejar durant 1 hora amb la solució de bloqueig.
- Incubar amb l'anticòs primari, a la dilució adient preparat en solució de bloqueig. La incubació estàndard és de 18 hores a 4°C.
- Rentar 3 vegades amb PBS-Tritó 0,5%.
- Incubar amb l'anticòs secundari, generalment a dilució 1/200, preparat en solució de bloqueig durant 1 hora a 25 °C.
- Rentar 3 vegades amb PBS
- Amplificar el senyal amb el kit ABC Peroxidase Staining (Thermo Scientific). Preparar segons les instruccions del kit. Posar Una gota de Reagent A amb una gota de Reagent B en 5 ml de PBS. Durant 1 hora a 25 °C.
- Revelar amb DAB :En 50 ml de PBS afegir 0.025 µg/ml DAB i 0.03% H₂O₂. Deixar que pugui la el color de la reacció fins a un màxim de 15 minuts
- Rentar amb aigua corrent 3 vegades
- Deshidratar les mostres, submergint-les en una concentració creixent d'alcohols: Alcohol 70%, alcohol 96%, alcohol absolut i finalment xilè.
- Muntar les mostres amb medi permanent DPX

14.3 Immunofluorescència (IF)

Solució de bloqueig: 0.3% Tritò X-100, 1% BSA en PBS

En aquest cas utilitzem anticòs secundari conjugat a un enzim a una molècula fluorescent, amb l'objectiu de detectar i localitzar una proteïna específica, dins la cèl·lula.

- Fer créixer les cèl·lules en plaques de cultiu cel·lular que contenen cobreobjectes prèviament esterilitzats.
- Fixar les cèl·lules amb 4% Formaldehid/ PBS, durant 20 minuts.
- Rentar 3 vegades amb PBS.

- Permeabilitzar les cèl·lules amb 0,2%/Tritó PBS durant 8 minuts.
- Rentar 3 cops amb PBS.
- Aquí es pot afegir a l'últim rentat 0,01%Azida sòdica/PBS i guardar les plaques a la nevera, o procedir amb la tècnica.
- Bloquejar els cobreobjectes amb la solució de bloqueig durant 30 minuts.
- Incubar amb l'anticòs primari, a la dilució adient, diluït en solució de bloqueig. La incubació estàndard és de 18 hores a 4°C.
- Rentar 3 vegades amb PBS.
- Incubar amb l'anticòs secundari, que porta conjugat una molècula fluorescent (Alexa Fluor 488 o Alexa Fluor 594) (ThermoFisher). Durant 1 hora a 25 °C a la foscor.
- Tenyir els nuclis amb DAPI (0.5 µg/µl) durant 15 minuts a 25 °C.
- Rentar 3 vegades amb PBS
- Muntar els cobreobjectes en un portaobjectes, fent servir medi de muntatge semi-permanent el Mowiol.
- Guardar les preparacions a 4°C i a les fosques fins al moment de l'observació.

14.4 Proximity Ligation Assay (PLA)

| |
|--|
| <u>Washing Buffer B:</u> 0.01M Tris-HCl pH 7.4, 0.15M NaCl, 0.05% Tween-20 |
|--|

Per tal de detectar les formes agregades de l' α -SYN, hem fet servir la tècnica de PLA. Aquesta tècnica ens permet detectar i localitzar interaccions entre proteïnes a nivell d'una única molècula. Es basa en la conjugació de dos anticossos amb un parell d'oligonucleòtids. En el nostre cas, com volem detectar l'agregació de l' α -SYN, per tant el mateix anticòs es conjuga amb els dos oligonucleòtids (PLUS i MINUS). En la **Figura 10** trobem un esquema de com funciona la tècnica. Si els dos oligonucleòtids estan suficientment a prop, al afegir la ligasa formarà un DNA tancat i circular que serà amplificat posteriorment per una polimerasa. En aquest pas amplifiquem fins a mil cops la senyal. Finalment, afegim un oligonucleòtid complementari unit a una molècula fluorescent, que només donarà fluorescència si els passos anteriors s'han produït.

Per a dur a terme aquesta tècnica, hem fet servir els kits de Sigma Aldrich: *Duolink® In Situ Detection Reagents Red*; *Duolink® In Situ Probemaker PLUS* i *Duolink® In Situ Probemaker MINUS*. Abans de procedir amb la tècnica, vam conjuguar el nostre anticòs als oligonucleòtids seguint les instruccions dels Kits:

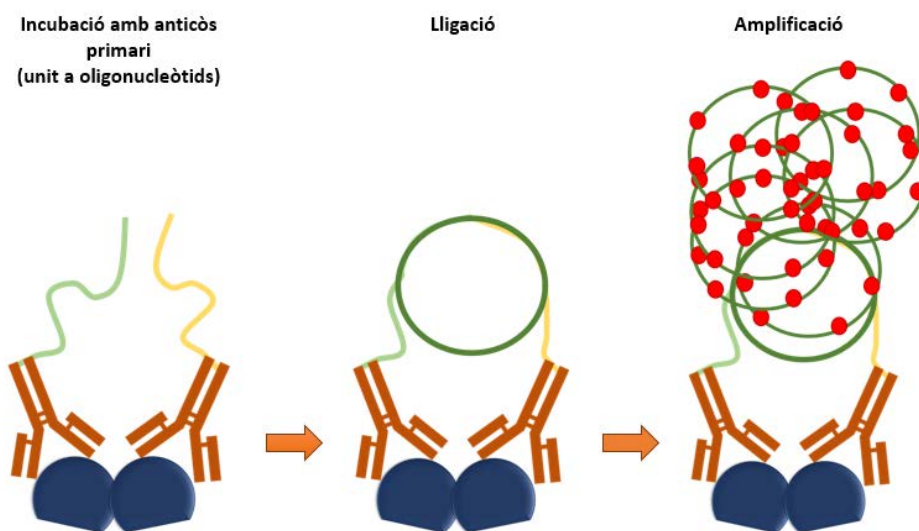


Figura 10. Representació esquemàtica de la tècnica PLA. L'anticòs primari conjugat prèviament amb els oligonucleòtids (PLUS i MINUS) s'incuba en la nostra mostra. Posteriorment si els oligonucleòtids estan suficientment a prop la lligasa formarà un DNA circular. Finalment, una polimerasa amplificarà aquest DNA circular amb oligonucleòtids que presenten fluorescència, donant una senyal fluorescent que detectarem amb un microscopi de fluorescència.

- Afegir el *Conjugation Buffer* al nostre anticòs (α -SYN) en una proporció 1:10 (2 μ l *conjugation buffer* i 20 μ l d'anticòs). Fer-ho per duplicat (PLUS i MINUS).
- Transferir cadascuna d'aquestes solucions al vial *PLUS oligonucleotide* o *MINUS oligonucleotide*. Incubar durant 18 hores a 25°C.
- Afegir 2 μ l de STOP reagent a cada vial i incubar durant 30 minuts a 25°C.
- Afegir 24 μ l de Storage solution per vial i guardar a 4°C fins que tenim les cèl·lules preparades.

Un cop tenim els anticossos conjugats, la tècnica procedeix de la següent manera:

- Preparar plaques de cultiu cel·lular amb cobreobjectes per sembrar les cèl·lules.
- Fixar les cèl·lules amb 4% Formaldehid/ PBS, durant 20 minuts.
- Rentar 3 vegades amb PBS.
- Permeabilitzar les cèl·lules amb PBS-Tritó 0,2 % durant 8 minuts.
- Rentar 3 vegades amb PBS. Aquí es pot afegir a l'últim rentat PBS-Azida sòdica 0,01% i guardar les plaques a la nevera, o procedir amb la tècnica.
- Afegir 20 µl/cubreobjecte de la solució formada pels anticossos d'α-SYN conjugats, segons indica el fabricant, en el nostre cas a una dilució 1:50. Deixar 18 hores a 4 °C.
- Rentar amb PBS.
- Afegir 20 µl per cubreobjecte, de la *solució lligasa*, formada per la lligasa(1:40), *stock lligasa* (1:5) i H₂O. Incubar 30 minuts a 37°C.
- Rentar amb PBS.
- Afegir 20 µl per cubreobjecte de la *solució d'amplificació*, formada per la polimerasa (1:80), *stock amplificació* (1:5) i H₂O. Incubar 80 minuts a 37 °C i en foscor.
- Rentar amb PBS.
- Tenir les mostres amb DAPI (0.5 µg/ µl) i incubar durant 2 minuts en foscor.
- Rentar 3 vegades amb el Washing Buffer B durant 10 minuts en foscor.
- Rentar un últim cop amb el Washing Buffer B (diluint 1/100 en PBS) 2 minuts en foscor.
- Muntar els cobreobjectes en un portaobjectes amb Mowiol.
- Guardar les preparacions a 4°C i a les fosques fins al moment de l'observació.

15. ANÀLISI D'EXPRESSIÓ

15.1 Extracció RNA

Amb aquesta tècnica aconseguim extraure el RNA dels pèl·lets cel·lulars, per analitzar l'expressió gènica d'específics gens . Fem servir el *High Pure RNA Isolation kit* (Roche). Es lisen els pèl·lets cel·lulars amb el tampó de lisi, proporcionat pel Kit, aquest lisat es passa a unes columnes on el RNA es queda retintut al filtre. Per purificar l'RNA el

màxim possible, es fa un tractament amb DNAsa durant 15 minuts. Després de rentar els filtres, eluïm el RNA en 30 µl d'H₂O estèril i el quantifiquem a un espectrofotòmetre Nanodrop 1000 (Thermo Scientific).

15.2 Retrotranscripció

Un cop obtingut el RNA de les mostres, el convertim a cDNA mitjançant un enzim amb activitat retrotranscriptasa. Agafem 1.5 µg de RNA per passar-lo a cDNA mitjançant PCR, seguint les instruccions del kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems). Es programa la PCR amb els següents passos:

- I. 60 minuts a 37 °C
- II. 5 minuts a 95 °C
- III. Manteniment a 4 °C

15.3 RT-PCR

Aquesta tècnica ens serveix per a detectar els nivells d'expressió d'un determinat gen en una mostra. En el nostre cas l'expressió gènica es fa a partir del cDNA obtingut en els apartats anteriors. En cada cicle de la PCR, es pren mesura de la fluorescència de la mostra. Com l'amplificació de la PCR és exponencial, es pot quantificar la quantitat de DNA segons en quin cicle d'amplificació la fluorescència supera el llindar establert prèviament. Per aquesta tècnica utilitzem el kit *Express Syber Green qPCR Supermix* (Invitrogen). Es preparen 0.3 µM dels primers (*Forward* i *Reverse*), 1 µg del cDNA o del DNA (en el cas dels experiments de CHIP) i el *Supermix 2X*, per a cada pou d'una placa de 96 pouets (Agilent Biosystems). La placa es col·loca en un termociclador Mx3005P (Stratagene) i es programa la PCR amb els següents passos:

- IV. 5 minuts a 95°C
- V. 15 segons a 95 °C
- VI. 60 segons a 60 °C (a on s'efectua la lectura)
- VII. Repetició des de el pas II, 35 cicles
- VIII. 1 minut a 95°C

- IX. Disminució gradual de la temperatura fins a 55 °C (lectures constants per a la corba de dissociació)
- X. Manteniment a 4°C

Els valors de la RT-PCR s'expressen en "ct", o dit d'una altra manera, el numero de cicles que triga cada mostra en creuar el valor llindar de la fluorescència. Quant més baix és el número de ct, més quantitat de DNA original conté la mostra. Com a control de la tècnica s'utilitza un gen que estigui expressat de la mateixa manera en totes les mostres o gen *housekeeping* (*actina*, *GAPDH*...)

| | Primers mRNA | Seqüència(5'-3') |
|--------------|--------------|----------------------|
| p27 ratolí | Forward | ATCTGCCTCTAAAAGCATTG |
| | Reverse | CCATCCCTAACGTTTATGTG |
| SNCA ratolí | Forward | GGTCCAAAACCTAAGGAAGG |
| | Reverse | CCTCCAACATTTGTCACTTG |
| E2F4 ratolí | Forward | ATGTCTTCAGAAGTGTTTGC |
| | Reverse | TCCAGGTTGTAGATGTAAT |
| GAPDH ratolí | Forward | ACCCAGAAGACTGTGGATGG |
| | Reverse | ACACATTGGGGGTAGGAACA |

Taula 4. Seqüència dels primers utilitzats en la RT-PCR dels experiments d'anàlisi d'expressió mitjançant mRNA.

A la **Taula 4** trobem els primers utilitzats en l'anàlisi de mRNA

15.4 Assaig luciferasa

Amb la finalitat de veure com p27, p21 i E2F4 modifiquen l'expressió del gen SNCA, es va clonar -2000kb *upstream* del TSS del gen SNCA, en un PGL3-promoter vector.

En primer lloc, silenciem amb shRNAs l'expressió de p27, p21 o E2F4 en la línia cel·lular HEK293T. Posteriorment, les cèl·lules es sembren en plaques de 24 pous i es co-transfecten, amb Lipofectamine 2000, el vectors pGL3 que porta clonat la seqüència de DNA en qüestió i el vector pCMV, que conté el gen de la galactosidasa i

MATERIALS I MÈTODES

que ens a serveix com a control de la taxa de transfecció. Com a control de l'experiment es transfecta una placa amb el vector buit pGL3-Ø.

A les 24 hores de la transfecció, es segueix el següent protocol, realitzant tots els passos són en fred:

- Rentar amb PBS i afegir 150µl de *Reporter Lysis Buffer* (Promega).
- Deixar la placa com a mínim 30 minuts a -80 °C.
- Descongelar en gel i recollir el contingut de cada pou en tubs.
- Centrifugar a 13000 rpm durant 10 minuts a 4°C.
- Passar el sobrenedant a un tub eppendorf nou.

L'activitat luciferasa es mesura en plaques de 96 pous opaques (adequades per a llegir activitat luciferasa) fent servir el *Luciferase Assay System* (Promega). Es carreguen per duplicat entre 10-20 µl de la mostra de lisat, obtingut anteriorment, per pou. La lectura es fa en un luminòmetre GLOMAX 96m (Promega) fent servir 50 µl de *Luciferase Assay Reagent*. Es realitzen lectures de 2 segons per pou.

Per a mesurar l'activitat β-galactosidasa, en una placa a part es carreguen 20 µl de mostra i 50 µl de reactiu ONPG (Sigma) Esperem a que la mostra es torni groga i es realitzen lectures a 30, 45 i 60 minuts en un lector de plaques Synergy 2 a 600 nm.

Per tal d'analitzar l'assaig luciferasa, fem servir el nostre valor de β-galactosidasa com a control, per a poder normalitzar totes les lectures de luciferasa. El valor de luciferasa / β-galactosidasa s'expressa com a RLU (Relative Luciferase Units).

16. EINES DE BIOINFORMÀTICA

16.1 Anàlisi de motius d'unió al DNA dels factors de transcripció

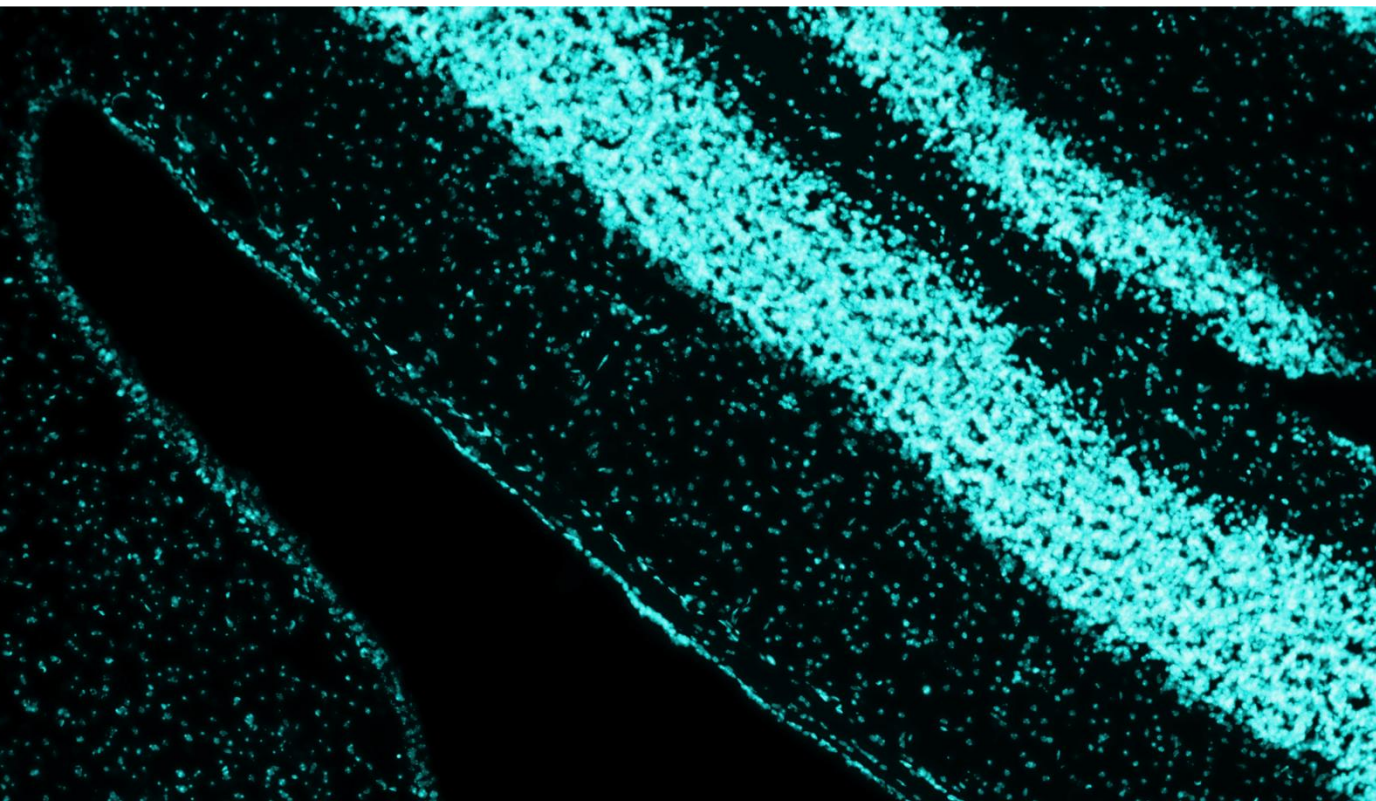
Amb la finalitat de trobar possibles llocs d'unió dels factors de transcripció E2F4 i C/EBPδ a la regió *upstream* i promotora del gen SNCA, vam fer ús d'eines bioinformàtiques per trobar regions *in silico* que poguessin unir aquests factors de transcripció.

Primerament, vam obtenir les -10000kb de la regió *upstream* del inici del gen SNCA (uc009cdn.1). Aquesta seqüència va ser utilitzada en el software lliure ALIBABA i es va fer servir la base de dades TRANSFAC per a seleccionar la matriu de C/EBP δ .

En el cas d'E2F4, vam fer servir una regió més petita, de -2500 kb, no vam trobar una matriu ja construïda de les regions d'unió d'E2F4 de ratolí, per tant, amb l'ajuda del Dr. Domenec Farré vam generar una matriu d'E2F4 per a poder comparar-la amb el nostre DNA.

Un cop obtingudes les possibles regions d'unió al nostre DNA, dissenyem primers que comprenguin aquestes regions per a un posterior anàlisi per CHIP.

RESULTATS



RESULTATS

17. ANÀLISI DEL PAPER DE P27 EN L'EXPRESSIÓ D' α -SYN EN MEFs.

17.1 Les MEFs p27KO presenten nivells elevats d' α -SYN en comparació amb les MEFs WT.

Com ja hem comentat prèviament, en el nostre laboratori s'han realitzat anàlisis d'expressió gènica (mitjançant *microarrays* d'expressió) en MEFs WT i MEFs p27KO, amb la finalitat d'identificar els gens regulats per p27. En aquests anàlisis, es va trobar que l'expressió del gen de l' α -SYN (denominat SNCA) es trobava incrementada entre 8 i 9 vegades en les MEFs p27KO. Per tant, en primer lloc, hem volgut determinar els nivells de la proteïna α -SYN en aquestes cèl·lules.

Com podem observar en la **Figura 11A**, quan analitzem per WB, els nivells de la proteïna α -SYN veiem que aquests es troben augmentats en les MEFs p27KO. Això indica que l'increment d'RNA missatger observat en els MEFs p27KO en els *microarrays* d'expressió, comporta també un increment dels nivells de proteïna.

17.2 Les MEFs p130KO i p130/p27 DKO presenten nivells elevats d' α -SYN en comparació amb les MEFs WT.

Posteriorment, i basats en resultats previs en el nostre laboratori de demostraven que p27 regula l'expressió d'alguns gens en associació als complexos E2F4/p130, vam analitzar els nivells d' α -SYN en MEFs p130KO. La proteïna p130 és una proteïna que s'associa a E2F4 en molts promotors gènics i conjuntament, provoquen la repressió de la seva expressió. Sense p130, E2F4 no pot ser reclutada en aquestes regions de la cromatina, de tal manera que a les cèl·lules que no expressen p130, E2F4 no està unida en aquestes regions reguladores. Mitjançant WB vam analitzar els nivells d' α -SYN en cèl·lules MEFs p130KO i també en MEFs p130/p27 doble KO (DKO), aquests resultats es mostren en la **Figura 11B i 11C**. En ambdós casos trobem que els nivells d' α -SYN augmenten respecte a les cèl·lules control, per tant, els complexos p130/E2F4 podrien participar junt amb p27 en la regulació de l'expressió del gen SNCA.

RESULTATS

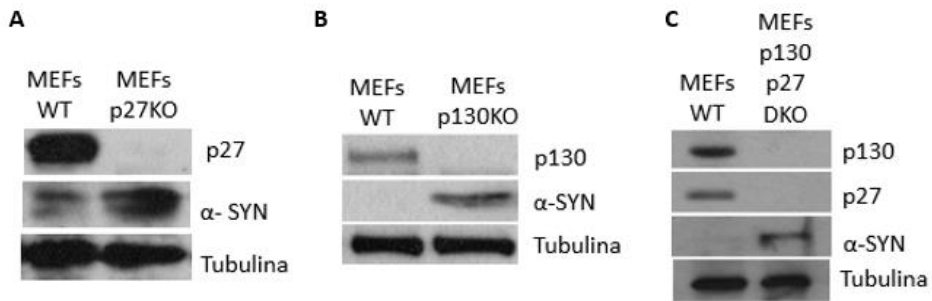


Figura 11. Nivells d' α -SYN en MEFs. Els nivells d' α -SYN s'han analitzat per WB en MEFs p27KO (A), p130KO (B) i p27/p130 DKO (C). La tubulina s'ha determinat com a control de càrrega.

17.3 Estudi de l'especificitat de l'anticòs d' α -SYN

També hem volgut estudiar l'estat d'agregació de l' α -SYN en aquestes cèl·lules deficientes en p27. Segons diversos estudis, les diferents formes de l' α -SYN agregada es poden detectar per WB. No obstant, en molts d'aquests estudis manquen controls d'especificitat de l'anticòs i per tant, nosaltres vam voler garantir que les bandes identificades per l'anticòs utilitzat en aquests experiments fossin específiques, per tal de garantir la veracitat dels nostres resultats. Concretament, vam utilitzar MEFs KO per a l' α -SYN, (MEFs SNCAKO). En aquestes cèl·lules, totes les bandes que apareguin en els WB emprant anticòssos contra l' α -SYN, seran bandes inespecífiques que no corresponen a aquesta proteïna. A la **Figura 12** es pot observar un WB en el que la única banda que no apareix en les cèl·lules MEFs SNCAKO es la d'aproximadament 21 kDa (marcada amb una fletxa) que correspon a l' α -SYN monomèrica. Les altres bandes identificades per l'anticòs no són específiques ja que també apareixen a les cèl·lules MEFs SNCAKO. Els experiments d'absorció amb el pèptid també mostren resultats similars (no s'ensenyen). Per tant, arribem a la conclusió que no podem determinar l'estat d'agregació de l' α -SYN per WB degut a la inespecificitat de l'anticòs.

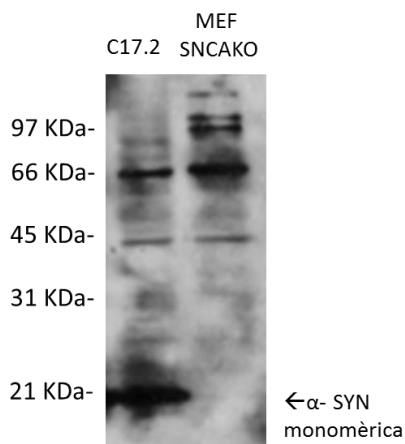


Figura 12. Control d'especificitat de l'anticòs d' α -sinucleïna per WB. Els nivells d' α -SYN s'han analitzat per WB en C17.2 i emprant com a control MEFs SNCAKO, determinant quines bandes del WB són les específiques

18. ESTUDI DE L'EXPRESSION D' α -SYN EN SECCIONS DE CERVELLS DE RATOLÍ I EN NEURONES DE RATOLÍ EN CULTIU.

18.1 Els nivells d' α - SYN es troben augmentats en seccions de cerebel de ratolins p27KO

Un cop demostrat que en les MEFs p27KO els nivells d' α - SYN monomèrica es troben augmentats, vam voler veure com s'afecta el patró d'expressió d' α - SYN en els cervells de ratolins p27KO. Concretament, vam analitzar les zones que es veuen més afectades pels agregats i Cossos de Lewy en la MP: Nucli Estriat, *Substància Nigra* i *Locus Coeruleus/Cerebel*.

Vam procedir a congelar i tallar 6 cervells de ratolins p27KO i 6 cervells de ratolins WT, cedits pel grup de la Dra. Isabel Fariñas de la Universitat de València. Emprant un criòstat vam obtenir seccions de 20 μ m de les zones abans esmentades i mitjançant tècniques d' IHQ vam analitzar els talls dels cervells. Primerament, vam comprovar l'especificitat de l'anticòs en un cervell SNCAKO. Malauradament, l'anticòs marcava

RESULTATS

moltes zones dels cervells dels ratolins SNCACO indicant que en moltes regions del cervell del ratolí l'anticòs donava una reacció inespecífica. L'única zona en la que vam observar una bona especificitat del nostre anticòs, va ser a la zona del cerebel. En

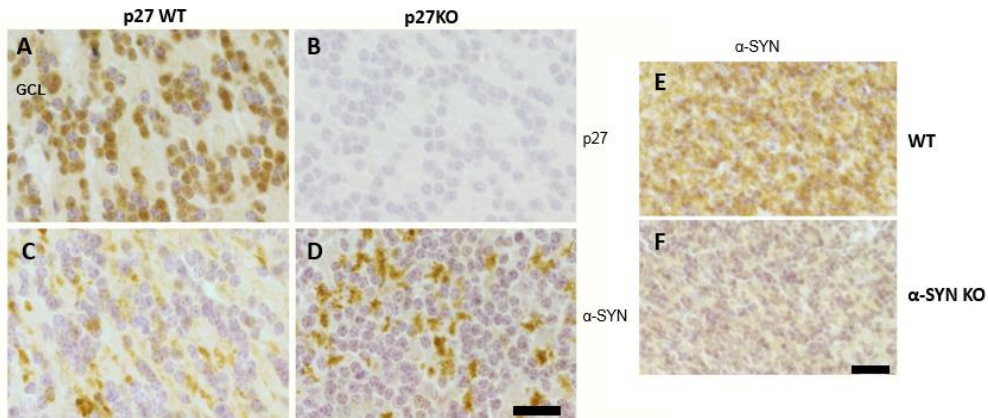


Figura 13. Nivells de p27 i α -SYN en seccions de cerebel de ratolins WT i p27 KO. La distribució de p27 i α -SYN s'ha visualitzat mitjançant IHQ en seccions de ratolins WT, p27KO i SNCACO (A) Tinció de p27 en seccions WT en la capa granular (GCL). (B) Tinció de p27 en seccions p27KO. (C) Tinció d' α -SYN tant en seccions WT i p27KO (D). (E) L'especificitat de l'anticòs d' α -SYN en seccions de cerebel de ratolins WT i SNCACO (F). Barra d'escala = 10 μ m

aquesta, s'observa com en la capa granular (GCL) els nivells d' α -SYN augmenten en els ratolins p27KO en contraposició amb els ratolins WT (Figura 13).

18.2 Creació de línies cel·lulars C17.2 KO de p27 o E2F4 mitjançant la tecnologia CRISPR/Cas9. Efectes sobre l'expressió d' α -SYN

Una vegada ja teníem bastants indicis de que p27 podria regular l'expressió d' α -SYN, vam plantejar-nos analitzar aquesta regulació en una línia cel·lular immortalitzada de ratolí amb fenotip neuronal. Per aquesta raó, vam escollir la línia cel·lular c17.2, una línia immortalitzada de progenitors neurals derivada de la capa granular del cerebel. En aquestes cèl·lules vam silenciar tant p27 com E2F4, i ho vam fer amb la tecnologia de CRISPR/Cas9. Amb aquesta tècnica vam aconseguir generar alguns clons completament deficients per a la proteïna d'interès (Figura 14). Nosaltres vam escollir

per a la realització dels treballs posteriors els clons que no presenten cap tipus d'expressió de p27 o E2F4, ni de cap forma truncada d'aquestes proteïnes.

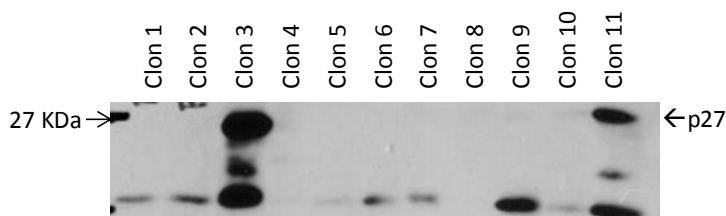


Figura 14. Nivells de p27 dels clons obtinguts per CRISPR/Cas9. Els nivells de p27 s'han analitzat per WB en els clons de C17.2 obtinguts per CRISPR/Cas9. En alguns clons es poden apreciar formes de p27 truncades de pes molecular més baix.

1.1.2 Els nivells d' α -SYN augmenten en les cèl·lules c17.2 p27KO

Dels 11 clons de possibles KO de p27, vam seleccionar els dos que presentaven nivells inexistents de p27 o d'alguna forma truncada (clons 4 i 8). Aquests clons s'anomenaran P1 i P2 d'ara en endavant. En aquests dos clons s'observa un augment de l' α -SYN tant a nivell de proteïna com de mRNA respecte els controls (**Figura 15A i 15B**). Per tant, podem dir que en aquestes cèl·lules, la pèrdua de p27 comporta un augment dels nivells d' α -SYN monomèrica, tal i com em vist també en les MEFs i en la capa granular del cerebel de ratolins p27KO.

Amb la finalitat de reafirmar que en aquestes cèl·lules l'augment d' α -SYN ve donat per la pèrdua de p27, vam decidir re-introduir p27 en el clon P1, mitjançant un vector lentiviral portador del gen de la p27. A la **Figura 15C i 15D** observem que la re-introducció de p27 indueix la reducció d' α -SYN tan a nivell de proteïna com de mRNA. Aquest experiment confirma que efectivament p27 participa en la regulació de l'expressió de l' α -SYN en aquestes cèl·lules. A més, aquests clons són bons models cel·lulars per a l'anàlisi d'aquesta regulació.

RESULTATS

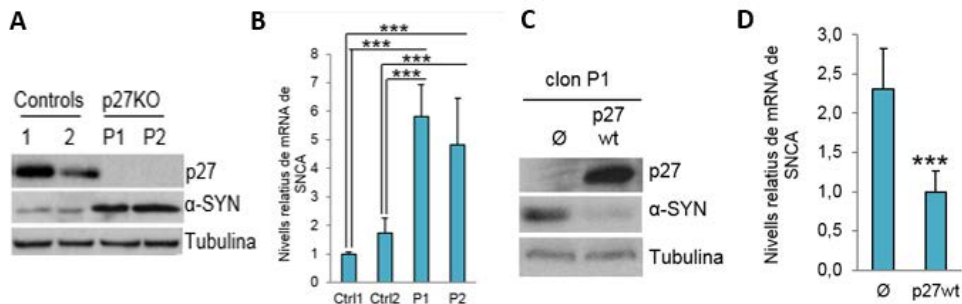


Figura 15. p27 regula l'expressió d'α-SYN. (A) Els nivells de p27 i α-SYN s'han determinat per WB en els dos clons control (1 i 2) i en els dos clons p27KO (P1 i P2). La tubulina s'ha determinat com a control de càrrega. (B) Nivells de mRNA d'α-SYN determinats en els clons per qPCR. Els resultats s'expressen relatius al control 1 (Ctrl1). (C) Les cèl·lules P1 s'han infectat amb lentivirus amb vector buit (∅) o amb p27 WT (p27wt). Els nivells de p27 i α-SYN s'han determinat per WB. La tubulina s'ha determinat com a control de càrrega. (D) Nivells de mRNA d'α-SYN determinats per qPCR en les mateixes cèl·lules que en (C). En tots els experiments els resultats són la mitja ± SD de com a mínim tres experiments independents. Els estudis estadístics es van realitzar mitjançant el test T-Student ***P<0.001.

1.1.3 Els nivells d'α-SYN augmenten en les cèl·lules c17.2 E2F4KO

Per tal d'analitzar si el paper de la p27 en la regulació de l'expressió de l'α-SYN està mediat pel complex p130/E2F4, tal com hem observat en les MEFs, vam crear, en paral·lel clons E2F4KO en la mateixa línia cel·lular c17.2 emprant la mateixa tecnologia CRISPR/Cas9. Dels clons obtinguts en vam seleccionar dos (E1 i E2) que no expressen E2F4. Tal com es pot observar a la **Figura 16**, la pèrdua d'E2F4 també comporta un augment dels nivells d'α-SYN tant a nivell de proteïna com a nivell de mRNA.

Aquests resultats recolzen la idea de que en diferents tipus cel·lulars (MEFs i C17.2) p27 regula l'expressió d'α-SYN a través de la seva unió als complexos p130/E2F4.

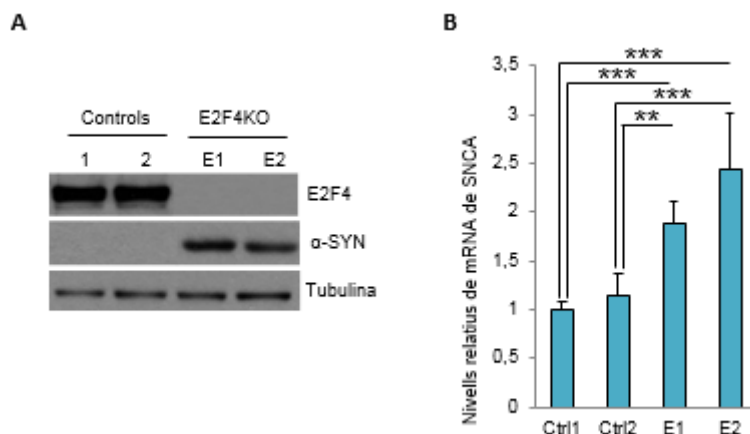


Figura 16. E2F4 regula l'expressió d'α-SYN. (A) Els nivells d'E2F4 i α-SYN s'han determinat per WB en els dos clons control (1 i 2) i en els dos clons E2F4KO (E1 i E2) La tubulina s'ha determinat com a control de càrrega. (B) Nivells de mRNA d'α-SYN determinats en els clons per qPCR. Els resultats s'expressen relatius al control 1 (Ctrl1). En l'experiment els resultats són la mitja ± SD de com a mínim tres experiments independents. Els estudis estadístics es van realitzar mitjançant el test T-Student ***P<0.001, **P<0.01

18.3 P27 i E2F4 s'uneixen a regions promotores del gen SNCA

Segons el model postulat per el nostre grup d'investigació, la p27, unida als complexos Ciclines-CDKs interacciona amb la p130 i E2F4, associades a les regions de la cromatina implicades en la regulació de expressió dels gens. D'aquesta manera, p27 apropa la CDK al substrat p130 per tal que el pugui fosforilar. Per tant, si considerem que p27 regula de manera directa l'expressió d' α-SYN a través del complexos p130/E2F4 hauríem de demostrar que tant p27 com E2F4, s'uneixen a alguna regió de la cromatina implicada en la regulació de l'expressió d'aquest gen. Donat que E2F4 és l'únic factor d'aquest complex que interactua de manera directa amb el DNA, vam analitzar *in silico* una regió de 2000 pb *upstream* del gen SNCA de ratolí, per verificar si hi ha possibles motius d'unió d'E2F4 en aquesta regió. Vam aconseguir identificar dues possibles zones d'unió d'E2F4 a aquesta regió de cromatina. Concretament, vam identificar una regió que va des de -2200 pb fins a -1350 pb (regió 1) i una altra que va des de -2300 pb al TSS (regió 2) (Figura 17A).

RESULTATS

Per tal de comprovar si aquestes regions uneixen E2F4 i p27, vam dissenyar *primers* de les dues regions del promotor que contenien aquests motius d'unió d'E2F4. Posteriorment, vam realitzar ChIPs anti-p27, i anti-E2F4 en cèl·lules C17.2 per tal de poder analitzar aquestes interaccions. En les dues regions analitzades per RT-qPCR, observem com efectivament hi ha unió de les 2 proteïnes. En aquests experiments també vam analitzar la interacció de p21 ja que aquesta proteïna també col·labora amb p27 en aquest mecanisme de regulació de l'expressió gènica. Aquests resultats indiquen que efectivament p27 podria participar de manera directa en la regulació de l'expressió del gen SNCA. (Figura 17B i 17C)

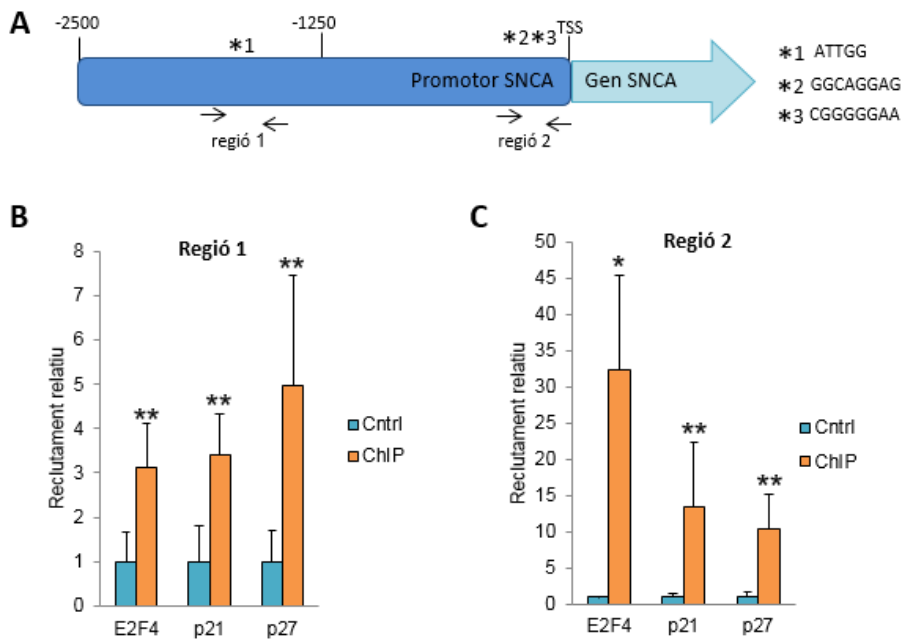


Figura 17. Experiments de ChIP en C17.2 (A) Representació dels llocs d'unió putatius d'E2F4 en la regió *upstream* del gen SNCA. Dos regions (Regió 1= -2200 a -1350 pb i Regió 2 = -300 al TSS) contenen possibles seqüències consensu d'unió a E2F4. La seqüència *1 es troba a la regió 1 mentre que les seqüències *2 i *3 es troben a la regió 2. (B) Associació de p27, p21 i E2F4 en la Regió 1 del promotor de SNCA determinat per ChIP en cèl·lules c17.2. (C) Associació de p27, p21 i E2F4 en la Regió 2 del promotor de SNCA determinat per ChIP en cèl·lules c17.2. En tots els experiments els resultats són la mitja \pm SD de com a mínim tres experiments independents. Els estudis estadístics es van realitzar mitjançant el test T-Student ***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05

Per tal de confirmar que aquestes regions són realment zones de regulació de l'expressió del gen SNCA i que tant p27 com E2F4 participen en aquesta regulació, vam realitzar assajos luciferasa en cèl·lules HEK-293T. Aquests assajos es van realitzar emprant un fragment de la cromatina que inclou la regió des del TSS fins a -2500 pb del promotor del gen SNCA de ratolí. Les cèl·lules portadores d'aquesta regió del promotor del gen SNCA van ser tractades amb shRNAs específics per tal de

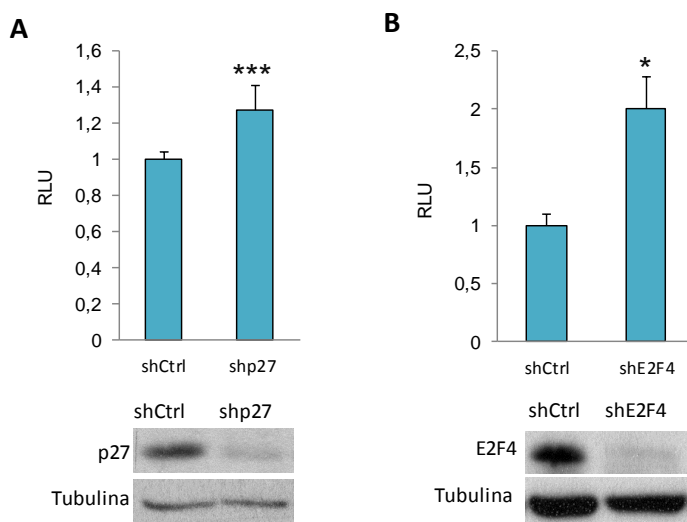


Figura 18. Assaig luciferasa en les cèl·lules HEK-293T. (A) Expressió del gen reporter de la luciferasa en HEK-293T infectades amb shRNA Control o shRNA per p27. En el panel inferior es mostra un WB que mostra els nivells de p27 en aquestes cèl·lules, fent servir com a control de càrrega la Tubulina. (B) Expressió del gen reporter de la luciferasa en HEK-293T infectades amb shRNA Control o shRNA per E2F4. En el panel inferior es mostra un WB que mostra els nivells de E2F4 en aquestes cèl·lules, fent servir com a control de càrrega la Tubulina. En tots els experiments els resultats són la mitja \pm SD de com a mínim tres experiments independents. Els estudis estadístics es van realitzar mitjançant el test T-Student *** $P < 0.001$, * $P < 0.05$

produir el silenciament de p27 o d'E2F4. Tal com es pot observar a la **Figura 18**, la disminució de p27 o de E2F4 indueix l'expressió del gen de la luciferasa indicant que efectivament tant p27 com E2F4 reprimeixen l'expressió del gen SNCA actuant sobre la regió promotora d'aquest gen.

1.1.4 Els nivells d' α -SYN estan regulats per l'activitat de les CDKs

RESULTATS

El nostre model de regulació de l'expressió gènica per part de p27 mitjançant els complexos E2F4/p130 implica un paper rellevant de l'activitat de les CDKs. Així doncs, la inhibició de l'activitat CDK, produiria que el complex p130/E2F4 no s'alliberés de les regions reguladores dels gens i en conseqüència, la seva expressió es trobaria reprimida. Per tal de comprovar el possible paper de l'activitat de les CDKs en la regulació de l'expressió del gen de l' α -SYN, vam analitzar l'efecte d'un inhibidor de les CDKs, la Roscovitina, sobre els nivells de l' α -SYN mitjançant WB. Tal com es pot

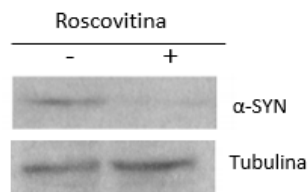


Figura 19. Efecte de la roscovitina sobre els nivells d' α -SYN. Els nivells d' α -SYN s'han determinat per WB en cèl·lules C17.2 tractades (+) o no tractades (-) amb l'inhibidor de CDKs roscovitina (20 μ M)

veure a la **Figura 19** el tractament de cèl·lules c17.2 amb 20 μ M de roscovitina, indueix una disminució dels nivells d' α -SYN, indicant que les CDKs participen en el procés d'expressió de l' α -SYN.

Per tant, com a conclusió d'aquests resultats, podem dir que p27 juga un paper rellevant en la regulació de l'expressió de l' α -SYN, d'acord amb el model descrit en el nostre laboratori per a altres gens. En aquest cas, a la regió propera del promotor del gen SNCA, hi ha dues regions d'unió a d'E2F4 a les que també s'hi associa p27. En aquestes regions trobaríem units els complexos repressors, provocant una supressió de l'expressió del gen SNCA. Quan els nivells d'E2F4, p130 o p27 disminueixen, aquests complexos es desorganitzen i la transcripció del gen SNCA s'activaria. Això indica que l'activació de la transcripció depèn de l'activitat quinasa de les CDKs, que fosforilarien p130 i desacoblarrien els complexos.

19. ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ D' α -SYN EN CÈL·LULES NEURALS HUMANES SH-SY5Y

Posteriorment, ens vam plantejar analitzar el paper de p27 en regulació de l'expressió d' α -SYN, en un model cel·lular humà, concretament les cèl·lules SH-SY5Y. Aquestes cèl·lules són neurones procedents d'un neuroblastoma i són relativament semblants a les cèl·lules dopaminèrgiques. Aquesta línia cel·lular està àmpliament utilitzada en la recerca de la MP. Vam voler treballar amb cèl·lules humanes per tal de poder detectar els l'agregació de l' α -SYN, ja que com hem comentat abans la capacitat d'agregació i les formes agregades de l' α -SYN de ratolí no són les mateixes que en la proteïna humana.

En aquestes cèl·lules, vam analitzar els efectes del silenciament, mitjançant vectors lentivirals portadors de ShRNAs específics, de les proteïnes p27 o p130, sobre l'expressió de l' α -SYN.

Hem observat que quan disminuïm els nivells de p27 en aquestes cèl·lules, es produeix una disminució de la quantitat d' α -SYN monomèrica detectada per WB. Una possible explicació seria que aquesta disminució es podria produir per un increment de l'agregació de l' α -SYN que per WB no es pot detectar (**Figura 20A**).

És interessant el fet que quan induïm la baixada dels nivells de p130, també podem veure (per WB) que es produeix una clara disminució de l' α -SYN monomèrica (**Figura 20B**). Aquests resultats (que aparentment són contradictoris amb els observats en els MEFs p27KO i p130KO) es podrien justificar per la diferent capacitat d'agregació de l' α -SYN en aquests dos tipus cel·lulars. Mentre que en les cèl·lules humanes l' α -SYN

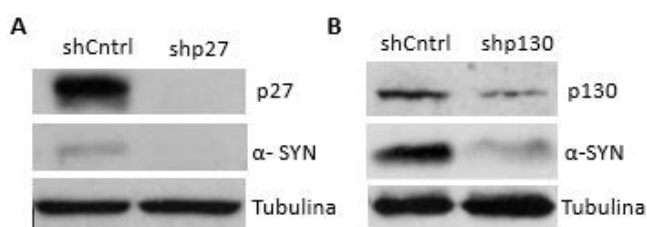


Figura 20. Efecte del silenciament de p27 i p130 sobre els nivells d' α -SYN. (A) Determinació dels nivells de p27 i α -SYN en cèl·lules SH-SY5Y infectades amb shRNA Control (shCntrl) o shRNA per p27 (shp27). La tubulina s'ha determinat com a control de càrrega. (B) Determinació dels nivells de p130 i α -SYN en cèl·lules SH-SY5Y infectades amb shRNA Control (shCntrl) o shRNA per p130 (shp130). La tubulina s'ha determinat com a control de càrrega.

RESULTATS

podria trobar-se agregada, en les de ratolí no.

Per tal d'analitzar l'agregació de l' α -SYN hem emprat la tècnica de "proximity ligation assay" (PLA). Els estudis de PLA en cèl·lules amb nivells baixos de p27 (p27KD) ens han permès observar que aquestes cèl·lules presenten agregats citoplasmàtics d' α -SYN indicant que efectivament, la disminució de p27 no sols indueix la síntesi d' α -SYN sinó que també indueix la seva agregació (**Figura 21**). Per tant, possiblement, l' α -SYN de nova síntesi, ràpidament s'organitza en forma d'agregats. Es per això que la forma monomèrica es veuria disminuïda.

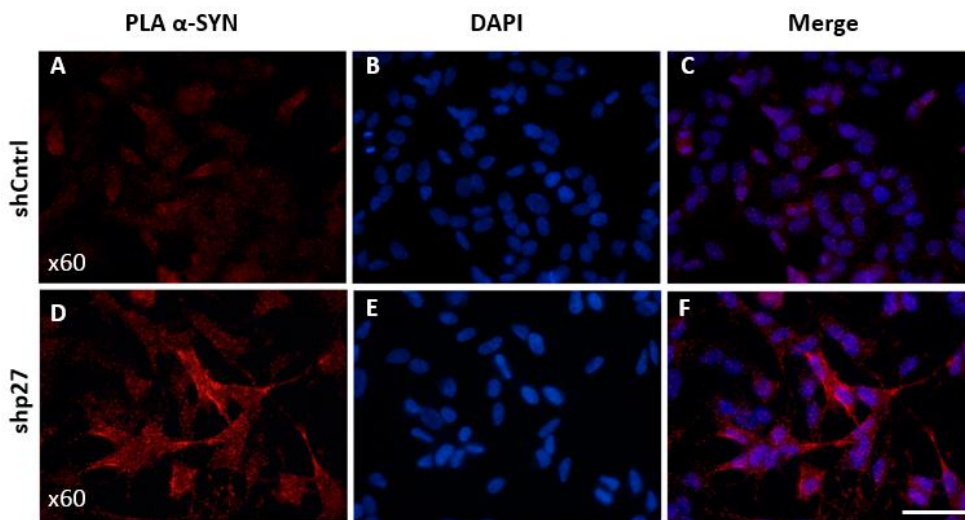


Figura 21 . Detecció dels agregats d' α -SYN mitjançant la tècnica PLA a les cèl·lules SH-SY5Y **shp27**. (A) Tècnica de PLA per α -SYN en cèl·lules SH-SY5Y infectades amb shRNA Control (shCntrl) en vermell (B) Tinció nuclear DAPI del mateix camp de cèl·lules en blau (C) Fusió de les dues imatges anteriors (Merge) (D) Tècnica de PLA per α -SYN en cèl·lules SH-SY5Y infectades amb shRNA per p27 (shp27) en vermell (E) Tinció nuclear DAPI del mateix camp de cèl·lules en blau (F) Fusió de les dues imatges anteriors (Merge). Barra d'escala =50 μ m

També hem estudiat l'agregació de l' α -SYN, en les cèl·lules amb nivells baixos de p130 (p130KD). En aquest cas, també observem que l' α -SYN present en aquestes cèl·lules, està agregada. Així doncs, la pèrdua de p130 provoca un increment en la quantitat i en l'agregació de l' α -SYN en les cèl·lules SH-SY5Y. És interessant observar que els patrons d'agregació entre les cèl·lules p27KD i les p130KD són diferents. Així doncs, mentre que en les cèl·lules p27KD el patró d'agregació és essencialment citoplasmàtic, en les

cèl·lules p130KD trobem una alta concentració d'agregats en el nucli cel·lular (**Figura 22**). En resum, aquests resultats indiquen que la disminució de p27 o de p130 indueix l'increment d'expressió d' α -SYN però aquesta α -SYN ràpidament s'agrega, la qual cosa provoca una disminució de la quantitat d' α -SYN monomèrica que es pot observar per WB.

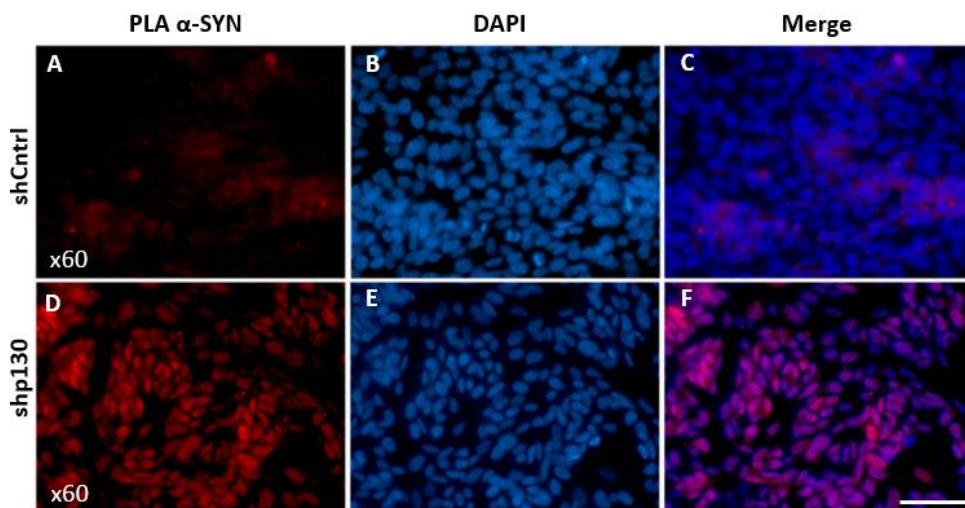


Figura 22. Detecció dels agregats d' α -SYN mitjançant la tècnica PLA a les cèl·lules SH-SY5Y **shp130**. (A) Tècnica de PLA per α -SYN en cèl·lules SH-SY5Y infectades amb shRNA Control (shCntrl) en vermell (B) Tinció nuclear DAPI del mateix camp de cèl·lules en blau (C) Fusió de les dues imatges anteriors (Merge) (D) Tècnica de PLA per α -SYN en cèl·lules SH-SY5Y infectades amb shRNA per p130 (shp130) en vermell (E) Tinció nuclear DAPI del mateix camp de cèl·lules en blau (F) Fusió de les dues imatges anteriors (Merge). Barra d'escala = 50 μ m

20. PAPER DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓ C/EBP δ EN LA REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ D' α -SYN. RELACIÓ ENTRE P27 I C/EBP δ

En col·laboració amb el grup del Dr. Saura de la Universitat de Barcelona vam estudiar el paper del factor de transcripció C/EBP δ en la regulació de l'expressió del gen SNCA. En aquest treball es demostra que en diferents regions del cervell de ratolins C/EBP δ -KO els nivells d' α -SYN es troben augmentats, indicant que C/EBP δ regula l'expressió d' α -SYN. En aquest estudi també es pot observar que en cèl·lules C/EBP δ -KO, quan es trona a re-introduir C/EBP δ , els nivells d' α -SYN es redueixen. A més, experiments de

RESULTATS

ChIP indiquen que a la regió promotora del gen SNCA hi ha llocs d'unió de C/EBP δ . Tot això indica que C/EBP δ pot estar regulant l'expressió gènica del gen SNCA unint-se directament al promotor d'aquest gen. Finalment, assajos luciferasa indiquen que C/EBP δ actua reprimint l'expressió d' α -SYN a través de l'acció directa sobre el promotor.

Com que nosaltres hem demostrat que p27 també regula l'expressió d' α -SYN per un mecanisme que implica la seva unió a la regió promotora d'aquest gen, vam voler comprovar si p27 i C/EBP δ podien col·laborar en aquesta regulació. En primer lloc, vam estudiar mitjançant tècniques de co-IP amb anti-C/EBP δ si hi havia una interacció entre p27 i C/EBP δ en cèl·lules c17.2. Els resultats d'aquests experiments, van indicar

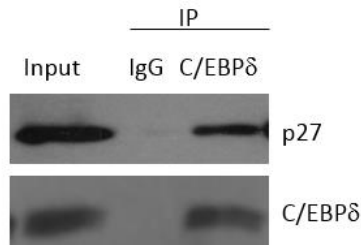


Figura 23. WB de la IP de C/EBP δ en C17.2. Les cèl·lules C17.2 van ser lisades i immunoprecipitades amb un anticòs anti-C/EBP δ o amb IgG com a control. Posteriorment, es va determinar la presència de p27 i C/EBP δ mitjançant WB.

que efectivament aquestes dues proteïnes interaccionen (**Figura 23**).

Un cop establert que C/EBP δ i p27 interaccionen, vam voler identificar a quines regions del promotor del gen SNCA de ratolí trobem unió de C/EBP δ . Utilitzant la base de dades TRANSFAC i el software ALIBABA, vam identificar varies possibles zones d'unió de C/EBP δ al promotor de SNCA. Concretament, vam establir 6 regions numerades de 1 a 6 segons la seva distància al origen de transcripció.

Posteriorment, vam efectuar un ChIP amb anticossos contra la C/EBP δ i contra p27 en les cèl·lules c17.2, emprant *primers* específics per a cascuna d'aquestes regions. Els resultats obtinguts ens indiquen que en 5 de les 6 regions analitzades hi ha unió de C/EBP δ i també unió de p27. (**Figura 24**)

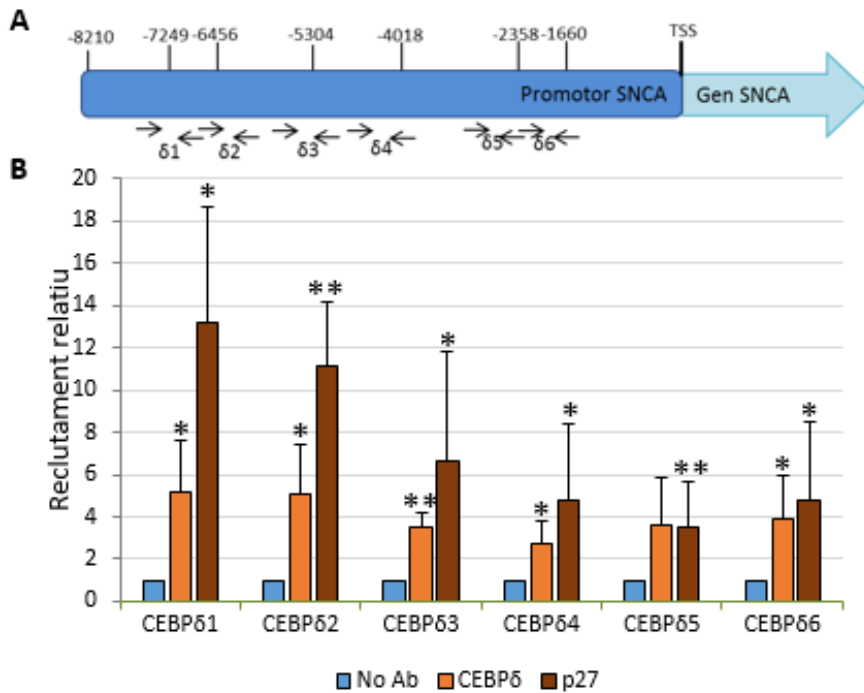


Figura 24. Experiments de ChIP en C17.2 (A) Representació dels llocs d'unió putatius de C/EBP δ en la regió *upstream* del gen SNCA. Sis regions (anomenades de δ_1 a δ_6) contenen possibles seqüències consensu d'unió a C/EBP δ . **(B)** Associació de p27 i C/EBP δ en les sis regions del promotor de SNCA determinat per ChIP en cèl·lules c17.2. En tots els experiments els resultats són la mitja \pm SD de com a mínim tres experiments independents. Els estudis estadístics es van realitzar mitjançant el test T-Student, **P<0.01, *P<0.05

Per tant, aquestes dades demostren la interacció entre p27 i C/EBP δ i la localització conjunta en diferents regions del promotor del gen SNCA, suggerint una col·laboració entre aquestes dues proteïnes en la regulació de l'expressió de l' α -SYN.

La regulació de l'expressió del gen SNCA entre p27 i C/EBP δ seria un mecanisme alternatiu i independent a la regulació per part de p27 i p130/E2F4.

21. P27 COM ELEMENT CLAU DE LA MALALTIA DE PARKINSON.

21.1 La disminució de p27 podria estar implicada en el desencadenament de la MP.

RESULTATS

Tal com hem mencionat a la introducció, els resultats obtinguts en un anàlisi d'expressió gènica en MEFs p27KO vs WT, realitzat pel nostre grup d'investigació, mostren un nombre rellevant de gens relacionats amb la MP que es troben alterats en absència de p27. En resum, la pèrdua de p27 en aquestes cèl·lules induïx canvis moleculars que mimetitzen els observats a la MP. Concretament, s'observa: 1) una sobre-expressió de l' α -SYN, 2) una disminució de diferents subunitats del complex I de la cadena respiratòria y 3) una sobre-expressió de diferents citoquines inflamatòries. Aquests canvis moleculars coincideixen amb les alteracions causants dels tres principals Hallmarks de la MP: 1) Increment i agregació de l' α -SYN, 2) disfunció mitocondrial i estrès oxidatiu i 3) neuro-inflamació. Per tant, postulem que la MP podria sorgir d'una pèrdua progressiva de p27 en les neurones. Aquesta reducció de p27 podria conduir a l'apoptosi de les neurones dopaminèrgiques de la SNpc, que serien les més sensibles a aquestes alteracions, resultant en la simptomatologia associada a aquesta malaltia. En aquesta primera part de la tesi hem definit el mecanisme de com p27 regula l'expressió de la l' α -SYN, i hem constatat que aquest mecanisme és operatiu en cultius de neurones humanes com les SH-SY5Y. Una vegada aclarit aquest punt, es vam plantejar d'estudiar si realment els nivells de p27 estan disminuïts en les cèl·lules dels malalts de Parkinson i a través de quins mecanismes es podria produir aquesta pèrdua de p27.

21.2 Els astròcits de malalts de Parkinson portadors de la mutació de LRRK2 (G2019S) presenten nivells més baixos de p27 i més elevats d' α -SYN

Per avançar en el estudi de la implicació de la p27 en el desencadenament de la MP, vam analitzar els nivells de p27 en mostres de pacients afectats d'aquesta malaltia. En primer lloc, amb la col·laboració del laboratori del Dr. Angel Raya, vam generar cèl·lules pluripotents (iPSCs) a partir de fibroblasts humans procedents d'un pacient de MP, portador de la mutació LRRK2 (G2019S). LRRK2 és una quinasa i aquesta mutació (híper-activadora de la quinasa) és de les més prevalents en el malalts que presenten una MP familiar. Aquestes cèl·lules es van posteriorment diferenciar a astròcits. Aquests astròcits es van utilitzar per determinar els nivells de p27 i d' α -SYN

mitjançant immunofluorescència. Els resultats van ser molt interessants, ja que es va observar que les cèl·lules portadores d'aquesta mutació, pràcticament no presenten p27 i pel contrari presenten nivells elevats d' α -SYN (**Figura 25**). Aquests resultats suggereixen que en aquests malalts, la hiper-activació de LRRK2 podria ser la responsable de la degradació de p27 que en conseqüència induiria l'increment d' α -SYN.

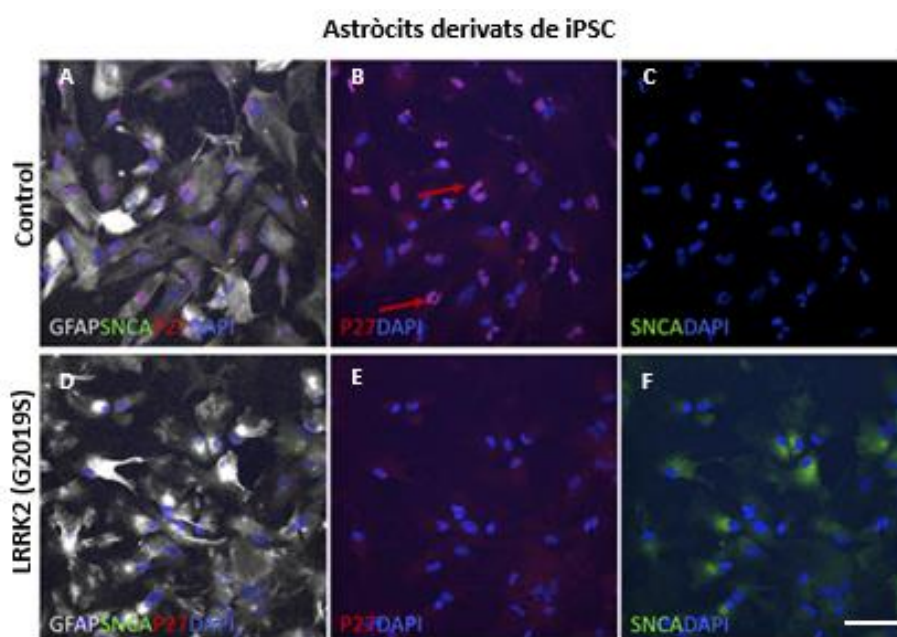


Figura 25. Nivells de p27 i α -SYN en astròcits de pacients LRRK2 (G2019S) derivats d'iPSC. **(A)** Tinció GFAP (blanc), SNCA (verd), (p27 (vermell) i DAPI (blau) en astròcits derivats d'iPSC de controls. **(B)** Tinció p27 (vermell) i DAPI (blau) en les mateixes cèl·lules control **(C)** Tinció SNCA (verd) i DAPI (blau) en les mateixes cèl·lules control **(D)** Tinció GFAP (blanc), SNCA (verd), (p27 (vermell) i DAPI (blau) en astròcits derivats de iPSC de pacients de MP amb la mutació LRRK2 G2019S. **(E)** Tinció p27 (vermell) i DAPI (blau) en les mateixes cèl·lules de pacients **(F)** Tinció SNCA (verd) i DAPI (blau) en les mateixes cèl·lules de pacients. Barra d'escala = 40 μ m

21.3 En el Locus Coeruleus de pacients mutants de LRRK2 (G2019S) hi ha disminució dels nivells de p27.

A continuació, vam voler determinar si les neurones dels malalts de Parkinson, portadors de la mutació LRRK2 (G2019S) tenien nivells baixos de p27. Així doncs, vam

RESULTATS

estudiar, mitjançant immunohistoquímica, els nivells de p27 en 6 seccions de mostres *post-mortem* que contenen la regió del *Locus Coeruleus* (LC) de malalts de Parkinson portadors d'aquesta mutació. Les mostres procedien del Banc de Teixits de la Facultat de Medicina. Els resultats indicaren que els nivells de p27 en les neurones adrenèrgiques del LC eren extremadament baixos respecte els nivells de les cèl·lules dels cervells control. Això corroboraria la nostra hipòtesi de que la pèrdua de p27 pot jugar un paper clau en el desenvolupament de la MP i pot estar incrementant els nivells d' α -SYN en el transcurs de la malaltia. (Figura 26)

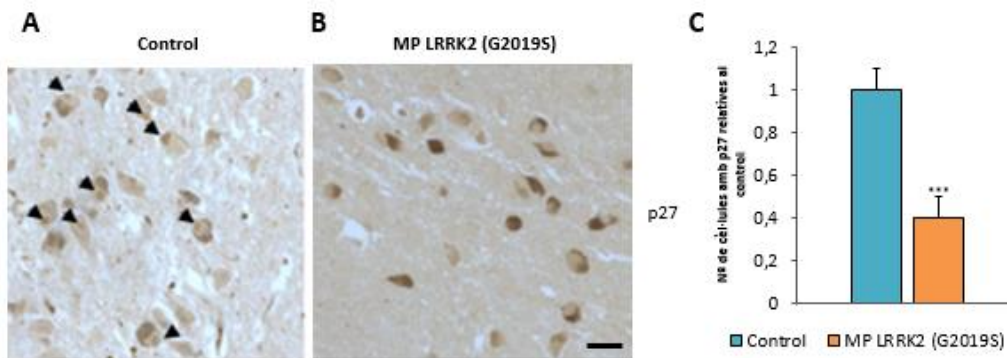


Figura 26. Nivells de p27 en neurones del LC de pacients LRRK2 G2019S. (A) Tinció de p27 en seccions de LC de cervells control, les fletxes indiquen el marcatge per p27 (B) Tinció de p27 en seccions de LC de cervells MP LRRK2 G2019S. (C) Gràfica que representa el número de cèl·lules positives per p27 en els malalts LRRK2 (G2019S) en relació amb els controls. Els resultats són la mitja \pm SD de com a mínim tres experiments independents. Els estudis estadístics es van realitzar mitjançant el test T-Student, *** $P < 0.001$. Barra d'escala = $5\mu\text{m}$

La pregunta que apareix és de com els malats de MP disminueixen els nivells de p27. Els resultats amb les mostres de pacients portadors de la mutació de LRRK2 (G2019S) suggereixen que p27 podria ser fosforilada per aquesta quinasa i posteriorment degradada. Un treball de fosfoproteòmica realitzat en cèl·lules portadores de la mutació LRRK2 (G2019S) pel grup del Dr. M Mann mostrava que en aquestes cèl·lules la p27 estava fosforilada a la S10.⁸⁰ Aquesta fosforilació és la responsable de la translocació de p27 del nucli al citoplasma i en aquest compartiment és susceptible de ser degradada. En el nostre laboratori s'ha estat estudiant si efectivament LRRK2 és capaç de fosforilar p27. Experiments amb proteïnes purificades revelaren que LRRK2 no fosforila directament

p27. Així doncs, la fosforilació ha de ser indirecta. S'ha pogut veure que LRRK2 es comporta com una MAP3K i pot activar MEK. Així doncs, en el nostre laboratori s'han fet estudis que indiquen que efectivament LRRK2 activa MEK i aquesta, en conseqüència activa ERK. Experiments de fosforilació amb proteïnes purificades demostren que tant ERK1 com ERK2 fosforilen p27 i més específicament a la S10. De fet, també s'ha observat que la inhibició de l'activitat de la ERK induïx una acumulació de p27 en el nucli cel·lular. Per tant, demostrem que la híper-activació de LRRK2 induïx la fosforilació de p27 i la seva translocació al citoplasma a través de la via de les MAP quinases. Com que la sola presència de p27 al citoplasma o la seva degradació dispara l'expressió d' α -SYN, aquests resultats són molt interessants, ja que per primera vegada s'estableix una connexió molecular entre els dos gens més importants implicats en les formes genètiques de la MP: el gen SNCA i LRRK2. (Figura 27)

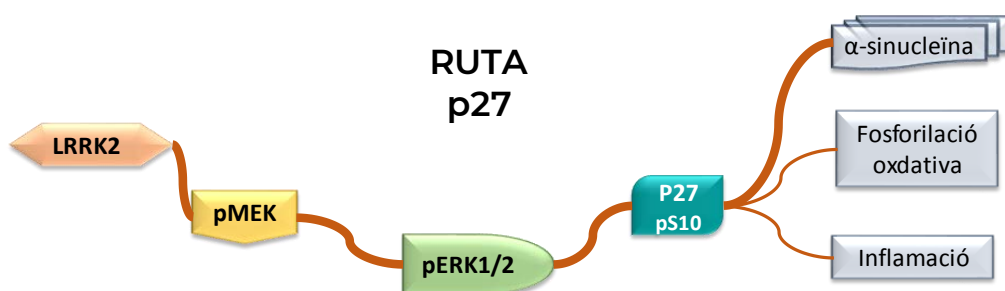


Figura 27. Esquema de la ruta p27. Via de connexió entre LRRK2 i α -SYN. LRRK2 fosforila a MEK activant-la, MEK fosforila a ERK1/2 i finalment ERK1/2 fosforila a p27 a la S10. Aquesta fosforilació exporta a p27 al citoplasma, resultant en un increment de l'expressió de l' α -SYN, per la pèrdua de la seva capacitat com a repressor transcripcional. Addicionalment la fosforilació oxidativa i la inflamació també podrien veure's alterades, ja que són els tres *hallmarks* de la MP que es veuen afectats amb la pèrdua de p27.

Ens vam plantejar que si aquesta ruta era rellevant en els malalts portadors de mutacions LRRK2, també ho podria ser en els malalts esporàdics, Així doncs, es van analitzar els nivells de p-ERK (la forma activa d'ERK) en els fibroblasts de tres pacients de MP esporàdica. Els resultats van demostrar que tots tres pacients tenien nivells superiors de p-ERK que les mostres controls. Això fa plantejar que és possible que la connexió entre el malalt genètic i els esporàdics sigui l'activació de la ERK.

RESULTATS

Així doncs, La pregunta següent és: Com es pot híper-activar la ERK en els malalts esporàdics? Hi ha moltes vies de senyalització que en cas de ser activades a través de factors de creixement, factors neurotròfics, hormones etc., poden induir l'activació d'ERK. Per altra banda, sabem que la quinasa CDK5 és un inhibidor de la MEK i per tant la inactivació o pèrdua de CDK5 també podria induir l'activació de ERK. Com que CDK5 ha estat implicada en diferents malalties neurodegeneratives entre elles la MP, vam pensar que seria una alternativa interessant estudiar el paper d'aquesta quinasa en la regulació de la ruta 27 i més concretament en la regulació de l'expressió i agregació de l' α -SYN.

21.4 Paper de CDK5 en la regulació de l'expressió i agregació de l' α -SYN

Primerament, hem determinat els nivells de CDK5 per WB, tant en la línia cel·lular c17.2 com a la línia SH-SY5Y. Els resultats indiquen que ambdues línies presenten alts nivells de CDK5 mentre que pel contrari presenten nivells molt baixos de CDK4 i CDK6 (**Figura 28**). Aquests resultats confirmen que aquesta quinasa té una rellevància funcional molt important en aquests tipus cel·lulars neuronals.

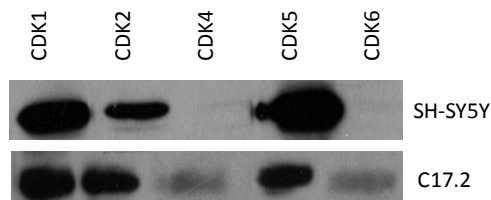


Figura 28. Nivells de les CDKs per WB de dues línies cel·lulars neuronals, SH-SY5Y i C17.2. Determinació per WB dels nivells de CDK1, CDK2, CDK4, CDK5 i CDK6 a les línies cel·lulars neuronals SH-SY5Y i C17.2

A continuació, vam voler estudiar si CDK5 participava en la regulació de l'expressió de l' α -SYN. Així doncs, vam silenciar CDK5 mitjançant vectors lentivirals que contenen shRNAs específics, en les cèl·lules SH-SY5Y. Vam observar que, quan disminuïm CDK5, els nivells d' α -SYN a nivell de proteïna monomèrica també disminueix tal com succeïa quan reduïem els nivells de p27 o de p130 (**Figura 29**).

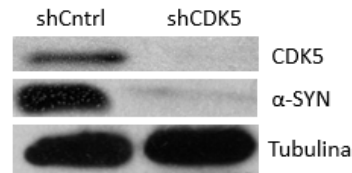


Figura 29. Efecte del silenciament de CDK5 sobre l'expressió d' α -SYN. Determinació dels nivells de CDK5 i α -SYN en cèl·lules SH-SY5Y infectades amb shRNA Control (shCntrl) o shRNA per CDK5 (shCDK5). La tubulina s'ha determinat com a control de càrrega.

És interessant el fet que quan mirem els agregats d' α -SYN mitjançant la tècnica PLA, en les cèl·lules SH-SY5Y shCDK5 observem un gran nombre d'agregats citoplasmàtics mentre que no s'observen agregats d' α -SYN en els nuclis (**Figura 30**). Aquests agregats poden ser molt grans i en algun cas son similars als agregats observats en les neurones dels pacients de MP (cossos de Lewy). Probablement, aquests agregats es troben en vesícules citoplasmàtiques. Cal destacar que aquest patró d'agregació és diferent al que observem en les cèl·lules deficientes en p130 (que presenten agregats nuclears) però en canvi podrien ser similars als observats en les cèl·lules p27KD, encara que en aquestes últimes cèl·lules la quantitat d'agregats és clarament menor.

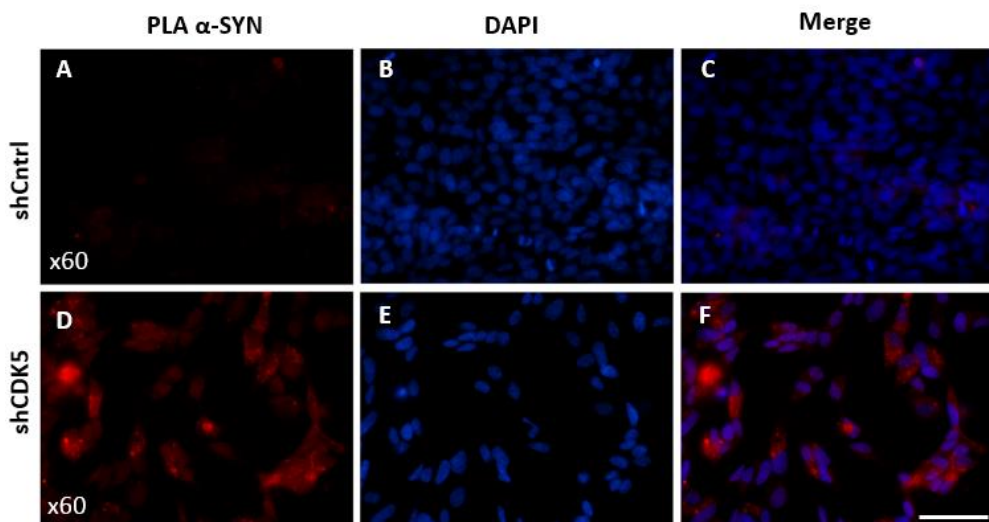


Figura 30. Detecció dels agregats d' α -SYN mitjançant la tècnica PLA a les cèl·lules SH-SY5Y shCDK5. (A) Tècnica de PLA per α -SYN en cèl·lules SH-SY5Y infectades amb shRNA Control (shCntrl) en vermell (B) Tinció nuclear DAPI del mateix camp de cèl·lules en blau (C) Fusió de les dues imatges anteriors (Merge) (D) Tècnica de PLA per α -SYN en cèl·lules SH-SY5Y infectades amb shRNA per CDK5 (shCDK5) en vermell (E) Tinció nuclear DAPI del mateix camp de cèl·lules en blau (F) Fusió de les dues imatges anteriors (Merge). Barra d'escala =50 μ m

RESULTATS

En aquest punt resulta evident que la disminució de CDK5 juga un paper molt rellevant en la inducció dels agregats d' α -SYN i per tant, ha de tenir un paper clau en la etiologia de la MP.

Així doncs, vam intentar analitzar la relació de p27 amb CDK5. Per una banda sabem que CDK5 inhibeix l'activitat de MEK i que per tant si eliminem CDK5, MEK s'activarà i a través de ERK fosforilarà la p27 a la S10 i induirà la seva translocació al citoplasma on pot ser degradada. Per altra banda se sap que CDK5 pot fosforilar la S10 de p27 i translocar-la al citoplasma. Per tant, la pèrdua de CDK5 induiria una acumulació de p27 en el nucli.

Aquests dos papers de CDK5 són antagònics, per tant val la pena analitzar què passa amb els nivells i localització de p27 quan es produeix la pèrdua de CDK5 en aquestes cèl·lules SH-SY5Y. Els resultats clarament indiquen que la disminució de CDK5 induïx una acumulació de p27 en el nucli (**Figura 31A**). Això vol dir que la via de fosforilació de la S10 de p27 per part de CDK5 és clarament dominant sobre el paper de CDK5 sobre la via de les MAP quinases. (**Figura 31B**)

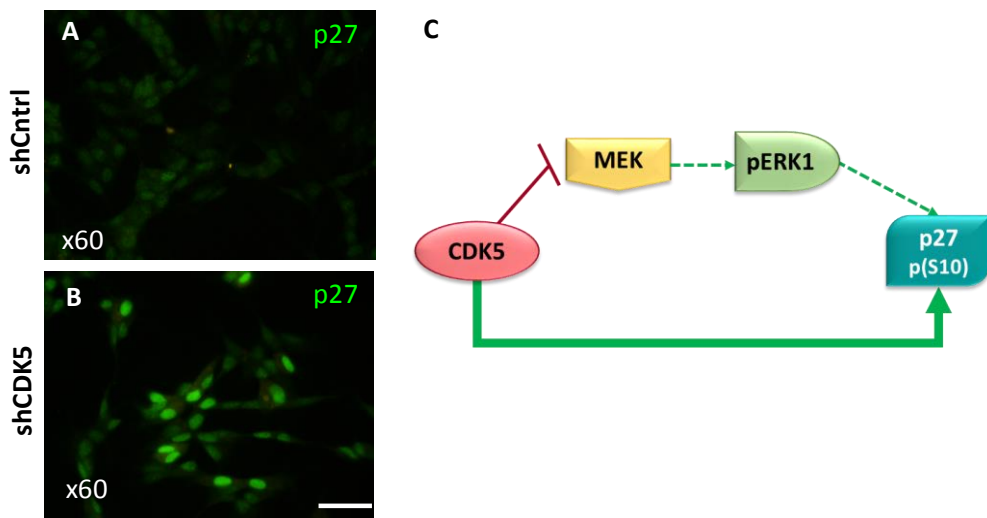


Figura 31. Detecció de p27 per fluorescència en cèl·lules SH-SY5Y amb shCDK5. (A) Nivells de p27 en cèl·lules SH-SY5Y infectades amb shRNA Control (shCntrl) en verd. **(B)** Nivells de p27 en cèl·lules SH-SY5Y infectades amb shRNA per CDK5 (shCDK5) en verd. **(C)** Esquema de les dues vies per la qual CDK5 pot actuar sobre l'estatus de fosforilació de p27. Per una banda CDK5 pot inhibir MEK, MEK no pot fosforilar a ERK i p27 no es fosforila a la S10. Per altra banda CDK5 pot fosforilar directament a p27 en la S10, resultant en la seva exportació al citoplasma. En el nostre model cel·lular, predomina la seva fosforilació directa per CDK5 en vers a la inhibició de MEK. Barra d'escala = 50 μ m

Com que aquesta acumulació de p27 en el nucli observada en cèl·lules deficientes en CDK5 és simultània a l'increment de l'agregació d' α -SYN, pensem que hi ha un mecanisme alternatiu a la via de MEK per explicar el paper de CDK5 en l'agregació d' α -SYN.

És interessant que el grup del Dr. Herrup ha establert una hipòtesi que planteja que les cèl·lules neurals, quan reben un estrès, intenten entrar en el cicle cel·lular, però com que no poden, això desencadena toxicitat.⁸¹ També planteja que en aquesta resposta és molt important el paper de la CDK5 a través de la seva interacció amb p27 i E2F1.⁸² De fet, el Dr. Herrup proposa que el complex CDK5/p27 és el que suprimeix l'expressió dels gens de cicle cel·lular a les neurones i que tant si falta p27 com CDK5, s'induiria l'expressió dels gens regulats. Aquest model és el que podria explicar la regulació de l'expressió de l' α -SYN per p27 i CDK5. Concretament, plantejem que en el promotor del gen SNCA estarien units els factors E2F1 i E2F4 que units a p130 i pRB formarien complexes repressors de l'expressió d'aquest gen. p27 s'uniria a E2F1 i E2F4 per l'extrem COOH i per l'extrem NH2 reclutaria p35/CDK5 en els promotors. Aquest model seria equivalent al que ja hem descrit nosaltres per altres gens. La diferencia es que en comptes de CDK4/6 en les neurones (que no tenen quantitats significatives d'aquestes dues quinases) hi hauria CDK5, en substitució d'aquestes.

Davant d'aquest plantejament, hem volgut doncs, analitzar la relació entre p27 i CDK5. En primer lloc hem estudiat la unió entre p27 i CDK5 en les cèl·lules SH-SY5Y, mitjançant IP. (**Figura 32A**). Els resultats indiquen que en aquestes cèl·lules efectivament es produeix una interacció entre ambdues proteïnes.

També hem volgut estudiar si p27 pot regular l'expressió de CDK5. Concretament, hem disminuït els nivells de p27 a través d'infeccions amb lentivirus portadors de shRNAs contra p27. Els resultats indiquen clarament que p27 regula l'expressió de CDK5 i així doncs, quan disminuïm p27, els nivells de CDK5 baixen. (**Figura 32B**)

Aquests resultats permeten postular un model en el que la disminució de p27 produïda per la hiper-activació de ERK induiria una reducció dels nivells de CDK5 que portarien a una inducció de l'expressió de l' α -SYN i la seva agregació. Aquest model es discutirà en detall en l'apartat de la discussió.

RESULTATS

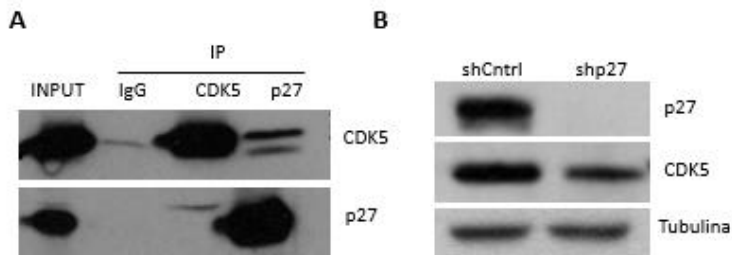


Figura 32. Interacció entre CDK5 i p27. (A) . Les cèl·lules SH-SY5Y van ser lisades i immunoprecipitades amb un anticòs anti-CDK5 i anti-p27. Posteriorment, es va determinar la presència de p27 i CDK5 mitjançant WB. **(B)** Determinació dels nivells de CDK5 i p27 en cèl·lules SH-SY5Y infectades amb shRNA Control (shCntrl) o shRNA per p27 (shp27). La tubulina s'ha determinat com a control de càrrega.

21.5 p27 interactua amb E2F1 pel seu extrem carboxi terminal

El grup del Dr. Herrup planteja que CDK5 interactua amb el complex pRb/E2F1, i que és p27 la proteïna que porta CDK5 a interaccionar amb pRb bloquejant així l'expressió de gens de cicle cel·lular a les cèl·lules nervioses. No obstant, queda per explicar el mecanisme pel qual p27 recluta CDK5 en els complexos pRb/E2F1. Com que nosaltres ja havíem descrit que p27 s'uneix pel seu extrem COOH amb E2F4 i p130, hem volgut estudiar si de manera similar, p27 s'uneix a E2F1 tal i com ho fa amb E2F4. Concretament, E2F4 interactua amb els aminoàcids 160-198 de l'extrem COOH de p27. Per tal d'establir per quin regió de p27 pot interactuar amb E2F1 vam purificar GST-E2F1 i es va passar per columnes de cromatografia que contenien p27 o diferents fragments d'aquesta proteïna i vam analitzar a quin fragment de p27 s'unia GST-E2F1 mitjançant Wb de les proteïnes retengudes a la columna. **(Figura 33)**

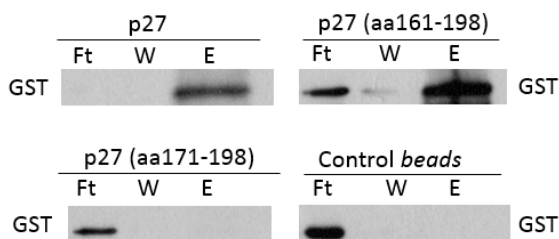
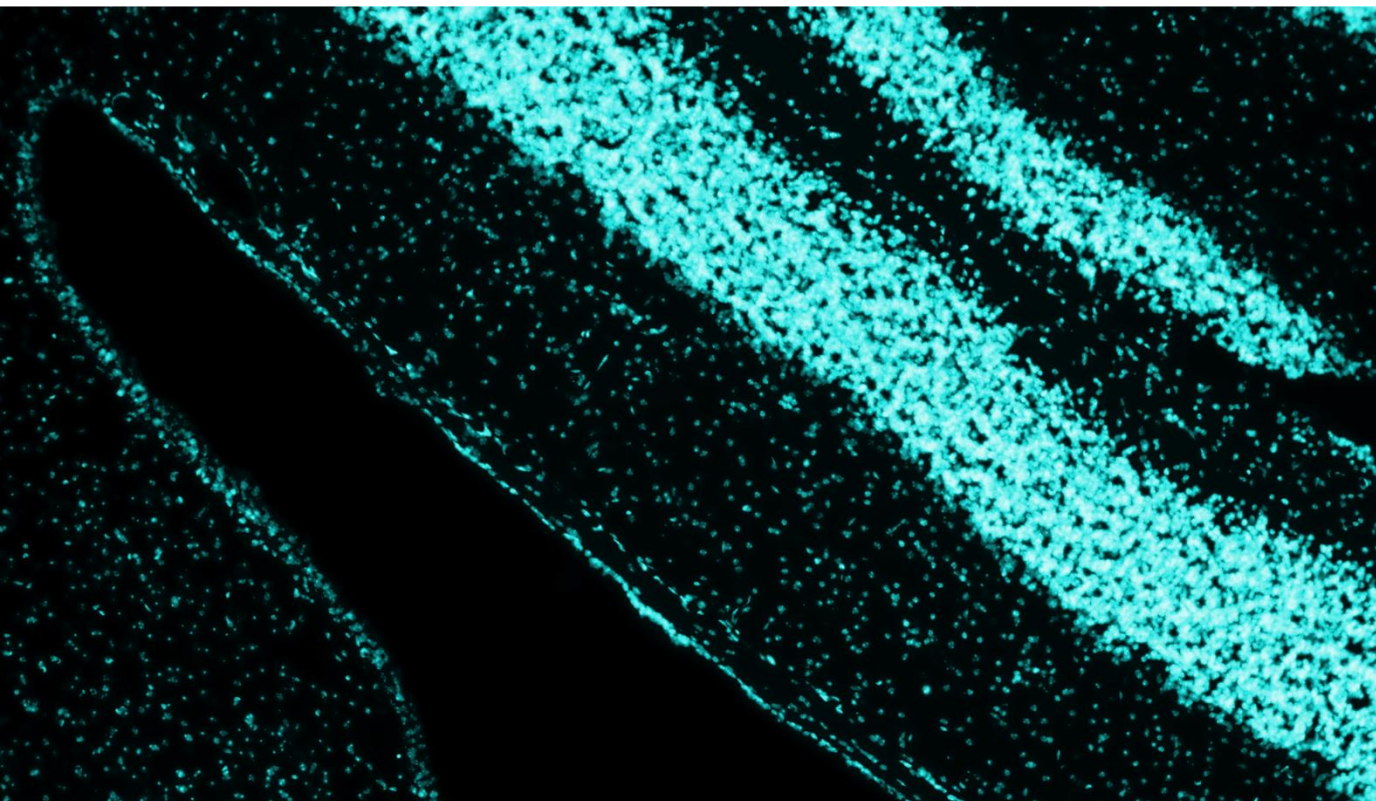


Figura 33. Anàlisi de la interacció directa entre pGST-E2F1 i p27 mitjançant cromatografia d'afinitat. Determinació de la presència de la proteïna recombinant pGST-E2F1 mitjançant immunodetecció per GST en les diferents fraccions obtingudes en la cromatografia d'afinitat, emprant columnes amb p27 sencera o amb els fragments dels aa 161-198 i 171-198 de p27 Ft= Flowthrough, W: últim rentat, E: Eluït.

Com es pot veure, E2F1 s'uneix a p27 WT i al fragment COOH, que comprèn els aminoàcids 161-198. No hem vist unió d'E2F1 en el fragment que va del 171-198, per tant, podem dir que la regió d'unió de p27 i E2F1 és entre els aminoàcids 160 i 170 aproximadament.

DISCUSSIÓ



DISCUSSIÓ

A partir dels resultats obtinguts en el *microarray* d'expressió de MEFs WT i p27KO, vam observar com tot un conjunt de gens relacionats amb els *hallmarks* de la MP es trobaven alterats, entre ells el gen que codifica per a l' α -SYN que estava incrementat en les cèl·lules p27KO. En aquesta tesi hem estudiat els nivells de la proteïna α -SYN en els MEFs deficientes en p27 i hem observat que aquestes cèl·lules presenten un increment de l' α -SYN monomèrica, indicant que la falta de p27 provoca un augment de la mateixa no sols a nivells d'RNA sinó també a nivells de proteïna. A més, en les MEFs p130KO i p130/p27DKO també observem un increment de l'expressió de l' α -SYN, indicant que p27 reprimeix l'expressió d'aquest gen a través del complex p130/E2F4.

En aquesta tesi també hem volgut analitzar què passa a les cèl·lules del cervell quan eliminem p27, ja que aquestes cèl·lules podrien tenir un comportament diferent al dels fibroblasts (MEFs).

Concretament, en seccions de cerebel de ratolins p27KO també observem un augment dels nivells d' α -SYN, concretament en la capa granular del cerebel. Aquest augment tan evident no s'aprecia ni en el *Locus Coeruleus*, ni en la *Substantia Nigra*, ni en el nucli Estriat. La causa de que no detectem canvis en aquestes regions del cervell podria ser degut a una manca d'especificitat de l'anticòs utilitzat, tal com hem mencionat en els resultats. Una altra possible explicació de perquè no veiem un augment d' α -SYN en aquestes zones dels cervells o perquè aquests ratolins no tenen cap símptoma relacionat directament amb el parkinsonisme, podria ser el temps. La MP debuta als 50-60 anys en els humans i per tant podria ser que la vida del ratolí fos massa curta com per a observar un efecte en aquestes zones. Addicionalment, el fet que hem observat mitjançant les diferents tècniques de detecció de proteïnes, WB, PLA i IHQ, és que en cadascuna d'aquestes tècniques estem detectant formes diferents de α -SYN i per tant potser amb la IHQ no detectem algunes formes agregades de l' α -SYN en els ratolins.

DISCUSSIÓ

No obstant, l'augment d' α -SYN en el cerebel d'aquests ratolins deficients en p27, confirma que p27 està regulant l'expressió de l' α -SYN en, al menys, determinades neurones. Aquest és un fet molt significatiu, ja que hi ha una sinucleïnopatia, l'atròfia multisistèmica (MSA), que cursa amb una acumulació d' α -SYN al cerebel i per tant, en aquests pacients p27 podria jugar un paper molt important.

Hem analitzat també el paper de p27 en la regulació de l' α -SYN en neurones de ratolí en cultiu. Mitjançant la tècnica CRISPR/Cas9 en les cèl·lules c17.2, vam silenciar l'expressió de p27 i d'E2F4, observant els mateixos resultats que en les MEFs. Així doncs, l'absència d'aquestes proteïnes provoca un augment de l' α -SYN monomèrica. Això ens corrobora el paper essencial de p27, p130 i E2F4 en la regulació de la transcripció del gen en les neurones. Per altra banda, el tractament de les cèl·lules amb Roscovitina, un inhibidor de l'activitat de les CDKs, produeix una disminució dels nivells d' α -SYN, indicant que els complexos ciclins-CDKs estan implicats en aquest mecanisme de regulació.

Emprant aquest model de neurones de ratolí hem analitzat els mecanismes de la regulació de l'expressió de l' α -SYN per p27 amb molt més detall. Amb la finalitat d'identificar les regions reguladores i els factors de transcripció que es poden trobar associats, vam identificar dues possibles regions d'unió d'E2F4 que podrien ser regions reguladores del gen SNCA. Per comprovar si aquestes regions uneixen E2F4 i p27, vam efectuar assajos de CHIP que van confirmar la nostra hipòtesi inicial, és a dir, E2F4 i p27 es troben unides al DNA en aquestes regions promotores *upstream* del gen SNCA.

Per tal de comprovar que E2F4 i p27 són capaces de modificar la transcripció del gen SNCA, es van realitzar assajos luciferasa que van demostrar que tan E2F4 com p27 modulen la transcripció d'aquest gen, ja que la disminució d'ambdós proteïnes induïx un increment de l'activitat luciferasa, indicant també que E2F4 i p27 actuen com a repressors transcripcionals.

Per tant, concloem que p27 modula l'expressió del gen SNCA en neurones, actuant com a repressor transcripcional i això ho fa a través de la seva associació amb els complexos E2F4/p130 units a les regions reguladores del gen. Aquestes dades obtingudes en cultius de neurones de cerebel confirmen els resultats observats en les

seccions de cervells de ratolins p27KO, on mitjançant tècniques immunohistoquímiques es demostrava que la manca de p27 ja produeix un augment de l' α -SYN en la capa granular del cerebel.

Un cop establert aquest mecanisme de regulació en neurones murines, vam voler analitzar-lo en neurones humanes. A més també vam voler estudiar addicionalment el paper de p27 en la inducció de l'agregació de l' α -SYN en aquestes cèl·lules. Concretament vam seleccionar les cèl·lules SH-SY5Y.

L' α -SYN humana i de ratolí tenen una alta homologia, però la formació d'agregats d' α -SYN és molt difícil de veure en ratolí. La bibliografia no es gaire clara en aquest aspecte, alguns diuen que la neuromelanina de les neurones dopaminèrgiques humanes juga un paper important en l'agregació, però la introducció de formes agregades de α -SYN humana en cervells de ratolí, també provoca la formació de Cossos de Lewy⁷⁰. Així doncs, sembla ser que l' α -SYN de ratolí no té tanta tendència a agregar-se, ni a formar Cossos de Lewy amb tanta facilitat. Per tant, vam apostar per realitzar aquests estudis en cèl·lules humanes.

Un cop definit el nostre model cel·lular, vam procedir a silenciar, mitjançant vectors lentivirals que contenen shRNAs, la p130 i la p27. En el cas de les cèl·lules shp130 (p130KD), sorprenentment, vam veure com la disminució dels nivells de p130 a les cèl·lules provocava una baixada dels nivells d' α -SYN monomèrica per WB. Com que per WB no es fiable analitzar els agregats d' α -SYN, vam mirar si la possible agregació la podíem detectar mitjançant la tècnica de PLA. Mitjançant aquesta tècnica, hem pogut veure que efectivament, la disminució de p130, indueix un augment de l'agregació de l' α -SYN. És interessant remarcar que l'increment de l'agregació d' α -SYN observat per PLA coincideix amb la disminució de la forma monomèrica observada per WB. Per tant, la conclusió es que en aquestes neurones humanes, p130 està clarament regulant l'expressió d' α -SYN, de manera que la seva deficiència indueix l'expressió d' α -SYN i aquesta, ràpidament s'agrega.

És interessant comentar que els agregats d' α -SYN observats a les cèl·lules deficientes en p130 es troben de manera abundant en el nucli de les cèl·lules encara que també s'observen agregats importants en el citoplasma. Interpretem que aquesta agregació nuclear pot ser deguda a un alt increment de l'expressió de l' α -SYN i addicionalment a

DISCUSSIÓ

alguna modificació post-traduccional que transporti aquesta proteïna al nucli. Això és interessant ja que la presència d' α -SYN en els nuclis, malgrat ha estat descrita en alguns treballs, no hi ha estudis sobre la seva presència en les diferents sinucleinopaties observades en els humans. No obstant, això podria ser degut a que els anticossos emprats en les tècniques d'immunohistoquímica convencional no siguin capaços de detectar les formes agregades en els nuclis o potser perquè l'agregació no és suficientment intensa per produir aquest transport al nucli. Per tant, aquest és un tema interessant en que queda molt per estudiar.

Quan s'analitzen els efectes de la disminució de p27 sobre l'expressió i agregació de l' α -SYN en aquestes cèl·lules humanes, veiem en primer lloc que de manera similar al que s'observa en les cèl·lules deficientes en p130, l' α -SYN monomèrica, analitzada per WB, també disminueix. És interessant, que quan s'analitza l'agregació de l' α -SYN s'observa clarament un increment dels agregats citoplasmàtics mentre que no s'observen agregats nuclears. A més, aquests agregats citoplasmàtics són més petits que els observats en el cas de la deficiència de p130.

Així doncs, de manera similar a la disminució de p130, la deficiència de p27 induïx l'expressió i agregació de l' α -SYN en aquestes cèl·lules humanes, encara que el patró d'agregació es diferent.

La nostra interpretació d'aquestes diferències és que quan no hi ha p130, E2F4 no pot unir-se al DNA i per tant no pot realitzar la seva funció repressora. Així doncs, en aquesta situació, l'expressió d' α -SYN s'indueix d'una manera important. En canvi, quan no hi ha p27 els complexos p130/E2F4 encara poden estar units a la cromatina i realitzar una funció repressora. Clar que en aquestes circumstancies, una menor inhibició dels complexos ciclina-CDKs (degut a la manca del inhibidor p27) pot fosforilar p130 i per tant induir l'expressió de l' α -SYN. No obstant, hi ha que tenir en compte que en aquesta situació (disminució de p27) hi ha un increment de p21 (ja que p27 reprimeix l'expressió de p21) que bloquejaria parcialment l'activitat de les CDKs i reduiria l'expressió de l' α -SYN. Per tot això, cal esperar que l'efecte de la pèrdua de p27 sobre l'agregació de l' α -SYN sigui menor que en el cas de la deficiència de p130.⁴³

Tot i així, com hem comentat a la introducció, p27 és capaç d'unir-se a altres factors de transcripció i per tant també pot controlar l'expressió d' α -SYN en associació a altres complexos.

Concretament, en un treball recent del grup del Dr. Saura de la Universitat de Barcelona es demostra que C/EBP δ (CCAAT/enhancer-binding protein delta) regula, actuant com a repressor, l'expressió de l' α -SYN.⁸³ C/EBP δ és una proteïna de 269 aminoàcids, codificat en el gen CEBPD que té la particularitat de no contenir introns, i que pertany a la família de les CCAAT/enhancer-binding protein. En mamífers, aquesta família consta de 6 membres: C/EBP α , C/EBP β , C/EBP γ , C/EBP δ , C/EBP ϵ i C/EBP ζ . Es caracteritzen per tenir un domini molt conservat, que és el que té la funció de factor de transcripció, anomenat *basic leucine zipper*, és a dir, un domini de leucines en forma de cremallera. Aquest domini és l'encarregat de la dimerització de la proteïna i de la unió al DNA. C/EBP β i C/EBP δ són els únics membres de la família que es troben expressats en el sistema nerviós central, participant en la formació de la memòria, en la plasticitat sinàptica i en les cèl·lules glials regulen tota la mecànica pro-inflamatòria.⁸⁴⁻⁸⁶

En aquest treball, es descriu que en ratolins deficientes en C/EBP δ hi ha un augment de l'expressió d' α -SYN tant en el còrtex cerebral com en altres regions del cervell, com l'Estriat o l'hipocamp. Per altra banda, en cultius de cèl·lules primàries neurals, una sobre-expressió de C/EBP δ produeix una baixada dels nivells d' α -SYN. Aquests resultats demostren que C/EBP δ regula l'expressió d' α -SYN. En aquest treball es descriu també que aquest FT s'uneix a diferents dominis de la regió promotora del gen SNCA i experiments de luciferasa van confirmar que efectivament C/EBP δ reprimeix la transcripció de l' α -SYN quan està unit a la regió promotora d'aquest gen.

Nosaltres, en el treball d'aquesta tesi hem establert una connexió entre C/EBP δ i p27. Concretament, mitjançant tècniques d'immunoprecipitació hem observat que hi ha una interacció entre ambdues proteïnes en la línia cel·lular de ratolí C17.2. Posteriorment, hem demostrat mitjançant CHIP que les regions del promotor del gen SNCA que uneixen C/EBP δ també uneixen p27. Aquests resultats suggereixen que p27 i C/EBP δ podrien col·laborar en la regulació de l'expressió del gen SNCA. Faltaria

DISCUSSIÓ

demostrar aquesta possibilitat mitjançant assajos luciferasa que estan pendents de realització.

A partir de tots els resultats obtinguts, podem afirmar que p27 regula la transcripció del gen SNCA que codifica per l' α -SYN. En aquest treball hem demostrat que la pèrdua de p27, d'E2F4 i o de p130 indueix l'expressió d'aquest gen. Així doncs, aquestes dades indiquen que p27 pot regular l'expressió del mateix a través d'un mecanisme prèviament descrit per el nostre grup que implica als complexos p130/E2F4. Per altra banda, hem observat que p27 també s'uneix al factor de transcripció C/EBP δ . Aquesta proteïna actua també reprimint l'expressió de SNCA. Per tant, els nostres resultats indiquen que p27 pot regular l'expressió de l' α -SYN a través de dos mecanismes alternatius: mitjançant la interacció amb els complexos p130/E2F4 o a través de la interacció amb C/EBP δ . (Figura 34)

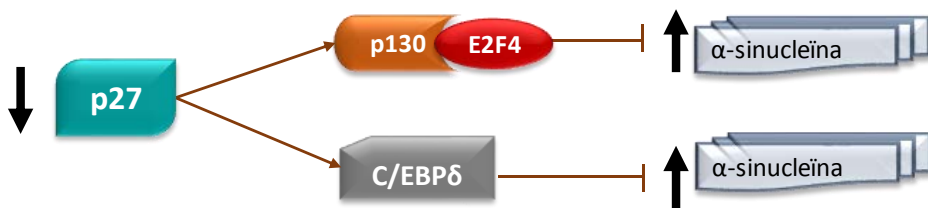


Figura 34. Representació esquemàtica dels dos complexos als que s'associa p27 per regular l'expressió de l' α -SYN. La baixada dels nivells de p27 o bé la seva presència al citoplasma, impossibilita la seva associació al complex p130/E2F4 i a C/EBP δ , resultant en un increment de la transcripció del gen SNCA i per tant en un augment de l'expressió d' α -SYN

El fet de que p27 a través de la unió a FTs reguli l'expressió d' α -SYN i que a més influeixi en la seva agregació ens va fer postular que pot-ser l'aparició de la MP podria ser deguda a una disminució progressiva dels nivells de p27 en determinats grups de neurones. És per això que vam voler comprovar si efectivament p27 es trobava disminuïda en pacients de la MP. Per una banda, vam contactar amb el laboratori del Dr. Angel Raya, que són especialistes en la generació de iPSC a partir de fibroblasts de pacients que després diferencien en astròcits o neurones dopaminèrgiques. La idea era analitzar els nivells de p27 en aquestes cèl·lules diferenciades. En el moment de

realitzar aquests experiments només va ser possible estudiar els nivells de p27 en astròcits obtinguts a partir de fibroblasts de pacients de MP portadors de la mutació LRRK2 G2019S, la forma més comú de Parkinson hereditari.

La proteïna LRRK2 presenta activitat quinasa i la mutació G2019S genera una forma hiperactiva d'aquesta quinasa i aquest increment d'activitat és el que acaba derivant en la patologia. En els astròcits portadors de LRRK2(G2019S), vam determinar els nivells de p27 i d' α -SYN mitjançant tècniques d'immunofluorescència. Els resultats van revelar que les cèl·lules dels pacients tenen uns nivells molt baixos de p27 i uns nivells elevats d' α -SYN respecte les cèl·lules control. Això obria la possibilitat de que LRRK2 pugui estar activant una cascada de senyalització que resulta en la disminució dels nivells de p27.

També vam determinar els nivells de p27 en seccions histològiques de cervells *post-mortem* de pacients de MP portadors d'aquesta mutació LRRK2(G2019S). Específicament, vam determinar els nivells de p27 en el *Locus Coeruleus* d'aquests pacients. Els resultats indiquen que els nivells de p27 en les neurones adrenèrgiques d'aquests pacients són molt baixos respecte els controls, fet que correlaciona amb les dades obtingudes en els astròcits. Per tant, tots aquests resultats suggereixen una clara correlació entre els dos principals gens implicats en la MP genètica, LRRK2 i SNCA. Faltava doncs, esbrinar quins eren els mecanismes a través dels quals LRRK2 induïa una disminució de p27 que en conseqüència generaria un increment en l'expressió d' α -SYN.

En el nostre laboratori es van realitzar experiments amb l'objectiu d'esbrinar aquest mecanisme. Dades d'un article del grup del Dr. Matias Mann⁸⁰ indicaven que cèl·lules portadores de la mutació LRRK2(G2019S) tenien la p27 fosforilada a la S10. Aquesta fosforilació de p27 és responsable de la seva translocació des del nucli al citoplasma on la p27 pot ser degradada. Es van realitzar assajos de fosforilació, amb LRRK2 i p27 purificades per tal de veure si p27 era fosforilada directament per LRRK2, però aquests experiments van donar resultats negatius. Així doncs, la fosforilació havia de ser indirecta. Com que LRRK2 es comporta com una MAP3K es va explorar si LRRK2 podia fosforilar i activar MEK i aquesta en conseqüència activaria ERK. En el nostre laboratori s'ha demostrat que LRRK2 efectivament estimula la via de les MAPKs, que culmina en l'activació de ERK. Assajos de fosforilació emprant ERK1/2 purificades i

DISCUSSIÓ

p27 també purificada com substrat indicaren que efectivament ERK fosforila p27 a la S10. Altres tipus d'experiments han constatat que ERK fosforila p27 i indueix la seva degradació. Això permet per primera vegada establir el mecanisme molecular que

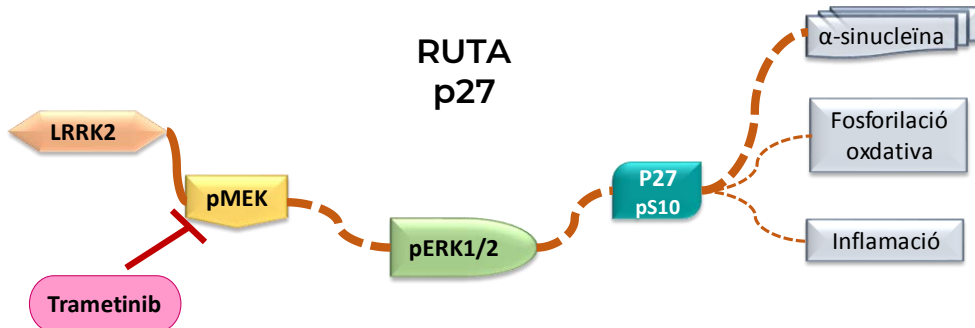


Figura 35. Representació esquemàtica de com el Trametinib és un bon fàrmac per bloquejar la ruta p27 en els malats LRRK2 (G2019S). La inhibició de MEK mitjançant el fàrmac Trametinib en els malats que cursen amb la mutació LRRK2 G2019S impediria que MEK fosforilés a ERK i per tant p27 tampoc es fosforilaria i romadria al nucli cel·lular, on pot exercir la seva funció repressora de l'expressió d' α -SYN i dels altres *hallmarks* de la MP.

connecta els dos gens més importants en el desencadenament de la MP: LRRK2 hiperactiva fosforila MEK, MEK activa ERK, ERK fosforila p27 induint la seva degradació. La degradació de p27 induiria l'increment de l'expressió d' α -SYN i també la seva agregació. L'establiment d'aquest mecanisme obre una finestra d'intervenció terapèutica en els malats portadors de formes hiperactives de LRRK2. La intervenció terapèutica seria el tractament dels malats amb inhibidors de MEK. En aquests moments s'estan utilitzant aquests tipus d'inhibidors, per exemple el Trametinib, en el tractament dels melanomes amb resultats força positius. Per tant en aquests moments ja disposem d'un fàrmac per poder tractar els malats de MP portadors de mutacions híper-activadores de LRRK2. (Figura 35)

El planteig posterior va ser preguntar-se quins poden ser els mecanismes que portarien a una hipotètica disminució de p27 en els pacients de la MP esporàdica. La primera aproximació va ser estudiar si els malats esporàdics podien presentar la via de ERK hiperactiva de manera similar als malats portadors de LRRK2(G2019S). Així doncs, en el nostre laboratori es van analitzar els nivells de p-ERK (la forma activa de ERK) en fibroblasts de malats de la MP esporàdica. Concretament es van analitzar tres malats i tots tres tenien la pERK incrementada respecte el control. Això, a manca de

més estudis, suggereix que d'alguna manera els malalts esporàdics híper-activen la via de ERK, la qual cosa provocaria una disminució de p27.

Com que aquests malalts esporàdics, que presenten una híper-activació de la via de les MAPKs, no presenten mutacions de LRRK2, ha d'haver-hi un altre mecanisme per assolir la activació de la via. Vam plantejar tres hipòtesis: 1) que malgrat no fossin portadors de mutacions de LRRK2 aquests pacients podrien presentar una sobre-expressió d'aquesta quinasa que podés portar a una hiperactivitat d'origen no mutacional, 2) que hi hagués una híper-activació de la via de Ras, *upstream* de MEK i 3) que aquests malalts patissin una disminució dels nivells de CDK5, ja que aquesta quinasa és inhibidora de la MEK. En aquesta Tesi vam optar per explorar la tercera opció ja que hi ha molta literatura de la implicació de CDK5 en les malalties neurodegeneratives. S'ha descrit que la fosforilació de MEK1 per CDK5 resulta en la inhibició de l'activitat catalítica de MEK1 i conseqüentment inhibeix l'activació per fosforilació d'ERK1/2⁸⁷. Hi ha varis articles que interrelacionen la via de les MAP quinases amb CDK5, tant en la regulació neuronal com en malalties com el càncer, on la via de les MAP quinases és extremadament important.

CDK5 pertany a la família de les CDKs, ja comentades en la introducció. Encara que comparteix una gran homologia amb els altres membres de la família, sobre tot amb CDK1 i CDK2, s'activa de manera diferent a la resta de CDKs ja que no s'activa mitjançant les ciclines clàssiques, si no que s'uneix a altres proteïnes específiques com p35, p39 i ciclina I, que s'expressen majoritàriament en neurones post-mitòtiques. CDK5, també es troba majoritàriament en les neurones post-mitòtiques, que com que no entren en el cicle cel·lular, les funcions de CDK5 no estan relacionades amb la regulació de la proliferació cel·lular. També es diu que CDK5 no és inhibida per p27 ni per altres membres de les CKIs.

Primerament, hem comprovat per WB els nivells de les diferents CDKs en les dues línies cel·lulars neurals, C17.2 i SH-SY5Y. Ambdós línies cel·lulars presenten nivells alts de CDK5, i també de CDK1 i CDK2, mentre que pel contrari, no presenten CDK4 ni CDK6, les dues CDKs implicades en la regulació transcripcional en associació als complexos p130/E2F4, durant la fase G1 del cicle cel·lular. Això ens porta a pensar que CDK5 podria jugar un paper similar al de CDK4/6 en les cèl·lules neurals. Això podria ser cert ja que hem comprovat per IP com CDK5 i p27 interactuen a nivell de proteïna.

DISCUSSIÓ

Per a veure quin efecte té CDK5 sobre l'expressió d' α -SYN, hem reduït els nivells de CDK5 en la línia cel·lular SH-SY5Y mitjançant vectors lentivirals que contenen shRNAs. A nivell de WB, una baixada de CDK5, disminueix els nivells d' α -SYN monomèrica per WB. És interessant el fet que quan analitzem aquestes cèl·lules amb la tècnica PLA, podem apreciar com hi ha un gran augment en l'agregació d' α -SYN. Aquesta α -SYN agregada presenta un patró totalment citoplasmàtic i amb uns agregats molt grans, molt similars als Cossos de Lewy que s'observen en els malalts de MP.

Aquestes dades fan pensar en que la disminució de CDK5 pot jugar un paper molt rellevant en l'etiologia de la MP.

Considerant que la CDK5 també fosforila a p27 en la S10 i que aquesta fosforilació provoca la seva exportació al citoplasma, vam efectuar una immunofluorescència per veure a on es troba localitzada la p27 en els shCDK5, i com era d'esperar, quan els nivells de CDK5 baixen, p27 es troba al nucli en major proporció que les cèl·lules control, encara que no apreciem diferències significatives per WB.

En la bibliografia hi ha una àmplia controvèrsia en vers el paper de CDK5 en les malalties neurodegeneratives. Molts articles conclouen que la hiper-activació de CDK5 és una característica d'aquestes malalties, tot i que a nosaltres ens apareixen agregats d' α -SYN quan disminuïm els seus nivells. Com ja hem comentat a la introducció, CDK1, CDK2 comparteixen els residus en T14 i Y15 que quan són fosforilats per altres quinases, resulten en la inhibició de l'activitat quinasa de la pròpia CDK.

Curiosament hi ha molts articles que consideren que independentment de l'alta homologia de CDK5 amb aquestes altres dues CDKs, la fosforilació en la Y15 per quinases com Fyn o c-Abl, provoquen l'activació de CDK5 quan aquesta s'uneix a p35. Que la fosforilació d'aquest residu indueixi l'activitat de la CDK5 en comptes d'inhibir-la, no té gaire sentit, ja que la fosforilació d'aquest residu fa que l'ATP no pugui unir-se i no es doni la transferència dels grup fosfat als substrats.

Aquests comentaris es fonamenten en un únic estudi in vitro. Recentment però, un article publicat per Dr. Hisanaga diu que la fosforilació a la Y15 no té cap repercussió en l'activació de CDK5.⁸⁸ En aquest article analitzen la fosforilació de la Y15 en CDK5 i

en el complex CDK5-p35 i en cap dels casos la detecten. Els seus resultats si que concorden amb el primer article on és reportat que CDK5 s'activa en un complex trimeric amb c-Abl i Cables, però sense p35.⁸⁹ La resta d'estudis que es basa en aquesta afirmació, no mostren la fosforilació de Y15 o no demostren que l'activitat estigui estimulada. Per tant, el grup del Dr. Hisanaga es planteja si la CDK5 només és pot fosforilar en la Y15 en el seu estat monomèric i sense unió a p35. A més a més, a nivell tècnic, per detectar Y15, primer s'ha d'immunoprecipitar amb un anticòs anti-CDK5 i després veure si aquesta està o no fosforilada, però en cap moment contemplen que una part de la CDK5 que s'immunoprecipita està unida a p35 i una altra es troba en forma monomèrica. Per tant, com no consideren discriminar entre CDK5 monomèrica i CDK5-p35, no és possible determinar quina CDK5 és la que es veu fosforilada. Per tant, podem concloure que fins ara, només és pot assegurar que la CDK5 monomèrica pot ser fosforilada en la Y15. Així doncs, aquestes afirmacions són com a mínim dubtoses.

Paral·lelament, el grup del Dr. Herrup ha analitzat la regulació transcripcional dels complexos E2F1/CDK5-p35 en les neurones i la seva importància en la regulació del cicle cel·lular específicament en les neurones post-mitòtiques i la seva rellevància en les malalties degeneratives, entre elles la MP. El Dr. Herrup postula que si les neurones post-mitòtiques són forçades a entrar en cicle cel·lular per la expressió d'un oncogen, aquestes arriben a fase S i sintetitzen DNA, però en comptes de dividir-se, moren. Si es bloqueja el cicle cel·lular en aquestes neurones, aquestes sobreviuen. Ells observen com el cicle cel·lular o la mort cel·lular modifica la localització de CDK5, indicant la possible importància d'aquesta localització en tot el procés i conclouen que és la seva unió a p27 la que fa que estigui en el nucli.⁸²

En absència de p27, CDK5 és troba en el citoplasma i no és capaç d'inhibir la transcripció de gens implicats en la regulació del cicle cel·lular. En contrast, la presència de CDK5 en el nucli té un efecte protector en les neurones, ja que estaria reprimint l'expressió d'aquests gens.⁸²

La repressió de l'expressió d'aquests gens per part de CDK5 ve donada per la seva participació en un complex que inclou E2F1-DP1. DP1 és un cofactor necessari per a l'activitat de E2F1 com activador transcripcional⁹⁰. El grup del Dr. Herrup arriba a la

DISCUSSIÓ

conclusió de que aquests complexos transcripcionals estan formats per E2F1-p27-CDK5/p35, i que si algun dels membres d'aquests complex no hi és, aquest complex no es pot formar i per tant no es pot reprimir l'expressió d'aquests gens. El model de regulació proposat és bastant semblant al model de regulació per part d'E2F4/p130 que hem caracteritzat en el nostre laboratori.

Com que en el nostre laboratori hem observat que E2F4 interacciona directament amb p27 a través del seu extrem COOH, hem volgut comprovar si en el cas d'E2F1 succeïa el mateix. Els experiments efectuats emprant cromatografia d'afinitat demostren que E2F1 també s'uneix a la part COOH de p27, entre els aminoàcids 160-170. Per tant, cap la possibilitat de que a la regió promotora del gen SNCA hi hagi regions d'unió no solament per d'E2F4 sinó també per E2F1 (s'hauria d'explorar aquesta possibilitat). Per tant p27 podria participar en la regulació de la repressió transcripcional a través dels dos tipus de complexos (E2F1-X(pRB?)-CDK5/p35 i E2F4-p130-CDK5/p35). A la **Figura 36** representem com es trobarien aquests complexos en el gen SNCA. El model del Dr. Herrup està plantejat per a gens implicats en la regulació del cicle cel·lular, però en cap cas, parla de la possibilitat de que aquest model sigui aplicable al gen SNCA. Les nostres dades són compatibles en que aquest model es pugui aplicar a la regulació del gen de l' α -SYN. Per una banda, si disminuïm p27 o p130 s'indueix una acumulació d' α -SYN i per altra banda si disminuïm CDK5 també es pot observar aquesta acumulació d' α -SYN, malgrat en aquest cas hi ha un increment de p27 en el nucli d'aquestes cèl·lules deficientes en CDK5.

Com que el model postula que si falta algun dels components del complex la repressió no pot tenir lloc, la manca de CDK5 (malgrat hi hagi p27 en el nucli) serà suficient per tal que s'indueixi l'expressió i acumulació d' α -SYN.

Els experiments de PLA en les cèl·lules shCDK5 ens revelen que en absència d'aquesta proteïna, l' α -SYN s'agrega donant un patró citoplasmàtic amb la presència de grans vesícules d' α -SYN. Aquest patró és diferent al observat en p130KD i p27KD, i és el més semblant als Cossos de Lewy observats en els pacients de MP. Això pot ser degut a que la CDK5 també està implicada en els processos d'autofàgia i en el *clearance* de l' α -SYN. En la bibliografia trobem que en *Drosophila*, quan elimines la CDK5, hi ha una disrupció severa de la autofàgia, que és suficient com per a activar els mecanismes

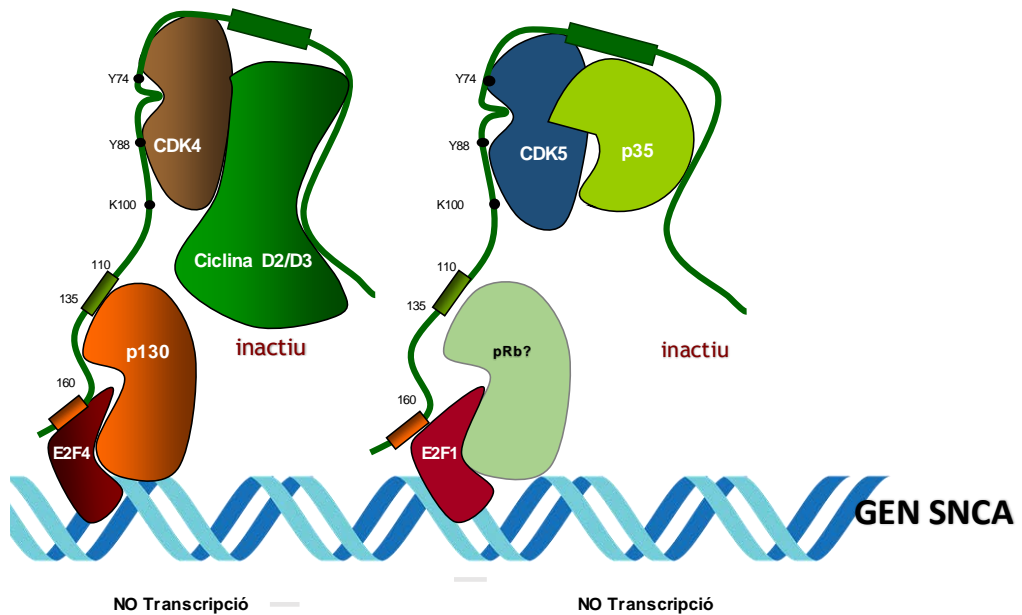


Figura 36. p27 com a repressor transcripcional. Representació esquemàtica que com p27 formaria els complexos E2F1-(pRb?)-CDK5/p35 i E2F4-p130-CDK4/CiclinaD2/D3 per a regular l'expressió del gen SNCA.

d'immunitat innata i desencadena en la mort més prematura de les neurones dopaminèrgiques.⁹¹

A la bibliografia sobre la MP es dona molta més importància a la disfunció dels mecanismes relacionats amb el *clearance* de l' α -SYN que als mecanismes que incrementen la transcripció del gen SNCA. Per exemple, en l'article que descriu la fosfo-proteòmica de les cèl·lules LRRK2(G2019S) es fa molt èmfasis en la fosforilació incrementada que s'observa de diferents proteïnes Rab implicades en les vies de transport intracel·lular de vesícules que acaben en els lisosomes i per tant que estan implicades en la degradació de proteïnes com l' α -SYN.⁸⁰ Segons es comenta en aquest article, aquesta elevada fosforilació bloquejaria els mecanismes de degradació via lisosomal. Els nostres resultats suggereixen que en el nostre model hi ha un component que fa de nexa entre aquestes dues vies complementàries. Per una banda, p27 s'encarrega d'augmentar la transcripció del gen SNCA en associació a diferents factors de transcripció com E2F4/p130, C/EBP δ i molt probablement, E2F1/pRb. Però, per altra banda els nostres resultats indiquen que la disminució de p27 també indueix una disminució dels nivells de CDK5 que col·laboraria en l'increment d'expressió de

DISCUSSIÓ

α -SYN, però que a més, també produiria disrupcions en els sistemes de *clearance* de α -SYN. El resultat d'ambdós processos resulta en un increment total de α -SYN i d'un increment de la seva agregació.

La pèrdua de p27 també indueix la disminució de l'expressió de varies subunitats dels diferents complexos de la cadena respiratòria i en conseqüència la generació d'estrès oxidatiu. Per altra banda, la pèrdua de p27 també indueix la secreció de quimiocines inflamatòries. Aquestes dues alteracions moleculars, conjuntament amb l'agregació d' α -SYN són els principals "Hallmarks" de la MP. Així doncs, postulem que aquesta malaltia pot ser generada per la pèrdua progressiva de p27 en diferents tipus de neurones, entre elles les noradrenèrgiques del LC i les dopaminèrgiques localitzades a la SN.

En aquest treball presentem evidències que donen suport a aquest postulat. Concretament, hem observat que seccions *post-mortem* del LC de cervells humans de pacients afectes de MP portadors de la mutació LRRK2(G2019S) presenten nivells molt més baixos de p27 que seccions control. Per altra banda, astròcits diferenciats de fibroblasts de pacients de MP, portadors de la mateixa mutació, presenten nivells molt baixos de p27 i elevats d' α -SYN. Finalment, hem identificat un possible mecanisme de induir l'agregació de α -SYN a través de la reducció dels nivells de CDK5 que podria ser operatiu en els malalts de MP esporàdics. Aquest mecanisme estaria d'acord amb el model proposat per el Dr. Herrup que planteja que els complexos E2F1-p27-CDK5/p35 estarien reprimint l'expressió de gens implicats en la progressió del cicle cel·lular al estar bloquejant el paper de E2F1 com a activador transcripcional. La pèrdua d'algun dels membres d'aquest complex repressor induiria l'expressió gènica. Segons aquest model, tant la pèrdua de p27 com de CDK5 permetria la expressió de α -SYN. Concretament, en el cas de la reducció dels nivells de CDK5, veiem que malgrat la p27 s'acumula en els nuclis, la manca de CDK5 no permet que p27 pugui reprimir l'expressió ni l'agregació de α -SYN.

També hem demostrat que p27 s'uneix a CDK5 i a E2F1, en aquest últim cas a través d'una regió específica del domini COOH, d'una manera semblant a la unió amb E2F4. Per tant, p27 podria ser la responsable d'unir p35/CDK5 a E2F1 i bloquejar la transcripció. p27 també és la responsable de reclutar les ciclines-CDKs a p130/E2F4 i

reprimir l'expressió gènica. Com que ambdós tipus de complexes col·laboren en la regulació de l'expressió gènica, plantejem que p27 pot jugar un paper clau en la regulació de l'activitat de les CDKs que són reclutades sobre ambdós tipus de estructures repressores. Per tant, podria actuar com a coordinador de l'acció dels dos complexes en la regulació transcripcional.

Per tant, a partir dels resultats obtinguts en aquesta tesi postulem dos mecanismes pels quals p27 està relacionada en l'aparició de les alteracions moleculars observades en la MP.

En el cas dels pacients mutants de LRRK2(G2019S), la LRRK2 hiperactiva fosforila MEK, aquesta fosforila a ERK i ERK s'encarrega de fosforilar a p27 en la S10. Aquesta fosforilació provoca que p27 s'exporti al citoplasma i no pugui exercir la seva funció com a repressor transcripcional en associació als complexes E2F4/p130, C/EBP δ o E2F1/pRb. La presència de p27 al citoplasma resulta en un increment de l'expressió del gen SNCA. Aquesta acumulació d' α -SYN induiria la seva agregació. Simultàniament, es produiria una disminució de l'expressió de CDK5 que a més de participar en l'increment de l'expressió de l' α -SYN també induiria un bloqueig del tràfic intracel·lular de vesícules facilitant l'acumulació i agregació d'aquesta proteïna.

En els malalts esporàdics, l'increment de pERK podria ser causa de la disminució de p27 i en conseqüència també de CDK5 que conduïrien, com el cas dels malalts genètics, a la acumulació i agregació de l' α -SYN. Queda per resoldre que és el que genera aquesta híper-activació d'ERK en aquest tipus de malalts. **(Figura 37)**

Una possibilitat és el dany al DNA produït per l'envelliment. Les cèl·lules envellides vam acumulant mutacions i per tant dany en el seu DNA que no es poden reparar totalment degut a la ineficiència dels mecanismes de reparació. Això desencadenaria (segons la hipòtesi del Dr. K. Herrup) la inducció dels primer passos de la MP i d'altres malalties neurodegeneratives. Aquest dany al DNA no reparat podria activar via ATM la via de les MAPK de manera continuada i això podria activar la ruta 27 tal com hem descrit anteriorment.⁹² A la **Figura 38** integrem les vies alterades en la MP relacionades amb la p27.

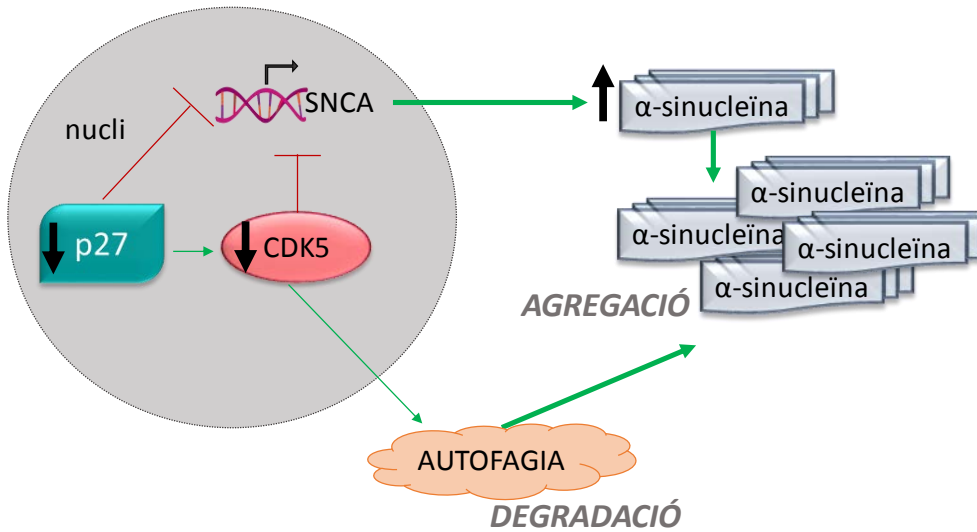
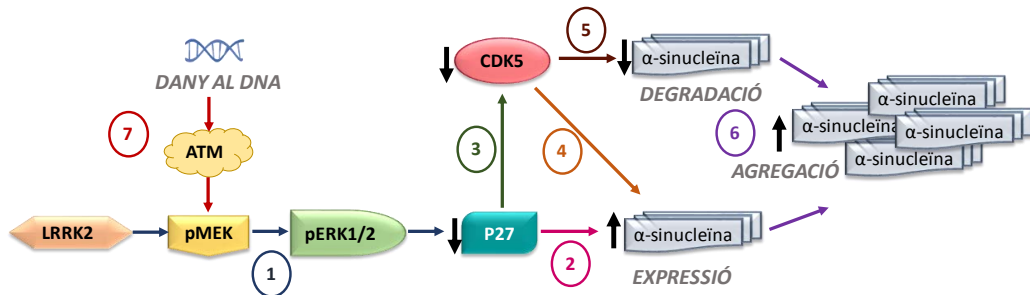


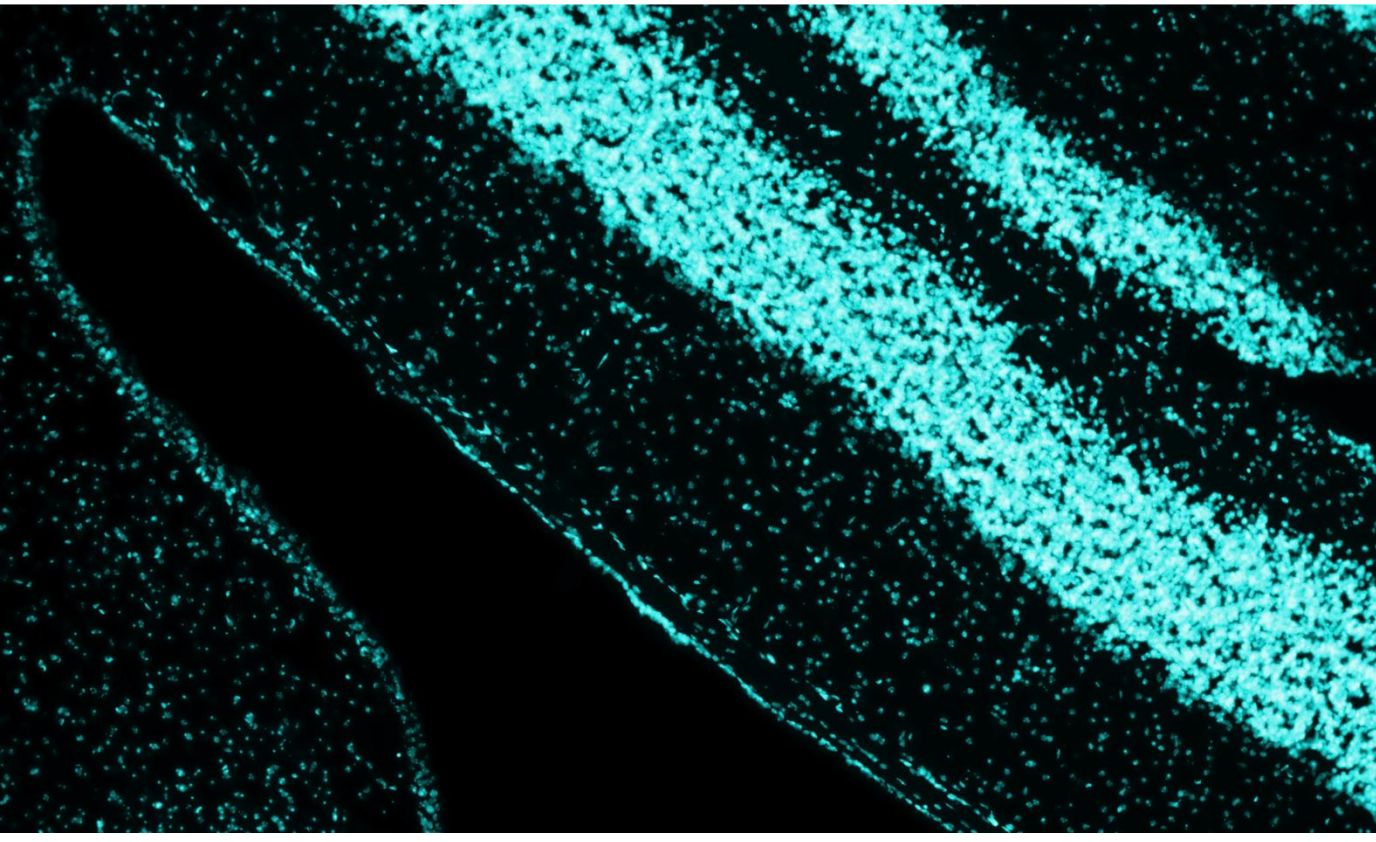
Figura 37. p27 i CDK5 regulen els nivells i l'agregació de l'α-SYN. Representació d'una cèl·lula neural on la baixada de p27 i CDK5 acaba conduint a un increment de l'expressió d'α-SYN i una disminució de la seva degradació, resultant en un increment de la seva agregació



- 1: LRRK2 degrada p27 a través de la via de ERK
- 2: La reducció dels nivells de p27 resulta en la inducció de l'expressió de l'α-SYN
- 3: La reducció dels nivells de p27 induïx una baixada dels nivells de CDK5
- 4: La reducció dels nivells de CDK5 induïx l'expressió de l'α-SYN
- 5: La reducció dels nivells de CDK5 induïx la reducció de la degradació de l'α-SYN
- 6: Tant l'increment de l'expressió d'α-SYN com la reducció de la seva degradació promouen la seva agregació
- 7: El dany al DNA en cèl·lules envellides activa la via de MEK-ERK mitjançant ATM

Figura 38. Vies moleculars relacionades amb p27 en la MP. Resum de totes les vies moleculars alterades en la MP que estan relacionades amb p27 que hem explorat experimentalment i complementat bibliogràficament en aquesta tesi. 1: LRRK2 degrada p27 a través de la via de ERK; 2: La reducció dels nivells de p27 resulta en la inducció de l'expressió de l'α-SYN; 3: La reducció dels nivells de p27 induïx una baixada dels nivells de CDK5; 4: La reducció dels nivells de CDK5 induïx l'expressió de l'α-SYN; 5: La reducció dels nivells de CDK5 induïx la reducció de la degradació de l'α-SYN; 6: Tant l'increment de l'expressió d'α-SYN com la reducció de la seva degradació promouen la seva agregació; 7: El dany al DNA en cèl·lules envellides activa la via de MEK-ERK mitjançant ATM

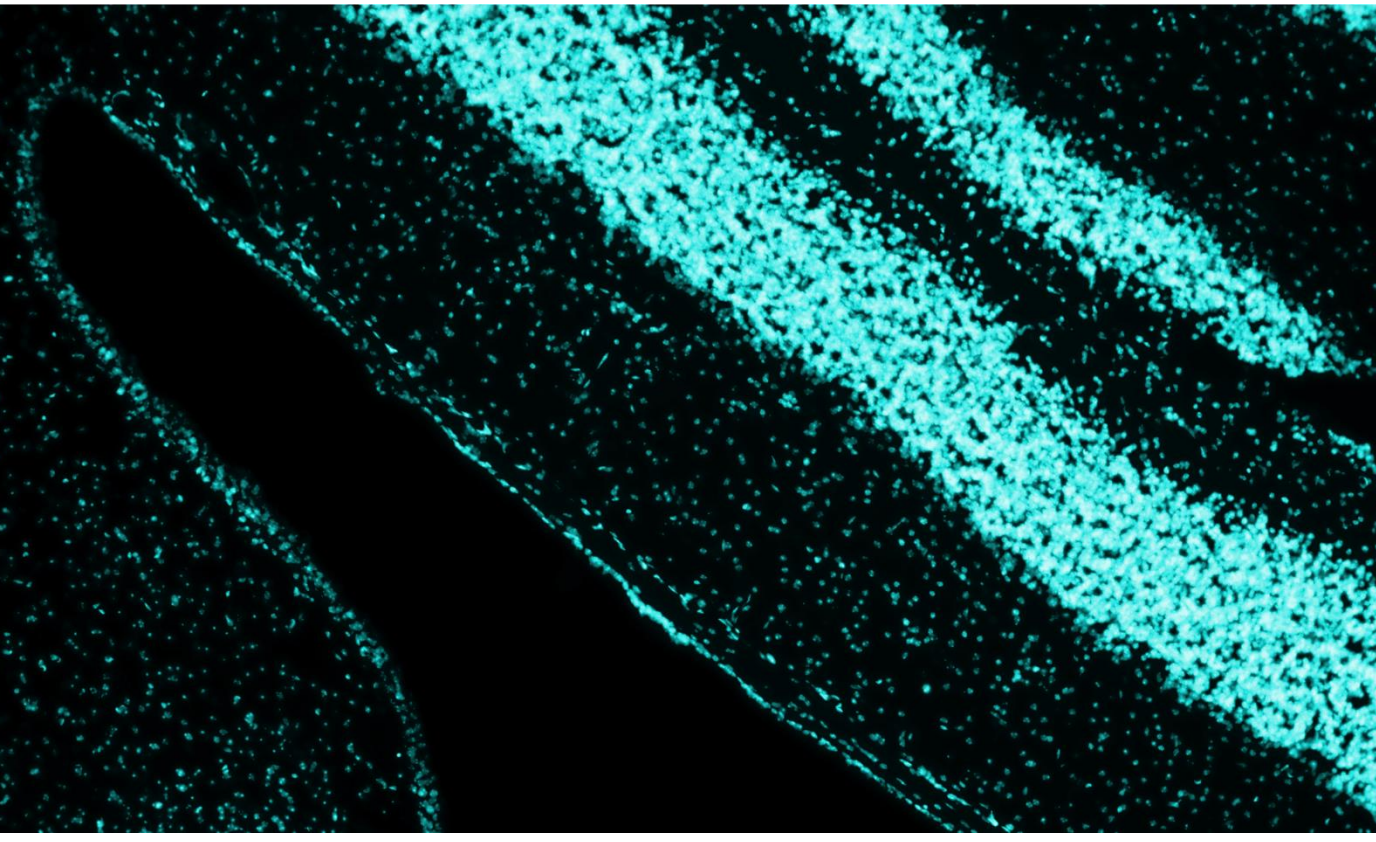
CONCLUSIONS



CONCLUSIONS

1. p27 regula l'expressió de l' α -SYN en diferents tipus cel·lulars: fibroblasts i neurones de ratolí i neurones humanes.
2. La regulació de l'expressió d' α -SYN per p27 és a través del complex p130/E2F4 que s'uneixen a regions específiques del gen SNCA i implica l'activitat de les CDKs.
3. Un mecanisme alternatiu de regulació podria ser a través del Factor de transcripció C/EBP δ .
4. p27 i p130 també regulen l'agregació d' α -SYN ja que la seva pèrdua en neurones humanes (SH-SY5Y) indueix la formació d'agregats d'aquesta proteïna.
5. Cèl·lules humanes de pacients de MP portadors de la mutació LRRK2 (G2019S) presenten nivells baixos de p27 i alts d' α -SYN.
6. LRRK2 indueix la pèrdua de p27 a través de l'activació de la via de les MAPK. Per tant, hem pogut establir la connexió molecular entre els dos gens més importants de la MP: LRRK2 i SNCA.
7. P27 regula l'expressió de CDK5, ja que la seva disminució indueix un descens dels nivells d'aquesta quinasa.
8. La disminució de CDK5 indueix la formació d'agregats citoplasmàtics d' α -SYN grans dimensions.
9. Tots aquests resultats indiquen una important rellevància de p27 i CDK5 en la etiologia de la MP.

BIBLIOGRAFIA



BIBLIOGRAFIA

1. Paweletz, N. Walther Flemming: pioneer of mitosis research. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 72–75 (2001).
2. Alberts, B. *Molecular Biology of the Cell.* (2014).
3. Lodish, H. *Molecular Cell Biology.* (2016).
4. Cheung, T. H. & Rando, T. A. Molecular regulation of stem cell quiescence. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 329–340 (2013).
5. Pardee, A. B. A Restriction Point for Control of Normal Animal Cell Proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **71**, 1286–1290 (1974).
6. Planas-Silva, M. D. & Weinberg, R. A. The restriction point and control of cell proliferation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 768–72 (1997).
7. Malumbres, M. & Barbacid, M. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 630–641 (2005).
8. Malumbres, M. Cyclin-dependent kinases. *Genome Biol.* **15**, 122 (2014).
9. Kato, J., Matsushime, H., Hiebert, S. W., Ewen, M. E. & Sherr, C. J. Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. *Genes Dev.* **7**, 331–342 (1993).
10. Cobrinik, D. Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene* **24**, 2796–2809 (2005).
11. Koff, A. *et al.* Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science* **257**, 1689–94 (1992).
12. King, R. W., Jackson, P. K. & Kirschner, M. W. Mitosis in transition. *Cell* **79**, 563–571 (1994).
13. Lew, D. J. & Kornbluth, S. Regulatory roles of cyclin dependent kinase phosphorylation in cell cycle control. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 795–804 (1996).
14. Malumbres, M. & Barbacid, M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **1**, 222–231 (2001).
15. Ravitz, M. J. & Wenner, C. E. Cyclin-dependent kinase regulation during G1 phase and cell cycle regulation by TGF-beta. *Adv. Cancer Res.* **71**, 165–207 (1997).
16. Sherr, C. J. & Roberts, J. M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* **13**, 1501–12 (1999).
17. Besson, A., Dowdy, S. F. & Roberts, J. M. CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev. Cell* **14**, 159–69 (2008).
18. Lim, S. & Kaldis, P. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development* (2013). doi:10.1242/dev.091744
19. Toyoshima, H. & Hunter, T. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* (1994). doi:10.1016/0092-

BIBLIOGRAFIA

- 8674(94)90573-8
20. Polyak, K. *et al.* Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* **78**, 59–66 (1994).
 21. Blain, S. W. Switching cyclin D-Cdk4 kinase activity on and off. *Cell Cycle* **7**, 892–8 (2008).
 22. Dyson, H. J. & Wright, P. E. Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 197–208 (2005).
 23. Lacy, E. R. *et al.* p27 binds cyclin-CDK complexes through a sequential mechanism involving binding-induced protein folding. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 358–64 (2004).
 24. Bachs, O. *et al.* Role of p27^{Kip1} as a transcriptional regulator. *Oncotarget* **9**, 26259–26278 (2018).
 25. Bachs, O. *et al.* Role of p27^{Kip1} as a transcriptional regulator. *Oncotarget* (2018). doi:10.18632/oncotarget.25447
 26. Sugiyama, Y. *et al.* Direct Binding of the Signal-transducing Adaptor Grb2 Facilitates Down-regulation of the Cyclin-dependent Kinase Inhibitor p27Kip1. *J. Biol. Chem.* (2001). doi:10.1074/jbc.M010811200
 27. Borriello, A. & Bencivenga, D. Targeting p27Kip1 protein: its relevance in the therapy of human cancer. *Expert Opin. Ther. Targets* **6**, 677–693 (2011).
 28. Hnit, S. S. T. *et al.* p27(Kip1) signaling: Transcriptional and post-translational regulation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **68**, 9–14 (2015).
 29. Vervoorts, J. & Lüscher, B. Post-translational regulation of the tumor suppressor p27(KIP1). *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 3255–64 (2008).
 30. Pérez-Luna, M. *et al.* PCAF regulates the stability of the transcriptional regulator and cyclin-dependent kinase inhibitor p27 Kip1. *Nucleic Acids Res.* **40**, 6520–33 (2012).
 31. Jäkel, H., Peschel, I., Kunze, C., Weinl, C. & Hengst, L. Regulation of p27^{Kip1} by mitogen-induced tyrosine phosphorylation. *Cell Cycle* (2012). doi:10.4161/cc.19957
 32. Besson, A., Gurian-West, M., Schmidt, A., Hall, A. & Roberts, J. M. p27Kip1 modulates cell migration through the regulation of RhoA activation. *Genes Dev.* **18**, 862–76 (2004).
 33. Larrea, M. D. *et al.* Phosphorylation of p27Kip1 Regulates Assembly and Activation of Cyclin D1-Cdk4. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 6462–6472 (2008).
 34. Chu, I. *et al.* p27 phosphorylation by Src regulates inhibition of cyclin E-Cdk2. *Cell* **128**, 281–94 (2007).
 35. Wei, Q., Miskimins, W. K. & Miskimins, R. The Sp1 family of transcription factors is involved in p27(Kip1)-mediated activation of myelin basic protein gene expression. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 4035–45 (2003).
 36. Nguyen, L. *et al.* [p27Kip1 independently promotes neuronal differentiation and migration in the cerebral cortex]. *Bull. Mem. Acad. R. Med. Belg.* **162**, 310–4 (2007).

37. Li, H. *et al.* p27(Kip1) directly represses Sox2 during embryonic stem cell differentiation. *Cell Stem Cell* **11**, 845–52 (2012).
38. Pippa, R. *et al.* p27Kip1 represses transcription by direct interaction with p130/E2F4 at the promoters of target genes. *Oncogene* **31**, 4207–20 (2012).
39. Gallastegui, E. *et al.* p27Kip1 represses the Pitx2-mediated expression of p21Cip1 and regulates DNA replication during cell cycle progression. *Oncogene* **36**, 350–361 (2017).
40. Perearnau, A. *et al.* p27Kip1, PCAF and PAX5 cooperate in the transcriptional regulation of specific target genes. *Nucleic Acids Res.* **45**, 5086–5099 (2017).
41. Biçer, A. *et al.* ChIP-Seq analysis identifies p27(Kip1)-target genes involved in cell adhesion and cell signalling in mouse embryonic fibroblasts. *PLoS One* **12**, e0187891 (2017).
42. Rayman, J. B. *et al.* E2F mediates cell cycle-dependent transcriptional repression in vivo by recruitment of an HDAC1/mSin3B corepressor complex. *Genes Dev.* **16**, 933–47 (2002).
43. Orlando, S. *et al.* p27Kip1 and p21Cip1 collaborate in the regulation of transcription by recruiting cyclin-Cdk complexes on the promoters of target genes. *Nucleic Acids Res.* (2015). doi:10.1093/nar/gkv593
44. Boumahdi, S. *et al.* SOX2 controls tumour initiation and cancer stem-cell functions in squamous-cell carcinoma. *Nature* **511**, 246–250 (2014).
45. Parkinson, J. On the Shaking Palsy. *Sherwood, Heely and Jones* 223–236 (1817). doi:10.1007/s00702-017-1684-0
46. Goetz, C. G. The history of Parkinson's disease: Early clinical descriptions and neurological therapies. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **1**, (2011).
47. Poewe, W. & Mahlknecht, P. The clinical progression of Parkinson's disease. *Park. Relat. Disord.* **15**, (2009).
48. Poewe, W. *et al.* Parkinson disease. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **3**, 17013 (2017).
49. Pinter, B. *et al.* Mortality in Parkinson's disease: a 38-year follow-up study. *Mov. Disord.* **30**, 266–9 (2015).
50. Kalia, L. V & Lang, A. E. Parkinson's disease. *Lancet* **386**, 896–912 (2015).
51. Antony, P. M. A., Diederich, N. J., Krüger, R. & Balling, R. The hallmarks of Parkinson's disease. *FEBS J.* **280**, 5981–5993 (2013).
52. Dickson, D. W. Parkinson's Disease and Parkinsonism: Neuropathology. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, a009258–a009258 (2012).
53. Shahmoradian, S. H. *et al.* Lewy pathology in Parkinson's disease consists of crowded organelles and lipid membranes. *Nat. Neurosci.* **22**, 1099–1109 (2019).
54. Burke, R. E. & O'Malley, K. Axon degeneration in Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* **246**, 72–83 (2013).
55. Dauer, W. & Przedborski, S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* **39**, 889–909 (2003).
56. McCann, H., Cartwright, H. & Halliday, G. M. Neuropathology of α -synuclein

BIBLIOGRAFIA

- propagation and braak hypothesis. *Mov. Disord.* **31**, 152–160 (2016).
57. Forno, L. S. Neuropathology of Parkinson's Disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **55**, 259–272 (1996).
 58. Dehay, B. *et al.* Lysosomal impairment in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **28**, 725–732 (2013).
 59. Jackson-Lewis, V., Blesa, J. & Przedborski, S. Animal models of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* **18 Suppl 1**, S183-5 (2012).
 60. Giráldez-Pérez, R. M., Antolín-Vallespín, M., Muñoz, M. D. & Sánchez-Capelo, A. Models of α -synuclein aggregation in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol. Commun.* **2**, 176 (2014).
 61. Hasegawa, T. *et al.* Accelerated alpha-synuclein aggregation after differentiation of SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Brain Res.* **1013**, 51–9 (2004).
 62. Xicoy, H., Wieringa, B. & Martens, G. J. M. The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Mol. Neurodegener.* **12**, 10 (2017).
 63. Falkenburger, B. H., Saridaki, T. & Dinter, E. Cellular models for Parkinson's disease. *J. Neurochem.* **139**, 121–130 (2016).
 64. Ghosh, D., Mehra, S., Sahay, S., Singh, P. K. & Maji, S. K. α -synuclein aggregation and its modulation. *Int. J. Biol. Macromol.* **100**, 37–54 (2017).
 65. Dehay, B. *et al.* Targeting α -synuclein for treatment of Parkinson's disease: mechanistic and therapeutic considerations. *Lancet. Neurol.* **14**, 855–866 (2015).
 66. Xilouri, M., Brekk, O. R. & Stefanis, L. Alpha-synuclein and Protein Degradation Systems: a Reciprocal Relationship. *Mol. Neurobiol.* **47**, 537–551 (2013).
 67. Kordower, J. H., Chu, Y., Hauser, R. A., Freeman, T. B. & Olanow, C. W. Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nat. Med.* **14**, 504–506 (2008).
 68. Kordower, J. H., Chu, Y., Hauser, R. A., Olanow, C. W. & Freeman, T. B. Transplanted dopaminergic neurons develop PD pathologic changes: A second case report. *Mov. Disord.* **23**, 2303–2306 (2008).
 69. Li, J.-Y. *et al.* Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat. Med.* **14**, 501–503 (2008).
 70. Recasens, A. *et al.* Lewy body extracts from Parkinson disease brains trigger α -synuclein pathology and neurodegeneration in mice and monkeys. *Ann. Neurol.* **75**, 351–362 (2014).
 71. Visanji, N. P., Brooks, P. L., Hazrati, L.-N. & Lang, A. E. The prion hypothesis in Parkinson's disease: Braak to the future. *Acta Neuropathol. Commun.* **1**, 2 (2013).
 72. Tyson, T., Steiner, J. A. & Brundin, P. Sorting out release, uptake and processing of alpha-synuclein during prion-like spread of pathology. *J. Neurochem.* **139 Suppl 1**, 275–289 (2016).
 73. Farrer, M. *et al.* alpha-synuclein gene haplotypes are associated with

- Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 1847–1851 (2001).
74. Mueller, J. C. *et al.* Multiple regions of α -synuclein are associated with Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* **57**, 535–541 (2005).
 75. Brenner, S., Wersinger, C. & Gasser, T. Transcriptional regulation of the α -synuclein gene in human brain tissue. *Neurosci. Lett.* **599**, 140–145 (2015).
 76. Piper, D. A., Sastre, D. & Schüle, B. Advancing Stem Cell Models of Alpha-Synuclein Gene Regulation in Neurodegenerative Disease. *Front. Neurosci.* **12**, 199 (2018).
 77. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–5 (1970).
 78. Smith, D. B. & Johnson, K. S. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**, 31–40 (1988).
 79. Frangioni, J. V. & Neel, B. G. Solubilization and Purification of Enzymatically Active Glutathione S-Transferase (pGEX) Fusion Proteins. *Anal. Biochem.* **210**, 179–187 (1993).
 80. Steger, M. *et al.* Phosphoproteomics reveals that Parkinson's disease kinase LRRK2 regulates a subset of Rab GTPases. *Elife* **5**, (2016).
 81. Zhang, J. & Herrup, K. Nucleocytoplasmic Cdk5 is involved in neuronal cell cycle and death in post-mitotic neurons. *Cell Cycle* **10**, 1208–1214 (2011).
 82. Zhang, J., Li, H. & Herrup, K. Cdk5 Nuclear Localization Is p27-dependent in Nerve Cells. *J. Biol. Chem.* **285**, 14052–14061 (2010).
 83. Valente, T. *et al.* CCAAT/enhancer binding protein δ is a transcriptional repressor of α -synuclein. *Cell Death Differ.* (2019). doi:10.1038/s41418-019-0368-8
 84. Pulido-Salgado, M., Vidal-Taboada, J. M. & Saura, J. C/EBP β and C/EBP δ transcription factors: Basic biology and roles in the CNS. *Prog. Neurobiol.* **132**, 1–33 (2015).
 85. Ko, C.-Y., Chang, W.-C. & Wang, J.-M. Biological roles of CCAAT/Enhancer-binding protein delta during inflammation. *J. Biomed. Sci.* **22**, 6 (2015).
 86. Balamurugan, K. & Sterneck, E. The Many Faces of C/EBP δ and their Relevance for Inflammation and Cancer. *Int. J. Biol. Sci.* **9**, 917–933 (2013).
 87. Sharma, P. *et al.* Phosphorylation of MEK1 by cdk5/p35 down-regulates the mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.* **277**, 528–34 (2002).
 88. Kobayashi, H. *et al.* Phosphorylation of cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) at Tyr-15 is inhibited by Cdk5 activators and does not contribute to the activation of Cdk5. *J. Biol. Chem.* **289**, 19627–36 (2014).
 89. Zukerberg, L. R. *et al.* Cdk5 links Cdk5 and c-Abl and facilitates Cdk5 tyrosine phosphorylation, kinase upregulation, and neurite outgrowth. *Neuron* **26**, 633–46 (2000).
 90. Zhang, J. *et al.* Cdk5 Suppresses the Neuronal Cell Cycle by Disrupting the E2F1-DP1 Complex. *J. Neurosci.* **30**, 5219–5228 (2010).

BIBLIOGRAFIA

91. Shukla, A. K., Spurrier, J., Kuzina, I. & Giniger, E. Hyperactive Innate Immunity Causes Degeneration of Dopamine Neurons upon Altering Activity of Cdk5. *Cell Rep.* **26**, 131-144.e4 (2019).
92. Chow, H.-M. *et al.* ATM is activated by ATP depletion and modulates mitochondrial function through NRF1. *J. Cell Biol.* **218**, 909–928 (2019).

PUBLICACIÓ

