



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Fisiopatología de modelos murinos de $\alpha$ -sinucleína y enfermedad de Parkinson

Elena Juárez Escoto

**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](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://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](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://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](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://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.



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

**SJD**  
Sant Joan de Déu  
Institut de Recerca

# Fisiopatología de modelos murinos de $\alpha$ -sinucleína y enfermedad de Parkinson

Tesis doctoral

Programa de Doctorat en Biomedicina  
Universitat de Barcelona

Institut de Recerca Sant Joan de Déu

Elena Juárez Escoto  
Barcelona, mayo de 2022

Directores:

Dr. Francesc Palau Martínez

Dra. Janet Hoenicka Blanco

Tutor:

Dr. Raúl Estevez Povedano



“Y una vez que la tormenta termine no recordarás cómo lo lograste, cómo sobreviviste. Ni siquiera estarás seguro si la tormenta ha terminado realmente. Pero una cosa sí es segura. Cuando salgas de esa tormenta no serás la misma persona que entró en ella. De eso se trata la tormenta.”

**Kafka en la orilla**  
Haruki Murakami



## AGRADECIMIENTOS

*Una lleva tanto tiempo fantaseando con sentarse a escribir los agradecimientos de su tesis que, cuando por fin llega ese momento, se queda en blanco. Y se le hace un nudo en la garganta.*

*En primer lugar, quisiera agradecer a la Dra. Janet Hoenicka y al Dr. Francesc Palau haberme dado la oportunidad de iniciar este camino y de crecer personal y profesionalmente en su laboratorio. Salgo de aquí con la certeza de que me costará encontrar un entorno como el que he tenido en los últimos años, y sintiéndome afortunada de haber contado con innumerables recursos y apoyos, no solo a nivel material sino, sobre todo, a nivel humano. Ha sido toda una experiencia ser testigo de la gran evolución del laboratorio desde sus orígenes en Barcelona, prácticamente, hasta ahora, y estoy segura de que quedan grandes cosas por llegar. Gracias por todo a ambos.*

*Gracias a mis compañeras y compañeros en esta carrera de fondo. Amigas y amigos. Aún a riesgo de que suene a cliché: esta tesis es vuestra. Para mí habéis constituido un pilar y un refugio en los días más grises. A Yaiza y Berta, gracias por aportar vuestra lucecita al laboratorio. Sois unas súper currantas y estoy segura de que os va a ir genial, porque siempre sabéis arrimar el hombro y hacer piña que, al final, es lo más importante en este trabajo, aunque nadie te lo cuente. A Alba y Jonathan, ¡compañeros de despacho! (que en este mundillo es casi como haber sido convivientes) Os deseo muchos ánimos con vuestras tesis, ambos estáis en momentos críticos, pero es cierto que hay luz al final del túnel, aunque a veces no lo parezca (bueno Jonathan, ¡tú casi que ya la estás viendo también!). Mucha fuerza, ¡serán unos trabajos preciosos!*

*Al núcleo duro... No sé ni qué deciros. Cuando pienso en vosotros sólo me viene a la cabeza felicidad, y seréis la principal razón para recordar mis años de tesis*

con cariño. A María, gracias por ser como eres: generosa, transparente, risueña... ¡auténtica! Siempre dispuesta a ayudar a los demás sin esperar nada a cambio. Ojalá cumplas tus sueños y vayamos a verte pronto a una casita en el pueblo, con tus lobitos, tus pájaros y tus ornitorrincos, si hace falta, porque te lo mereces. A Jordi, el experto, que cuando entraste pensamos míralo qué tímido y ¡a qué mala hora te dimos cuerda! Te dimos media vuelta de rosca y luego tú te pasaste vuelta y media más jajajaja. Es un decir, ¿eh? Bromas aparte, muchas gracias por todo tu apoyo, me has ayudado muchas veces sin saberlo, simplemente viniendo a preguntarme qué tal o si bajaba a desayunar, en mis momentos de máxima ofuscación en los que no quería saber nada de nadie, y ahí estabas, proponiéndome alguna ruta loca de montaña. Ahora cada vez que vea un xuxo me acordaré de ti ("¡Elena! ¿¿Un xuxo??") y de todas las veces que nos hemos puesto morados en los picapicas, que no han sido pocas. Y hablando de picapicas y comida, gracias a Abel que, aunque nunca te perdonaremos el abandono, ya sólo con acordarme de ti para escribirte unas palabras me da la risa. Me vienen tantos momentazos a la mente: oírte cantar canciones viejunas y no tan viejunas, como el Oooh look what you made me doooo de Taylor Swift limpiando el incubador, o los momentos de dispersión (véase Thalía). El mítico "¡Ahoooooora!", la hairy death, "¿Cuál ratón medieval eres hoy?", "Van a venir 13 millones de naves de Ganímedes", "Comisión comisión" o "Auxilio, me desmayo" fueron algunos de los grandes éxitos de la época. Ya fuera un drama o un mínimo e irrelevante suceso, todo ha sido susceptible de que creásemos una comedia recurrente al respecto. Maravilla. Gracias por todos esos momentos.

A Joy, creo que nunca podré devolverte toda la ayuda que me has dado. Para mí siempre has estado ahí, echándome una mano con una sonrisa, al pie del cañón, y siempre he admirado tu paciencia, tu tenacidad, tu saber hacer y, sobre todo, ¡el cariño que le pones a las cosas! En cualquier lugar en el que

*trabajos o estés tienen suerte de tenerte, porque tienes un aura muy bonita y siempre se puede contar contigo para sacar adelante hasta la tarea más difícil. ¡Vales muchísimo! Gracias.*

*Y a Lara, qué te voy a decir, todo se queda corto... Me has enseñado que hay una forma de hacer las cosas bien, y que en este mundo del publish or perish todavía hay gente haciendo ciencia de la buena, cuidando los detalles, luchando y enseñando y guiando a quien lo necesite con cariño y humildad. Porque en este mundillo de egos y prepotencia encontrar a alguien como tú es maravilloso, y mucho más poder llamarte amiga, porque eso es lo que eres para mí. Yo no hubiera conseguido llegar hasta aquí sin ti. Has confiado en mí desde el principio y has hecho que me sintiera útil en muchísimos momentos en los que yo no me sentía así. Tampoco podré devolverte toda la ayuda que me has dado, pero espero poder invitarte a unos vermutillos de vez en cuando y tenderte la mano cuando lo necesites. Gracias por tanto.*

*Pero este tipo de trabajo no solo requiere una persona o un grupo, y sería hipócrita por mi parte no reconocerlo aquí. Gracias a todo el personal del animalario, que hacen un trabajo muchas veces igualmente invisible que necesario, lo cual es bastante injusto. Gracias a Isabel, Raquel, Guillem... porque este trabajo no podría haberse hecho sin su labor. Igualmente invisible y necesario es el trabajo de limpieza: muchas gracias a todas esas trabajadoras, a las cuales encima fastidiamos sin darnos cuenta, al adelantar nuestro horario de trabajo solapando con el suyo o acumulando tonterías en el escritorio o la poyata como es mi caso. Y aunque en este trabajo hayan quedado plasmadas sólo un 10 % de las imágenes de microscopía confocal tomadas, Mónica, gracias, porque tú me has dado soporte en el 100 % de ellas, y no han sido pocas las horas y el esfuerzo empleados, que muchas veces también quedan invisibilizados.*

*Uno de los aprendizajes más importantes que me llevo de estos años es, paradójicamente, que la ciencia no lo es todo en la vida. De hecho, más te vale llevar un buen paracaídas para cuando el trabajo te ponga contra las cuerdas. Mi paracaídas ha tenido un montón de nombres y formas, y este es el momento de reconocerlos. Gracias a todos los electrocalçoteros, especialmente a Felipe y a mi pareja de manchegos favorita, David y Mari. Joder, es que han sido años muy buenos gracias a vosotros. Los planes aleatorios que hemos hecho dan para escribir otra tesis como mínimo, y Barcelona no hubiese sido lo mismo sin vosotros, sin las noches de MACBA, sin el palco de los pobres y pedir entradas del Primavera en Fórum, sin los ramen-Ya Hiro, sin las calçotadas, sin los carajillitos, sin los planes que se lían... ¡Os voy a echar muchísimo de menos!*

*Gracias a Gema y Lucía, mis cheetah girls, porque, aunque estemos cada una a unos cuantos kilómetros de distancia, sé que estáis ahí. Cada vez que os veo me dais una alegría impresionante, y siempre seréis mi compañía favorita para ver Harry Potter en momentos de bajón, ¡que para mí es decir mucho! Me encanta pensar que, aunque los años pasen, siempre volveremos a buscar un hueco para reencontrarnos y ponernos al día como si nada.*

*Gracias a mis pistachos realfooders mislateros. Ya son unos cuantos años desde que os conozco (veinte, de hecho, qué vértigo; Rebeca, a ti toda la vida prácticamente), y aunque no nos veamos tanto como quisiéramos, la magia es que sé que siempre puedo contar con vosotros. Y habiéndonos visto en los peores y más feos momentos, también llamado ir al colegio juntos, es una maravilla veros cada vez más guapos, realizados, creciendo, alcanzando metas y siendo unas personitas tan interesantes (¡ajajajaja ¡que sí!). Silvia, Mónica, Geles, Rebeca, Manuel, ¡sois impresionantes! Qué suerte la mía de teneros siempre ahí. Y no podía dejar pasar esta oportunidad para dar la bienvenida al nuevo miembro minipistacho: ¡Bienvenida Mía!*

*Para terminar he dejado la parte más difícil. La parte para la que no existen palabras... A Pablo, gracias por darme otras perspectivas, por auparme, por animarme a volar siempre. Hay tantas cosas que no hubiera podido hacer sin ti, cosas que sólo he podido ver posibles a través de tus ojos, aunque lo niegues. No siempre ha sido fácil, pero después de estos años locos de confinamiento, de tiempos raros, de estrés, de lo único que salgo convencida es de que contigo los pesos son más ligeros y los golpes más suaves. De mis mayores alegrías es, simplemente, volver a casa y saber que estarás allí, siempre dispuesto a escucharme y apoyarme, y tengo la suerte de poder revivirlo cada día.*

*Después de seis años y medio en Barcelona sigo sin estar empadronada entre unas cosas y otras. Y, aunque mi intención es que no me vuelva a pasar, en un momento dado eso me trajo a la mente una reflexión: una nunca sabe dónde va a acabar, pero siempre tiene que saber a dónde va a volver. Y eso, sin ir más lejos, es donde la familia esté.*

*A la mamà, al papà i a la Mar. Al Ram. Perquè encara que no estem massa aplomats (jo sobretot), al final ens entenem. Gràcies per estar ahí i per tindre sempre un plat de paella o arròs al forn a la taula, i per tots els refranys de poble que tanta gràcia ens fan, però que convendria recalcar més encara en moments difícils, per alegrar-nos i recordar les coses que realment són importants a la vida...*

*Salut i força al canut!!*



# CONTENIDO

Glosario de abreviaturas .....	xv
Índice de figuras.....	xix
Índice de tablas .....	xxiii
INTRODUCCIÓN .....	1
1. ENFERMEDAD DE PARKINSON .....	3
1.1. <i>Paralysis agitans</i> : aspectos históricos de la enfermedad de Parkinson .....	3
1.2. Epidemiología, síntomas y neuropatología.....	6
1.3. Etiología.....	9
1.3.1. <i>Factores genéticos</i> .....	9
1.3.2. <i>Factores ambientales</i> .....	11
1.4. Control del movimiento.....	12
1.4.1. <i>El circuito motor de los ganglios basales</i> .....	12
1.4.2. <i>La vía nigroestriada</i> .....	15
2. $\alpha$ -SINUCLEÍNA.....	19
2.1. $\alpha$ -Sinucleína, enfermedad de Parkinson y otras sinucleinopatías.....	19
2.2. Estructura y conformaciones.....	21
2.2.1. <i>Cuerpos de Lewy</i> .....	26
2.3. Funciones descritas .....	28
3. FISIOPATOLOGÍA CELULAR DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON ASOCIADA CON $\alpha$ -SINUCLEÍNA.....	31
3.1. Tráfico de membranas .....	32
3.1.1. <i><math>\alpha</math>Syn y el tráfico de membranas</i> .....	33
3.2. Rutas degradativas .....	34
3.2.1. <i><math>\alpha</math>Syn y autofagia mediada por chaperonas</i> .....	39
3.2.2. <i><math>\alpha</math>Syn y macroautofagia</i> .....	40
3.3. Homeostasis mitocondrial.....	42
3.3.1. <i><math>\alpha</math>Syn y la mitocondria</i> .....	46
3.3.2. <i><math>\alpha</math>Syn y los contactos mitocondriales</i> .....	48
3.4. Neuroinflamación .....	49
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	55

MATERIAL Y MÉTODOS.....	59
1. MODELO MURINO.....	61
1.1. Expansión de la colonia .....	61
1.2. Sistema de genotipado .....	62
1.3. Evaluación motora.....	65
1.3.1. Rotarod acelerado.....	65
1.3.2. Análisis de huellas .....	66
1.4. Obtención de muestras frescas de tejido cerebral de ratón .....	67
1.5. Obtención de cortes cerebrales fijados mediante perfusión intracardíaca.....	68
2. MODELOS CELULARES.....	69
2.1. Cultivo primario de mesencéfalo ventral .....	69
2.2. Cultivo primario estriatal.....	70
2.3. Tinciones y tratamientos .....	71
3. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS .....	72
3.1. Inmunodetección de proteínas por <i>Western blot</i> .....	72
3.1.1. Extracción, cuantificación de proteína y preparación de muestras .....	72
3.1.2. Electroforesis en geles SDS-PAGE.....	73
3.1.3. Transferencia húmeda y <i>Western blot</i> .....	73
3.2. Inmunodetección de proteínas por inmunofluorescencia. 74	
3.2.1. Inmunofluorescencia en cortes de tejido fijado congelado.....	74
3.2.2. Inmunofluorescencia de neuronas en cultivo.....	75
3.3. Análisis de interacciones proteínicas mediante Ensayo de Ligación por Proximidad (PLA) .....	75
4. TRANSCRIPTÓMICA (RNASEQ).....	76
5. MICROSCOPIA .....	77
5.1. Microscopía óptica .....	77
5.2. Microscopía confocal.....	77
5.3. Microscopía electrónica de transmisión.....	78
6. ANTICUERPOS.....	79
7. ANÁLISIS DE DATOS .....	80
7.1. Análisis de imagen.....	80
7.2. Análisis estadístico .....	81

RESULTADOS..... 83

CAPÍTULO I. CARACTERIZACIÓN DE LOS MODELOS MURINOS DE AUSENCIA O KNOCKOUT (*SNCA<sup>-/-</sup>*) Y SOBREENPRESIÓN (*SNCA-OVX*) DE  $\alpha$ SYN..... 85

1.1. Establecimiento de las colonias murinas de  $\alpha$ Syn mediante sistema de doble genotipado.....85

1.2. Evaluación motora de los modelos *Snca<sup>-/-</sup>* y *SNCA-OVX*..89

1.2.1. *El déficit de  $\alpha$ Syn provoca una reducción temprana de la coordinación motora*.....89

1.2.2. *El modelo de sobreexpresión SNCA-OVX presenta una coordinación motora normal y una marcada variabilidad en su desempeño en la tarea del rotarod a los 3 meses de edad*.....92

1.2.3. *Los animales SNCA-OVX presentan alteraciones de marcha en comparación a individuos silvestres y *Snca<sup>-/-</sup>**.....93

CAPÍTULO II. FISIOPATOLOGÍA CELULAR DEL DÉFICIT Y SOBREENPRESIÓN DE  $\alpha$ SYN..... 96

2.1. Obtención de modelos celulares para el estudio fisiopatológico del déficit y sobreexpresión de  $\alpha$ Syn.....96

2.2. Estudio de la vía autofágica ..... 102

2.2.1. *Los animales *Snca<sup>-/-</sup>* y SNCA-OVX muestran un aumento de autofagosomas en el estriado a los 6 meses de edad, en ausencia de cambios en el marcador de flujo autofágico p62/SQSTM1*..... 102

2.2.2. *Los individuos SNCA-OVX presentan un incremento temprano y específico de p62/SQSTM1 en las neuronas dopaminérgicas de la SNc*.....106

2.2.3. *Los modelos de déficit y sobreexpresión de  $\alpha$ Syn muestran una inducción autofágica en neuronas estriatales embrionarias*..... 111

2.3. Evaluación lisosomal ..... 114

2.3.1. *Los modelos *Snca<sup>-/-</sup>* y SNCA-OVX presentan un incremento lisosomal en el estriado y la SNc a los 6 meses de edad* ..... 114

2.3.2. *El déficit de  $\alpha$ Syn incrementa la señal lisosomal en neuronas estriatales embrionarias* ..... 118

2.4. Estudio preliminar de microscopía electrónica de transmisión ..... 120

2.4.1. *La ausencia de  $\alpha$ Syn provoca cambios morfológicos en las mitocondrias estriatales*..... 122

2.5. Análisis transcriptómico ..... 124

2.5.1. *El déficit de  $\alpha$ Syn causa una desregulación bioenergética nigroestriatal en animales de 6 meses de edad, la cual es parcialmente compartida por los individuos transgénicos*..... 128

2.5.2.	<i>Los modelos de <math>\alpha</math>Syn muestran una alteración de la expresión de genes relacionados con exosomas, en paralelo a los cambios en la expresión de genes mitocondriales.....</i>	133
2.5.3.	<i>El déficit de <math>\alpha</math>Syn genera un incremento en la expresión de genes axonales en el estriado .....</i>	134
2.6.	Estudio de los contactos entre mitocondrias y lisosomas	135
2.6.1.	<i>El déficit de <math>\alpha</math>Syn incrementa los contactos entre las mitocondrias y los lisosomas.....</i>	136
<b>CAPÍTULO III. PROCESOS NEUROINFLAMATORIOS EN MODELOS DE <math>\alpha</math>SYN</b>		<b>138</b>
3.1.	Análisis transcriptómico y de rutas neuroinflamatorias.....	138
3.1.1.	<i>El déficit de <math>\alpha</math>Syn produce cambios en la respuesta inmune .....</i>	138
3.1.2.	<i>Los animales <math>Snca^{-/-}</math> y SNCA-OVX de 6 meses muestran una activación estriatal de rutas de señalización relevantes para las respuestas inmunes.....</i>	140
3.2.	Estudio de fenotipos microgliales .....	143
3.2.1.	<i>La falta de <math>\alpha</math>Syn reduce la microglía neurotóxica M1 en el estriado y la SNC de animales de 6 meses de edad, mientras que el transgén en individuos SNCA-OVX la incrementa respecto al modelo knockout.....</i>	143
<b>DISCUSIÓN</b> .....		<b>149</b>
CAPÍTULO I. MODELOS MURINOS DE ENFERMEDAD DE PARKINSON .....		151
CAPÍTULO II. FISIOPATOLOGÍA CELULAR ASOCIADA CON $\alpha$ SYN.....		155
$\alpha$ Syn en la vía autofágica-lisosomal.....		155
$\alpha$ Syn en la homeostasis y bioenergética mitocondriales .....		160
$\alpha$ Syn en los contactos mitocondriales.....		163
CAPÍTULO III. $\alpha$ SYN EN LAS RESPUESTAS INMUNES .....		167
IMPLICACIONES FINALES .....		169
$\alpha$ Syn en la vulnerabilidad neuronal selectiva y la axonopatía .....		169
Enfermedad de Parkinson asociada a $\alpha$ Syn: ¿ganancia de función tóxica, pérdida de función o ambas?.....		172
<b>CONCLUSIONES</b> .....		<b>177</b>
<b>ANEXO</b> .....		<b>181</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....		<b>201</b>

## GLOSARIO DE ABREVIATURAS

### A

AD: autosómica dominante  
AG: aparato de Golgi  
AMPK: *AMP-activated protein kinase*  
ANOVA: *analysis of variance*  
AR: autosómica recesiva  
AraC: citarabina  
ATG: *autophagy-related proteins*  
ATP: adenosín trifosfato  
ATV: área tegmental ventral  
a.u.: unidades arbitrarias

### B

Baf.A1: Bafilomicina A1  
BSA: seroalbúmina bovina

### C

cm: centímetro  
CMA: *chaperone-mediated autophagy*  
CPu: núcleo caudado y putamen  
CSP $\alpha$ : *cysteine-string protein  $\alpha$*   
Ct: extremo carboxi terminal  
CTE: cadena de transporte de electrones

### D

DE: diferencialmente expresados  
DIV: día *in vitro*  
DMV: núcleo motor dorsal del nervio vago  
DNA: ácido desoxirribonucleico  
DRP1: *dynamin-related protein 1*

### E

EP: enfermedad de Parkinson  
ERK1/2: *extracellular signal-regulated kinase 1/2*

### F

FBS: suero bovino fetal

### G

g: gramo  
GABA: ácido  $\gamma$ -aminobutírico  
GCasa: glucocerebrosidasa  
GDAP1: *ganglioside induced differentiation associated protein 1*  
gDNA: ácido desoxirribonucleico genómico  
GFAP: *glial fibrillary acidic protein*  
GP: globo pálido  
GPe: globo pálido externo  
GPi: globo pálido interno  
GSEA: *Gene Set Enrichment Analysis*  
GTPasa: guanosina trifosfatasa

### H

h: hora  
HRP: *horseradish peroxidase*  
HSC70: *heat shock cognate protein of 70kDa*

### I

IFN- $\gamma$ : interferón  $\gamma$   
IL: interleuquina  
IU: unidades internacionales

### J

JNK: *c-Jun N-terminal kinase*

## K

kDa: kilodalton

kg: kilogramo

## L

LAMP1: *lysosome-associated membrane protein 1*

LAMP2A: *lysosome-associated membrane protein 2A*

LC: *locus coeruleus*

LC3: *microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*

LRRK2: *Leucine-rich repeat kinase 2*

## M

M: molar

MAM: membranas asociadas a mitocondrias

MAPK: *MAP kinases*

MCS: sitios de contacto de membranas

mg: miligramo

mL: mililitro

mm: milímetro

mM: milimolar

MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina

mRNA: ácido ribonucleico mensajero

MSN: neuronas espinosas medianas

MSN D1: neuronas espinosas medianas con receptores de dopamina D1

MSN D2: neuronas espinosas medianas con receptores de dopamina D2

MTDR: *MitoTracker Deep Red*

mTOR: *mechanistic target of rapamycin*

mTORC1: complejo de mTOR

MVB: *multivesicular body*

## N

NAC: componente no amiloide

NF- $\kappa$ B: *nuclear factor  $\kappa$ B*

ng: nanogramo

nm: nanómetro

nM: nanomolar

NST: núcleo subtalámico

Nt: extremo amino terminal

## O

OCT: *optimal cutting temperature*

OXPPOS: fosforilación oxidativa

## P

PB: tampón fosfato

PBS: tampón fosfato salino

PCR: reacción en cadena de polimerasa

PE: fosfatidiletanolamina

PFA: paraformaldehído

PI3KC3: complejo de fosfoinositol 3-quinasa de clase III

PI3P: inositol trifosfato

PINK1: *PTEN-induced putative kinase 1*

PLA: ensayo de ligación por proximidad

PTPIP51: *protein tyrosine phosphatase-interacting protein 51*

## Q

qPCR: PCR cuantitativa

## R

RE: retículo endoplasmático  
RNA: ácido ribonucleico  
RNc: núcleo caudal del rafe  
RNr: núcleo rostral del rafe  
ROIs: regiones de interés  
ROS: especies reactivas de oxígeno  
rpm: revoluciones por minuto

## S

s: segundo  
SD: desviación estándar  
SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico  
SN: *substantia nigra*  
SNAP-25: *synapsosome-associated protein, 25kDa*  
SNARE: *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*  
SNc: *substantia nigra pars compacta*  
SNr: *substantia nigra pars reticulata*  
STR: cuerpo estriado

## T

TBS-T: *Tris-Buffered Saline-Tween*  
TEM: microscopía electrónica de transmisión  
TEMED: tetrametiletilendiamida  
TFEB: *transcription factor EB*  
TH: tirosina hidroxilasa  
TKO: triple *knockout*  
TNF- $\alpha$ : *tumor necrosis factor  $\alpha$*   
TOM20: *translocase of outer mitochondrial membrane 20*  
TUBB3:  $\beta$ III-tubulina

## V

VAMP: *vesicle-associated membrane protein*  
VDAC1: *voltage dependent anion-selective channel 1*  
vM: mesencéfalo ventral

---

$\alpha$ Syn:  $\alpha$ -sinucleína  
 $\beta$ Syn:  $\beta$ -sinucleína  
 $\gamma$ Syn:  $\gamma$ -sinucleína  
 $\mu$ g: microgramo  
 $\mu$ L: microlitro  
 $\mu$ m: micrómetro  
 $\mu$ M: micromolar



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Correlación de síntomas y neuropatología de la EP según el modelo de Braak.....	8
<b>Figura 2.</b> Localización de los ganglios basales en el cerebro murino y humano.....	12
<b>Figura 3.</b> Esquema simplificado de las vías directa e indirecta del movimiento en un cerebro sano (A) y en un cerebro con EP (B).....	14
<b>Figura 4.</b> Factores intrínsecos y extrínsecos que pueden determinar la vulnerabilidad selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNc en la EP.....	17
<b>Figura 5.</b> Estructura del gen <i>SNCA</i> , su mRNA y la proteína $\alpha$ Syn.....	22
<b>Figura 6.</b> Estructura tridimensional de la proteína $\alpha$ Syn en humano y ratón.....	24
<b>Figura 7.</b> Conformaciones fisiológicas y patológicas de $\alpha$ Syn.....	26
<b>Figura 8.</b> Composición de los cuerpos de Lewy.....	27
<b>Figura 9.</b> Función conocida de $\alpha$ Syn en la sinapsis.....	30
<b>Figura 10.</b> Principales rutas de tráfico de membranas en la célula.....	33
<b>Figura 11.</b> Tipos de autofagia en la célula.....	35
<b>Figura 12.</b> Proceso de inducción autofágica (macroautofagia).....	38
<b>Figura 13.</b> Procesos mitocondriales a nivel neuronal.....	43
<b>Figura 14.</b> Procesos neuroinflamatorios en la EP asociada a $\alpha$ Syn.....	52
<b>Figura 15.</b> Prueba del rotarod acelerado.....	66
<b>Figura 16.</b> Procedimiento para el análisis de huellas.....	67
<b>Figura 17.</b> Procedimiento de disección y selección de muestras de mesencéfalo ventral.....	68
<b>Figura 18.</b> Neuronas estriatales embrionarias en cultivo a DIV4.....	71
<b>Figura 19.</b> Genotipado del modelo murino <i>Snca</i> <sup>-/-</sup> .....	86
<b>Figura 20.</b> Genotipado del modelo transgénico <i>SNCA</i> <sup>Tg/Tg</sup> ( <i>SNCA</i> -OVX).....	87
<b>Figura 21.</b> Caracterización de los niveles de expresión proteínica de $\alpha$ Syn en los animales silvestres (wild type) y en los modelos <i>Snca</i> <sup>-/-</sup> y <i>SNCA</i> -OVX.....	88

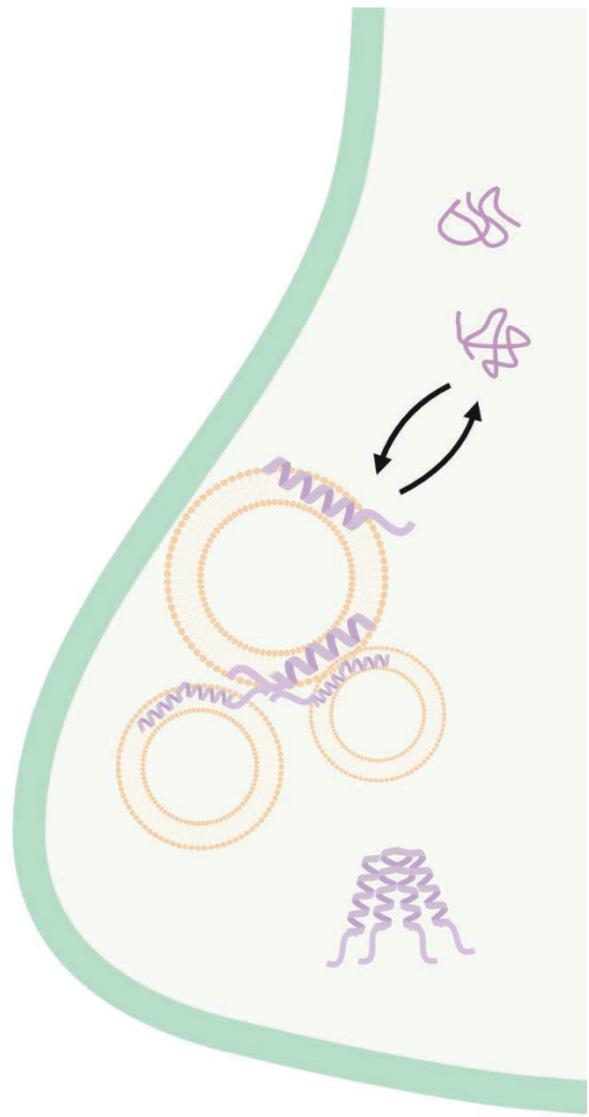
<b>Figura 22.</b> Peso corporal de los animales silvestres (wild type) y de los modelos murinos <i>Snca</i> <sup>-/-</sup> y <i>SNCA-OVX</i> a los 3, a los 6 y a los 12 meses de edad. ....	90
<b>Figura 23.</b> Evaluación de la coordinación motora mediante la prueba del rotarod acelerado.....	91
<b>Figura 24.</b> Correlación entre la coordinación motora y la dosis de transgén en el modelo <i>SNCA-OVX</i> .....	93
<b>Figura 25.</b> Análisis de las huellas traseras. ....	95
<b>Figura 26.</b> Caracterización de cultivo primario de vM. ....	99
<b>Figura 27.</b> Neuronas dopaminérgicas en cortes de SNc.....	100
<b>Figura 28.</b> Caracterización de cultivo primario estriatal. ....	101
<b>Figura 29.</b> Estudio de marcadores autofágicos en muestras cerebrales de los modelos de $\alpha$ Syn a los 6 y 12 meses de edad.. ....	105
<b>Figura 30.</b> Análisis por inmunofluorescencia del marcador p62 en estriado y SNc de los modelos de $\alpha$ Syn a los 3, 6 y 12 meses de edad. ....	109
<b>Figura 31.</b> Análisis por inmunofluorescencia del marcador p62 en regiones no dopaminérgicas adyacentes a la SNc, en los modelos de $\alpha$ Syn a los 6 y 12 meses de edad.. ....	110
<b>Figura 32.</b> Estudio de marcadores autofágicos en cultivo primario de neuronas estriatales. ....	113
<b>Figura 33.</b> Niveles proteínicos del marcador lisosomal LAMP1 en muestras cerebrales de los modelos de $\alpha$ Syn a los 6 y 12 meses de edad. ....	115
<b>Figura 34.</b> Análisis por inmunofluorescencia de lisosomas en estriado y SNc de los modelos de $\alpha$ Syn a los 3, 6 y 12 meses de edad.....	118
<b>Figura 35.</b> Estudio lisosomal en cultivos primarios de neuronas estriatales. ....	119
<b>Figura 36.</b> Resultados preliminares del estudio por TEM.....	121
<b>Figura 37.</b> Estudio preliminar por TEM de morfología mitocondrial en los modelos de $\alpha$ Syn, en estriado (STR) y mesencéfalo ventral (vM), a los 6 meses de edad.....	124
<b>Figura 38.</b> Representación de resultados globales del análisis transcriptómico. ....	125

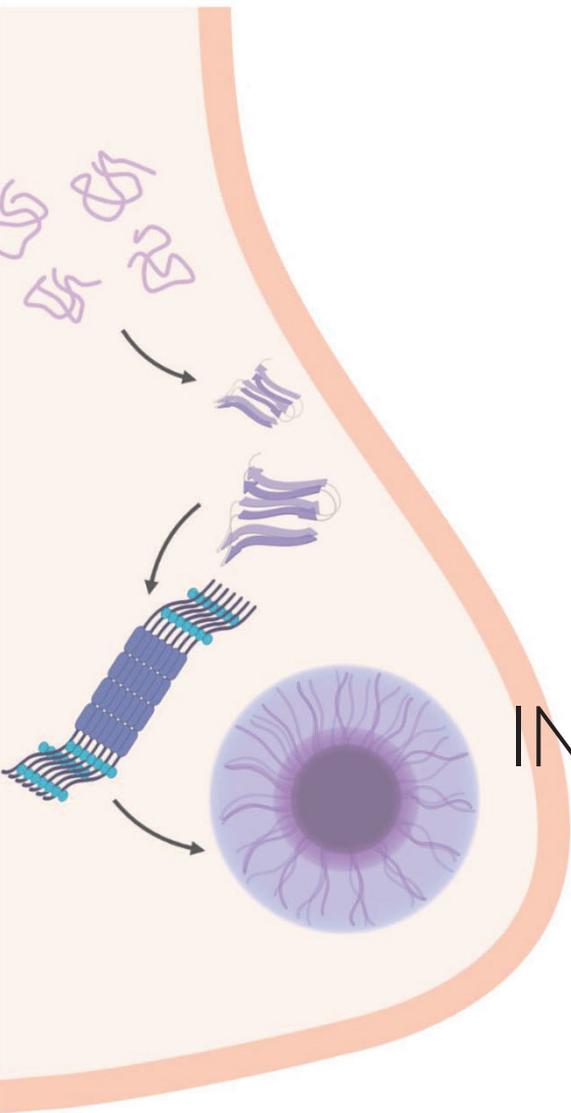
<b>Figura 39.</b> Análisis de enriquecimiento en GO terms de componentes celulares en animales <i>Snca</i> <sup>-/-</sup> de 6 meses, respecto a individuos silvestres. ....	130
<b>Figura 40.</b> Genes mitocondriales diferencialmente expresados en individuos <i>Snca</i> <sup>-/-</sup> de 6 meses de edad. ....	131
<b>Figura 41.</b> Análisis de enriquecimiento en GO terms de rutas KEGG de individuos <i>Snca</i> <sup>-/-</sup> de 6 meses, respecto a individuos silvestres. ....	132
<b>Figura 42.</b> Genes de las categorías celulares "exosoma extracelular", "axón" y "sinapsis" diferencialmente expresados en individuos <i>Snca</i> <sup>-/-</sup> de 6 meses de edad. ....	135
<b>Figura 43.</b> Estudio de los contactos mitocondria-lisomas y de la proteína de anclaje GDAP1 en neuronas estriatales embrionarias. ....	137
<b>Figura 44.</b> Gene Set Enrichment Analysis del estriado de individuos <i>Snca</i> <sup>-/-</sup> a los 6 meses de edad. ....	139
<b>Figura 45.</b> Estudio de las vías MAPK JNK y ERK y de la vía de NF-κB en muestras cerebrales de los modelos de αSyn a los 6 y 12 meses de edad. ....	142
<b>Figura 46.</b> Análisis de microglía neurotóxica y neuroprotectora en el estriado de los modelos de αSyn a los 6 y 12 meses. ....	145
<b>Figura 47.</b> Análisis de microglía neurotóxica y neuroprotectora en la SNc de los modelos de αSyn a los 6 y 12 meses. ....	147
<b>Figura 48.</b> Microglía total en el estriado y la SNc de los modelos de αSyn. ....	148
<b>Figura 49.</b> Alteraciones fisiopatológicas tempranas en el estriado y la SNc de los modelos de αSyn a los 6 meses de edad. ....	166
<b>Figura 50.</b> Esquema simplificado del modelo de proteinopenia propuesto por Espay y colaboradores. ....	175



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Principales determinantes genéticos de la EP. ....	10
<b>Tabla 2.</b> Oligonucleótidos empleados para el genotipado de la colonia SNCA. ....	64
<b>Tabla 3.</b> Programa de ciclos empleado para el genotipado del gen <i>Snca</i> por PCR estándar. ....	64
<b>Tabla 4.</b> Anticuerpos primarios empleados en este trabajo.....	79
<b>Tabla 5.</b> Anticuerpos secundarios empleados en este trabajo.....	80
<b>Tabla 6.</b> Primeros diez genes diferencialmente expresados en el estriado del modelo <i>Snca</i> <sup>-/-</sup> , en comparación a los animales silvestres. ....	126
<b>Tabla 7.</b> Primeros diez genes diferencialmente expresados en el estriado del modelo SNCA-OVX, en comparación a los animales silvestres. ....	127
<b>Tabla 8.</b> Primeros diez genes diferencialmente expresados en el mesencéfalo ventral del modelo <i>Snca</i> <sup>-/-</sup> , en comparación a los animales silvestres. ....	127
<b>Tabla 9.</b> Primeros diez genes diferencialmente expresados en el mesencéfalo ventral del modelo SNCA-OVX, en comparación a los animales silvestres. ....	128





# INTRODUCCIÓN



## 1. ENFERMEDAD DE PARKINSON

### 1.1. *Paralysis agitans*: aspectos históricos de la enfermedad de Parkinson

*The first symptoms are a slight sense of weakness, with a proneness to trembling in some particular part; sometimes in the head, but most commonly in one of the hands and arms [...].*

*But as the malady proceeds [...] the propensity to lean forward becomes invincible, and the patient is thereby forced to step on the toes and fore part of the feet, whilst the upper part of the body is thrown so far forward as to render it difficult to avoid falling on the face. [...] In some cases it is found necessary entirely to substitute running for walking; since otherwise the patient, on proceeding only a very few paces, would inevitably fall.*

*An Essay on the Shaking Palsy*

James Parkinson, 1817

En junio del año 1817 James Parkinson publicó *An Essay on the Shaking Palsy* (Un Ensayo sobre la Parálisis Agitante), donde recogía sus observaciones sobre un grupo de pacientes que mostraban temblores en reposo, lentitud o ausencia de movimientos (bradicinesia o acinesia) e, incluso, dificultades para andar (Parkinson, 1817). Aunque estas fueron las primeras observaciones de la entonces llamada *paralysis agitans*, no fue renombrada como enfermedad de Parkinson (EP) y descrita en profundidad hasta 50 años después, cuando William Rutherford Sanders y Jean-Martin Charcot acuñaron el término y establecieron la base clínica de la enfermedad (Sanders, 1865; Charcot, 1875; Goedert and Compston, 2018).

A finales del siglo XIX, sin embargo, la patología subyacente era todavía completamente desconocida. En 1893 se señaló por primera vez a la *substantia nigra pars compacta* (SNc) como región cerebral afectada en la EP, cuando Paul Blocq y Georges Marinesco detectaron, en un paciente con temblores en reposo en su lado izquierdo, un granuloma en el pedúnculo cerebral derecho, el cual estaría afectando a la SNc (Blocq and Marinesco, 1893). La importancia de esta región llegó 20 años después, cuando Konstantin Trétiakoff publicó sus observaciones, en las cuales la SNc de los pacientes de EP mostraba una despigmentación macroscópica como consecuencia de la pérdida de neuronas dopaminérgicas que contienen neuromelanina, el pigmento que aporta la coloración oscura a esta región (Trétiakoff, 1919). Esta sería la primera descripción de los cambios neuropatológicos en la SNc de pacientes con EP. Otra de las características neuropatológicas clave se había descrito tan solo unos años antes por Friedrich Heinrich Lewy, que reportó unos acúmulos proteínicos en las neuronas (Lewy, 1913), los cuales se renombraron como cuerpos de Lewy por Gonzalo Rodríguez Lafora (Lafora, 1913) y el propio Trétiakoff, que los había detectado en la SNc de los pacientes.

Otros hitos en la historia de la EP fueron el descubrimiento de la dopamina como neurotransmisor, que hasta ese momento era considerada un precursor de la adrenalina y la noradrenalina, y el descubrimiento de la vía nigroestriada durante la segunda mitad del siglo XX. Primero se detectó la presencia de dopamina en el cerebro de vertebrados, siendo el estriado la región de mayor concentración (Montagu, 1957; Carlsson et al., 1958) y, además, se le asignó por primera vez un papel funcional a este neurotransmisor: el control motor (Carlsson et al., 1957). El descubrimiento de la vía nigroestriada se posibilitó gracias a una serie de experimentos de lesión, que relacionaron

anatónicamente al estriado dorsal con la SNc (Dahlstroem and Fuxe, 1964; Anden et al., 1965). Estos estudios permitieron determinar que el estriado dorsal contenía los terminales de las neuronas dopaminérgicas de la SNc, y dieron paso a la aparición del modelo de las vías directa e indirecta del movimiento tal y como lo conocemos hoy (página 12).

El siguiente gran avance en la neuropatología de la EP tuvo relación con la serendipia, cuando se puso por primera vez el foco en la mitocondria como orgánulo clave en esta patología. En 1983, Langston y colaboradores observaron un grupo de heroinómanos que había desarrollado una serie de síntomas prácticamente indistinguibles de la EP, tras inyectarse un contaminante en el procesamiento de heroína sintética, la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina (MPTP) (Langston et al., 1983). Estudios posteriores determinaron que era un metabolito derivado, el MPP<sup>+</sup>, el que se acumulaba en la matriz mitocondrial inhibiendo el complejo I de la cadena de transporte de electrones (CTE), inhibición que también fue observada en la SNc de pacientes con EP (Schapira et al., 1990). El descubrimiento del mecanismo de acción del MPTP supuso un antes y un después en la investigación en EP, ya que abrió la puerta al establecimiento de modelos neurotóxicos que han trascendido hasta nuestros días.

Los esfuerzos en los años posteriores se centraron en determinar el origen y las causas de la EP, descubriéndose varios de los genes implicados y factores de riesgo más importantes en la etiología de esta enfermedad. Los casos de EP monogénicos, aunque minoritarios, permitieron el avance en la comprensión de las causas subyacentes a la neurodegeneración en la EP (página 9).

Desde aquel primer ensayo de James Parkinson han pasado más de dos siglos de investigación en esta enfermedad, que se ha erigido como la segunda enfermedad neurodegenerativa más común, solamente por detrás de la enfermedad de Alzheimer (más información en las revisiones de Przedborski, 2017; Del Rey et al., 2018, con motivo del bicentenario de Un Ensayo sobre la Parálisis Agitante).

## **1.2. Epidemiología, síntomas y neuropatología**

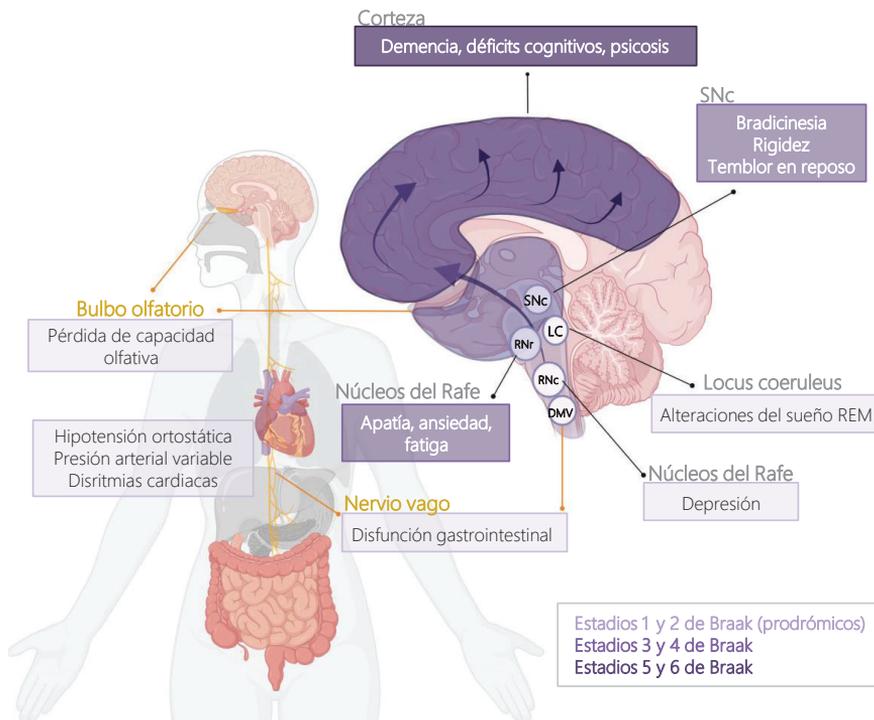
La EP es una enfermedad neurodegenerativa, crónica y de avance lento que afecta a más de 6 millones de personas en todo el mundo (GBD 2016 Parkinson's Disease Collaborators, 2018). De hecho se estima que, en 2040, se alcancen los 13 millones de afectados globalmente (Dorsey and Bloem, 2018). Aunque la EP de inicio temprano (<40 años) es infrecuente, un 25 % de los individuos afectados es menor de 65 años, y alrededor de un 10 % de pacientes son menores de 50 años (Bloem et al., 2021). Entre los 60 y los 90 años su incidencia se multiplica de 5 a 10 veces, lo que la convierte en el trastorno de movimiento más común (Poewe et al., 2017).

Las características clave en la EP incluyen la muerte selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNc, una porción del mesencéfalo implicada en el control del movimiento (página 12). Como consecuencia de ello los pacientes muestran los síntomas motores más característicos de la EP, como son el temblor en reposo, la rigidez y la bradicinesia, cuya aparición va ligada al diagnóstico de la enfermedad. No obstante, estos síntomas están precedidos por otros de tipo no motor que incluyen trastornos en la conducta del sueño, pérdida de la capacidad olfativa, problemas digestivos como estreñimiento e, incluso, depresión y ansiedad. En fases más avanzadas de la EP los síntomas motores se complican y aparecen la inestabilidad postural, la dificultad para

andar y la disfagia, pero también pueden aparecer síntomas psicóticos, como alucinaciones o demencia (Kalia and Lang, 2015; Poewe et al., 2017). Aunque estos son los síntomas más típicos cabe remarcar que la EP no constituye una entidad única, sino que cada paciente manifiesta síntomas y patrones de progresión muy variables incluso bajo el mismo desencadenante; de modo inverso, distintas causas pueden generar clínicas similares, a las que nos referimos como síndromes parkinsonianos o parkinsonismos (Bloem et al., 2021).

Como se ha nombrado anteriormente, otra de las claves neuropatológicas de la EP es la presencia de inclusiones intracelulares en las neuronas que sobreviven, los llamados cuerpos de Lewy, unos agregados esféricos y muy eosinófilicos (indicador de estructuras básicas) en cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina (Fares et al., 2021). Estos agregados se detectaron en regiones clave de la EP y, en 1997, se determinó que el principal componente de los cuerpos de Lewy era la proteína  $\alpha$ -sinucleína ( $\alpha$ Syn) (Spillantini et al., 1997, 1998). Estas observaciones llevaron a que, en 2003, Braak postulara su hipótesis de transmisión de  $\alpha$ Syn en pacientes con EP esporádico. Según esta hipótesis, la acumulación y transmisión de  $\alpha$ Syn se desencadenaría, tras la infección de un agente patógeno, desde el intestino o bulbo olfatorio y avanzaría hasta alcanzar el sistema nervioso central, a través de neuronas conectadas sinápticamente (Braak et al., 2003). Esta transmisión secuencial de cuerpos de Lewy se correlacionaría con la aparición de los distintos síntomas, habiendo seis estadios que explicarían la progresión de la enfermedad (Figura 1). Congruente con este modelo de transmisión,  $\alpha$ Syn se encontró, tras décadas, en cuerpos de Lewy de neuronas trasplantadas en pacientes con EP (Kordower et al., 2008; Li et al., 2008), lo cual llevó a atribuir a  $\alpha$ Syn un comportamiento de propagación priónica (Olanow and Prusiner, 2009). Un

estudio reciente abordó la cuestión del inicio de la transmisión patológica de  $\alpha$ Syn, e identificó dos tipos de EP en base al patrón de progresión de la enfermedad. En el llamado tipo *body-first* la disfunción comienza a nivel intestinal, en línea con la hipótesis de Braak; en el *brain-first*, en cambio, la disfunción comienza a nivel cerebral, en la vía nigroestriada, y termina afectando al sistema nervioso periférico autónomo (Horsager et al., 2020).



**Figura 1. Correlación de síntomas y neuropatología de la EP según el modelo de Braak.** El modelo propone que la transmisión se desencadene en el bulbo olfatorio o en el nervio vago (indicados en amarillo). Aparecen coloreados los órganos donde se han reportado acúmulos de  $\alpha$ Syn y por donde podría avanzar la transmisión procedente del intestino por el nervio vago. El avance de la patología con cuerpos de Lewy se muestra en distintas tonalidades de violeta, correspondientes a los estadios del modelo de Braak. En recuadros coloreados por estadios se muestran algunos de los síntomas más comunes, junto a sus sustratos anatómicos. En círculos aparecen regiones con pérdida neuronal en el sistema nervioso central. DMV: núcleo motor dorsal del nervio vago; LC: locus coeruleus; RNC: núcleo caudal del rafe; RNr: núcleo rostral del rafe; SNC: *substantia nigra pars compacta*. Imagen creada con BioRender.

Aunque el modelo de Braak todavía genera controversias al no cumplirse en todos los casos, sentó los precedentes para los posteriores estudios sobre la

transmisión célula-célula de  $\alpha$ Syn, además de proponer una serie de características compartidas por las neuronas afectadas que les conferirían una vulnerabilidad selectiva, como tener axones de gran tamaño no mielinizados, un cierto patrón de actividad neuronal o elevados niveles de estrés oxidativo. Este sería el caso de poblaciones neuronales como las neuronas del *locus coeruleus*, del núcleo motor dorsal del nervio vago, de los núcleos del rafe o las neuronas colinérgicas del núcleo pedunculopontino, todas ellas poblaciones neuronales afectadas en la EP (Surmeier et al., 2017).

### 1.3. Etiología

#### 1.3.1. Factores genéticos

La EP es una enfermedad mayoritariamente esporádica, es decir, de aparición espontánea sin una causa genética conocida. Sin embargo, entre el 5 % y 10 % de los casos son familiares y han permitido identificar genes clave para comprender la fisiopatología subyacente en los últimos 20 años (Poewe et al., 2017). Se han identificado más de 20 loci y 19 genes causantes de EP, aunque los genes asociados a ciertos loci *PARK* no han sido identificados todavía. Por otro lado, algunos de los genes considerados como causantes de EP (*UCHL1*, *GIGYF2*, *EIF4G1*, *HTRA2*, *TMEM230*, *DNAJC13* y *CHCHD2*) están aún en debate por la novedad o falta de reproducibilidad del estudio que los identificó como tal (Del Rey et al., 2018; Blauwendraat et al., 2020) (Tabla 1).

Aunque la EP familiar suele resultar en formas de aparición más temprana y de progresión más rápida en comparación a la EP esporádica, se ha visto que existe un solapamiento a nivel genético entre ambas. De hecho, algunas de las variantes asociadas a formas familiares de EP se han encontrado en pacientes con EP esporádica, siendo este el caso de ciertas variantes en el gen *SNCA*, que codifica la proteína  $\alpha$ Syn y es la primera causa descrita de formas

familiares, y el gen *LRRK2*, que constituye la causa genética que explica mayor número de casos (Redenšek et al., 2017).

Tabla 1. Principales determinantes genéticos de la EP.

Locus	Gen	Herencia	Inicio	Localización	Nombre y funciones de la proteína
<i>PARK1/4</i>	<i>SNCA</i>	AD, Riesgo	Temprano	4q21.3-q22	$\alpha$ -sinucleína: regulación de vesículas y liberación de neurotransmisores
<i>PARK2</i>	<i>PRKN</i>	AR	Temprano	6q25.2-q27	Parkina: ubiquitina-ligasa E3 implicada en control de calidad y recambio de mitocondrias por mitofagia
<i>PARK6</i>	<i>PINK1</i>	AR	Temprano	1p36.12	PINK1: control de calidad y recambio de mitocondrias por mitofagia
<i>PARK7</i>	<i>DJ-1</i>	AR	Temprano	1p36.23	DJ-1: cisteína proteasa, chaperona, protección ante estrés oxidativo y control de calidad mitocondrial
<i>PARK8</i>	<i>LRRK2</i>	AD, Riesgo	Tardío	12q12	LRRK2: tráfico vesicular intracelular, autofagia y homeostasis de orgánulos (aparato de Golgi, endosomas y lisosomas)
<i>PARK9</i>	<i>ATP13A2</i>	AR	Temprano	1p36	ATP13A2: ATPasa lisosomal implicada en autofagia y homeostasis de cationes
<i>PARK14</i>	<i>PLA2G6</i>	AR	Temprano	22q13.1	PLA2G6: fosfolipasa relacionada con homeostasis de membrana, homeostasis mitocondrial y metabolismo de ácidos grasos
<i>PARK15</i>	<i>FBXO7</i>	AR	Temprano	22q12.3	FBXO7: subunidad de complejo ubiquitina-ligasa E3 implicada en mitofagia, regulación mitocondrial y control de proteasoma
<i>PARK17</i>	<i>VPS35</i>	AD	Tardío	16q12	VPS35: componente del complejo de proteínas del retrómero con implicaciones en función autofágica y lisosomal
<i>PARK19</i>	<i>DNAJC6</i>	AR	Temprano	1p31.3	DNAJC6: co-chaperona necesaria para el desensamblaje de vesículas recubiertas de clatrina
<i>PARK20</i>	<i>SYNJ1</i>	AR	Temprano	21q22.11	Sinaptotjanina-1: inositol-fosfatasa implicada en endocitosis de vesículas sinápticas y tráfico de endosomas
<i>PARK23</i>	<i>VPS13C</i>	AR	Temprano	15q22.2	VPS13C: homeostasis mitocondrial, mitofagia y autofagia de retículo endoplásmico
-	<i>GBA</i>	AD, Riesgo*	-	1q22	Glucocerebrosidasa: enzima lisosomal
-	<i>POLG</i>	AD	Temprano	15q26.1	Polimerasa de ADN mitocondrial gamma

AD: herencia autosómica dominante; AR: herencia autosómica recesiva. \*Penetrancia incompleta (información extraída de Hunn et al., 2015; Del Rey et al., 2018; Blauwendraat et al., 2020).

Así pues, más que de EP monogénica o familiar y esporádica, hablaríamos de una enfermedad con múltiples contribuyentes genéticos, de forma que existen por un lado variantes infrecuentes de alta penetrancia (causando lo que llamaríamos EP monogénica) y, por otro, factores genéticos que incrementarían el riesgo a desarrollar la enfermedad, sin ser necesarios o suficientes por sí solos para causarla. A estas contribuciones genéticas habría que sumarles, además, los factores ambientales, que podrían desplazar la balanza hacia padecer o no la EP (Blauwendraat et al., 2020).

Los genes causantes o determinantes de riesgo en la EP codifican proteínas que participan en procesos celulares *a priori* muy dispares. Sin embargo, podríamos agrupar muchos de ellos en tres categorías celulares, que ponen de manifiesto su relevancia en la enfermedad: (i) procesos de tráfico de membranas (vía endosomal y/o dinámica vesicular presináptica), (ii) procesos de degradación y (iii) homeostasis mitocondrial (Smolders and Van Broeckhoven, 2020) (Tabla 1).

### 1.3.2. Factores ambientales

El principal factor de riesgo para la EP es la edad, aunque existen otros factores que juegan un papel en su etiología. El hecho de que exista un mayor número de hombres afectados que de mujeres sugiere que puede haber algún tipo de influencia hormonal en la predisposición a la EP. A raíz de ello, las mujeres están infrarrepresentadas en los ensayos clínicos a pesar de sufrir más discinesias y fluctuaciones motoras. Los ambientes rurales, debido a la exposición incrementada a herbicidas y pesticidas, han demostrado en estudios epidemiológicos producir un mayor riesgo de EP, así como la dieta, las infecciones virales o la exposición a metales pesados (Bloem et al., 2021).

Por otro lado, entre los factores que reducen el riesgo de padecer EP se encuentran el consumo de tabaco y café, el uso de fármacos antiinflamatorios y la actividad física, aunque no está del todo claro si estas asociaciones son causales o están relacionadas con otros factores como los niveles de dopamina (Kalia and Lang, 2015; Bloem et al., 2021).

## 1.4. Control del movimiento

### 1.4.1. El circuito motor de los ganglios basales

Los síntomas motores más característicos de la EP tienen su origen en una disfunción del circuito encargado del control del movimiento en el cerebro. Este circuito está formado por los ganglios basales, un conjunto de estructuras subcorticales interconectadas que engloban al estriado y al globo pálido interno (GPi) y externo (GPe), aunque actualmente pueden referirse también a los núcleos relacionados: el núcleo subtalámico, la SNc y la *substantia nigra pars reticulata* (SNr) (Figura 2). Asociados originariamente con el control motor, hoy se sabe que estos ganglios pueden subdividirse en dominios implicados en tres circuitos paralelos: el circuito motor, el circuito asociativo (cognitivo) y el circuito límbico (emocional) (Obeso et al., 2014).

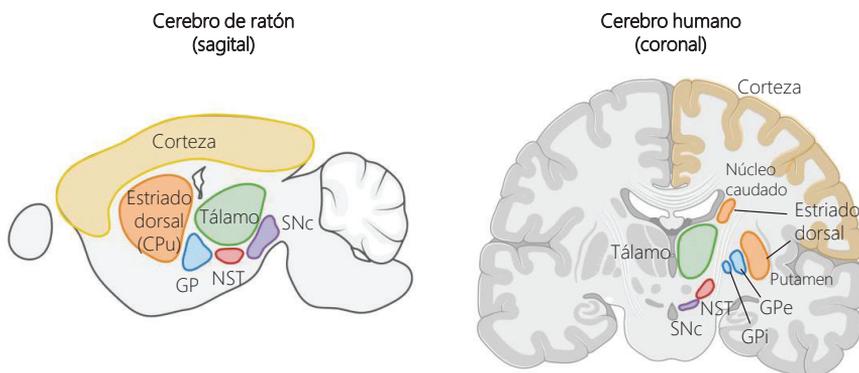


Figura 2. Localización de los ganglios basales en el cerebro murino y humano. CPU: núcleo caudado y putamen; GP: globo pálido; GPe: globo pálido externo; GPi: globo pálido interno; NST: núcleo subtalámico; SNc: *substantia nigra pars compacta*. Imagen creada con BioRender.

El modelo clásico del circuito motor de los ganglios basales se describió a finales de 1980 y principios de 1990, y contribuyó en gran medida a la comprensión del papel de la dopamina en el control motor. Este modelo subdivide al circuito motor en las vías directa e indirecta del movimiento (McGregor and Nelson, 2019) (Figura 3A):

- En la vía directa, las neuronas dopaminérgicas de la SNc proyectan sus axones al estriado dorsal, donde hacen sinapsis con las llamadas neuronas espinosas medianas (MSN) que expresan receptores de dopamina D1 (MSND<sub>1</sub>). La activación de estas neuronas hace que el GPi reduzca su inhibición sobre el tálamo, que de este modo podrá activar a la corteza y promover el movimiento.
- En la vía indirecta, las neuronas dopaminérgicas de la SNc proyectan sus axones al estriado dorsal, pero en este caso hacen sinapsis con las MSN con receptores de dopamina D2 (MSND<sub>2</sub>). La vía indirecta generaría una activación de los ganglios basales, a través del GPe y el núcleo subtalámico, que termina inhibiendo al tálamo y suprimiendo el movimiento. Sin embargo, a diferencia de la vía directa, la dopamina tendría un efecto inhibitorio sobre las MSND<sub>2</sub>, de forma que se inactivaría la vía indirecta y se activaría la directa, con un resultado neto de promoción del movimiento.

En pacientes con EP los síntomas motores aparecen cuando se alcanza un umbral, en el cual hay una pérdida del 80 % de axones dopaminérgicos en el estriado y del 50 % de somas dopaminérgicos en la SNc (Kurowska et al., 2016). En estos pacientes la vía directa del movimiento se hipoactiva, mientras que la indirecta está hiperactivada. En esta situación, el GPe se encuentra sobreinhibido, mientras el núcleo subtalámico y el GPi se sobreactivan

causando una inhibición talamocortical y, en última instancia, del movimiento (Obeso et al., 2014) (Figura 3B).

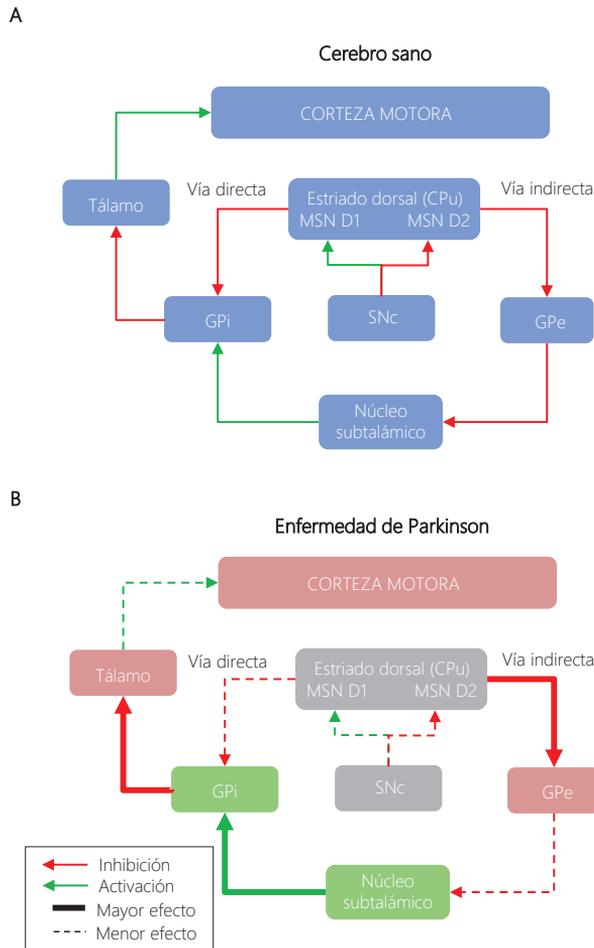


Figura 3. Esquema simplificado de las vías directa e indirecta del movimiento en un cerebro sano (A) y en un cerebro con EP (B). El funcionamiento correcto de las vías directa e indirecta en una persona sana permite el equilibrio entre ambas y un control fino del movimiento, para posibilitar los movimientos voluntarios e impedir los involuntarios. En la EP, la muerte de neuronas en la *substantia nigra* altera ambas vías, al perderse la entrada dopaminérgica necesaria para la regulación de las neuronas espinosas medianas del estriado. Esto causa una serie de cambios en los circuitos de estas vías que resultan en una inhibición neta del movimiento, impidiendo que los pacientes puedan iniciar movimientos a voluntad. CPU: núcleo caudado y putamen; GPe: globo pálido externo; GPi: globo pálido interno; MSN D1: neuronas espinosas medianas con receptores de dopamina D1; MSN D2: neuronas espinosas medianas con receptores de dopamina D2; SNc: *substantia nigra pars compacta*.

#### 1.4.2. *La vía nigroestriada*

Aunque en este apartado nos centraremos en la vía nigroestriada, las proyecciones de las neuronas dopaminérgicas conforman cuatro rutas importantes en el sistema nervioso y endocrino: la ruta mesocortical, la ruta mesolímbica, la ruta tuberoinfundibular y la ruta nigroestriada. Las dos primeras, que se originan en las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral (ATV), están implicadas en el control ejecutivo y el sistema de recompensa respectivamente. La ruta tuberoinfundibular, en cambio, se origina en el núcleo arcuato del hipotálamo y controla la liberación de prolactina desde la neurohipófisis.

La vía nigroestriada constituye el primer paso hacia las vías directa e indirecta del movimiento. Está compuesta por las neuronas dopaminérgicas cuyo cuerpo neuronal o soma, en la SNc, proyecta sus axones al estriado. Detallaremos, a continuación, algunas de las singularidades de las regiones cerebrales unidas por dicha ruta por su relevancia en esta tesis:

##### *La substantia nigra pars compacta:*

La SNc es una región del mesencéfalo ventral (vM) fácilmente identificable en el cerebro humano, ya que las neuronas dopaminérgicas que la componen contienen neuromelanina, un pigmento precursor de la dopamina. Este pigmento aporta a la región una coloración oscura característica por la cual recibe su nombre, aunque, curiosamente, los roedores carecen de dicho pigmento en su SNc, lo que ha suscitado distintas investigaciones fisiopatológicas al respecto (Vila, 2019).

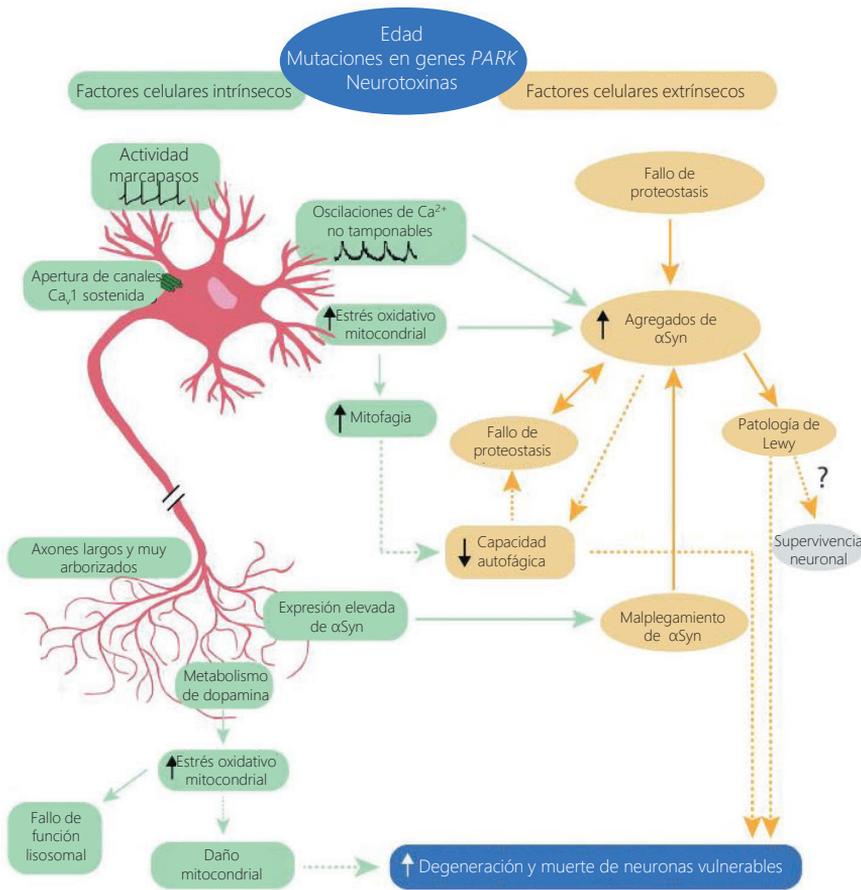
En el vM existen tres grupos de neuronas dopaminérgicas funcional y anatómicamente distinguibles: los grupos A8, A9 y A10. Las neuronas del

grupo A9 son las que dan lugar a la SNc y constituyen la vía nigroestriada, mientras que las A10 se encuentran en el ATV y las A8 en el campo retrorubral (Arenas et al., 2015). Las neuronas dopaminérgicas de la SNc tienen una serie de características que las pueden hacer más susceptibles que otras poblaciones neuronales *a priori* similares, como las neuronas dopaminérgicas del ATV, las cuales resultan relativamente indemnes (Figura 4). Las neuronas dopaminérgicas de la SNc presentan una actividad de tipo marcapasos muy característica responsable del tono dopaminérgico, que consiste en disparos tónicos interrumpidos por disparos de actividad desencadenados en respuesta a estímulos. Este nivel de actividad genera una gran demanda energética en estas neuronas, con los elevados niveles de estrés oxidativo que ello conlleva (Guzman et al., 2009, 2010). Además, generan grandes fluctuaciones de calcio con una capacidad relativamente baja de tamponar este ion, a diferencia de las neuronas del ATV, lo que puede desencadenar programas de muerte celular, como la apoptosis (Surmeier et al., 2017). A nivel de sistema nervioso central constituyen una población neuronal con axones especialmente largos, no mielinizados y, sobre todo, muy arborizados (Alegre-Abarrategui et al., 2019; Gonzalez-Rodriguez et al., 2020). En primates se estima que una sola neurona dopaminérgica puede establecer hasta un millón de sinapsis y, en rata, entre 100.000 y 250.000 (Bolam and Pissadaki, 2012; Lanciego et al., 2012).

#### El estriado:

El estriado constituye la estructura subcortical más grande del cerebro humano. Está compuesto por dos tipos de neuronas: las neuronas de proyección y las interneuronas. Las neuronas de proyección, las MSN, constituyen la gran mayoría de la población neuronal estriatal (90 %) y se

caracterizan por la presencia de espinas dendríticas, unas estructuras postsinápticas especializadas.



**Figura 4. Factores intrínsecos y extrínsecos que pueden determinar la vulnerabilidad selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNc en la EP.** Entre los factores intrínsecos (verde) podemos encontrar el tipo de actividad de estas neuronas, necesario para el tono dopaminérgico, que conlleva grandes oscilaciones de  $Ca^{2+}$ , una elevada demanda energética, oxidación de dopamina, estrés oxidativo y una mayor necesidad de eliminación de mitocondrias dañadas. También se plantea que las poblaciones vulnerables tengan basalmente mayores niveles de  $\alpha Syn$  que las neuronas no afectadas. Si a estos factores les sumamos otros extrínsecos (amarillo), como los agregados de  $\alpha Syn$  por mutaciones o multiplicaciones del gen, sobrecargamos los procesos anteriores y podemos llegar a la muerte neuronal. Líneas sólidas: nexos establecidos. Líneas punteadas: nexos que requieren más investigación. Imagen adaptada de González-Rodríguez et al., 2020.

Todas las MSN inhiben a sus neuronas receptoras del globo pálido, ya que utilizan ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) como neurotransmisor (Lanciego et al., 2012). Estas neuronas pueden subdividirse en función del tipo de receptor dopaminérgico que expresan (D1 o D2) y proyectar al GPi o GPe como parte de las vías directa e indirecta del movimiento respectivamente. Las MSN<sub>D1</sub> y MSN<sub>D2</sub> también se caracterizan por la expresión diferencial de neuropéptidos, ya que las primeras expresan sustancia P y dinorfina, mientras que las MSN<sub>D2</sub> expresan encefalina (Surmeier et al., 1998). Las interneuronas del estriado, por su parte, también pueden clasificarse en base a características neuroquímicas, siendo las más abundantes las interneuronas colinérgicas, también denominadas interneuronas tónicamente activas por su patrón de actividad. Otro tipo de interneuronas que son controladas por la entrada dopaminérgica son las *fast-spiking interneurons*, interneuronas GABAérgicas que se caracterizan por expresar parvalbúmina, aunque recientemente se ha visto que no constituyen un grupo homogéneo (Muñoz-Manchado et al., 2018). Finalmente, existen dos tipos adicionales de interneuronas GABAérgicas, las que expresan calretinina y las nitrérgicas (Lanciego et al., 2012).

El estriado consta de dos regiones funcionales principales: el estriado dorsal y el estriado ventral. El estriado dorsal es la región que participa en el control motor y se subdivide, a su vez, en los núcleos caudado y putamen; la región ventral, en cambio, contiene el núcleo accumbens y participa en procesos del sistema límbico. Desde un punto de vista inmunohistoquímico, el estriado también puede subdividirse en dos regiones discretas: la matriz y los estriosomas o "parches". La matriz tiene una especial relevancia en las vías del movimiento, puesto que contiene las MSN que inervan al GPi y GPe, y es donde se reciben las aferencias de la SNc (Lanciego et al., 2012).

## 2. $\alpha$ -SINUCLEÍNA

### 2.1. $\alpha$ -Sinucleína, enfermedad de Parkinson y otras sinucleinopatías

El gen *SNCA*, localizado en el brazo largo del cromosoma 4 (4q22.1), codifica la proteína  $\alpha$ Syn. Esta proteína está regulada durante el desarrollo y, si bien la expresión de su mRNA alcanza su máximo en las primeras semanas postnatales en roedores y luego decrece, los niveles proteínicos se mantienen elevados durante toda la vida adulta (Petersen et al., 1999). Tanto en roedores como en humanos se localiza en el terminal presináptico en las primeras semanas de vida (Bayer et al., 1999; Petersen et al., 1999) pero, curiosamente, es de las últimas proteínas en alcanzar este terminal, por lo que no sería necesaria para su correcto desarrollo temprano (Withers et al., 1997). Las funciones que se le atribuyen (página 28) y su presencia exclusiva en vertebrados indican que es necesaria para funciones complejas, aunque no esenciales, de los terminales presinápticos (Burré, 2015).

La proteína  $\alpha$ Syn fue descubierta en neuronas colinérgicas de *Torpedo californica*, localizada principalmente en terminales sinápticos y parcialmente en el núcleo, de ahí su nombre (Maroteaux et al., 1988). Se trata de una proteína de 140 aminoácidos enriquecida en regiones cerebrales como el neocórtex, el hipocampo, el bulbo olfatorio, el estriado, el tálamo y el cerebelo (Iwai et al., 1995). También se expresa, aunque en menor medida, en otros tejidos, como intestino o corazón, y en eritrocitos (Alegre-Abarrategui et al., 2019). A nivel cerebral, esta proteína es tan abundante que constituye el 1 % del total de proteínas citosólicas (Stefanis, 2012) y se ha determinado que tiene una expresión diferencial en distintos tipos de neuronas, lo cual podría jugar un papel en la vulnerabilidad selectiva de la EP. Taguchi y colaboradores observaron que, a nivel de soma,  $\alpha$ Syn se encuentra muy enriquecida en tipos

neuronales afectados en EP, como el núcleo dorsal del nervio vago, el bulbo olfatorio o la SNc; sin embargo, a nivel sináptico se expresa ampliamente en sinapsis glutamatérgicas y, de forma minoritaria, en sinapsis GABAérgicas, con excepción de las MSN que sí la expresan a nivel sináptico quizás debido a su naturaleza de proyección y a que, además de utilizar GABA, pueden utilizar también ciertos neuropéptidos como neurotransmisores (Taguchi et al., 2016, 2019).

El primer vínculo entre la proteína  $\alpha$ Syn y la EP se estableció en 1997, cuando Polymeropoulos y colaboradores publicaron la asociación del cambio aminoacídico A53T con esta enfermedad en una serie de casos familiares de origen griego e italiano (Polymeropoulos et al., 1997). Se trataba de una EP con una herencia autosómica dominante de aparición temprana, más concretamente, en la cuarta década de la vida. Este hallazgo, que inicialmente fue acogido con recelo ya que  $\alpha$ Syn contiene una treonina en la posición 53 en roedores, fue seguido por la identificación de otras dos mutaciones como causantes de EP autosómica dominante: la A30P, identificada en familias alemanas, y la E46K, identificada en familias españolas y asociada a un fenotipo de demencia con cuerpos de Lewy (Krüger et al., 1998; Zarranz et al., 2004). En otros estudios se identificaron distintas familias que albergaban duplicaciones y triplicaciones del gen *SNCA* (Singleton et al., 2003; Chartier-Harlin et al., 2004; Ibáñez et al., 2004) con un efecto dosis-dependiente, ya que la triplicación resultaba en una aparición más temprana y peor progresión (Fuchs et al., 2007).

A raíz del descubrimiento de Polymeropoulos et al. (1997), la investigación en EP dio un vuelco hacia la detección de la proteína  $\alpha$ Syn en el cerebro de pacientes, identificándose así como el principal componente de los cuerpos de

Lewy, que se localizaban tanto en el soma como en las neuritas de las neuronas afectadas (denominándose cuerpos y neuritas de Lewy, respectivamente). Estos acúmulos, además, no se limitaban a pacientes con mutaciones en el gen *SNCA*, sino que se encontraron también en pacientes con EP idiopático, constituyendo de este modo el segundo gran hito que vincularía  $\alpha$ Syn con la EP (Spillantini et al., 1997, 1998; Baba et al., 1998).

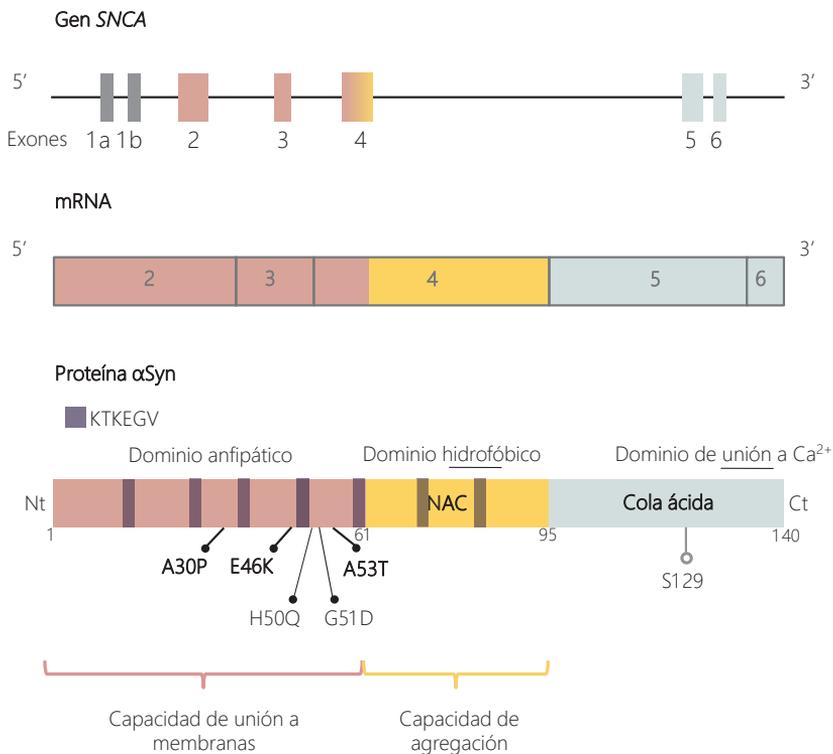
Sin embargo,  $\alpha$ Syn no solo se ha relacionado con la EP sino que también está implicada en patologías como la demencia con cuerpos de Lewy o la atrofia multisistémica que conforman, junto con otras, un grupo de enfermedades conocidas como sinucleinopatías. Estas patologías tienen como nexo los acúmulos de  $\alpha$ Syn, pero esta proteína tiene una distribución específica que define a cada una de ellas. Así por ejemplo, en el caso de la atrofia multisistémica, las inclusiones de  $\alpha$ Syn se ubican principalmente en la oligodendroglía, mientras que en la EP la encontramos en forma de cuerpos y neuritas de Lewy en determinadas poblaciones neuronales (Auluck et al., 2010).

## 2.2. Estructura y conformaciones

$\alpha$ Syn forma parte de la familia de las sinucleínas, a la que también pertenecen  $\beta$ -sinucleína ( $\beta$ Syn) y  $\gamma$ -sinucleína ( $\gamma$ Syn) (Lavedan, 1998).  $\beta$ Syn llega a compartir un 90 % de la secuencia amino o N-terminal (incluyendo dominio central) con  $\alpha$ Syn, y un 33 % de la secuencia carboxilo o C-terminal;  $\gamma$ Syn, en cambio, es más divergente, ya que comparte un 78 % y un 6 % de estas secuencias respectivamente (Auluck et al., 2010). Las tres sinucleínas son muy abundantes en el cerebro y se caracterizan por tener siete repeticiones imperfectas de 11 aminoácidos (conteniendo la secuencia consenso KTKEGV) conservadas y presentes exclusivamente en mamíferos. Esta secuencia se

encuentra repetida en su dominio amino terminal y puede adquirir una estructura helicoidal (Bendor et al., 2013).

$\alpha$ Syn se encuentra desplegada en su forma nativa y monomérica. Su estructura, sin embargo, explica las conformaciones que puede llegar a adquirir en distintas condiciones (Figura 5):

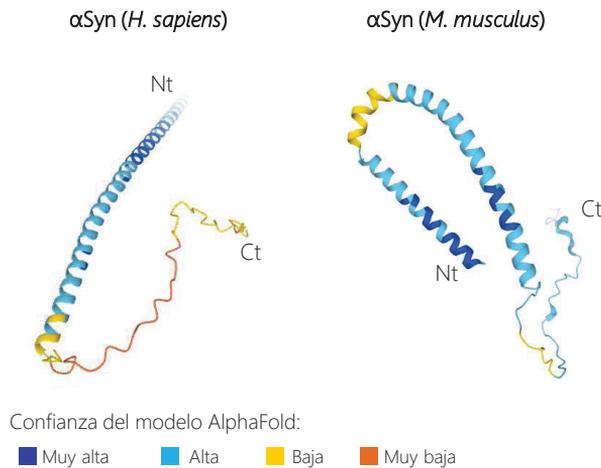


**Figura 5. Estructura del gen *SNCA*, su mRNA y la proteína  $\alpha$ Syn.** Se muestran distintos colores correspondientes a los dominios proteínicos finales: dominio anfipático (rosa), núcleo central hidrofóbico (amarillo) y cola ácida (gris). El gen y el mRNA tienen marcados los exones, que están coloreados según el dominio proteínico del que formarán parte. En la proteína se indican las repeticiones KTKEGV (morado), las principales mutaciones (●) y la fosforilación en el residuo de serina de la posición 129 (○), una de las modificaciones postraduccionales más relevantes.

1. La parte amino terminal (residuos 1-60) es la que confiere a la proteína su capacidad de unión a membranas, que adopta para ello una estructura de hélice  $\alpha$  y posibilita la interacción con lípidos a través de las lisinas opuestas de la hélice (Davidson et al., 1998; Bendor et al., 2013).
2. El núcleo central hidrofóbico (residuos 61-95) o componente no amiloide (NAC), designación que se le dio a raíz de que se encontrara junto al  $\beta$ -amiloide en las placas seniles, características de la enfermedad de Alzheimer (Uéda et al., 1993). Este dominio difiere entre  $\alpha$ Syn y  $\beta$ Syn, albergando la primera una secuencia de 12 aminoácidos (residuos 71-82) altamente hidrofóbicos que le permite adquirir una estructura de hojas  $\beta$  y, por tanto, la capacidad de agregación (Giasson et al., 2001).
3. El extremo carboxilo (residuos 96-140) contiene residuos cargados negativamente y tiende a no adquirir estructura definida. Se ha propuesto que esta región actúa como dominio de interacción de  $\alpha$ Syn con otras proteínas y de modulación de la interacción con vesículas sinápticas, a través de su unión a calcio (Eliezer et al., 2001; Burré et al., 2010; Lautenschläger et al., 2018a).

Las principales mutaciones que se han asociado a casos de EP familiar (A30P, E46K y A53T) afectan al dominio anfipático de unión a membranas, aunque el impacto de cada una de ellas sobre la proteína es distinto (Auluck et al., 2010). La mutación A30P disminuye la interacción con membranas, al quebrar la primera hélice  $\alpha$  (Yonetani et al., 2009), y estaría más asociada a un fenotipo de pérdida de función (Diao et al., 2013), a diferencia de las otras dos

mutaciones importantes que promoverían la interacción con membranas. La mutación E46K genera un cambio de carga en el aminoácido que aumenta la afinidad por fosfolípidos y a ello añade, además, la exposición de zonas hidrofóbicas promoviendo interacciones con otras moléculas de  $\alpha$ Syn y, por tanto, la agregación (Perlmutter et al., 2009; Rospigliosi et al., 2009). Finalmente, la mutación A53T expande el núcleo hidrofóbico, al interrumpir una estructura helicoidal y promover la adquisición de una estructura en hojas  $\beta$ , confiriendo así una ganancia de función tóxica a la proteína (Giasson et al., 1999; Biere et al., 2000).



**Figura 6. Estructura tridimensional de la proteína  $\alpha$ Syn en humano y ratón.** La proteína  $\alpha$ Syn murina y humana solo difieren en siete residuos. Los dominios anfipático e hidrofóbico pueden adquirir una estructura en hélice alfa, mientras que el dominio carboxi-terminal carece de estructura definida. Nt: extremo amino-terminal; Ct: extremo carboxi-terminal. Imágenes extraídas de *AlphaFold Protein Structure Database*.

$\alpha$ Syn también está sujeta a diversas modificaciones postraduccionales que son relevantes a nivel fisiopatológico. Esta proteína puede sufrir fosforilación, oxidación, nitrosilación, glicación o glucosilación, pero la principal modificación postraduccionales de  $\alpha$ Syn es la fosforilación en el residuo S129. Esta fosforilación constituye menos del 4 % de la  $\alpha$ Syn en condiciones fisiológicas,

sin embargo, en los cuerpos de Lewy, dicha modificación constituye el 90 % de  $\alpha$ Syn presente en estos acúmulos. La oxidación también se relaciona con la oligomerización de la proteína, lo cual adquiere mayor importancia en caso de oxidación de la dopamina y de estrés oxidativo, eventos implicados reiteradamente en la fisiopatología de la EP (Stefanis, 2012).

Ante lípidos y membranas la proteína adopta una estructura en hélices  $\alpha$  gracias a su dominio N-terminal (Figura 6), lo que favorece su afinidad por las superficies fosfolipídicas (Bendor et al., 2013). Aunque  $\alpha$ Syn tiene preferencia por membranas curvadas, propias de vesículas de tamaño reducido (Davidson et al., 1998), su estructura helicoidal puede adaptarse. En caso de interacción con vesículas grandes (100 nm), adquiere una estructura de hélice extendida (Georgieva et al., 2008), pero en caso de vesículas más pequeñas adoptaría una estructura en hélice "rota" (Chandra et al., 2003) (Figura 7). Se ha visto que la unión a membranas podría constituir una forma de prevenir su agregación, ya que las estructuras tóxicas tendrían su origen en las formas citosólicas desplegadas (Bendor et al., 2013; Burré et al., 2015); sin embargo, todavía existe debate al respecto ya que también se ha propuesto que la interacción con lípidos actúe como desencadenante del proceso de agregación (Lee et al., 2002).

Aunque los oligómeros se han asociado a estructuras tóxicas previas a la formación de acúmulos intracelulares, en la actualidad se debate la posibilidad de que  $\alpha$ Syn exista fisiológicamente no solo como monómero desplegado, sino también como forma tetramérica helicoidal estable (Bartels et al., 2011; Wang et al., 2011; Nuber et al., 2018) (Figura 7). Otros multímeros se han observado en formas de  $\alpha$ Syn unidas a membranas y serían necesarias para su correcto funcionamiento en el terminal presináptico (Burré et al., 2014).

Los oligómeros tóxicos, en cambio, se forman cuando la proteína adopta una estructura en hojas  $\beta$  que promueve su agregación, la formación de fibras insolubles y, en última instancia, de cuerpos de Lewy (Conway et al., 1998; El-Agnaf et al., 1998) (Figura 7).

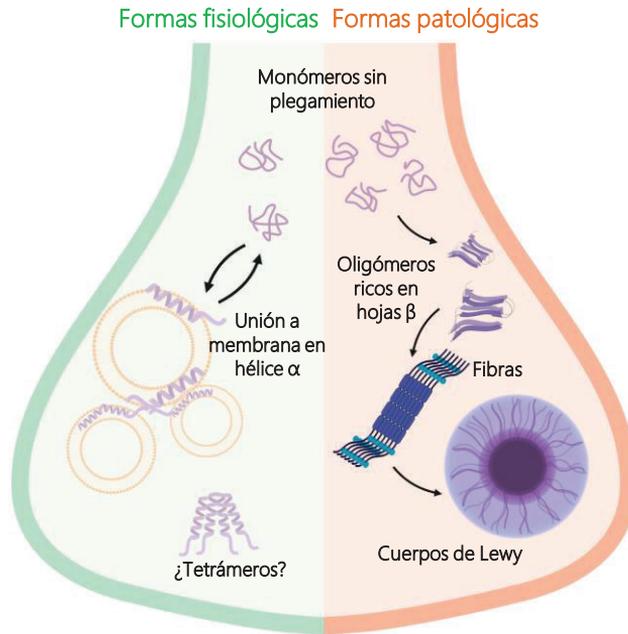
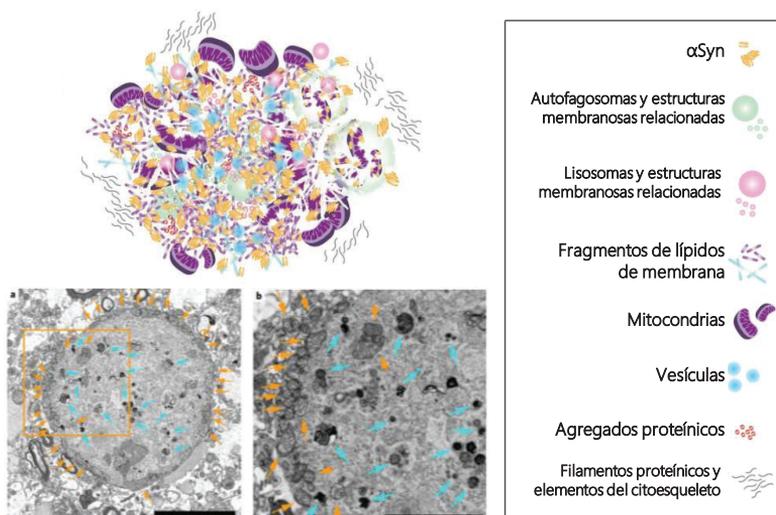


Figura 7. Conformaciones fisiológicas y patológicas de  $\alpha$ Syn. En la parte izquierda aparecen las conformaciones fisiológicas que puede adquirir  $\alpha$ Syn; a la derecha, las formas patológicas y el proceso de formación de las mismas. Imagen creada con BioRender.

### 2.2.1. Cuerpos de Lewy

El hecho de que los cuerpos de Lewy se encontraran en pacientes con EP idiopática (Baba et al., 1998) atrajo la atención sobre  $\alpha$ Syn y sobre estas estructuras, situándolas en el centro de la investigación de la EP. Aunque podría considerarse que los cuerpos de Lewy constituyen el último escalafón en el proceso de agregación y fibrilación de  $\alpha$ Syn, hay que tener en cuenta que los cuerpos de Lewy contienen más de 300 proteínas, de las cuales 90 han sido confirmadas en estudios *postmortem*. Se trata de proteínas relacionadas en muchos casos con las rutas degradativas celulares,

chaperonas moleculares y proteínas de daño axonal (Wakabayashi et al., 2013). En un estudio reciente, utilizando técnicas de microscopía correlativa óptica-electrónica, se ha determinado que los cuerpos de Lewy también contienen múltiples estructuras membranosas, incluyendo vesículas y restos de orgánulos, como mitocondrias y lisosomas (Shahmoradian et al., 2019) (Figura 8). Todo ello parece ir en línea con lo expuesto anteriormente sobre las rutas celulares de los principales contribuyentes genéticos a la EP: (i) procesos de tráfico de membranas (vía endosomal y/o dinámica vesicular presináptica), (ii) procesos de degradación y (iii) homeostasis mitocondrial (página 10). De hecho, otras enfermedades neurodegenerativas monogénicas, no consideradas sinucleinopatías, cursan también con estos agregados proteínicos. Se trata de enfermedades mitocondriales, enfermedades de depósito lisosomal y enfermedades con acumulación de hierro que, de este modo, nos indican que estas rutas celulares están fallando y desencadenando la formación de los cuerpos de Lewy (Erskine et al., 2021).



**Figura 8. Composición de los cuerpos de Lewy.** Modelo esquematizado de la composición de los cuerpos de Lewy (parte superior y leyenda) e imágenes reales de estas inclusiones (parte inferior), obtenidas mediante la técnica *Serial block-face scanning electron microscopy*. Puede observarse un anillo de mitocondrias (flechas naranjas) y lisosomas en la parte central (flechas azules). Imágenes adaptadas de Shahmoradian et al., 2019.

### 2.3. Funciones descritas

En 1995 se atribuyó a  $\alpha$ Syn un primer papel en plasticidad sináptica. George y colaboradores observan cambios en la expresión de "sinelfina" (homóloga de  $\alpha$ Syn) en regiones concretas del cerebro de *Taeniopygia guttata* o diamante mandarín. Dichas regiones eran los núcleos del control del canto en estas aves, que mostraban una expresión reducida de esta proteína durante el aprendizaje de nuevas canciones (George et al., 1995).

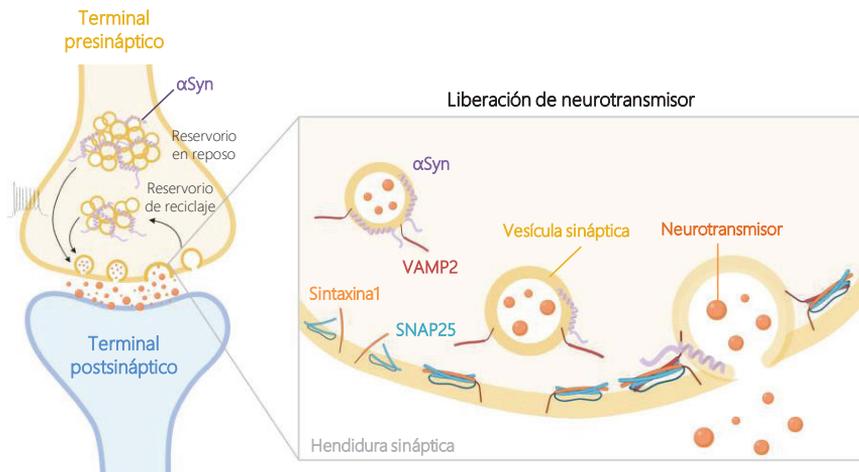
$\alpha$ Syn fue descubierta en terminales sinápticos (Maroteaux et al., 1988), dando pistas sobre su posible función que, sin embargo, sigue sin comprenderse en profundidad en la actualidad. Las sinapsis son zonas de unión y comunicación entre una neurona presináptica y una célula postsináptica (que puede ser otra neurona, una célula muscular o una célula secretora glandular, por ejemplo). Estas zonas permiten establecer un flujo de información cuya base son los neurotransmisores, moléculas mensajeras que desencadenan una serie de cambios en las neuronas o células receptoras. Las sinapsis se componen de tres estructuras básicas: el terminal presináptico, la hendidura sináptica y el terminal postsináptico. Los terminales presinápticos son estructuras neuronales especializadas en la liberación de neurotransmisores en respuesta a un potencial de acción (Südhof, 2012). Estos neurotransmisores se sintetizan y empaquetan en vesículas sinápticas, que conforman reservorios identificables en base a ciertos parámetros, como la distancia a la membrana presináptica o el número de vesículas que contienen (Alabi and Tsien, 2012) (Figura 9).

La llegada del potencial de acción a la neurona provoca la apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , permitiendo la entrada de este ion en el terminal. En este momento actúa la maquinaria de exocitosis del neurotransmisor: el sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  sinaptotagmina y el complejo de proteínas SNARE, que incluye las proteínas

sinaptobrevina o VAMP, localizada en la membrana vesicular, y SNAP-25 y syntaxina-1, localizadas en la membrana presináptica. Durante los ciclos de exocitosis y reciclaje vesicular las proteínas del complejo SNARE sufren ciclos repetidos de ensamblaje y desensamblaje, posibilitando la fusión de membranas y la liberación del neurotransmisor, así como el reciclaje vesicular (Südhof, 2013).

Teniendo en cuenta los eventos que se llevan a cabo en los terminales presinápticos, diversos estudios se centraron en determinar la relación de  $\alpha$ Syn con la liberación de neurotransmisores en la sinapsis. Se han publicado observaciones tanto a favor como en contra de la facilitación de la neurotransmisión por parte de  $\alpha$ Syn. El tipo neuronal y los protocolos de estimulación parecen tener una influencia en los resultados obtenidos. Diversos estudios en cultivos neuronales hipocampales deficientes en  $\alpha$ Syn indicaban que esta proteína regulaba los grupos vesiculares más alejados de la membrana (reservorio en reposo), los cuales se movilizan únicamente ante estimulaciones prolongadas; de este modo, asignan a  $\alpha$ Syn un papel positivo en la neurotransmisión ante estos estímulos (Murphy et al., 2000; Cabin et al., 2002). Posteriormente se publicó que  $\alpha$ Syn posibilitaría el posicionamiento y agrupado de vesículas generando un "entorno" para las mismas, a través de sus interacciones (tanto con fosfolípidos como con otras proteínas presinápticas) (Diao et al., 2013). Por su parte, otros estudios utilizando modelos murinos deficientes en  $\alpha$ Syn y/o  $\beta$ Syn y  $\gamma$ Syn llegaban a conclusiones distintas, y atribuían un papel de regulación negativa de la neurotransmisión dopaminérgica, al observar aumentos de la liberación estriatal de dopamina en ausencia de estas proteínas (Abeliovich et al., 2000; Chandra et al., 2004; Senior et al., 2008; Anwar et al., 2011).

En una publicación más reciente parecen unificarse distintas observaciones, ya que reportan efectos opuestos por parte de  $\alpha$ Syn en la neurotransmisión dopaminérgica según el patrón de actividad neuronal. Ante la llegada de potenciales de acción repetidos, con intervalos de tiempo cortos,  $\alpha$ Syn facilitaría la dilatación de los poros de fusión y la propia fusión vesicular en las zonas activas. Esto a su vez agiliza la recuperación de los reservorios más cercanos a la membrana (reservorios de reciclaje). Cuando se trata de potenciales más espaciados, el efecto previo de facilitación sería innecesario y promovería una inhibición en la movilización de vesículas de los reservorios en reposo (Somayaji et al., 2020) (Figura 9).



**Figura 9. Función conocida de  $\alpha$ Syn en la sinapsis.**  $\alpha$ Syn actúa como chaperona presináptica, permitiendo el ensamblaje del complejo de proteínas SNARE, a través de su interacción con la SNARE vesicular VAMP2. Su función sería relevante para facilitar o no la neurotransmisión ante determinados estímulos. Imagen creada con BioRender.

En 2005, a raíz de un trabajo realizado en ratones sin la chaperona presináptica CSP $\alpha$ , se le asigna otro papel a la proteína  $\alpha$ Syn. CSP $\alpha$  pertenece a la familia de proteínas DNAJC (gen *DNAJC5*), las cuales están asociadas a la EP y cuyo déficit causa una neurodegeneración sináptica fulminante (Fernández-Chacón et al., 2004). Curiosamente, la sobreexpresión de  $\alpha$ Syn ralentiza este fenotipo, mientras que su supresión lo agrava, lo cual llevó a

determinar que ambas proteínas tenían funciones homólogas como chaperonas presinápticas. Sin embargo, mientras CSP $\alpha$  mostraba un efecto sobre los niveles de SNAP-25 que alteraría el complejo SNARE,  $\alpha$ Syn parecía tener un impacto directo en la formación de dicho complejo (Chandra et al., 2005). Basándose en estos hallazgos, Jacqueline Burré y colaboradores determinan que  $\alpha$ Syn promueve el ensamblaje del complejo SNARE *in vivo* e *in vitro*. En concreto, describen la unión de  $\alpha$ Syn a la sinaptobrevina-2 (VAMP2) a través de su dominio carboxilo (Figura 9) y confirman que el ensamblaje del complejo no se produce en ausencia de las sinucleínas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  en ratones TKO. Estos animales mostraban alteraciones neurológicas a cierta edad, a partir de la cual morían prematuramente, lo que asignaría a las sinucleínas un papel de mantenimiento presináptico a largo plazo, de forma dependiente de la actividad sináptica (Burré et al., 2010).

Aunque la función completa de  $\alpha$ Syn sigue sin esclarecerse, estos estudios entre otros parecen indicar que participaría en procesos relacionados con la actividad sináptica, como la plasticidad, el aprendizaje, la liberación y mantenimiento de vesículas de neurotransmisores o el tráfico de membranas, necesario para la movilización de los reservorios vesiculares.

### 3. FISIOPATOLOGÍA CELULAR DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON ASOCIADA CON $\alpha$ -SINUCLEÍNA

La dificultad de describir la función de  $\alpha$ Syn se ha debido en gran medida a la falta de alteraciones graves en los modelos con ausencia de la misma (Abeliovich et al., 2000; Cabin et al., 2002; Senior et al., 2008). Aunque a veces con resultados contradictorios, los modelos de sobreexpresión o mutación sí

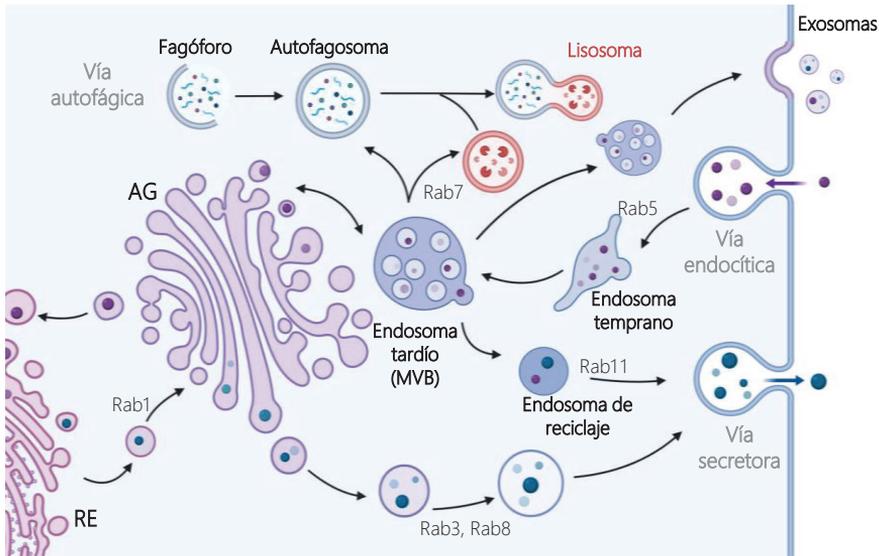
han dado pistas de las rutas o procesos fisiopatológicos asociados a  $\alpha$ Syn en la EP:

### **3.1. Tráfico de membranas**

El tráfico de membranas es un proceso logístico clave en el mantenimiento de la homeostasis celular, especialmente en neuronas, ya que presentan una morfología altamente polarizada con compartimentos muy definidos. Podemos dividir este tráfico en dos vías importantes: la vía secretora o biosintética y la vía endocítica (Figura 10). Se trata de rutas de entrada y salida de la célula, pero también de clasificación y localización de proteínas, que de este modo viajan en vesículas y alcanzan sus destinos sin necesidad de atravesar membranas (Hasegawa et al., 2017).

En la vía secretora o biosintética, las proteínas recién sintetizadas viajan en vesículas por las cisternas del retículo endoplasmático (RE) y se transportan al aparato de Golgi (AG), que constituye su principal plataforma de clasificación. Mediante un sistema de adaptadores y cubiertas de membrana específicos, las vesículas llegan a su compartimento de destino, con el cual se fusionan en un proceso dependiente de proteínas SNARE (Bonifacino and Glick, 2004). Las vesículas con estas proteínas pueden dirigirse a la membrana plasmática, fusionarse con endosomas, degradarse en lisosomas o ser devueltas al RE (Hasegawa et al., 2017). La vía endocítica es una vía de entrada a la célula en la que juegan un papel fundamental las guanosina trifosfatasa (GTPasas) Rab. Las vesículas derivadas del proceso de endocitosis, llamadas endosomas, sufren múltiples modificaciones para adquirir distintas identidades, como cambios en sus proteínas Rab, aumento de vesículas intraluminales (para formar endosomas tardíos) o acidificación (para formar lisosomas). Los endosomas tardíos con vesículas intraluminales se denominan cuerpos

multivesiculares, y pueden fusionarse con lisosomas o autofagosomas para degradar el material de su interior. También pueden fusionarse con la membrana plasmática y expulsar al exterior de la célula sus vesículas intraluminales, que constituyen entonces exosomas (Huotari and Helenius, 2011). Por tanto, ambas rutas, endocítica y secretora, confluyen y requieren un continuo intercambio de membranas altamente regulado.



**Figura 10. Principales rutas de tráfico de membranas en la célula.** En la vía secretora, las proteínas sintetizadas en el retículo endoplasmático y modificadas por el aparato de Golgi alcanzan sus destinos o son secretadas al exterior de la célula. En la vía endocítica se introduce material en la célula y se crean endosomas que pueden madurar, generar lisosomas, fusionarse con otras vesículas o degradar su material en la vía autofágica. También pueden volver a la membrana plasmática y constituir endosomas de reciclaje, o generar exosomas, si albergaban vesículas en su interior que se secretaran tras la fusión con la membrana. Las proteínas Rab son GTPasas clave en los procesos membranosos. RE: retículo endoplasmático; AG: aparato de Golgi. MVB: cuerpo multivesicular (*multivesicular body*). Imagen creada con BioRender.

### 3.1.1. $\alpha$ Syn y el tráfico de membranas

Existen múltiples estudios que muestran fallos en la vía endocítica y secretora como consecuencia de mutaciones o sobreexpresión de  $\alpha$ Syn. Se ha visto que la sobreexpresión de  $\alpha$ Syn bloquea el tráfico entre el RE y el AG en levaduras, las cuales, aunque no poseen de forma natural esta proteína, proporcionan un

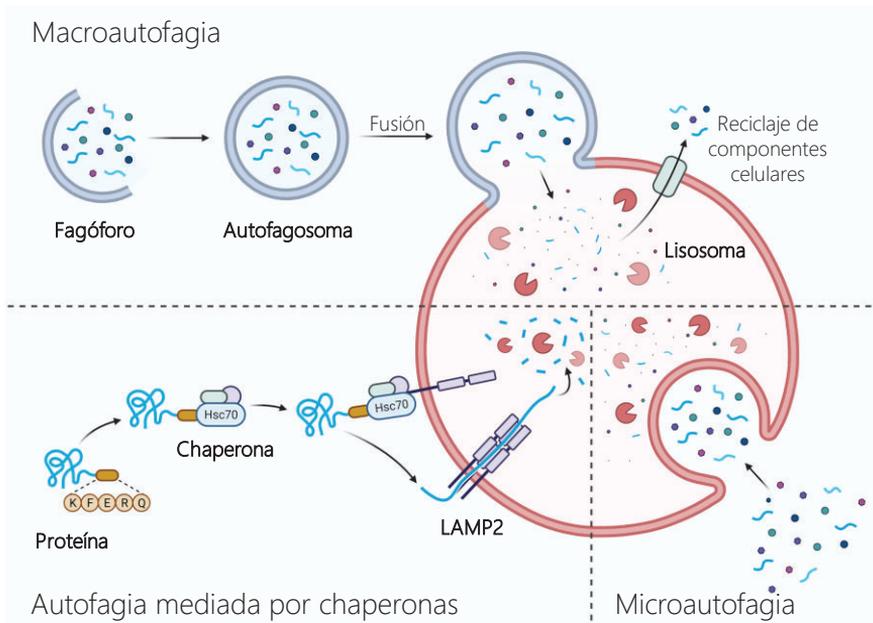
modelo simple y manipulable para su estudio. Este bloqueo podía rescatarse mediante la sobreexpresión de la proteína homóloga de Rab1 (Cooper et al., 2006) o de SNARE de RE/AG (Thayanidhi et al., 2010). También se ha determinado la interacción y/o colocalización de  $\alpha$ Syn con las proteínas Rab3A, Rab5, Rab8 y Rab11 (Dalfó et al., 2004; Chutna et al., 2014; Breda et al., 2015). De hecho, en modelos neuronales, Rab8A (encargada del tráfico post-AG) y Rab3A (específica de terminales presinápticos e implicada en organización y fusión de vesículas sinápticas) pueden rescatar la degeneración y alteraciones causadas por  $\alpha$ Syn, por lo que las interacciones anormales con estas proteínas serían clave en los fallos del tráfico intracelular observados (Gitler et al., 2008).

### **3.2. Rutas degradativas**

Otro pilar fundamental en la fisiopatología de la EP son los procesos degradativos. Existen tres tipos principales de rutas degradativas en mamíferos: la autofagia mediada por chaperonas (CMA), la microautofagia y la macroautofagia (Scrivo et al., 2018) (Figura 11). Estas vías de degradación tienen distintos propósitos en la célula y, aunque en este trabajo nos centraremos en la macroautofagia, conviene comentar brevemente las singularidades de cada una de ellas y su relación fisiopatológica con  $\alpha$ Syn.

En el caso de la CMA, se trata de una ruta con fines regulatorios (controlando la vida media de determinadas proteínas) y de control de calidad proteínico (eliminando proteínas dañadas o mal sintetizadas) (Kaushik and Cuervo, 2018). Las proteínas son identificadas por la chaperona citosólica HSC70, también conocida como HSPA8, mediante el reconocimiento de un motivo peptídico específico (KFERQ) en ellas. Una vez transportadas a la membrana lisosomal por esta chaperona, deben translocarse a través de la proteína LAMP2A para

acceder al lumen del lisosoma. La microautofagia, en cambio, consiste en la invaginación de la membrana lisosomal para capturar una porción de citoplasma con el material a degradar (Scrivo et al., 2018).



**Figura 11. Tipos de autofagia en la célula.** La macroautofagia requiere de la formación de vesículas de doble membrana y la fusión con el lisosoma. La autofagia mediada por chaperonas permite introducir directamente las proteínas a degradar en el lisosoma, de forma dependiente de la chaperona HSC70 y, en la microautofagia, el propio lisosoma engulle el material a degradar invaginando su membrana. Imagen creada con BioRender.

La macroautofagia (denominada en adelante como autofagia o vía autofágica-lisosomal) es la única de estas vías que requiere de la formación de membranas y vesículas para llevarse a cabo y, por tanto, la que tiene capacidad de degradar material más voluminoso (como orgánulos de la propia célula y agregados proteínicos) (Aman et al., 2021). Se trata de un proceso catabólico altamente conservado en eucariotas con profundas implicaciones en la homeostasis celular. Inicialmente se le atribuyó un papel de degradación no selectiva, necesario únicamente en caso de falta de

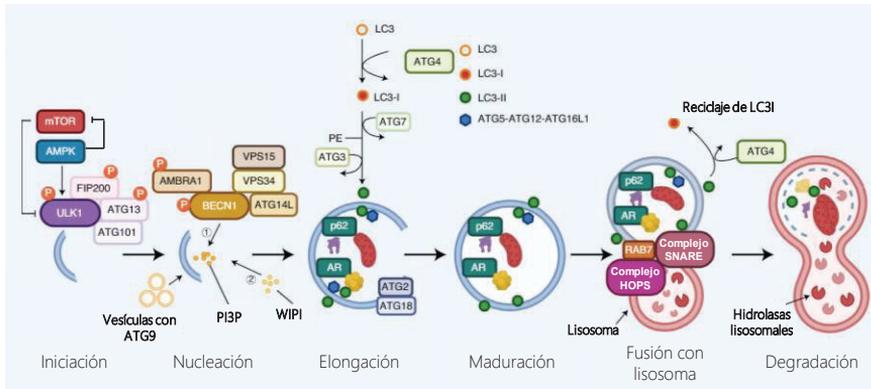
nutrientes o energía; sin embargo, en la actualidad sabemos que se trata de un proceso que puede ser dirigido (autofagia selectiva) y que es necesario para el funcionamiento basal celular (Menzies et al., 2017).

La inducción autofágica en respuesta a estímulos consiste en una serie de activaciones de complejos de proteínas ATG, que culminan en la formación de una vesícula de doble membrana alrededor del material a degradar, que constituirá el autofagosoma. Ante determinados estímulos, como déficit de aminoácidos o energía, la quinasa activada por adenosín monofosfato (AMPK) inhibe al complejo de mTOR, mTORC1, un sensor clave que actúa inhibiendo el proceso de autofagia cuando hay suficientes niveles de nutrientes o energía. AMPK, además, activa al complejo quinasa ULK1, que será el primer complejo efector de la inducción y que comprende las proteínas ULK1, ATG13, FIP200/RB1CC1 y ATG101 (Kim et al., 2011) (Figura 12, "Iniciación"). A continuación, se activa el complejo de fosoinositol 3-quinasa de clase III (PI3KC3), compuesto por VPS34, VPS15, Beclina1/BECN1 y ATG14, que se encargará de generar inositol trifosfato (PI3P) en las membranas donantes para marcar los sitios de iniciación del fagóforo (membrana precursora del autofagosoma). En ese momento se recluta la proteína de unión a PI3P WIPI y ATG9 que transferirá membrana al fagóforo para su expansión (Aman et al., 2021) (Figura 12, "Nucleación"). Estas membranas pueden proceder del RE (Axe et al., 2008), de la membrana mitocondrial externa (Hailey et al., 2010), de membranas asociadas a mitocondrias (MAM, contactos entre el RE y la mitocondria) (Hamasaki et al., 2013) y de la membrana plasmática (Ravikumar et al., 2010).

Posteriormente son necesarias una serie de reacciones, llevadas a cabo por complejos enzimáticos de ubiquitina ligasas (enzimas E3), para completar el

proceso de formación del autofagosoma. La proteína MAP1LC3 o, simplemente, LC3, es un miembro de la familia de proteínas altamente conservadas ATG8. El LC3 recién sintetizado ha de ser hidrolizado por la proteasa de cisteína ATG4, dando lugar a la forma LC3-I. Esta forma, citosólica, ha de ser conjugada con fosfatidiletanolamina (PE) mediante reacciones de tipo ubiquitinación por parte de las proteínas ATG7 y ATG3, y del complejo formado por ATG12-ATG5-ATG16. La forma lipidada se denomina LC3-II y está unida al fagóforo tanto por la parte interna como externa de la membrana (Kabeya et al., 2000); de hecho, esta proteína se utiliza como marcador de autofagosomas formados (Klionsky et al., 2021) (Figura 12, "Elongación" y "Maduración").

Para que la vía autofágica pueda ser selectiva es necesaria la acción de los llamados receptores de autofagia, como p62/Sequestosoma1 (p62/SQSTM1, referido en adelante como p62), Optineurina/OPTN o Neurabina1/NBR1. p62 contiene una región de interacción con LC3 y de unión a ubiquitina, de forma que puede anclarse a la cara interna del autofagosoma introduciendo en él el material a degradar marcado mediante ubiquitinación (Pankiv et al., 2007). Así, podemos hablar de distintos tipos de autofagia selectiva según los sustratos de la misma: mitofagia (mitocondrias), reticulofagia (RE), agrefagia (agregados proteínicos), pexofagia (peroxisomas), nucleofagia (núcleo) o lipofagia (gotas lipídicas) (Aman et al., 2021). Finalmente, la fusión del autofagosoma con el lisosoma se lleva a cabo mediante proteínas Rab, SNARE (Syntaxina-17, SNAP-29 y VAMP8) (Itakura et al., 2012) y el complejo HOPS (Jiang et al., 2014). Una vez fusionados, las hidrolasas contenidas en el interior del lisosoma en un ambiente ácido degradarán el material y se procederá al reciclaje de componentes celulares (Figura 12, "Fusión con lisosoma" y "Degradación").



**Figura 12. Proceso de inducción autofágica (macroautofagia).** La formación del autofagosoma requiere de la inhibición de mTOR y la activación de varios complejos para marcar los sitios de iniciación del fagóforo (precursor del autofagosoma). La maduración del autofagosoma implica la lipidación de la proteína ATG8 LC3, que se unirá de este modo a la membrana. La acción de receptores autofágicos, como p62, permite degradar selectivamente proteínas y componentes celulares. La fusión con el lisosoma da paso a la degradación del material por parte de las enzimas lisosomales. AR: receptor autofágico (*autophagy receptor*); PI3P: inositol trifosfato. Imagen adaptada de Aman et al 2021.

La vía autofágica-lisosomal a nivel neuronal tiene varias singularidades. En neuronas, está altamente compartimentalizada: mientras los autofagosomas se forman en los axones, los lisosomas quedan restringidos al soma. De este modo, es necesario un proceso de transporte y maduración de autofagosomas a través del axón, los cuales se fusionarían con los lisosomas al alcanzar el cuerpo neuronal (Hill and Colón-Ramos, 2020). Recientemente, también se ha visto que pueden enviarse lisosomas a los axones para cumplir necesidades de degradación local (Farfel-Becker et al., 2019). Las neuronas, además, debido a su naturaleza postmitótica, son especialmente dependientes de las rutas degradativas, puesto que no pueden dividirse y diluir los materiales tóxicos o envejecidos. De hecho, la delección de los genes *Atg5* y *Atg7* resulta en la acumulación de agregados proteínicos en las neuronas y distrofia axonal, respectivamente (Hara et al., 2006; Komatsu et al., 2007), y la falta de proteínas clave de los complejos de inducción reduce la supervivencia

de los animales y también es suficiente para causar neurodegeneración (Liang et al., 2010; Joo et al., 2016).

### 3.2.1. $\alpha$ Syn y autofagia mediada por chaperonas

La degradación de  $\alpha$ Syn depende de su estado conformacional, pudiendo degradarse mediante CMA, cuando está en su forma monomérica, o preferentemente por la vía autofágica-lisosomal cuando se trata de oligómeros de gran tamaño y otras formas patológicas (Lee et al., 2004; Vogiatzi et al., 2008).

La CMA se ha implicado en múltiples estudios en la fisiopatología de la EP. En 2004 y 2008 se publicó que las formas mutantes y modificadas por dopamina de  $\alpha$ Syn bloqueaban LAMP2A impidiendo su propia degradación y la de otros sustratos (Cuervo et al., 2004; Martínez-Vicente et al., 2008). Posteriormente se vio que la disfunción de la CMA, en líneas celulares expresando  $\alpha$ Syn silvestre y la forma mutante A53T, podía ir acompañada de una inducción compensatoria de la autofagia (Xilouri et al., 2009). Congruente con esta disfunción, en un estudio *postmortem* de pacientes con EP se encontraron niveles reducidos de LAMP2A y HSC70 en la SNc y la amígdala (Alvarez-Erviti et al., 2010) y, en otro más reciente, esta reducción de LAMP2A se correlacionaba además con los aumentos de  $\alpha$ Syn (Murphy et al., 2015). En modelos animales y celulares se ha demostrado que la sobreexpresión de LAMP2A puede tener un efecto neuroprotector (Xilouri et al., 2013; Issa et al., 2018). Sin embargo, en ratones con mayores niveles de  $\alpha$ Syn, bien por sobreexpresión transgénica o por tratamiento con la neurotoxina paraquat, encontraron aumentos de LAMP2A y HSC70 (Mak et al., 2010). Por tanto, aunque existan resultados contradictorios, la CMA parece tener un papel relevante en la fisiopatología de la EP asociada con  $\alpha$ Syn.

### 3.2.2. $\alpha$ Syn y macroautofagia

$\alpha$ Syn puede afectar a la vía autofágica-lisosomal en distintos niveles, y existen pruebas tanto de inhibiciones como de activaciones perjudiciales de esta ruta ante sobreexpresión o formas patológicas de  $\alpha$ Syn. A su vez, defectos en esta vía degradativa pueden afectar a la propia degradación de  $\alpha$ Syn y a su expulsión al medio extracelular, generando más acúmulos y propagación y retroalimentando, de este modo, el proceso (Poehler et al., 2014).

En cerebros de pacientes con EP se hallaron incrementos en la cantidad de autofagosomas (Anglade et al., 1997; Crews et al., 2010) y, en modelos animales de  $\alpha$ Syn, también se han encontrado niveles aumentados del marcador de autofagosomas LC3-II y de Beclina1 (Yu et al., 2009; Klucken et al., 2012). Sin embargo, no está claro si estos aumentos procederían de un incremento en su formación (como mecanismo compensatorio a una inhibición de la CMA, por ejemplo) o de un flujo autofágico defectuoso.

En varios estudios en formas mutantes de  $\alpha$ Syn (E46K y A30P) se sostiene que existe una afectación autofágica a través de la inactivación de la ruta de señalización de quinasas c-Jun N-terminal (JNK) (Yan et al., 2014; Lei et al., 2019). Esta inactivación puede afectar a la formación del complejo VPS34 de forma independiente de mTOR, mediante un incremento en la unión de Beclina1 a BCL2 (Song et al., 2014; Yan et al., 2014). Anteriormente ya se habían visto efectos neuroprotectores derivados de la activación autofágica al sobreexpresar Beclina1 en un modelo murino transgénico de  $\alpha$ Syn (Spencer et al., 2009).

En la formación de autofagosomas, se ha publicado que la sobreexpresión de  $\alpha$ Syn puede inhibir el proceso de autofagia al reducir la formación de omegasomas (membranas iniciadoras de fagóforos), mediante la

deslocalización de Atg9 en un proceso dependiente de Rab1a (Winslow et al., 2010). Además, la expresión de  $\alpha$ Syn humana en *Drosophila melanogaster* también puede impedir la maduración de los autofagosomas por una estabilización excesiva de actina (Sarkar et al., 2021). Por otro lado, existen estudios que reportan un aumento en el flujo autofágico y sobreactivación de esta ruta en neuronas con sobreexpresión de  $\alpha$ Syn silvestre y/o la forma mutante A53T (Cuervo et al., 2004; Choubey et al., 2011; Koch et al., 2015), por lo que el efecto neto de  $\alpha$ Syn sobre el proceso autofágico probablemente dependa de sus niveles, conformación o del modelo y tipo celular de estudio.

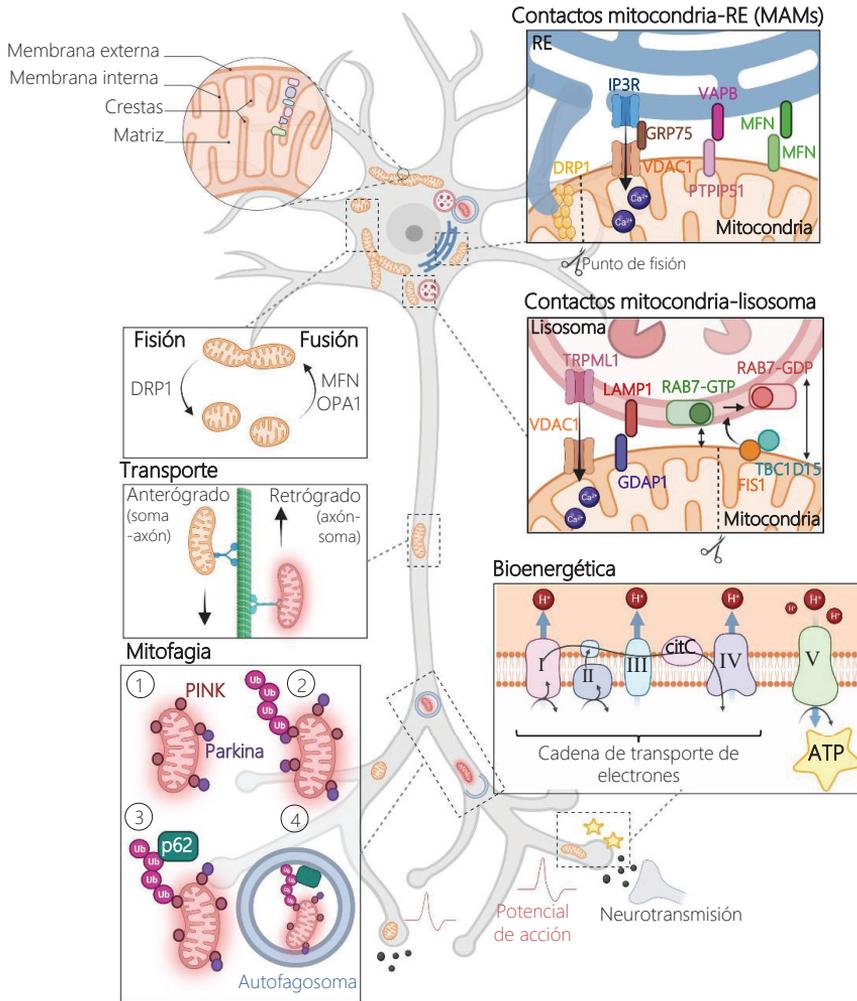
En relación con los lisosomas, cabe remarcar que mutaciones en heterocigosis en el gen *GBA*, el cual codifica la enzima lisosomal glucocerebrosidasa (GCasa), constituyen el factor de riesgo genético más común para padecer la EP; mutaciones en homocigosis, en cambio, se asocian a una enfermedad de depósito lisosomal, la enfermedad de Gaucher (Goker-Alpan et al., 2004; Lwin et al., 2004). En casos de EP idiopático también se han encontrado reducciones en la actividad de esta enzima (Chiasserini et al., 2015), por lo que los lisosomas han adquirido un papel central en la fisiopatología de la EP. Distintos grupos encontraron reducciones en la cantidad de lisosomas en cerebros de pacientes con EP idiopático (Chu et al., 2009; Alvarez-Erviti et al., 2010; Dehay et al., 2010) y permeabilización lisosomal en modelos neurotóxicos murinos (Dehay et al., 2010). En línea con estos hallazgos, la sobreexpresión del factor de transcripción EB (TFEB), un regulador central de la biogénesis lisosomal y la autofagia, tiene efectos neuroprotectores en modelos murinos de EP inhibiendo a mTOR y activando la ruta (Dehay et al., 2010; Decressac et al., 2013; Torra et al., 2018).

Recientemente se ha publicado que la sobreexpresión de  $\alpha$ Syn impide la fusión entre lisosomas y autofagosomas, al reducir los niveles de la proteína SNARE SNAP29. Para compensar esta disfunción degradativa, se produce un incremento en la fusión de los autofagosomas con la membrana plasmática y, por tanto, un aumento de vesículas extracelulares (Tang et al., 2021). De hecho, la disfunción autofágica/lisosomal se ha postulado en distintos estudios como el principal mecanismo promotor de la propagación de  $\alpha$ Syn para compensar dicha disfunción, ya sea mediante el incremento de su liberación al medio por exosomas (Alvarez-Erviti et al., 2011; Fussi et al., 2018; Minakaki et al., 2018; Stykel et al., 2021) o por nanotúneles de membrana entre células, viajando dentro de los propios lisosomas (Abounit et al., 2016; Dilsizoglu Senol et al., 2021).

### **3.3. Homeostasis mitocondrial**

La mitocondria ha estado asociada clásicamente a la obtención de energía celular pero en la actualidad sabemos que, a través de sus funciones (Figura 13), tiene implicaciones en múltiples procesos celulares que van desde la señalización de muerte celular por apoptosis, a la regulación de la respuesta inmune y metabólica o del ciclo celular (McBride et al., 2006). Las mitocondrias son orgánulos de doble membrana, de forma que su membrana externa contiene proteínas y canales relevantes para su comunicación con el citoplasma y otros orgánulos, así como para procesos de dinámica o transporte mitocondrial. La membrana mitocondrial interna (separada de la externa por el llamado espacio intermembranoso) forma unas estructuras, las crestas, que permiten ampliar su superficie y maximizar la obtención de energía en forma de adenosín trifosfato (ATP), ya que en ellas ocurre el proceso de fosforilación oxidativa (OXPHOS). El interior de la mitocondria se denomina matriz mitocondrial y en él residen proteínas necesarias para el

ciclo de Krebs, la replicación del DNA mitocondrial o ribosomas para la propia biosíntesis proteínica (Kühlbrandt, 2015; Giacomello et al., 2020).



**Figura 13. Procesos mitocondriales a nivel neuronal.** Las mitocondrias aportan la energía necesaria para los procesos celulares, a través de la fosforilación oxidativa que se da en los complejos de su interior. Para ello, deben transportarse a través de los axones a las sinapsis, donde se requiere mayor nivel de aporte energético. Las mitocondrias también pueden sufrir ciclos de fisión y fusión para cumplir necesidades energéticas o mitigar daños. Si el daño persiste, pueden ser degradadas por mitofagia. Los contactos de la mitocondria con otros orgánulos, a través de pares proteínicos de anclaje, influyen en la dinámica mitocondrial y en el mantenimiento de la homeostasis de  $Ca^{2+}$ . ATP: adenosín trifosfato; MAM: membranas asociadas a mitocondrias. RE: retículo endoplásmico. Imagen creada con BioRender.

La OXPHOS es una ruta metabólica dependiente de oxígeno en la cual intervienen complejos de donantes y aceptores de electrones, en la llamada cadena respiratoria o cadena de transporte de electrones (CTE). A través de una serie de reacciones de oxidación-reducción se forma un gradiente electroquímico de protones que forma una energía potencial, la fuerza protón-motriz. La ATP sintasa (complejo V) aprovecha la vuelta de estos protones a través de un canal para así generar energía en forma de ATP, necesaria para la actividad celular (Figura 13). Esta ruta, sin embargo, tiene la desventaja de generar especies reactivas de oxígeno (ROS), como  $\text{H}_2\text{O}_2$  o  $\text{O}_2^-$ , que pueden poner en riesgo a la célula al generar una situación de estrés oxidativo si se acumulan (Knott et al., 2008).

Las mitocondrias son orgánulos altamente dinámicos, ya que forman redes en constante movimiento como resultado de los ciclos de fusión y fisión a los que pueden someterse. La biogénesis y degradación mitocondrial, su transporte y los procesos de fusión y fisión constituyen la denominada dinámica mitocondrial (Figura 13). Mantener un buen equilibrio entre estos procesos contribuye en gran medida a la salud de la red y al cumplimiento de requisitos energéticos de la célula (Van Laar and Berman, 2013). Las mitocondrias que pueden resultar dañadas por fallos bioenergéticos y estrés oxidativo, por ejemplo, y que son incapaces de fisionarse o fusionarse para mitigar el daño, pueden ser degradadas a través del proceso de mitofagia (Twig et al., 2008). En este proceso se detectan selectivamente mitocondrias con bajos potenciales de membrana (indicativo de una pérdida de la homeostasis mitocondrial), en las cuales se acumula la proteína PINK1. Esta proteína es capaz de reclutar Parkina, una ubiquitina-ligasa que permite así la ubiquitinación mitocondrial y la unión del receptor de autofagia selectiva p62 (Figura 13) (Narendra et al., 2008; Matsuda et al., 2010). Como hemos visto

anteriormente, ambas proteínas, PINK y Parkina, se encuentran entre los principales determinantes genéticos de la EP (loci *PARK2* y *PARK6*) (página 10; Tabla 1).

La regulación bidireccional entre los procesos de dinámica y bioenergéticos es de especial relevancia en neuronas, las cuales necesitan transportar y distribuir las mitocondrias a puntos de alta demanda energética, como son los terminales presinápticos, para mantener su actividad. Las neuronas tienen, además, una alta dependencia de la OXPHOS, ya que el 95 % de su energía en forma de ATP procede de esta ruta (Van Laar and Berman, 2013), y no pueden cambiar a la glucólisis como vía de obtención de energía en caso de que la OXPHOS se vea afectada (Knott et al., 2008).

Además del aporte energético, otra de las funciones principales de las mitocondrias es la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$ . Las oscilaciones de este ion son de vital importancia en el proceso de despolarización neuronal para la neurotransmisión, por lo que las neuronas deben tener sus niveles muy controlados mediante proteínas que lo tamponen (p.e. calbindina y parvalbúmina) o secuestrándolo en depósitos intracelulares, como la mitocondria o el RE (Giorgi et al., 2018). En la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  tiene un papel clave la comunicación mitocondrial: en los últimos años se ha visto que las mitocondrias establecen los llamados sitios de contacto de membranas (MCS) con distintos orgánulos, incluyendo el RE, pero también lisosomas, peroxisomas, endosomas y membrana plasmática (Giacomello et al., 2020). Los contactos con el RE o los lisosomas, entre otras funciones, permiten la transferencia de  $\text{Ca}^{2+}$  entre la mitocondria y estos orgánulos (Figura 13) (Rizzuto et al., 1993; Peng et al., 2020).

Los contactos entre la mitocondria y el RE, también denominados membranas asociadas a mitocondrias (MAM), tienen implicaciones en la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$ , pero también en morfología y dinámica mitocondrial, autofagia (son un punto de formación de autofagosomas), apoptosis y síntesis e intercambio de fosfolípidos (Perrone et al., 2020). De hecho, en estos puntos puede reclutarse la proteína de fisión DRP1 que, con ayuda de túbulos del RE que constriñen la mitocondria, forma anillos a su alrededor para dividirla (Figura 13) (Friedman et al., 2011). Los contactos entre las mitocondrias y los lisosomas, por su parte, también constituyen una plataforma para regular bidireccionalmente la morfología, dinámica e identidad de ambos orgánulos, lo que contribuye a que se distribuyan y funcionen correctamente (Wong et al., 2018; Cantarero et al., 2020). Los MCS mitocondriales, en especial las MAM y los contactos mitocondria-lisosoma, se encuentran actualmente en el foco de numerosos estudios, puesto que en ellos confluyen muchas de las funciones alteradas en las enfermedades neurodegenerativas (Prinz et al., 2020).

### *3.3.1. $\alpha\text{Syn}$ y la mitocondria*

$\alpha\text{Syn}$  tiene una mayor afinidad por las membranas mitocondriales que por otras membranas, debido a la composición de las mismas y, de hecho, existen evidencias de que  $\alpha\text{Syn}$  puede interactuar fisiológica y patológicamente con la mitocondria a varios niveles (membrana externa, membrana interna, matriz y MCS) (Bernal-Conde et al., 2019).

$\alpha\text{Syn}$  puede acumularse en las mitocondrias de la SNc y del estriado de pacientes con EP e inhibir el complejo I de la CTE (Devi et al., 2008). Esta inhibición se conoce desde hace varias décadas (Schapira et al., 1990) y se ha corroborado en trabajos posteriores (Chinta et al., 2010; Loeb et al., 2010; Reeve et al., 2018). Recientemente, de hecho, se ha demostrado que la

eliminación del complejo I de la CTE es suficiente para causar parkinsonismo y neurodegeneración en un modelo murino (González-Rodríguez et al., 2021). Las principales consecuencias de esta disfunción serían la reducción de producción de energía en forma de ATP o la acumulación de ROS. La aparición de estrés oxidativo también se ha reportado en diversos modelos (Parihar et al., 2008; Subramaniam et al., 2014; Ludtmann et al., 2018) y puede contribuir a la propia agregación de  $\alpha$ Syn (Scudamore and Ciossek, 2018). Por otra parte, se ha visto que  $\alpha$ Syn podría estar ejerciendo un papel fisiológico directo sobre la ATP sintasa (complejo V) en su forma monomérica (Ludtmann et al., 2016); ante agregación y formación de oligómeros ricos en hojas  $\beta$ ,  $\alpha$ Syn dejaría de ejercer este rol y causaría la oxidación de la ATP sintasa por la aparición de ROS, estimulando la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial y la muerte celular (Ludtmann et al., 2018).

La inhibición del complejo I de la CTE podría mediarse gracias al acceso de  $\alpha$ Syn a la matriz mitocondrial a través del canal VDAC1, por el cual puede translocarse y causar un bloqueo (Gurnev et al., 2015; Rostovtseva et al., 2015; Jacobs et al., 2019). Del mismo modo,  $\alpha$ Syn también puede interactuar con TOM20 y bloquearlo y, en este caso, impedir la importación de proteínas necesarias para el funcionamiento mitocondrial (Di Maio et al., 2016). El reclutamiento de  $\alpha$ Syn a la mitocondria se ha descrito ante determinadas condiciones, como acidificación del medio o externalización de cardiolipina, con la cual interacciona (Cole et al., 2008). La cardiolipina es un fosfolípido que se encuentra en la membrana mitocondrial interna; sin embargo, en condiciones de estrés mitocondrial puede translocarse a la membrana mitocondrial externa, donde es necesaria, por ejemplo, para reclutar la proteína LC3 e iniciar el proceso de mitofagia. A través de su interacción con la cardiolipina  $\alpha$ Syn puede competir con el LC3, impidiendo la mitofagia (Ryan

et al., 2018), pero también generar multímeros en forma de poros en la membrana externa, causando una mayor disfunción mitocondrial (Ghio et al., 2019).

En la dinámica mitocondrial, la sobreexpresión y mutaciones patogénicas de  $\alpha$ Syn generan un aumento de mitocondrias fragmentadas a través de su unión directa a la membrana, de forma independiente a DRP1, la principal proteína de fisión (Nakamura et al., 2011; Pozo Devoto et al., 2017). Este fenotipo también se ha visto como resultado de una fusión reducida, tanto de forma independiente (Kamp et al., 2010) como dependiente de la propia maquinaria de fusión mitocondrial (Xie and Chung, 2012).  $\alpha$ Syn genera, además, una movilidad mitocondrial enlentecida en distintos modelos (Xie and Chung, 2012; Li et al., 2013; Melo et al., 2017; Pozo Devoto et al., 2017), lo cual puede tener un impacto sobre el reclutamiento de mitocondrias a puntos de demanda energética.

### 3.3.2. $\alpha$ Syn y los contactos mitocondriales

En 2014 se le atribuyó a  $\alpha$ Syn una nueva localización fisiológica en las MAM, congruente con su afinidad por las balsas lipídicas. En este estudio se observó que las mutaciones en  $\alpha$ Syn reducían su presencia en las MAM, lo cual afectaba a la cercanía entre orgánulos y a las funciones de los contactos, generando además mitocondrias fragmentadas (Guardia-Laguarta et al., 2014). Anteriormente, Calì y colaboradores ya habían reportado que  $\alpha$ Syn era necesaria para la transferencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , incrementando los contactos entre la mitocondria y el RE. El silenciamiento o agregación de  $\alpha$ Syn, en cambio, reducían los contactos y la transferencia de este ion, además de causar un incremento autofágico (Calì et al., 2012).  $\alpha$ Syn podría estar ejerciendo estos efectos mediante su unión a VAPB, una de las proteínas de anclaje descritas

de las MAM, de forma que las mutaciones o sobreexpresión de  $\alpha$ Syn afectarían a la unión de VAPB con PTPIP51 (Paillusson et al., 2017).

En cuanto a los contactos entre la mitocondria y los lisosomas, se sabe que pueden tener profundas implicaciones en la fisiopatología de la EP, por el protagonismo que tienen ambos orgánulos en esta patología. Sin embargo, todavía no se ha establecido ningún vínculo directo entre  $\alpha$ Syn y dichos contactos. En 2018 se describió un mecanismo por el cual ambos orgánulos controlaban su distancia y los puntos de fisión mitocondrial, de forma dependiente de la hidrólisis de GTP por parte de RAB7 (Wong et al., 2018) (Figura 13). Como hemos visto, RAB7 es una de las GTPasas que interacciona con  $\alpha$ Syn, por lo que no sería descartable que  $\alpha$ Syn tuviera un impacto en estos contactos a través de esta interacción. Recientemente el mismo grupo publicaba, en neuronas de un paciente de EP con mutaciones en heterocigosis en *GBA*, que los contactos mitocondria-lisosoma están aumentados por un fallo en su desacoplamiento, lo cual tenía un impacto sobre la distribución y función mitocondriales (Kim et al., 2021).

### 3.4. Neuroinflamación

En la última década la neuroinflamación se ha postulado como un evento central en la fisiopatología de las enfermedades neurodegenerativas del sistema nervioso central (Kwon and Koh, 2020), así como en neuropatías periféricas (Fernandez-Lizarbe et al., 2019). Aunque el sistema nervioso central se ha considerado un tejido relativamente inmunoprivilegiado, con un microambiente inmunosupresor, tiene la capacidad de iniciar respuestas inmunes controladas a distintos niveles. Los factores desencadenantes de estas respuestas pueden ser agentes externos, asociados a infecciones víricas o bacterianas, o agentes internos, los llamados patrones moleculares

asociados a daño (DAMPs). Entre estos últimos encontraríamos mediadores liberados por las neuronas dañadas o muertas, como ATP, metaloproteinasa-3, neuromelanina o, en el caso concreto que nos ocupa,  $\alpha$ Syn agregada (Tufekci et al., 2012).

La microglía, los macrófagos residentes del cerebro, representan entre un 5 % y un 12 % del total de células del sistema nervioso central y constituyen la inmunidad innata frente a estos factores. Entre sus principales funciones destacan el mantenimiento de la homeostasis sináptica y de mielina, su papel como sensores de daño o infección, la migración a estos lugares de daño para fagocitar restos neuronales y la protección frente a estímulos tóxicos o infecciosos (Hickman et al., 2018). Ante una estimulación, la microglía “en reposo” puede adquirir distintos fenotipos activados, que son identificables en base a parámetros morfológicos (la microglía en reposo ramificada pasa a una morfología ameboide al activarse) o en base a la expresión de determinados marcadores. El fenotipo M1 se adquiere a través de la llamada “activación clásica”, mediante la producción de citoquinas proinflamatorias como interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) y el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ); por su parte, el fenotipo M2 se da tras la “activación alternativa”, y está mediado por citoquinas como la interleuquina (IL) 4 (IL-4) o la IL-13, las cuales poseen propiedades antiinflamatorias (Tang and Le, 2016). El paso de la microglía M2 neuroprotectora a la microglía M1 neurotóxica es un factor común a las enfermedades neurodegenerativas, promoviendo un ambiente neuroinflamatorio que retroalimenta el daño neuronal. En el caso de la EP, fueron McGeer y colaboradores los que reportaron por primera vez la presencia de microglía reactiva en la SNc de cerebros *postmortem* de pacientes (McGeer et al., 1988). De hecho, los pacientes con EP muestran aumentos de citoquinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en el

estriado y el líquido cefalorraquídeo (Mogi et al., 1994; Blum-Degen et al., 1995). Esta misma activación microglial se ha encontrado en numerosos modelos con formas mutantes o sobreexpresión de  $\alpha$ Syn (Gomez-Isla et al., 2003; Su et al., 2008; Theodore et al., 2008; Sanchez-Guajardo et al., 2010; Watson et al., 2012), y podría iniciarse con la secreción de  $\alpha$ Syn al medio por parte de neuronas afectadas o dañadas, la cual intentará captar y degradar la microglía. La detección de esta  $\alpha$ Syn extracelular, de forma dependiente de los receptores TLR (Kim et al., 2013; Choi et al., 2020), entre otros, puede modular la actividad fagocítica de la microglía, estimular la producción de citoquinas proinflamatorias y ROS, así como activar cascadas de señalización claves como las rutas de NF $\kappa$ B y de quinasas MAP (MAPK) (Klegeris et al., 2008; Hoenen et al., 2016; Choi et al., 2020).

Los astrocitos también se han visto implicados en la fisiopatología de las enfermedades neurodegenerativas. Estas células gliales son las más numerosas del cerebro y tienen funciones tan importantes como el mantenimiento de la homeostasis de agua e iones, la secreción de neurotrofinas, la regulación de la transmisión sináptica o la regulación de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, funciones vitales para la supervivencia neuronal (Kam et al., 2020). Los astrocitos también pueden responder ante infecciones o citoquinas proinflamatorias procedentes de la microglía y activarse, generando los astrocitos A1 reactivos (Liddelow et al., 2017). La astrogliosis se ha manifestado en distintos modelos de EP a través de la hipertrofia de sus somas y prolongaciones, así como de aumentos de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), uno de los principales marcadores de estas células. Al igual que en el caso de la microglía, también hay indicios de que los astrocitos tienen la capacidad de captar la  $\alpha$ Syn que liberan las neuronas como mecanismo de protección. Estos astrocitos, además, son capaces de

generar citoquinas proinflamatorias tras acumular  $\alpha$ Syn (Lee et al., 2010) y podrían, de este modo, exacerbar y perpetuar la activación microglial (Farina et al., 2007).

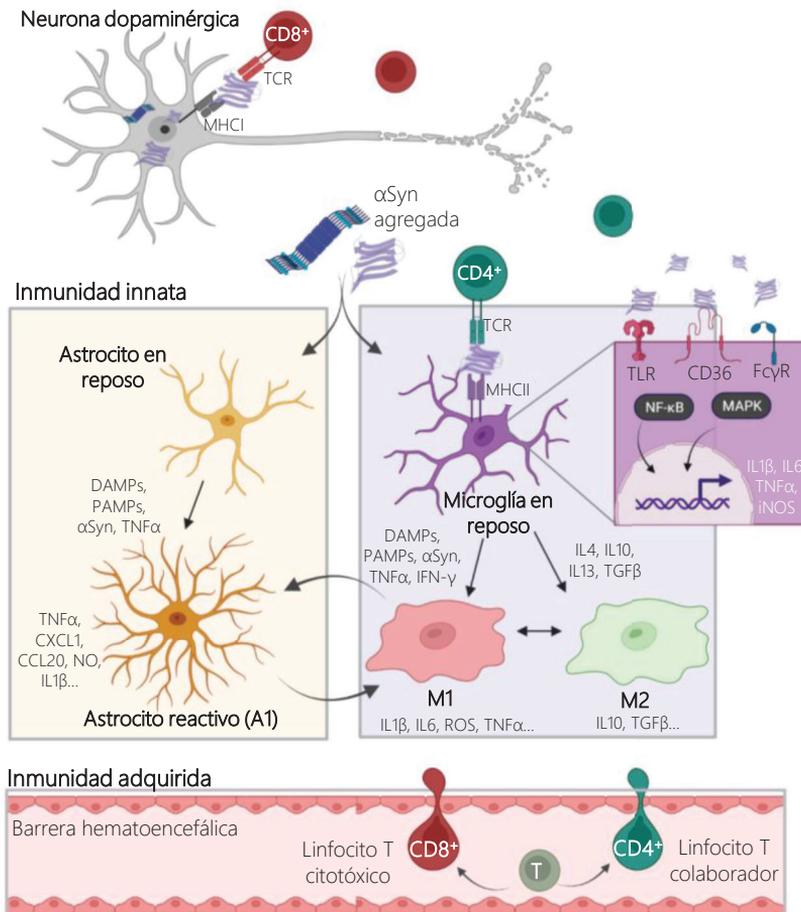
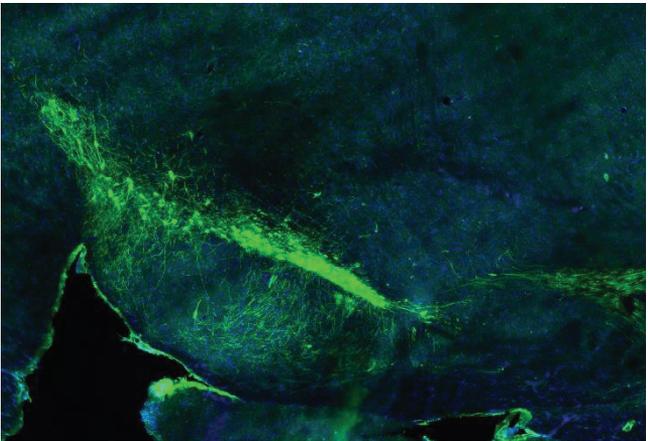
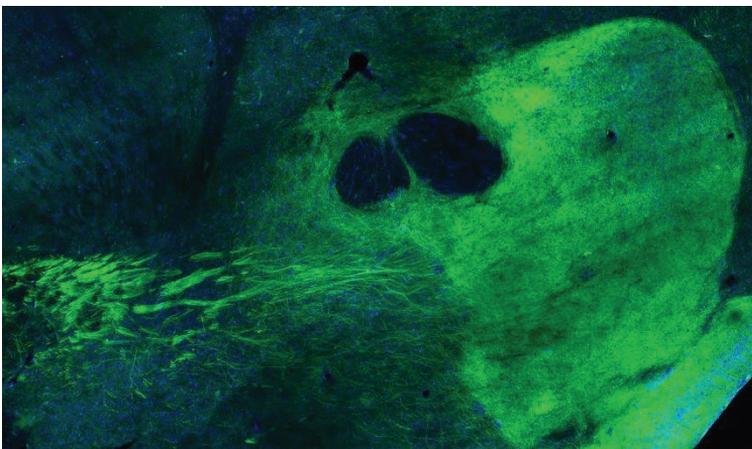


Figura 14. Procesos neuroinflamatorios en la EP asociada a  $\alpha$ Syn. La  $\alpha$ Syn secretada por las neuronas es detectada por la microglía, que la capta para degradarla, y activa las rutas de señalización proinflamatorias. Esto causa la aparición de fenotipos microgliales neurotóxicos (M1) en detrimento de los neuroprotectores (M2), así como de astrocitos reactivos, que agravan la neuroinflamación y el daño neuronal. Los linfocitos T citotóxicos y colaboradores también pueden infiltrarse en el sistema nervioso central y detectar los antígenos de  $\alpha$ Syn, modulando la respuesta inflamatoria. MHC: complejo mayor de histocompatibilidad. TCR: receptor de linfocitos T. Imagen creada con BioRender.

Aunque se han estudiado en menor medida que las respuestas innatas, la EP también puede provocar respuestas inmunes adquiridas, es decir, respuestas neuroinflamatorias que son específicas según los antígenos desencadenantes. Los principales efectores de estas respuestas son los linfocitos T, que modulan a su vez la respuesta de otras células inmunes, y los linfocitos B, que producen respuestas humorales generando anticuerpos específicos (Schonhoff et al., 2020). La infiltración de linfocitos T colaboradores (CD4<sup>+</sup>) y citotóxicos (CD8<sup>+</sup>) del sistema inmunitario periférico se ha detectado en cerebros *postmortem* y modelos de EP (Brochard et al., 2009; Sanchez-Guajardo et al., 2010). Además, se ha visto que péptidos derivados de  $\alpha$ Syn pueden ser reconocidos por linfocitos T colaboradores y citotóxicos derivados de pacientes de EP, actuando de este modo como epítomos antigénicos (Sulzer et al., 2017). Las respuestas adquiridas pueden contribuir al proceso inflamatorio mediante la producción de citoquinas proinflamatorias o la activación de células del sistema inmunitario innato (Schonhoff et al., 2020).



# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS





## HIPÓTESIS

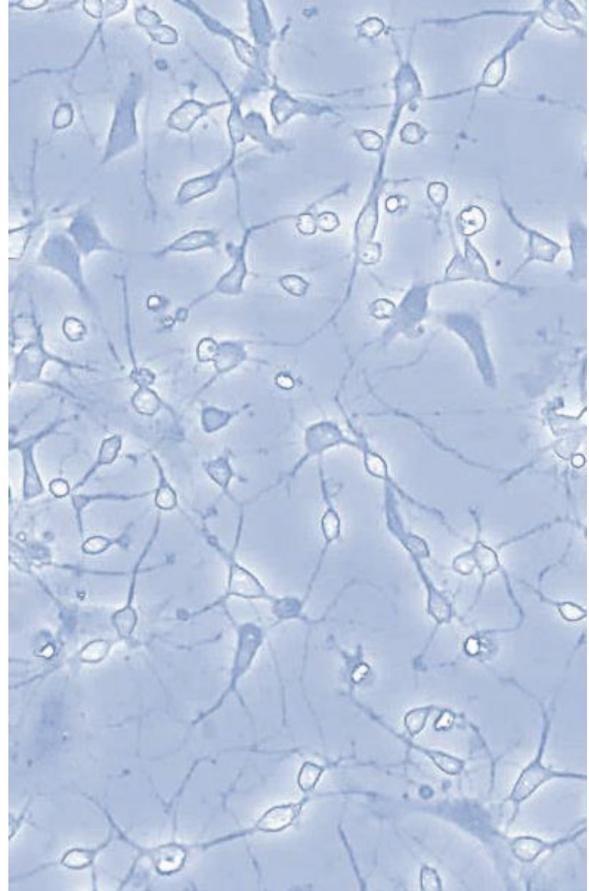
Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto en relación con la fisiopatología de la enfermedad de Parkinson y el protagonismo de la proteína  $\alpha$ Syn en la misma, planteamos la siguiente hipótesis:

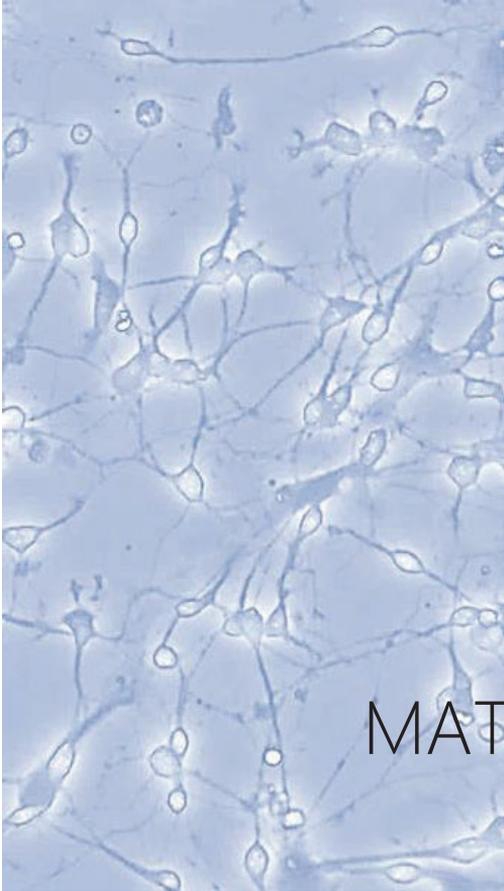
La proteína  $\alpha$ Syn tiene una implicación fisiológica en los procesos celulares afectados en la enfermedad de Parkinson. La alteración de la dosis génica del gen *SNCA*, codificante de  $\alpha$ Syn, puede contribuir a la fisiopatología neurodegenerativa y a la vulnerabilidad neuronal selectiva.

## OBJETIVOS

Con el fin de abordar esta hipótesis, hemos establecido tres objetivos que conllevan el estudio fisiopatológico en paralelo de dos modelos murinos de  $\alpha$ Syn, uno de ausencia y otro de sobreexpresión de dicha proteína, así como el análisis de las regiones implicadas en la vía nigroestriada, como principal eje afectado por la neurodegeneración dopaminérgica:

1. Establecer y caracterizar el fenotipo motor de modelos murinos de ausencia (*Snca knockout* [*Snca*<sup>-/-</sup>]) y sobreexpresión (*SNCA-OVX*) de  $\alpha$ Syn.
2. Conocer el efecto de la ausencia o la ganancia de función de  $\alpha$ Syn en:
  - 2.1. La vía autofágica-lisosomal.
  - 2.2. La homeostasis mitocondrial y de sus contactos de membrana con otros orgánulos determinantes en la fisiopatología de la EP.
  - 2.3. Los procesos neuroinflamatorios relevantes en la neurodegeneración.
3. Estudiar las singularidades en las respuestas de la SN, como región que alberga los somas dopaminérgicos, y el estriado dorsal, como región que contiene los axones dopaminérgicos y las neuronas receptoras de dichas aferencias.





## MATERIAL Y MÉTODOS



## 1. MODELO MURINO

Para el presente estudio se utilizó la cepa B6.Cg-Tg(SNCA)OVX37Rwm *Snca*<sup>tm1Rosl</sup>/J (#023837, The Jackson Laboratory), también denominada SNCA-OVX, un modelo murino de EP familiar asociada a múltiples copias del gen *SNCA*. Esta cepa se obtuvo introduciendo un cromosoma artificial bacteriano con el locus completo de dicho gen, permitiendo que la expresión del transgén *SNCA* recapitule la de la proteína endógena, al insertarse y estar bajo el control del promotor nativo, así como de sus zonas reguladoras. Este modelo fue generado sobre un fondo puro C57BL/6 *Snca*<sup>-/-</sup> mediante cruces con la cepa *Snca*<sup>tm1Rosl</sup> (#003692, The Jackson Laboratory) para evitar interacciones entre la  $\alpha$ Syn endógena y la humana (Janezic et al., 2013). Para estudiar la función fisiológica de  $\alpha$ Syn se aprovechó el fondo *Snca*<sup>-/-</sup> como modelo deficiente en dicha proteína, ya que estos animales tienen interrumpidos los dos primeros exones del gen *Snca* (Abeliovich et al., 2000). Como control se utilizó la cepa de ratón de fondo puro C57BL/6. Todos los procedimientos han sido aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universitat de Barcelona (CEEA-UB) y la Generalitat de Catalunya, con el número de registro C-379/17 (9818).

### 1.1. Expansión de la colonia

La colonia se expandió a partir de individuos hemicigotos para el transgén de  $\alpha$ Syn humana y heterocigotos para el alelo interrumpido del gen *Snca* (*Snca*<sup>+/-</sup> *SNCA*<sup>Tg/0</sup>). Se realizaron los cruces necesarios hasta obtener los genotipos de interés, que se llevaron a homocigosis para asegurar los genotipos embrionarios en los cultivos primarios. Los genotipos obtenidos, por tanto, fueron *Snca*<sup>+/+</sup> como animales silvestres (*wild type*), con ambas copias normales del gen de la  $\alpha$ Syn endógena. En segundo lugar, el genotipo *Snca*<sup>-/-</sup>

como modelo de estudio de la función de  $\alpha$ Syn, ya que posee ambos alelos del gen *Snca* interrumpidos y ausencia de transgén humano; finalmente, el genotipo *Snca*<sup>-/-</sup> *SNCA*<sup>Tg/Tg</sup> (*SNCA*-OVX) es el modelo empleado para el estudio de la fisiopatología de la EP, al poseer el doble de expresión de  $\alpha$ Syn humana respecto a la endógena en los animales silvestres (Janezic et al., 2013). Tanto los animales *Snca*<sup>-/-</sup> como los animales *SNCA*-OVX son viables y fértiles y poseen una esperanza de vida normal. La colonia se expandió inicialmente mediante sistema de cruces continuos. A los 21 días postparto las crías fueron destetadas, sexadas e identificadas mediante perforación de oreja y asignación de número de camada. Se tomó como muestra la propia perforación de oreja para el posterior genotipado. Los animales fueron alojados en la Unidad de Experimentación Animal del Hospital Sant Joan de Déu, en jaulas de tipo 500 (Panlab) con lecho de serrín y viruta para formar los nidos. Las condiciones de alojamiento fueron de 20-23 °C de temperatura, 45-60 % de humedad y ciclos de 12 horas de luz/oscuridad, con comida y agua a demanda.

## 1.2. Sistema de genotipado

Dada la naturaleza del modelo *SNCA*-OVX, el genotipado de esta colonia está compuesto por dos reacciones en cadena de polimerasa (PCR), una de tipo estándar y otra de tipo cuantitativo (qPCR). El DNA genómico (gDNA) se extrajo de muestras de oreja con un kit comercial basado en columnas de purificación (*Quick-DNA Miniprep Plus Kit*, Zymo Research). La concentración y pureza del gDNA obtenido se midió con un NanoDrop One (ThermoFisher Scientific). Por tanto, de cada muestra se determinó: i) la presencia o ausencia del alelo mutante que tiene interrumpidos los primeros exones del gen *Snca* y ii) la presencia y cantidad de transgén *SNCA* para saber si se encontraba en hemigiosis u homocigosis. Las tablas 2 y 3 muestran las secuencias de oligonucleótidos y las condiciones empleadas.

La PCR estándar se llevó a cabo con el *KAPA2G Robust HotStart PCR Kit* (Roche). Los tamaños de los fragmentos generados para cada genotipo fueron: 192 pares de bases (pb) para el alelo mutante (individuos *Snca*<sup>-/-</sup>), 105 pb para el alelo normal (individuos *Snca*<sup>+/+</sup>) y ambas bandas en individuos heterocigotos (*Snca*<sup>+/-</sup>).

La qPCR se realizó utilizando *PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix* (Applied Biosystems) y los oligonucleótidos indicados en la mitad inferior de la Tabla 2. Previamente al genotipado se llevó a cabo una curva patrón y se compararon distintos métodos de extracción de gDNA, para descartar aquellos con presencia de contaminantes que inhibieran la reacción. Se considera una buena curva aquella con una eficiencia de entre 90 y 110 %, una pendiente de -3.3 (la diferencia de ciclos esperada por un factor de dilución 10) y un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de al menos 0.99. Se emplearon 10, 20, 40 y 100 ng totales de gDNA mediante diluciones seriadas y se seleccionó el *Quick-DNA Miniprep Plus Kit* como método de extracción, al cumplir todos los requisitos mencionados. Para el genotipado se utilizaron inicialmente dos puntos de la curva para asegurar los resultados obtenidos (20 y 40 ng) y como controles de genotipo conocido un hemicigoto y un homocigoto para el transgén de  $\alpha$ Syn humana. La qPCR se realizó con el *QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) siguiendo el protocolo de ciclos recomendado por el fabricante, y se analizó con el software correspondiente.

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados para el genotipado de la colonia *SNCA*.

Nombre	Especie	Secuencia (5' → 3')	T <sup>a</sup> anill.
<i>Snca Forward</i>	Ratón	TCAGCCACGATAAACTGAGG	57 °C
<i>Wild type Snca Reverse</i>	Ratón	GTGAGGGCTGTGGGTATCTG	59 °C
<i>Mutant Snca Reverse</i>	Ratón	GCCTGAAGAACGAGATCAGC	57 °C
<i>SNCA Transgene Forward</i>	Humano	CCTCCTGTTAGCTGGGCTTT	57 °C
<i>SNCA Transgene reverse</i>	Humano	ACCACTCCCTCCTTGGTTTT	55 °C
<i>IPC Forward</i>	Ratón	CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT	63 °C
<i>IPC Reverse</i>	Ratón	GTAGGTGGAATTCTAGCATCATCC	67 °C

T<sup>a</sup> anill.: temperatura de anillamiento. IPC: *Internal Positive Control* (gen de la interleuquina-2 murina).

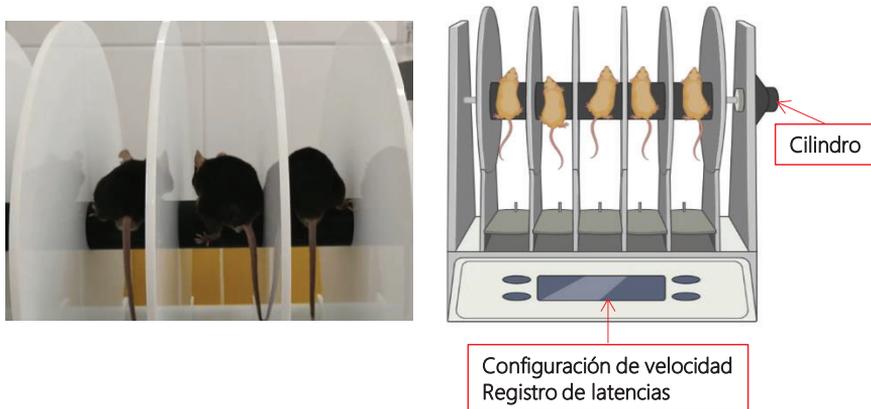
Tabla 3. Programa de ciclos empleado para el genotipado del gen *Snca* por PCR estándar.

Paso	T <sup>a</sup>	Tiempo	Ciclos
1	Desnaturalización inicial	94 °C	2 min
2	Desnaturalización	94 °C	20 s
3	Anillamiento	65 °C	15 s
4	Elongación	68 °C	10 s
5	Desnaturalización	94 °C	15 s
6	Anillamiento	60 °C	15 s
7	Elongación	72 °C	10 s
8	Elongación final	72 °C	2 min
9	Mantenimiento	10 °C	∞

### 1.3. Evaluación motora

#### 1.3.1. Rotarod acelerado

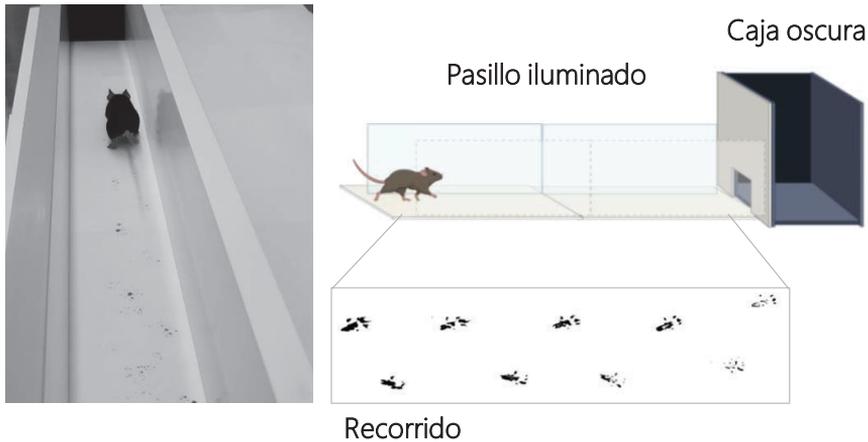
Para evaluar su coordinación motora, los animales fueron sometidos a la prueba del rotarod (Dunham and Miya, 1957). La prueba del rotarod acelerado consiste en colocar al animal en un cilindro que acelera de forma constante desde 4 revoluciones por minuto (rpm) a 40 rpm, durante un período de 5 minutos (Brooks and Dunnett, 2009) (Figura 15). La latencia de caída, es decir, el tiempo que tarda cada animal en caer, nos informará de la coordinación motora del mismo. La prueba se realizó en animales de 3, 6 y 12 meses de edad con un Rota Rod LE8205 (Panlab). Todos los ratones se pesaron previamente a cada prueba para evitar diferencias asociadas al peso, y se aclimataron a la sala durante 1-1.5 horas. Los animales realizaron un día de entrenamiento en el cual cada uno debía mantenerse 60 segundos a una velocidad constante de 4 rpm. Aquellos animales que no superaron este entrenamiento, en un máximo de 10 minutos totales de intentos, fueron descartados de la prueba. La prueba se llevó a cabo en los tres días consecutivos al entrenamiento para poder comparar diferencias en la coordinación motora y en la progresión de cada genotipo en esos tres días (McFadyen et al., 2003). En cada día de prueba (sesión), cada animal realizó tres intentos para completar el periodo de 5 minutos, con un tiempo de descanso de un minuto. Se anotaron las latencias de caída en cada intento y se representó la media de los tres intentos para cada animal, sesión y edad. Las medias se compararon mediante un ANOVA de dos vías de medidas repetidas, con el cual se pudo analizar el efecto de genotipo, de progresión entre sesiones y de interacción entre ambas variables. En caso de ser significativo, el efecto de genotipo se sometió a comparaciones múltiples.



**Figura 15. Prueba del rotarod acelerado.** Imagen real del procedimiento (izquierda) y esquema ilustrativo indicando la situación del cilindro y los animales, y la pantalla de configuración y registro (derecha). Ilustración creada con BioRender.

### 1.3.2. Análisis de huellas

El análisis de las huellas se realizó con el fin de evaluar la forma de caminar de los animales *Sncα<sup>-/-</sup>* y *SNCA-OVX* a los 6 y 12 meses de edad. Los animales se aclimataron a la sala durante 1-1.5 horas. Las patas traseras de cada animal se pintaron con tinta al agua no-tóxica para obtener los recorridos, y cada ratón se colocó al principio de un pasillo iluminado de 70 cm de largo, 9 cm de ancho y 7 cm de alto que terminaba en una caja oscura. El pasillo se recubrió con papel de filtro para que se marcaran las huellas (Figura 16). Cada animal generó tres recorridos consecutivos que fueron escaneados para su posterior análisis mediante el programa ImageJ (NIH, <http://rsb.info.nih.gov/ij>). Se analizaron 9 huellas individuales (3 huellas por recorrido) y 12 medidas de zancadas (4 medidas por recorrido) para cada individuo. Los parámetros analizados en las huellas fueron la expansión de los dedos y la longitud plantar. Los parámetros analizados en las zancadas fueron la longitud y el ángulo.



**Figura 16. Procedimiento para el análisis de huellas.** Imagen real del procedimiento (izquierda) y esquema ilustrativo indicando la situación del pasillo, el animal y la caja, así como el recorrido resultante (derecha). Ilustración creada con BioRender.

#### 1.4. Obtención de muestras frescas de tejido cerebral de ratón

Las muestras de corteza, estriado y mesencéfalo ventral (vM) se obtuvieron tras el sacrificio por dislocación cervical de animales de 6 y 12 meses de edad. Se extrajo el cerebro y se colocó sobre una matriz de disección que permite obtener secciones coronales de 1 mm de grosor. Las muestras de vM se obtuvieron recogiendo las fracciones ventrales correspondientes a la región comprendida entre las coordenadas 2.70 mm y 3.77 mm posteriores a bregma (figuras 53 a 63 del atlas cerebral de ratón de Paxinos y Franklin). Para determinar qué secciones estaban más enriquecidas en *substantia nigra* (SN) se seleccionaron, posteriormente, mediante la inmunodetección del marcador dopaminérgico tirosina hidroxilasa (TH) por *Western blot*, siendo las fracciones 12 y 13 las seleccionadas en disecciones posteriores (Figura 17). El estriado y la corteza se diseccionaron manualmente (Spijker, 2011). Todas las muestras se congelaron inmediatamente en N<sub>2</sub> líquido y se almacenaron a -80 °C para su posterior extracción proteínica. En caso de extracción de RNA, las muestras se sumergieron en trizol según su peso y se almacenaron a -80 °C.

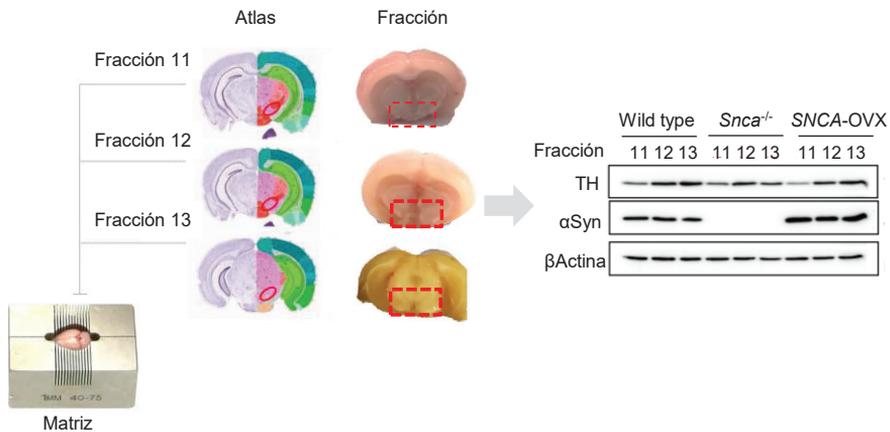


Figura 17. Procedimiento de disección y selección de muestras de mesencéfalo ventral. La matriz de disección permite la ubicación del cerebro y su división en fracciones de 1 μm. Las fracciones aproximadas correspondientes a la localización de la *substantia nigra*, tomando como referencia el atlas de Paxinos y Franklin, se recogieron de forma individual. Estas fracciones se sometieron a *Western blot* para detectar aquellas con mayor cantidad de tirosina hidroxilasa, como forma indirecta de seleccionar las fracciones con más neuronas dopaminérgicas.

### 1.5. Obtención de cortes cerebrales fijados mediante perfusión intracardíaca

La perfusión intracardíaca se realizó en animales de 3, 6 y 12 meses previamente anestesiados. La anestesia se administró vía intraperitoneal y consistía en una mezcla de ketamina/xilacina (100/10 mg/kg). Previamente al procedimiento se evaluó el plano anestésico con el reflejo de la estación (intento de incorporación sobre las extremidades) y el reflejo podal tras la compresión de los dedos de las extremidades. Una vez comprobada la desaparición de estos reflejos, se procedió a la apertura de la cavidad torácica para acceder al ventrículo izquierdo, donde se insertó la aguja conectada a la bomba de infusión intravenosa (Alaris CC), y se realizó una incisión en la aurícula derecha para permitir la salida de flujo del sistema circulatorio. El flujo de bombeo se fijó a 300 mL/h y se inyectaron 100 mL de tampón fosfato

salino (PBS), para la limpieza del tejido, seguidos de 100 mL de paraformaldehído (PFA) al 4 % en PBS como fijador. Una vez concluida la perfusión, se extrajo el cerebro ya fijado del cráneo y se llevó a cabo una postfijación de 24 horas en PFA 4 % en PBS. El cerebro fue entonces criopreservado con un gradiente de sacarosa, sumergiéndolo sucesivamente en tampón fosfato (PB) 0.1 M al 10 %, 20 % y 30 % de sacarosa. La inclusión de los cerebros en medio de congelación OCT se realizó colocándolos en un baño de isopentano sobre N<sub>2</sub> líquido. Una vez embebidas en OCT, las muestras se guardaron a -80 °C o se colocaron en el criostato (Leica Biosystems) para proceder a la obtención de secciones de 40 μm de grosor. Los cortes se recogieron en placas con solución anticongelante (30 % glicerol, 30 % etilenglicol, 40 % PB 0.1 M, pH 7.4) y se guardaron a -20 °C hasta su uso.

## 2. MODELOS CELULARES

### 2.1. Cultivo primario de mesencéfalo ventral

El cultivo primario de neuronas dopaminérgicas se llevó a cabo mediante la disección del mesencéfalo ventral de embriones a 12.5 y 14.5 días de gestación. Los embriones se extrajeron de los cuernos uterinos y se colocaron en placas con medio de disección GHEBS (*glucose HEPES buffer solution*; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 22.2 mM glucosa, 25 mM HEPES, pH 7.4, y 20 IU/mL penicilina más 20 mg/mL de estreptomicina) en hielo. El cerebro se extrajo y se sometió a dos cortes para aislar el mesencéfalo del prosencéfalo y rombencéfalo. Las meninges fueron eliminadas y el mesencéfalo se abrió por la parte dorsal, de forma que la parte ventral quedó en el centro de la pieza y se descartaron las regiones externas (dorsales). En condiciones de esterilidad, los mesencéfalos se lavaron con GHEBS estéril y se procedió a su digestión enzimática. La digestión enzimática se realizó con papaína a 0.3 mg/mL

(Roche) en GHEBS, suplementada con DNasa I (Roche) a 1 mg/mL, durante 15 minutos a 37 °C. La digestión se inactivó con el medio de siembra, *Dubelcco's Modified Eagle Medium* con la mezcla de nutrientes F-12 (DMEM/F-12) (Merck) suplementado con 10 % de suero bovino fetal (FBS) inactivado, 10 % de suero de caballo y gentamicina 10 µg/mL. Se procedió entonces a la disgregación mecánica hasta obtener una suspensión celular homogénea, descartando los trozos restantes no disgregados. La mezcla se filtró con un tamiz celular de 40 µm de tamaño de poro (Corning) y se centrifugó a 100 g durante 5 minutos. El pellet se resuspendió en el medio de siembra, y se procedió al conteo celular con cámara de Neubauer y ajustándose la suspensión a la concentración deseada. Las células se sembraron en placas p24 (Sarstedt) con cubreobjetos de 12 mm (VWR) pretratados con poli-D-lisina (Merck) a 100 µg/mL en tampón bórico-borato 150 mM, pH 8.3, y laminina (Merck) a 10 µg/mL en medio de siembra, ambas incubadas durante una noche a 37 °C. Las neuronas se mantuvieron hasta el día *in vitro* (DIV) 7, realizando un cambio del 50 % del medio a DIV4.

## 2.2. Cultivo primario estriatal

El cultivo primario de neuronas estriatales se llevó a cabo mediante la disección de los dos estriados de embriones a 16.5 días de gestación. Los embriones se extrajeron de los cuernos uterinos y se colocaron en placas con medio de disección GHEBS en hielo. El cerebro se extrajo y se eliminaron las meninges. Mediante dos cortes corticales paralelos a la línea media se accedió a los estriados para su recolección. En condiciones de esterilidad, los estriados se lavaron con GHEBS estéril y se procedió a su digestión enzimática con tripsina al 0.05% (Merck) a 37 °C durante 10 minutos. La tripsina se inactivó con DMEM/F-12 suplementado con 10 % FBS inactivado y 10 µg/mL de gentamicina (Gibco). Se procedió entonces a la disgregación mecánica hasta

obtener una suspensión celular homogénea, descartando los trozos restantes no disgregados. La mezcla se filtró con un tamiz celular de 40  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro (Corning) y se centrifugó a 200 g durante 5 minutos. El pellet se resuspendió en 1 mL de medio Neurobasal (Gibco) suplementado con 1 % de GlutaMax (Merck), 2% de B-27 (Gibco) y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de gentamicina (Gibco). Se procedió al conteo celular con cámara de Neubauer y se ajustó la suspensión a la concentración deseada. Las células se sembraron en placas p24 (Sarstedt) con cubreobjetos de 12 mm (VWR) para inmunofluorescencia, o en placas p6 para *Western blot*. Las placas fueron pretratadas con poli-D-lisina (Merck) a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en tampón bórico-borato 150 mM, pH 8.3, y laminina (Merck) a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en medio de siembra, ambas incubadas durante una noche a 37 °C. Las neuronas se mantuvieron hasta DIV7, realizando un cambio del 50 % del medio a DIV4 (Figura 18), en el cual se añadió citarabina (AraC) a 1  $\mu\text{M}$  y se eliminó el FBS para evitar la proliferación excesiva de células gliales.

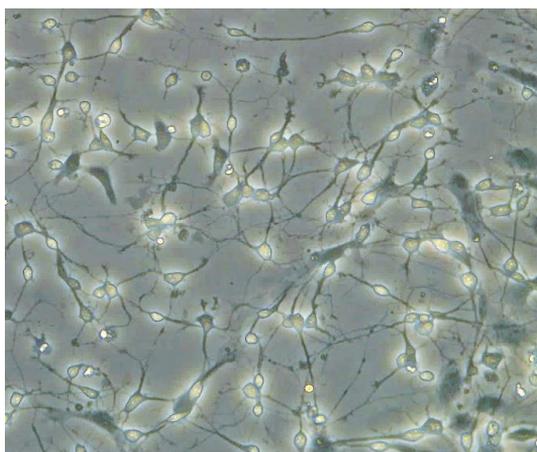


Figura 18. Neuronas estriatales embrionarias en cultivo a DIV4. Imagen de campo claro con el objetivo 20x.

### 2.3. Tinciones y tratamientos

Para visualizar las mitocondrias, las neuronas en cultivo de vM se tiñeron con *MitoTracker DeepRed* (MTDR) (Invitrogen) a 200 nM durante 30 minutos a 37

°C, tras lo cual se continuó con el procedimiento habitual de fijación e inmunofluorescencia para la detección de TH (página 75). Para la inhibición lisosomal, las neuronas estriatales se trataron con Bafilomicina A1 (Merck) a 200 nM durante 4 horas a 37 °C.

### 3. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

#### 3.1. Inmunodetección de proteínas por *Western blot*

##### 3.1.1. *Extracción, cuantificación de proteína y preparación de muestras*

El extracto proteínico de las muestras cerebrales diseccionadas se obtuvo añadiendo entre 100 y 500  $\mu\text{L}$  de tampón de lisis (50 mM Tris HCl a pH 7.4, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 % Tritón X-100), suplementado con inhibidores de proteasas (0.1 mM PMSF y cóctel de inhibidores de Roche 1x) y fosfatasa (50 mM NaF y 1 mM  $\text{Na}_2\text{VO}_3$ ). Las muestras se mantuvieron en hielo durante todo el procedimiento y se homogeneizaron con un homogeneizador *Polytron*. En el caso de los cultivos neuronales, se añadieron entre 75 y 100  $\mu\text{L}$  de tampón de lisis al pocillo, y se despegaron y recogieron las neuronas utilizando un *scraper* o rascador celular (Sarstedt). Tras 20 minutos de incubación con tampón de lisis, las muestras se sometieron a una centrifugación de 13200 rpm 20 minutos a 4 °C. La concentración proteínica del sobrenadante (extracto proteínico) se cuantificó por colorimetría con el *Pierce BCA Protein Assay Kit* (ThermoFisher Scientific), con concentraciones conocidas de seroalbúmina bovina (BSA) para establecer la recta patrón. Se prepararon muestras de 30-40  $\mu\text{g}$  de proteína total con la cantidad de tampón de carga 4x (62.5 mM Tris HCl a pH 6.8, 10 % glicerol, 2.3 % SDS, 0.1 % azul de bromofenol, 5 %  $\beta$ -mercaptoetanol) correspondiente, y se hirvieron a 95 °C durante 5 minutos. Las muestras hervidas se guardaron a -20 °C hasta su uso o se cargaron directamente en geles de poliacrilamida.

### 3.1.2. Electroforesis en geles SDS-PAGE

Las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) para la separación de proteínas por tamaño. El gel separador se preparó con bis-acrilamida al 5-15 %, según los tamaños de las proteínas de interés, en tampón Tris HCl a 1.5 M y 14 mM SDS a pH 8.8. El gel concentrador se preparó con bis-acrilamida al 4.75 % en tampón Tris HCl a 0.5 M y 14 mM SDS a pH 6.8. En ambos geles se añadieron tetrametiletilendiamina (TEMED) y persulfato de amonio como agentes de catálisis y polimerización de acrilamida. El gel corrió en condiciones desnaturizantes en tampón de electroforesis (25mM Tris HCl, 200 mM glicina y 1.7 mM SDS) a voltaje constante de 70-90 V. Para el marcaje de los pesos moleculares se cargó el marcador de peso molecular *PageRuler Prestained Protein Ladder* (ThermoFisher Scientific).

### 3.1.3. Transferencia húmeda y Western blot

Posteriormente a la electroforesis en gel, las muestras fueron electro-transferidas a membranas de PVDF de 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro (GE Healthcare) para la detección de las proteínas de interés. La transferencia se llevó a cabo durante 90 minutos a 4 °C, a un voltaje constante de 90 V, en tampón de transferencia (25 mM Tris HCl a pH 8, 19.2 mM glicina y 10-20 % metanol). Las membranas se bloquearon con 5 % de leche desnatada en polvo o BSA en solución salina tamponada con Tris, con Tween (TBS-T: 25 mM Tris HCl a pH 8, 50 mM NaCl, 2.5 mM KCl y 0.1 % Tween-20), para minimizar las interacciones inespecíficas. A continuación, se incubaron con los anticuerpos primarios (página 79) para la detección de las proteínas de interés, diluidos en TBS-T (pudiendo suplementarse con 5% de leche o BSA, según las necesidades del anticuerpo). La incubación se llevó a cabo durante toda la noche a 4 °C en agitación. Los restos de anticuerpo primario no unido

se eliminaron de la membrana mediante tres lavados con TBS-T en agitación. Se procedió entonces a la incubación, durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación, con los anticuerpos secundarios correspondientes (página 80), conjugados a HRP y diluidos en TBS-T con 5 % de leche desnatada en polvo. Tras esta incubación, se lavó el excedente de anticuerpo secundario con tres lavados con TBS-T en agitación y se procedió al revelado de las membranas. La detección quimioluminiscente se realizó incubando las membranas 2 minutos con una mezcla 1:1 de los reactivos del *Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare), y se procedió al revelado en el *iBrigh CL1000 Imaging System* (ThermoFisher Scientific). La cuantificación densitométrica de las bandas se realizó mediante el programa ImageJ (NIH, <http://rsb.info.nih.gov/ij>) y se relativizaron las proteínas de interés a las proteínas control correspondientes (proteínas no fosforiladas o proteínas *housekeeping*).

### 3.2. Inmunodetección de proteínas por inmunofluorescencia

#### 3.2.1. *Inmunofluorescencia en cortes de tejido fijado congelado*

Los restos de anticongelante se eliminaron de los cortes de interés mediante dos lavados de 30 minutos en PB y un lavado de 5 minutos en PBS. Los cortes se sumergieron entonces en solución de bloqueo y permeabilización (4 % BSA, 5 % suero de cabra o burro y 0.1 % tritón en PBS), tras lo cual se lavaron con PBS y se incubaron en flotación durante 48-72 horas con los anticuerpos primarios (página 79) diluidos en solución de incubación (4 % BSA, 1 % suero de cabra o burro, opcionalmente 0.1 % Tritón X-100, en PBS), a 4 °C. Tras lavar el excedente de anticuerpo primario con PBS, los cortes se incubaron durante 2 horas en flotación con los anticuerpos secundarios correspondientes (página 80), diluidos en solución de incubación. Finalmente, se llevaron a cabo dos lavados sobre el tejido, durante 20 minutos en PB, y un último lavado de 20

minutos en PBS, tras el cual se procedió al montaje de los cortes sobre portaobjetos en *Fluoromount-G Mounting Medium* con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Invitrogen), sellándose a continuación los cubreobjetos sobre el portaobjetos.

### 3.2.2. *Inmunofluorescencia de neuronas en cultivo*

Las neuronas sembradas en cubreobjetos de 12 mm (VWR) se fijaron durante 20 minutos con PHEM (60 mM Pipes, 25 mM HEPES, 5 mM EGTA, 1 mM MgCl<sub>2</sub>) suplementado con 0.25 % de glutaraldehído, 4 % de PFA y 4 % de sacarosa, pH 7.4. Se hicieron tres lavados para eliminar los restos de fijador, con PB 0.1 M, y se guardaron las células en PB con azida sódica al 0.2 % a 4 °C hasta su uso. En caso de continuar con el procedimiento de inmunofluorescencia, las neuronas se incubaron 1.5 horas en solución de permeabilización y bloqueo (4 % BSA, 0.5 % Tritón X-100 en PB 0.1 M), y toda la noche con los anticuerpos primarios (página 79) diluidos en la misma solución, a 4 °C. Se eliminó el anticuerpo primario con tres lavados de PB, tras lo cual se incubaron las células 1.5 horas en solución de permeabilización y bloqueo con los anticuerpos secundarios correspondientes (página 80). Se eliminó el anticuerpo secundario con tres lavados de PB y se procedió al montaje sobre portaobjetos en *Fluoromount-G Mounting Medium* con DAPI (Invitrogen), sellándose a continuación los cubreobjetos sobre el portaobjetos.

### 3.3. Análisis de interacciones proteínicas mediante Ensayo de Ligación por Proximidad (PLA)

Las neuronas estriatales sembradas en cubreobjetos se fijaron con PHEM, y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.4 % durante 10 minutos. Posteriormente, se procedió según las instrucciones del kit comercial (*Duolink In Situ Proximity Ligation Assay*, Merck). Brevemente, las neuronas se

incubaron con la solución de bloqueo 1 hora en una cámara húmeda precalentada a 37 °C. A continuación, se incubaron con los anticuerpos primarios específicos diluidos (1/200) en la solución correspondiente, durante una noche a 4 °C en la cámara húmeda. Al día siguiente, se llevó a cabo la incubación con las sondas, complementarias y dirigidas a cada anticuerpo primario, durante 1 hora a 37 °C en la cámara húmeda, y la ligación de las mismas, durante 30 minutos a 37 °C. Finalmente, la amplificación se llevó a cabo incubando las neuronas con la enzima diluida según lo indicado, durante 100 minutos a 37 °C en la cámara húmeda. Entre cada paso se realizaron los lavados con los tampones y los tiempos indicados. Para visualizar las neuronas, tras el ensayo de ligación se llevó a cabo una inmunofluorescencia para detectar el marcador neuronal  $\beta$ III-tubulina (TUBB3), según lo descrito en el apartado anterior. El montaje final sobre portaobjetos se realizó en *Duolink In Situ Mounting Medium* con DAPI, y las preparaciones se guardaron a -20 °C hasta su visualización.

#### 4. TRANSCRIPTÓMICA (RNASEQ)

La extracción de RNA se llevó a cabo en muestras de estriado y vM tras su homogeneización en trizol con el kit *Direct-zol™ RNA Miniprep* (Zymo Research), siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se cuantificó la concentración de RNA de las muestras en el fluorímetro Qubit™ 4 (Invitrogen), utilizando para ello el *Qubit RNA BR Assay Kit* (Life Technologies). La calidad de las muestras fue analizada por parte del Centro Nacional de Análisis Genómico (CNAG-CRG) mediante un ensayo de RNA 6000 *Nano Bioanalyzer* (Agilent Technologies) y se comprobó su integridad (RIN>7). El análisis bioinformático posterior se llevó a cabo en la Unidad de Bioinformática del Hospital Sant Joan de Déu. En primer lugar, se llevó a cabo un control de calidad de los datos crudos (archivos FASTQ) utilizando el *software* FastQC

([www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/](http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/)), y los adaptadores y las bases de baja calidad (Phred score < 20) se eliminaron con el *software* Cutadapt (Martin, 2011). Las lecturas se alinearon con STAR (Dobin et al., 2013) y con el método de pseudoalineamiento Kallisto (Bray et al., 2016) para la cuantificación de genes. Se realizó un Análisis de Componentes Principales para garantizar la calidad de las muestras. Para obtener la expresión diferencial de genes se utilizó DESeq2 (Love et al., 2014) aplicando una distribución binomial negativa. El análisis de enriquecimiento de los genes diferencialmente expresados se realizó con la base de datos DAVID (Huang et al., 2009a, 2009b), y se eliminaron los términos redundantes de componentes celulares para su visualización utilizando la herramienta REVIGO (Supek et al., 2011) con los parámetros por defecto. El *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA) se hizo con GenePattern (Reich et al., 2006) utilizando el módulo ontológico c5.all.v7.4. Los *heatmaps* se generaron con la función heatmap.2 del paquete gplot de R.

## 5. MICROSCOPIA

### 5.1. Microscopía óptica

Las imágenes de campo claro de cultivos neuronales se tomaron con un microscopio invertido Leica DMIL LED Fluo (Leica Microsystems), utilizando los objetivos de 10x y 20x aumentos.

### 5.2. Microscopía confocal

Las imágenes de microscopía de fluorescencia fueron adquiridas con el microscopio confocal Leica TCS SP8 X White Light Laser (Leica Microsystems), utilizando los objetivos HC PL APO CS 10x/0.40 DRY y HC PL APO CS2 20x/0.75 IMM para las muestras de tejido cerebral, y el objetivo de aceite HC

PL APO CS2 63x/1.40 OIL para los cultivos neuronales. Para los tejidos cerebrales a 10x se tomaron imágenes de 15 planos en Z a 3.5  $\mu\text{m}$  de grosor; para los de 20x, 15 planos a 1.5  $\mu\text{m}$  de grosor. Las imágenes de cultivos neuronales se adquirieron a 63x, y se tomaron de 8 planos en Z a 1  $\mu\text{m}$  de grosor, o de 15 planos a 0.6  $\mu\text{m}$  de grosor en caso de requerir mayor detalle de imagen. La configuración de láser se mantuvo para los análisis de intensidades, fijando los parámetros en la muestra de mayor intensidad. El procesamiento de imágenes se realizó con el programa *Leica Application Suite X* (LAS X) (Leica Microsystems).

### **5.3. Microscopía electrónica de transmisión**

La preparación de muestras para microscopía electrónica se realizó en colaboración con el Centro de Biotecnología Animal y Terapia Génica (CBATEG) de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB). Las regiones de interés (estriado y SN) se obtuvieron según lo descrito anteriormente. Las secciones de 1  $\text{mm}^2$  se fijaron en 2.5 % de glutaraldehído, 2 % de PFA en PB, ajustado a pH 7.7, a 4°C. A continuación, se procedió a realizar varios lavados con PB 0.1 M y a la postfijación y contraste de las muestras con tetraóxido de osmio al 1 % durante una hora a 4 °C. Las muestras fueron lavadas con agua mili Q y deshidratadas en acetona a concentraciones crecientes. Posteriormente, para su inclusión, se sumergieron en ratios crecientes de resina:acetona. Una vez las muestras quedaron completamente infiltradas en resina Spurr, se llevó a cabo la polimerización de la misma, durante 3 días a 60 °C. Las secciones semifinas y ultrafinas (70 nm) se obtuvieron con el ultramicrotomo Leica EM UC6 (Leica Microsystems). Previa observación con el microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM-1400 (Jeol Ltd., Tokyo, Japan), las rejillas fueron contrastadas con citrato de plomo (solución Reynolds) y acetato de uranio.

## 6. ANTICUERPOS

Tabla 4. Anticuerpos primarios empleados en este trabajo

Proteína	Tipo	Referencia y casa comercial	Dilución y uso
αSyn	Monoclonal ratón	3H2897 (SCBT)	1/500 (WB)
αSyn	Policlonal conejo	2628 (CST)	1/50 (IF)
α-Tubulina	Monoclonal ratón	T6199 (Sigma-Merck)	1/2000 (WB)
β-Actina	Monoclonal ratón	A5316 (Sigma-Merck)	1/8000 (WB)
Beclina-1	Policlonal conejo	3738 (CST)	1/1000 (WB)
CD206	Policlonal cabra	AF2535	1/100 (IF)
CD86	Policlonal rata	553689 (BD Biosci.)	1/100 (IF)
DARPP-32	Monoclonal ratón	sc-271111 (SCBT)	1/50 (IF)
DRD1	Policlonal rata	D2944 (Sigma-Merck)	1/200 (IF)
DRD2	Policlonal conejo	AB5084P (Millipore)	1/200(IF)
ERK1/2	Policlonal conejo	4695 (CST)	1/300 (WB)
GDAP1	Policlonal conejo	HPA024334 (Sigma-Merck)	1/500 (WB)
Iba1	Policlonal conejo	O19-19741 (Wako)	1/200 (IF)
JNK	Policlonal conejo	9252 (CST)	1/300 (WB)
Lamp1	Policlonal conejo	ab24170 (Abcam)	1/100 (IF)
Lamp1	Policlonal conejo	L1418 (Sigma-Merck)	1/500 (WB)
LC3B	Policlonal conejo	L7543 (Sigma-Merck)	1/500 (WB)
NFκB	Policlonal conejo	3034 (CST)	1/300 (WB)
p62	Policlonal conejo	P0067 (Sigma-Merck)	1/100 (IF) 1/500 (WB)
p-ERK1/2	Policlonal conejo	4370 (CST)	1/500 (WB)
p-JNK	Policlonal conejo	9251 (CST)	1/300 (WB)
p-NFκB	Policlonal conejo	3031 (CST)	1/300 (WB)
TH	Monoclonal ratón	22941 (ImmunoStar)	1/5000 (IF) 1/1000 (WB)
TH	Policlonal conejo	P40101 (Pel-Freez Bio)	1/1000 (IF)
TUBB3	Monoclonal ratón	G7121 (Promega)	1/800 (IF)
TUBB3	Policlonal conejo	T2200 (Merck)	1/500 (IF)

Tabla 5. Anticuerpos secundarios empleados en este trabajo

Nombre	Referencia y casa comercial	Dilución y uso
Goat anti-Mouse IgG (H+L) Alexa Fluor 488	A-11029 (Invitrogen)	1/500 (IF)
Goat anti-Mouse IgG (H+L) Alexa Fluor 594	A-11032 (Invitrogen)	1/500 (IF)
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor 488	A-11034 (Invitrogen)	1/500 (IF)
Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor 594	A-21207 (Invitrogen)	1/500 (IF)
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor 633	A-21070 (Invitrogen)	1/500 (IF)
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) HRP	31460 (Invitrogen)	1/10000 (WB)
Goat anti-Mouse IgG (H+L) HRP	62-6520 (Invitrogen)	1/10000 (WB)

IF: inmunofluorescencia. WB: *Western blot*

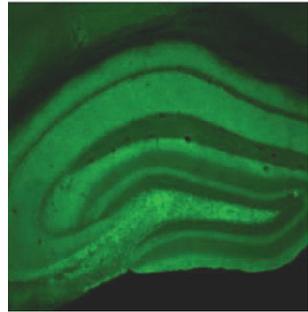
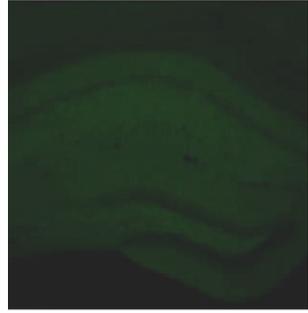
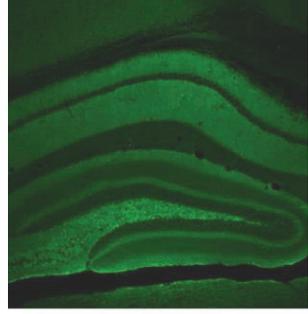
## 7. ANÁLISIS DE DATOS

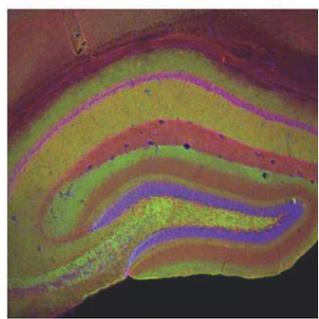
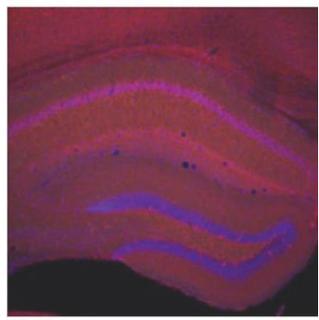
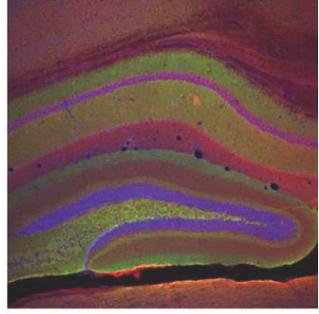
### 7.1. Análisis de imagen

El análisis de imagen se realizó con el programa ImageJ (NIH, <http://rsb.info.nih.gov/ij>), con la proyección máxima de los planos en Z. Para la comparativa de intensidades, las imágenes de tejido estriatal se analizaron seleccionando varios campos como regiones de interés (ROIs), y sustrayendo la intensidad de fondo de cada campo. Las imágenes de SNc se analizaron en ROIs celulares, descartando la zona del núcleo, y sustrayendo la intensidad de fondo adyacente a cada célula. Los análisis de área se hicieron mediante ROIs o estableciendo umbrales. Los contajes de puntos o células se realizaron con la herramienta *Multi point*. El análisis de p62 en áreas no dopaminérgicas se llevó a cabo con MATLAB R\_2018a (The MathWorks Inc.).

## 7.2. Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo con el software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc.). Se evaluó la normalidad de los datos utilizando los tests de Kolmogorov-Smirnov, D'Agostino-Pearson y Shapiro-Wilk. En caso de cumplir la distribución normal, los genotipos se compararon con la prueba ANOVA de una vía; en caso de no cumplirla o de baja  $n$ , se realizó la prueba no paramétrica Kruskal Wallis. Si el resultado obtenido era estadísticamente significativo, las comparaciones múltiples se realizaron, respectivamente, con el test LSD de Fisher y el test de Dunn, indicándose en la propia figura de la siguiente forma:  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ . Para el análisis de dos variables independientes y su interacción, se realizó la prueba ANOVA de dos vías, indicándose en el pie de figura los  $P$  valor y estadísticos  $F$  relevantes. Las gráficas se hicieron utilizando el paquete ggplot2 de R, representándose los datos en gráficos de barras en caso de pruebas paramétricas, y en diagramas de cajas en caso de pruebas no paramétricas.





# RESULTADOS



## CAPÍTULO I.

### CARACTERIZACIÓN DE LOS MODELOS MURINOS DE AUSENCIA O *KNOCKOUT* ( $SNCA^{-/-}$ ) Y SOBREENPRESIÓN ( $SNCA$ -OVX) DE $\alpha$ SYN

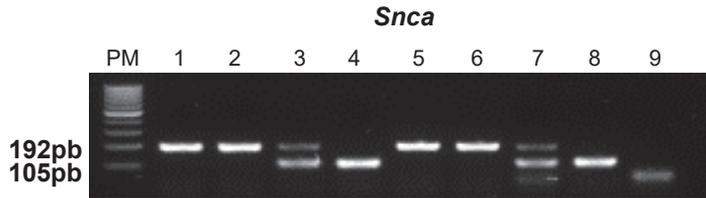
Para el establecimiento de los dos modelos murinos se adquirieron ratones comerciales de la cepa B6.Cg-Tg( $SNCA$ )OVX37Rwm*Snca*<sup>tm1Rosl</sup>/J de The Jackson Laboratory. Los animales recibidos eran heterocigotos para el alelo mutante sin los exones 1 y 2 del gen *Snca* y no transgénicos ( $Snca^{+/-}$ ), o hemicigotos para el transgén que contiene el locus completo  $SNCA$  humano silvestre ( $Snca^{+/-}$ ,  $SNCA^{Tg/0}$ ). Estos ratones fueron utilizados para la creación de la colonia inicial con los tres genotipos de interés: ratones sin  $\alpha$ Syn endógena ( $Snca^{-/-}$ ), ratones con sobreexpresión de  $\alpha$ Syn humana sobre un fondo sin  $\alpha$ Syn murina ( $Snca^{-/-}$ ,  $SNCA^{Tg/Tg}$ ), denominados  $SNCA$ -OVX, y ratones no-transgénicos con una dotación normal de  $\alpha$ Syn endógena ( $Snca^{+/+}$ ), que constituirían el modelo control silvestre (*wild type*).

Debido a la propia naturaleza del modelo de EP, de sobreexpresión de  $\alpha$ Syn humana sobre un fondo *knockout*, decidimos aprovechar el modelo *knockout* de la proteína endógena como control de transgén y, además, extraer información acerca de la función biológica de  $\alpha$ Syn en las vías fisiopatológicas estudiadas.

#### 1.1. Establecimiento de las colonias murinas de $\alpha$ Syn mediante sistema de doble genotipado

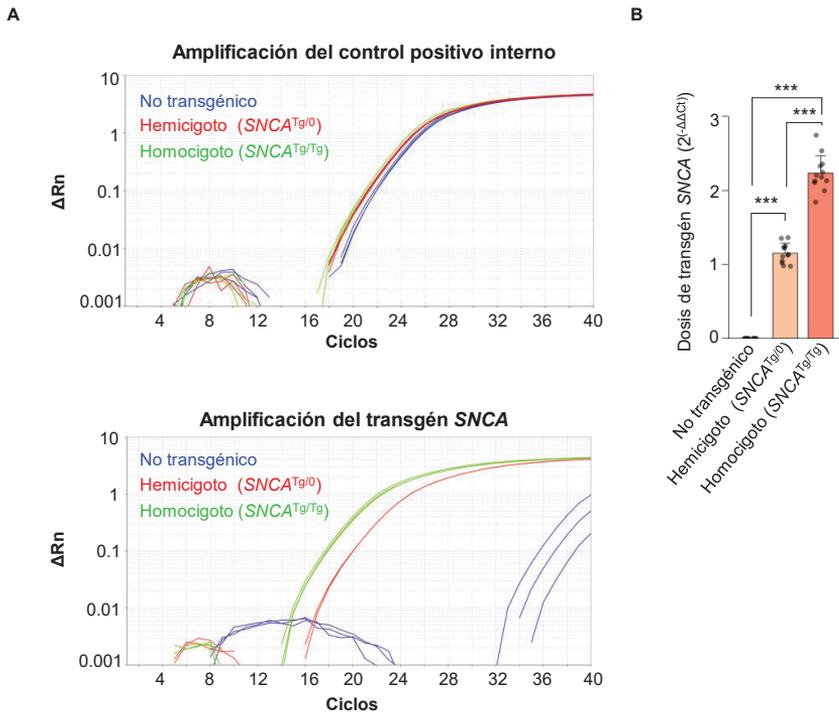
Para la amplificación de la colonia necesitábamos un doble genotipado que consistía, en primer lugar, en una PCR estándar para determinar la presencia o ausencia de  $\alpha$ Syn endógena. El tamaño del amplificado cambiaba de 105 a 192 pares de bases (pb) cuando el alelo estaba mutado, debido a la presencia

del *cassette* que permite la delección de los exones 1 y 2. Una banda de 105 pb, por tanto, determinaría la presencia del alelo silvestre (*Snca*<sup>+/+</sup>); dos bandas, de 105 y 192 pb, aparecerían en el caso de individuos heterocigotos (*Snca*<sup>+/-</sup>); y una única banda, de 192 pb, sería lo esperado en caso de un animal con los dos alelos delecionados (*Snca*<sup>-/-</sup>) (Figura 19).



**Figura 19. Genotipado del modelo murino *Snca*<sup>-/-</sup>.** Productos de la PCR del gen de la  $\alpha$ Syn murina, obtenidos en animales *Snca*<sup>-/-</sup> (192 pb, carriles 1, 2, 5 y 6), *Snca*<sup>+/-</sup> (105 y 192 pb, carriles 3 y 7) y *Snca*<sup>+/+</sup> (105 pb, carriles 4 y 8). PM: Marcador de peso molecular. Carril 9: control negativo de la reacción.

Una vez expandimos la colonia silvestre y *Snca*<sup>-/-</sup>, procedimos a la obtención de animales hemicigotos para el transgén sobre un fondo *knockout*, derivados de cruces entre animales *Snca*<sup>-/-</sup> y animales *Snca*<sup>+/-</sup>, *SNCA*<sup>Tg/0</sup>. Los individuos obtenidos, hemicigotos sin  $\alpha$ Syn endógena, se cruzaron entre ellos hasta generar el genotipo en homocigosis deseado (*Snca*<sup>-/-</sup>, *SNCA*<sup>Tg/Tg</sup>), que constituiría nuestro modelo *SNCA*-OVX. Para ello, necesitábamos determinar cuantitativamente la cantidad de transgén para distinguir los individuos hemicigotos de los homocigotos entre la descendencia. Realizamos qPCRs de gDNA, utilizando como controles iniciales los animales comerciales hemicigotos y no transgénicos recibidos. Según lo esperado, confirmamos que los homocigotos para el transgén contaban con el doble de dosis que los individuos hemicigotos conocidos, reflejado por el  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ . Los animales no transgénicos, por su parte, no mostraban amplificación puesto que los oligonucleótidos cebadores estaban diseñados para la detección específica del transgén humano (Figura 20).



**Figura 20. Genotipado del modelo transgénico  $SNCA^{Tg/Tg}$  ( $SNCA$ -OVX)** (A) Curvas de amplificación representativas, obtenidas para el gen control (panel superior) y para el transgén  $SNCA$  (panel inferior), en un animal no transgénico (azul),  $SNCA^{Tg/0}$  (rojo) y  $SNCA^{Tg/Tg}$  (verde). (B) Cuantificación de la dosis de transgén para el genotipado de individuos no transgénicos,  $SNCA^{Tg/0}$  y  $SNCA^{Tg/Tg}$  ( $n = 12$ ), obtenida tras la normalización con el gen control (ver Tabla 2). Los datos están expresados como media  $\pm$  desviación estándar (SD) y los puntos representan valores de animales individuales. Rn: valor del reportero normalizado (señal de fluorescencia).

Analizamos la expresión proteínica de  $\alpha$ Syn mediante las técnicas de *Western blot* e inmunofluorescencia en distintos tejidos cerebrales de animales de los tres genotipos de interés (Figura 21). Aunque el anticuerpo utilizado no era específico para distinguir la  $\alpha$ Syn murina de la humana, sabíamos que la proteína en individuos silvestres sólo podía proceder de la detección de  $\alpha$ Syn endógena, ya que estos individuos no tenían amplificación de transgén en la qPCR. De modo inverso, en los individuos  $SNCA$ -OVX se confirmaba el fondo  $Snc\alpha^{-/-}$  por PCR estándar, por lo que la detección de la proteína sólo podía proceder del transgén humano.

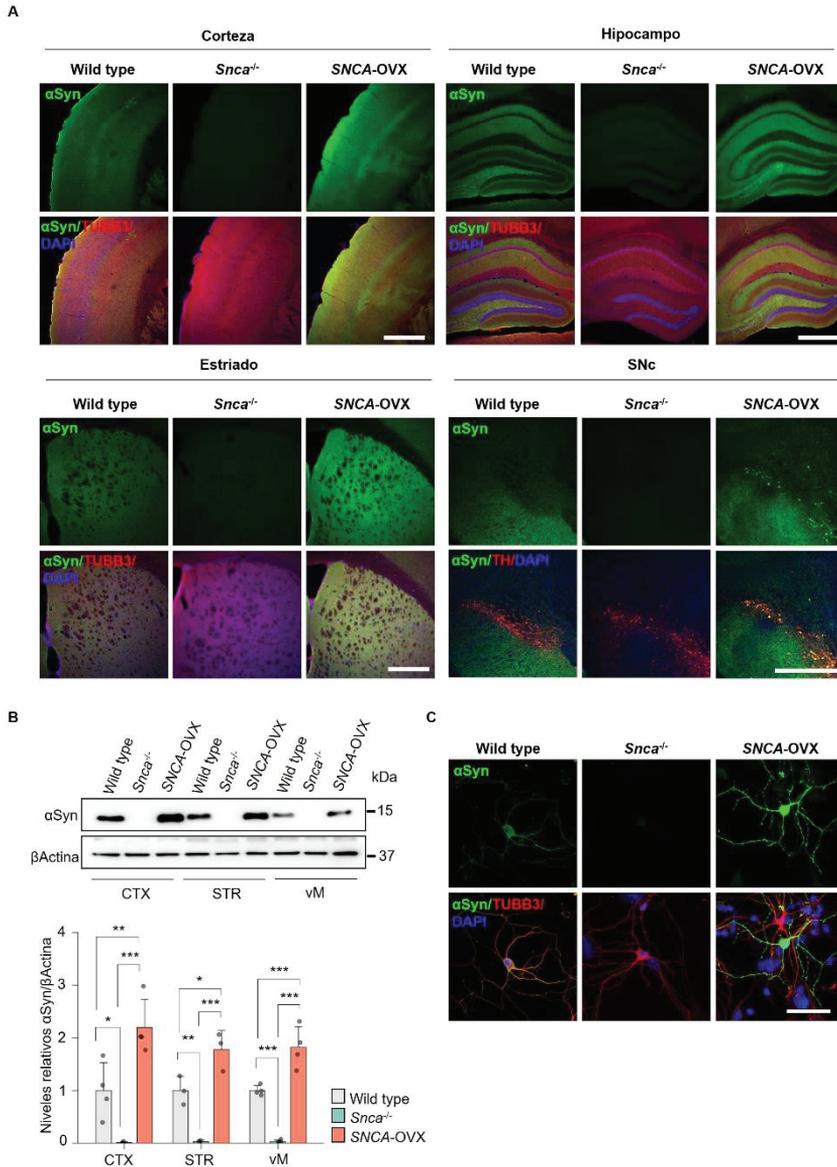


Figura 21. Caracterización de los niveles de expresión proteínica de  $\alpha$ Syn en los animales silvestres (*wild type*) y en los modelos *Snca*<sup>-/-</sup> y SNCA-OVX. (A) Imágenes de inmunofluorescencia de  $\alpha$ Syn (verde), el marcador neuronal TUBB3 (rojo) y el marcador nuclear DAPI (azul) en corteza, hipocampo y estriado. Imágenes de inmunofluorescencia de  $\alpha$ Syn (verde), tirosina hidroxilasa o TH (rojo) y DAPI (azul) en *substantia nigra pars compacta* (SNc). Escala: 500  $\mu$ m. (B) Inmunoblot representativo de los niveles proteínicos de  $\alpha$ Syn en muestras de corteza (CTX), estriado (STR) y mesencéfalo ventral (vM), con su cuantificación correspondiente (n = 4). Los datos están expresados como media  $\pm$  SD y los puntos representan valores de animales individuales. (C) Imágenes de inmunofluorescencia de  $\alpha$ Syn (verde), TUBB3 (rojo) y DAPI (azul) en neuronas estriatales en cultivo. Escala: 50  $\mu$ m.

Según la descripción del modelo, los animales *SNCA-OVX* muestran un aumento de la expresión de  $\alpha$ Syn humana de 1.9 en comparación a su expresión endógena. El perfil de expresión del transgén recapitula el de la proteína murina, ya que se expresa bajo el control de su promotor natural (Janezic et al., 2013). Confirmamos que el modelo *SNCA-OVX* tiene un incremento de expresión de  $\alpha$ Syn en comparación a los ratones silvestres en regiones donde se expresa la proteína endógena, tanto por inmunofluorescencia (Figura 21A) como por *Western blot*, con la detección de una banda de 14 kDa (Figura 21B). También observamos este incremento en cultivos neuronales estriatales (Figura 21C). Además, encontramos diferencias cualitativas en las neuronas TH+ de la SNc del modelo *SNCA-OVX*, que presentaban una señal intensa para  $\alpha$ Syn (Figura 21A), quizás debido a una mayor acumulación de  $\alpha$ Syn en neuronas dopaminérgicas. Por otra parte, la ausencia de expresión de  $\alpha$ Syn en el modelo *Snc $\alpha$ <sup>-/-</sup>* también fue corroborada en todos los ensayos mencionados (Figura 21).

## 1.2. Evaluación motora de los modelos *Snc $\alpha$ <sup>-/-</sup>* y *SNCA-OVX*

### 1.2.1. *El déficit de $\alpha$ Syn provoca una reducción temprana de la coordinación motora*

Aunque estos animales fueron caracterizados fenotípicamente cuando se publicó el modelo, quisimos evaluar su actividad motora específicamente en las edades de nuestro estudio (3, 6 y 12 meses de edad). La prueba del rotarod acelerado constituye un paradigma ampliamente aceptado para la evaluación de la coordinación motora, de modo que analizamos la latencia de caída de los animales en un periodo de tres minutos en los cuales la velocidad de rotación del cilindro aumentaba de 4 a 40 rpm. El procedimiento se repitió tres días consecutivos con el fin de evaluar la progresión conforme aprendían el procedimiento, y el mismo grupo de animales fue evaluado a los 3, 6 y 12

meses de edad. Para descartar un posible efecto de peso en el desempeño en el rotarod, todos los animales se pesaron previamente a la prueba, no detectándose diferencias significativas entre ellos (Figura 22).

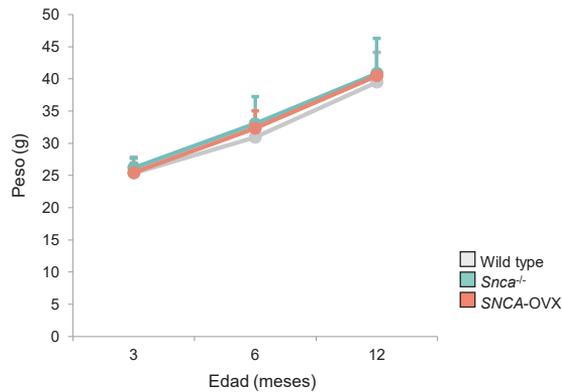


Figura 22. Peso corporal de los animales silvestres (*wild type*) y de los modelos murinos *Snca*<sup>-/-</sup> y SNCA-OVX a los 3, a los 6 y a los 12 meses de edad. Los datos están representados como media  $\pm$  SD (n = 9 *wild type*, n = 10 *Snca*<sup>-/-</sup>, n = 9 SNCA-OVX).

Se analizó la latencia media de caída de cada animal (derivada de tres intentos para completar los tres minutos de duración de la prueba) en los tres días consecutivos a las distintas edades (Figura 23). Las comparaciones múltiples revelaron que los individuos *Snca*<sup>-/-</sup> tenían una reducción de la latencia de caída en comparación a los animales control y/o transgénicos en todas las sesiones a los 3 y 6 meses, y en dos de las sesiones a los 12 meses de edad. Cuando analizamos la progresión de los genotipos en las tres sesiones, todos ellos mejoraban con independencia de su genotipo a los 3 y 6 meses. A los 12 meses, en cambio, no había una mejora estadísticamente significativa en los animales a través de las sesiones. De hecho, encontramos un declive en la latencia de caída en los individuos *Snca*<sup>-/-</sup>. Todos estos resultados muestran que los individuos deficientes en  $\alpha$ Syn presentan una pérdida temprana de la coordinación motora, que va desde los 3 hasta los 12 meses de edad (Figura 23A), y una reducción en su desempeño a través de las sesiones en individuos envejecidos de 12 meses (Figura 23B).

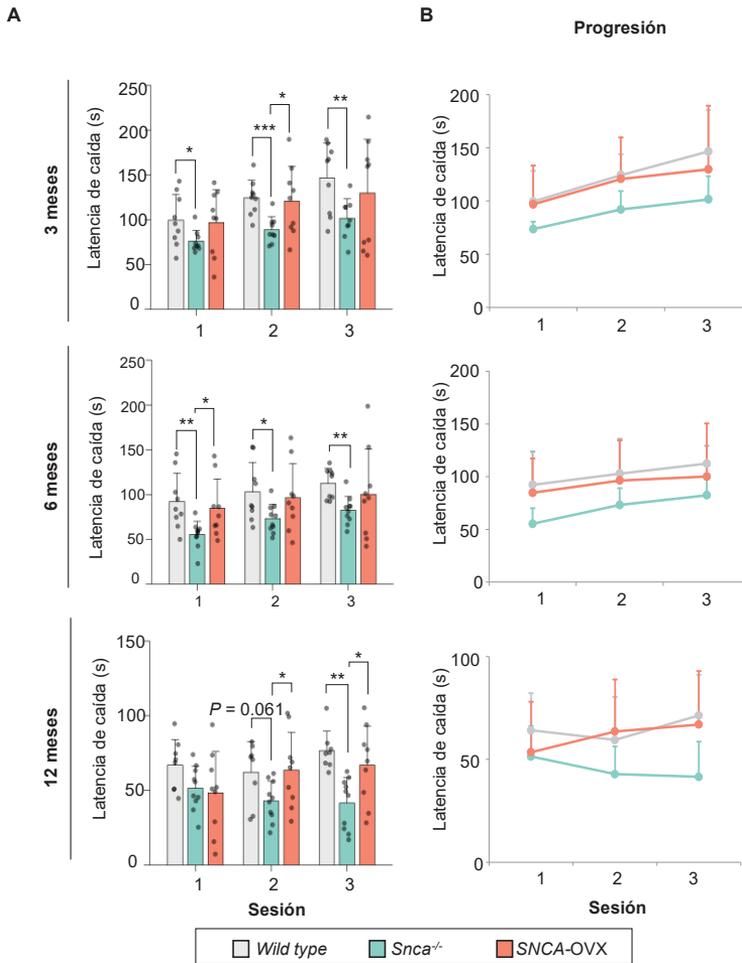


Figura 23. Evaluación de la coordinación motora mediante la prueba del rotarod acelerado. (A) Latencias medias de caída de tres intentos para cada animal ( $n = 9$  wild type,  $n = 10$  Snca<sup>-/-</sup>,  $n = 9$  SNCA-OVX), a los 3, 6 y 12 meses de edad, durante tres sesiones (días) consecutivos [Efecto de la variable "genotipo" a los 3, a los 6 y a los 12 meses respectivamente:  $F_{(2, 24)} = 4.411$ ,  $P = 0.0234$ ;  $F_{(2, 25)} = 3.725$ ,  $P = 0.0384$ ;  $F_{(2, 25)} = 3.598$ ,  $P = 0.0424$ ]. (B) Evolución de la latencia de caída a lo largo de las tres sesiones en cada edad de estudio [Efecto de la variable "progresión" a los 3 meses, a los 6 y a los 12 meses respectivamente:  $F_{(1,92, 96,13)} = 13$ ,  $P < 0.0001$ ;  $F_{(1,684, 42,11)} = 12.71$ ,  $P = 0.0001$ ;  $F_{(1,713, 42,83)} = 1.042$ ,  $P = 0.3517$ . Efecto de la interacción "Genotipo-Progresión" a los 3 meses, a los 6 y a los 12 meses respectivamente  $F_{(4, 48)} = 0.4906$ ,  $P = 0.7426$ ;  $F_{(4, 50)} = 0.3790$ ,  $P = 0.8226$ ;  $F_{(4, 50)} = 2.895$ ,  $P = 0.0312$ ]. Los datos están expresados como media  $\pm$  SD y los puntos representan valores individuales. El análisis estadístico se llevó a cabo con el test ANOVA de dos vías de medidas repetidas, con la variable "progresión" como factor intra-grupo y "genotipo" como factor entre grupos.

1.2.2. *El modelo de sobreexpresión SNCA-OVX presenta una coordinación motora normal y una marcada variabilidad en su desempeño en la tarea del rotarod a los 3 meses de edad*

En cuanto al modelo de sobreexpresión SNCA-OVX, no encontramos diferencias estadísticamente significativas en la coordinación motora respecto a individuos silvestres en ninguna de las edades estudiadas (Figura 23A). Puesto que a los 3 meses de edad parecía haber dos grupos diferenciados, uno con bajas latencias de caída y otro con latencias altas en las tres sesiones, nos preguntamos si la dosis relativa de transgén podría condicionar este comportamiento. Esta dualidad se perdía a los 6 y 12 meses de edad, lo cual nos hizo pensar que la interacción entre el transgén y la edad también podría estar explicando este efecto y la elevada variabilidad observada en estos animales. Establecimos una correlación entre la dosis de transgén SNCA, determinada en la qPCR, y la latencia de caída media de los animales en cada una de las edades, esta vez unificando las tres sesiones de cada edad (Figura 24).

Aunque el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) indicaba que casi el 30 % de la variación en la latencia de caída era debida a la dosis de transgén en animales de 3 meses ( $R^2 = 0.2982$ ) esta correlación no alcanzaba la significación estadística ( $P = 0.1282$ ). Teniendo esto en cuenta no podríamos afirmar que la dualidad en el desempeño de animales SNCA-OVX de 3 meses fuera debida a la dosis de transgén; sin embargo, cabe remarcar que, a los 6 y 12 meses de edad, los coeficientes de determinación eran mucho más reducidos y menos cercanos a la significación, coincidiendo con la desaparición de los dos grupos con latencias diferenciadas (Figura 24).

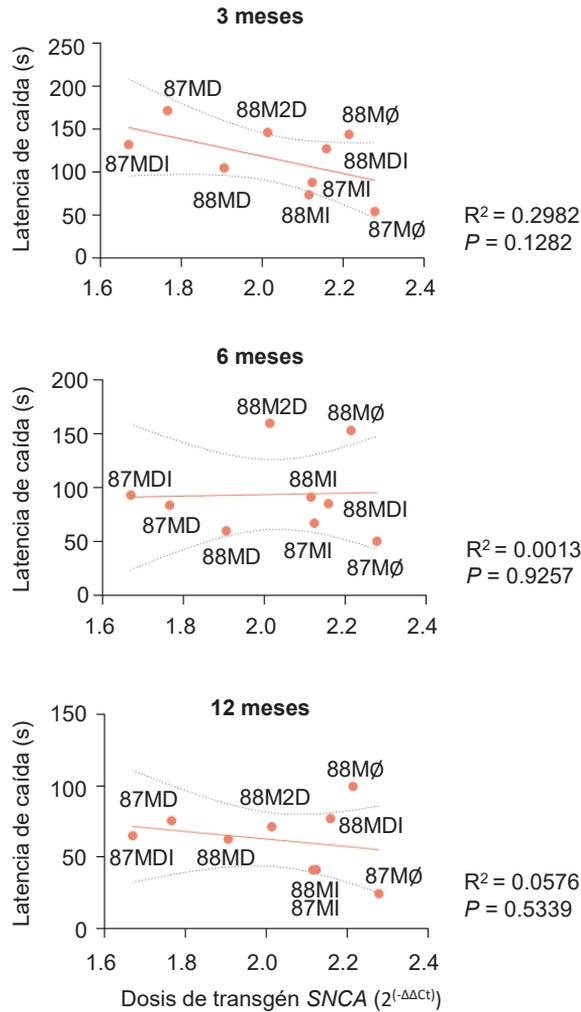


Figura 24. Correlación entre la coordinación motora y la dosis de transgén en el modelo SNCA-OVX. Análisis del efecto de la dosis de transgén en individuos SNCA-OVX sobre el desempeño en la tarea del rotarod acelerado (n = 9). Los puntos representan valores de animales individuales y se muestra la línea de tendencia.

1.2.3. *Los animales SNCA-OVX presentan alteraciones de marcha en comparación a individuos silvestres y Snca<sup>-/-</sup>*

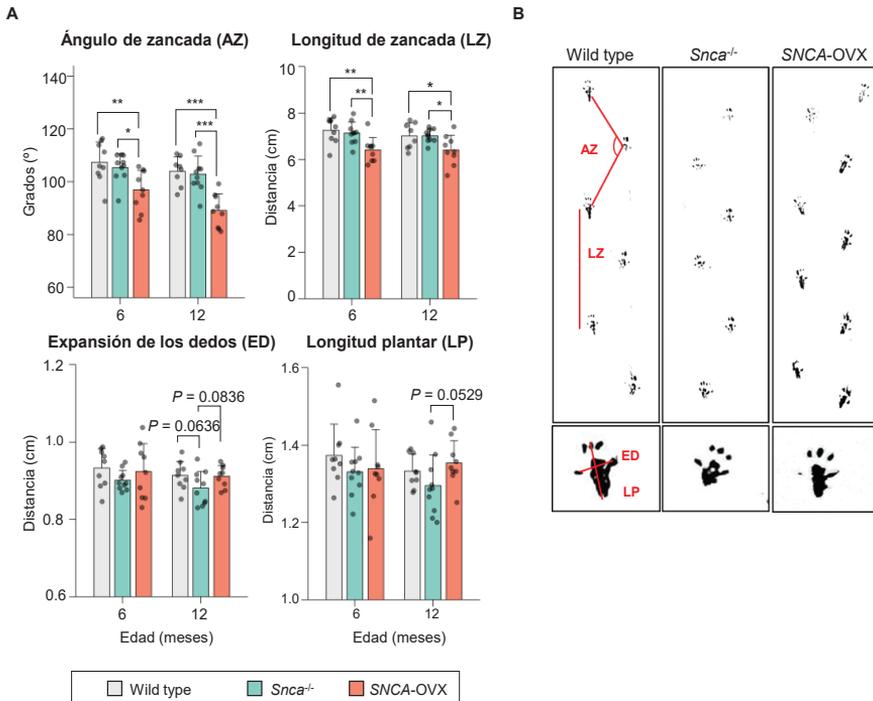
Los síntomas motores de la EP incluyen cambios en la forma de caminar de los pacientes, con pasos más cortos y dificultad para iniciar nuevos movimientos. Quisimos comprobar si nuestro modelo de EP, a pesar de no

mostrar una afectación de la coordinación motora, podía presentar estos cambios en su marcha. Para ello llevamos a cabo un análisis de las pisadas a lo largo de un recorrido (Figura 25). Decidimos realizar esta prueba posteriormente al análisis del rotarod, por lo que se hizo en los mismos animales, pero únicamente a los 6 y 12 meses de edad.

El análisis de las pisadas se realizó evaluando cuatro parámetros en los recorridos de cada animal, a través del marcaje de sus patas traseras. Dos parámetros (la longitud y el ángulo de zancada) están directamente relacionados con la forma de caminar del animal, mientras que los otros dos (expansión de los dedos y longitud plantar) hacen referencia a la huella de la pata trasera en sí misma (Figura 25B).

Los animales con sobreexpresión de  $\alpha$ Syn tenían una reducción del ángulo de zancada tanto a los 6 (*Wild type*  $107.87 \pm 7.72^\circ$ ; *Snca*<sup>-/-</sup>  $105.4 \pm 5.31^\circ$ ; *SNCA-OVX*  $96.87 \pm 7.51^\circ$ ) como a los 12 meses de edad (*Wild type*  $104 \pm 5.50^\circ$ ; *Snca*<sup>-/-</sup>  $102.9 \pm 6.79^\circ$ ; *SNCA-OVX*  $89.04 \pm 6.36^\circ$ ). Lo mismo ocurría en la longitud de la zancada a los 6 (*Wild type*  $7.26 \pm 0.54$  cm; *Snca*<sup>-/-</sup>  $7.14 \pm 0.47$  cm; *SNCA-OVX*  $6.41 \pm 0.53$  cm) y a los 12 meses (*Wild type*  $7.01 \pm 0.55$  cm; *Snca*<sup>-/-</sup>  $7.02 \pm 0.28$ cm; *SNCA-OVX*  $6.41 \pm 0.64$  cm) (Figura 25A). Al analizar los parámetros de las huellas no encontramos diferencias significativas ni en la expansión de los dedos ni en la longitud plantar de animales *SNCA-OVX*. Curiosamente, en los individuos *Snca*<sup>-/-</sup> de 12 meses sí encontramos tendencias hacia una menor expansión de los dedos (*Wild type*  $0.91 \pm 0.04$ cm; *Snca*<sup>-/-</sup>  $0.88 \pm 0.04$ cm; *SNCA-OVX*  $0.91 \pm 0.03$ cm) y longitud plantar (*Wild type*  $1.33 \pm 0.04$ cm; *Snca*<sup>-/-</sup>  $1.29 \pm 0.08$ cm; *SNCA-OVX*  $1.35 \pm 0.06$ cm) (Figura 25A).

De la evaluación de las huellas concluimos que los animales *SNCA-OVX* mostraban unas pisadas más cortas, congruentes con un fenotipo de marcha parkinsoniana, aunque en ausencia de una afectación de la coordinación motora a las edades analizadas.



**Figura 25. Análisis de las huellas traseras.** (A) Ángulo y longitud de zancada medios de cada individuo ( $n = 9$  *wild type*,  $n = 10$  *Snca*<sup>-/-</sup>,  $n = 9$  *SNCA-OVX*), obtenidos de 12 zancadas (4 por recorrido), a los 6 y a los 12 meses de edad. Expansión de los dedos y longitud plantar medios de cada individuo ( $n = 9$  *wild type*,  $n = 10$  *Snca*<sup>-/-</sup>,  $n = 9$  *SNCA-OVX*), obtenidos de 9 huellas (3 por recorrido), a los 6 y a los 12 meses de edad. (B) Imágenes representativas de los recorridos y detalle de la huella de animales silvestres (*wild type*), *Snca*<sup>-/-</sup> y *SNCA-OVX*, mostrando los parámetros analizados en rojo.

## CAPÍTULO II.

### FISIOPATOLOGÍA CELULAR DEL DÉFICIT Y SOBREENPRESIÓN DE $\alpha$ SYN

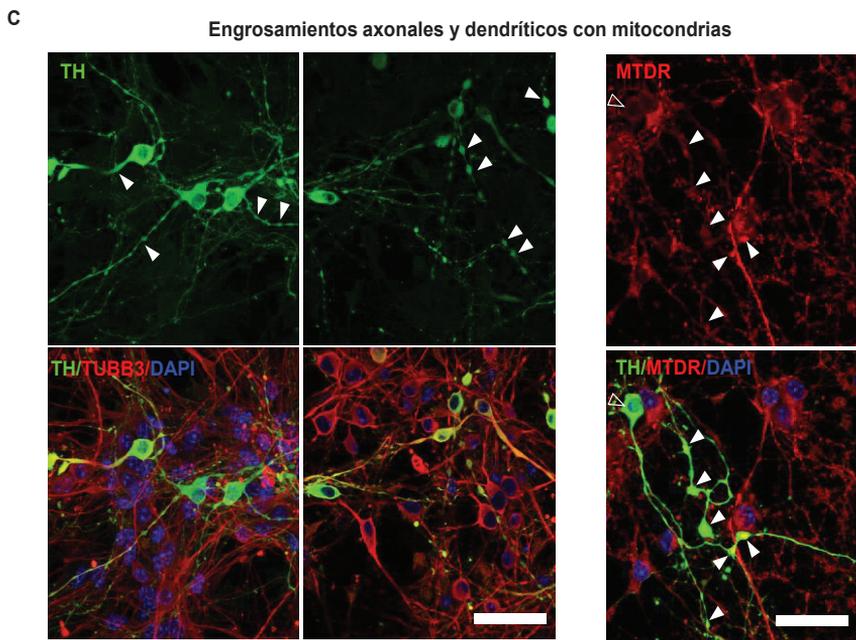
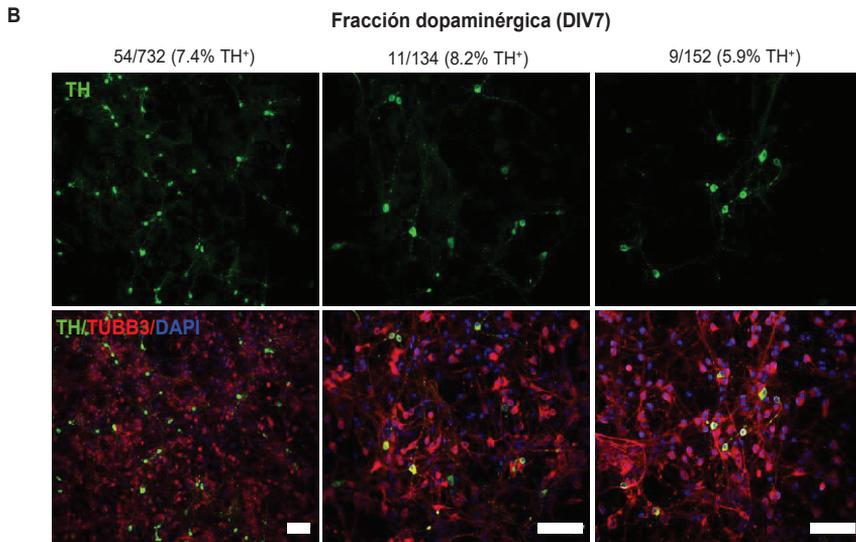
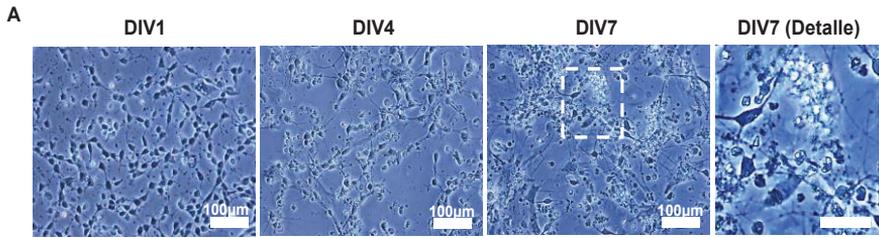
Las neuronas dopaminérgicas de la SNc son una de las poblaciones neuronales más afectadas en la EP. Numerosos estudios han indicado que existe una axonopatía previa a la muerte de estas neuronas (O’Keeffe and Sullivan, 2018), pero no se han determinado los mecanismos clave que intervienen en este proceso. Con el fin de determinar las consecuencias que tiene la falta o la sobreexpresión de  $\alpha$ Syn en la biología de las neuronas dopaminérgicas, con un enfoque espaciotemporal, analizamos las principales rutas relacionadas con la EP en el estriado (donde proyectan sus axones las neuronas dopaminérgicas), y la SNc o mesencéfalo ventral (vM) (donde se localizan sus cuerpos neuronales), de nuestros modelos de  $\alpha$ Syn a distintas edades. Por otro lado, para el análisis de ciertos parámetros, necesitábamos establecer modelos celulares que confirmaran resultados *in vitro* de forma más reproducible y controlada que los tejidos, y que nos facilitaran el uso de tratamientos sin necesidad de administración en los animales.

#### 2.1. Obtención de modelos celulares para el estudio fisiopatológico del déficit y sobreexpresión de $\alpha$ Syn

Inicialmente nos planteamos como modelo celular el cultivo primario de vM. Este cultivo ofrecía la ventaja de obtener las neuronas diana de estudio, es decir, las neuronas dopaminérgicas. Intentamos implementar el protocolo de obtención de estas neuronas en el laboratorio, comenzando por seleccionar procedimientos que se ajustaran a la experiencia previa del grupo en cultivos neuronales. Esto implicaba descartar cultivos postnatales que requerían sistemas de co-cultivo, donde se sembraban células gliales previamente a la siembra neuronal (Lautenschläger et al., 2018b). Los protocolos de cultivos

embrionarios de vM fijan como límites los días embrionarios 12.5 y 16.5 (E12.5 y E16.5) para la obtención de neuronas dopaminérgicas viables. La elección de un día embrionario más temprano resulta en una mayor viabilidad en detrimento de la fracción dopaminérgica obtenida. Decidimos seleccionar protocolos en los que se llegara a un compromiso, y comenzamos con un protocolo a E14.5 (Figura 26).

Este protocolo tenía muy bajo rendimiento ya que generábamos, por cada embrión, un máximo de 250.000 células. Los protocolos publicados reportan una fracción de neuronas dopaminérgicas de entre un 1 % y un 10 % de las neuronas totales. En nuestra experiencia, llegamos a obtener un máximo de 8.2 % de neuronas dopaminérgicas, identificadas en base a la expresión de tirosina hidroxilasa (TH), la enzima encargada del paso limitante en la síntesis de dopamina (Figura 26B). Estas neuronas, sin embargo, no se distribuían de forma uniforme en el pocillo, por lo que en realidad la fracción dopaminérgica era menor. A pesar de haber obtenido varios cultivos que permitían el estudio de marcadores en estas neuronas, el protocolo no pudo establecerse de forma reproducible y caracterizarse en profundidad; resultaba la mayoría de ocasiones en la muerte prematura de las neuronas, que intentaban mantenerse hasta el séptimo día *in vitro* (DIV7) para garantizar la madurez neuronal. Cuando pudieron conservarse hasta DIV7 se observó la presencia de engrosamientos en las neuritas de las neuronas dopaminérgicas que, además, mostraban marcaje mitocondrial con *MitoTracker Deep Red* (MTDR) (Figura 26C). Los somas de las neuronas dopaminérgicas exhibían también menor intensidad de MTDR, lo que refleja una pérdida del potencial de membrana mitocondrial, al cual es sensible el MTDR (Figura 26C).



**Figura 26. Caracterización de cultivo primario de vM.** (A) Neuronas embrionarias mesencefálicas en cultivo a distintos días *in vitro* (DIV), en imágenes de campo claro. Escala: 100  $\mu\text{m}$ . Escala detalle: 50  $\mu\text{m}$ . (B) Máximas fracciones dopaminérgicas obtenidas en cultivo de vM y sus inmunofluorescencias correspondientes. Se muestra TH (verde), como marcador de neuronas dopaminérgicas, TUBB3 (rojo) y el marcador nuclear DAPI (azul). Escala: 50  $\mu\text{m}$ . (C) Neuronas dopaminérgicas en inmunofluorescencias de TH (verde), TUBB3 (rojo) y DAPI (azul) con engrosamientos neuríticos (indicados por ▲). Presencia de mitocondrias en los engrosamientos (▲) en inmunofluorescencia de TH (verde), MTDR (rojo) y DAPI (azul), y pérdida de potencial de membrana mitocondrial en el soma dopaminérgico (indicado por Δ). Escala: 50  $\mu\text{m}$ .

Todo ello ponía de manifiesto que la dopaminérgica era la población neuronal más vulnerable en el cultivo. Posteriormente tratamos de adaptar el protocolo con las alternativas de disgregación menos lesivas, incluso a expensas del rendimiento, pero los resultados seguían sin ser reproducibles. Tratamos entonces de implementar un protocolo de mayor viabilidad, como los publicados a día E12.5 (Weinert et al., 2015). Estos cultivos, a pesar de ser más viables y reproducibles, no nos permitieron generar una fracción dopaminérgica como el anterior por lo que no nos servían para estudiar la fisiología de estas neuronas.

Decidimos entonces descartar el cultivo dopaminérgico por varios motivos: i) por la facilidad de observación y estudio de las neuronas dopaminérgicas en la propia SNC en el cerebro murino adulto (Figura 27); ii) por las limitaciones del cultivo en sí mismo, ya que no constituía un modelo dopaminérgico puro o mayoritario *in vitro*, por lo que no iba a aportarnos ninguna ventaja añadida sobre los cortes de tejido de SNC; y iii) porque obtuvimos varios resultados que indicaban que el estriado podía darnos información sobre las rutas alteradas de forma temprana ante la falta o el exceso de  $\alpha\text{Syn}$ .

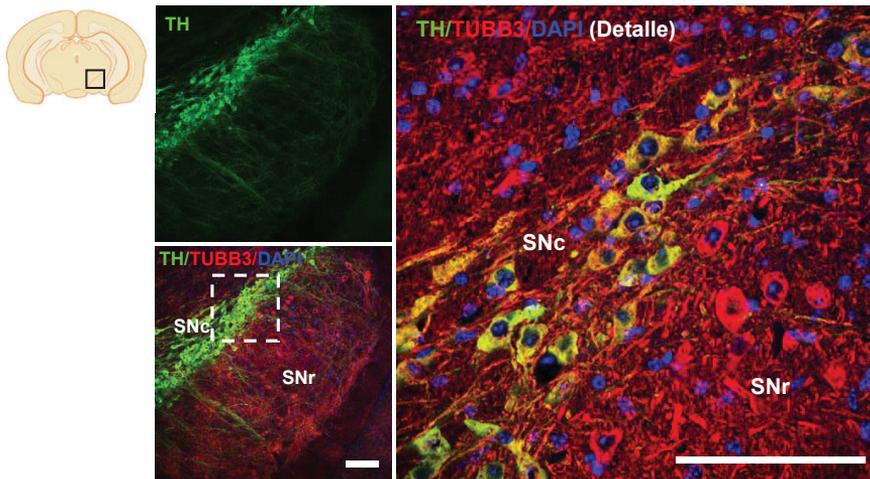


Figura 27. Neuronas dopaminérgicas en cortes de SNc. Imágenes de inmunofluorescencia de neuronas dopaminérgicas en la *substantia nigra pars compacta* (SNc), mediante la detección de la proteína TH (verde). Todas las neuronas del corte aparecen marcadas con TUBB3 (rojo). Los núcleos están marcados con DAPI (azul). Se muestra a la izquierda una ilustración de un corte coronal de cerebro murino, indicando la ubicación de la SN. SNr: *substantia nigra pars reticulata*. Escala: 100  $\mu$ m.

Por todo lo expuesto anteriormente implementamos el cultivo primario estriatal, que tenía un rendimiento y homogeneidad muy superiores, ya que el 90 % de neuronas del estriado son neuronas espinosas medianas (MSN), y llegamos a generar  $2 \cdot 10^6$  células por embrión. El cultivo estriatal a día E16.5 era viable y reproducible, y las células podían mantenerse hasta DIV7 (Figura 28A) y caracterizarse en base a la detección de marcadores estriatales, como el marcador de MSN DARPP32 y marcadores específicos de MSN con receptores de tipo D1 o D2 (Figura 28B).

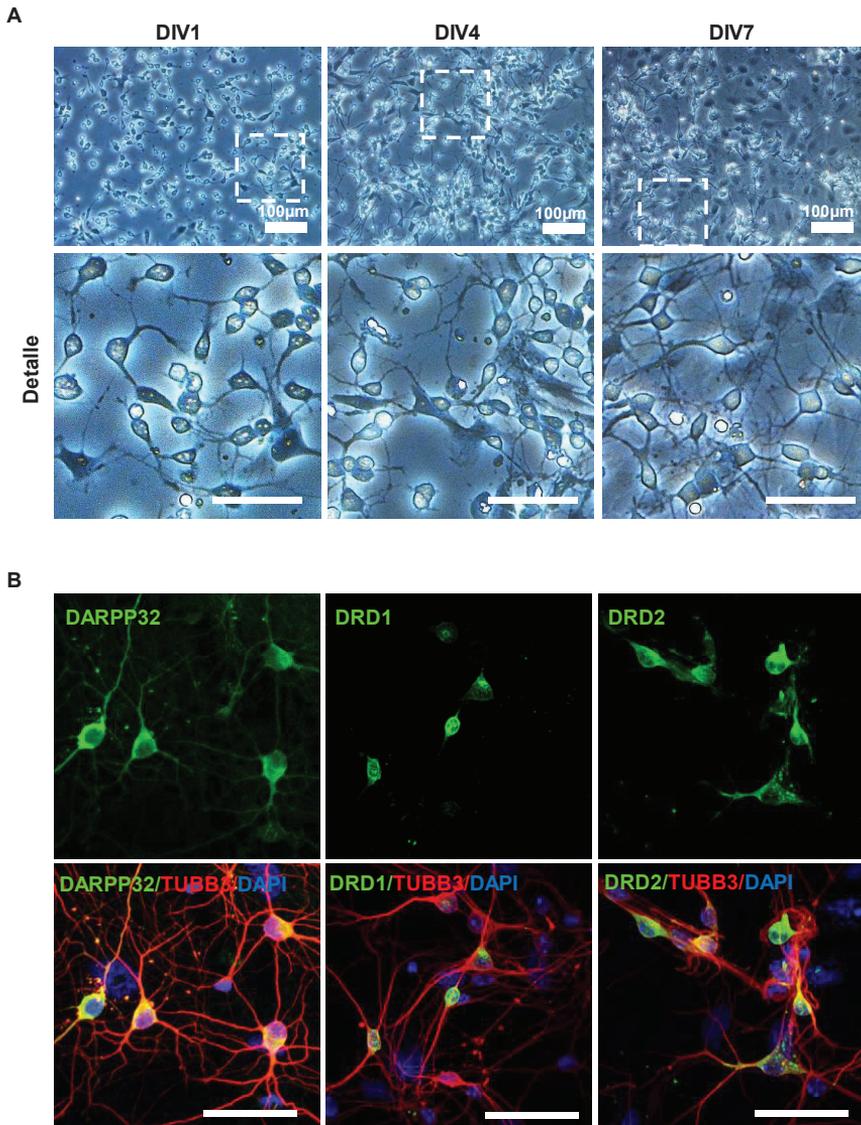


Figura 28. Caracterización de cultivo primario estriatal. (A) Neuronas estriatales en cultivo a distintos días *in vitro* (DIV), en imágenes de campo claro, junto con sus detalles correspondientes. Escala: 100 µm. Escala detalle: 50 µm. (B) Detección de marcadores estriatales clave en cultivo. Se muestran imágenes de inmunofluorescencia de DARPP32 (como marcador de neuronas MSN), DRD1 (como marcador de neuronas espinosas de la vía directa) y DRD2 (como marcador de neuronas espinosas de la vía indirecta) en verde, junto con TUBB3 (rojo) y DAPI (azul). Escala: 50 µm.

## 2.2. Estudio de la vía autofágica

Los procesos degradativos constituyen un pilar fisiopatológico fundamental en las enfermedades neurodegenerativas. Como se ha mencionado en la introducción, la sobreexpresión de  $\alpha$ Syn y sus mutaciones se han relacionado con déficits en la capacidad degradativa celular, pero también con activaciones nocivas de la ruta autofágica. En cuanto a la falta de  $\alpha$ Syn, por su parte, no se ha estudiado en profundidad qué consecuencias tiene sobre la autofagia.

### *2.2.1. Los animales Snca<sup>-/-</sup> y SNCA-OVX muestran un aumento de autofagosomas en el estriado a los 6 meses de edad, en ausencia de cambios en el marcador de flujo autofágico p62/SQSTM1*

Como primera aproximación al estudio de la ruta autofágica en nuestros modelos, evaluamos marcadores de esta vía en la corteza, como región control que no se ve afectada hasta estadios avanzados de la EP, y en el estriado y la SNc, como regiones centrales de la EP y de la fisiología dopaminérgica. Llevamos a cabo el análisis en animales de distintas edades con el fin de identificar cambios temporales en la expresión diferencial de estos marcadores entre genotipos.

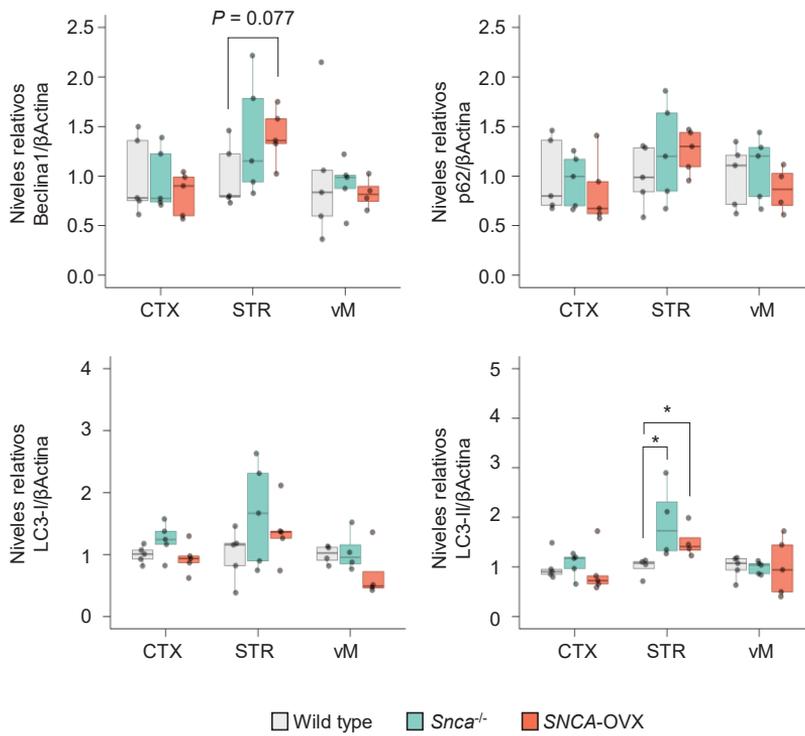
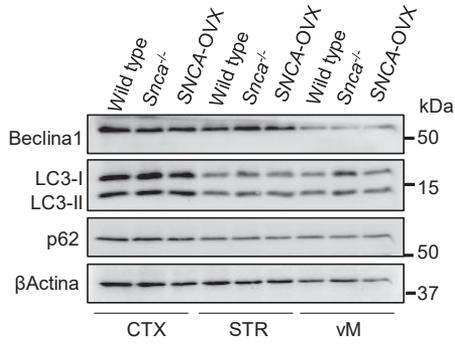
Comenzamos evaluando los niveles de proteínas clave de la vía autofágica por *Western blot*. Los marcadores seleccionados fueron Beclina1, LC3 y p62 que, como se ha comentado en la introducción, tienen implicaciones en el proceso de inducción, formación de autofagosomas y autofagia selectiva, respectivamente. p62 constituye en sí mismo un sustrato de degradación, por lo que resulta útil en la evaluación del flujo autofágico.

Encontramos un aumento significativo en el marcador de autofagosomas LC3-II en el estriado de individuos *Snca*<sup>-/-</sup> y *SNCA-OVX* de 6 meses, en comparación a los animales silvestres (Figura 29A). Aunque tradicionalmente se utilizaba la ratio LC3-II/LC3-I como medida indirecta de la cantidad de autofagosomas, en la actualidad también se aconseja relativizar estos marcadores respecto a una proteína control, puesto que un aumento o disminución de ambos puede ser informativo. Además, a nivel cerebral, la señal de la banda correspondiente a LC3-I es muy superior a la del LC3-II, lo que dificulta la evaluación conjunta de ambos marcadores (Klionsky et al., 2021). Dicho esto, el marcador LC3-I en los estriados de animales deficientes en  $\alpha$ Syn parecía tener el mismo patrón que el LC3-II, aunque no alcanzaba la significación estadística ( $P = 0.157$ ). Lo mismo ocurría al evaluar el marcador de inducción autofágica Beclina1 en estriados de 6 meses en los dos modelos. p62, por su parte, no mostró diferencias significativas entre los genotipos a los 6 meses de edad. En cuanto al análisis de estos mismos marcadores en animales de 12 meses de edad, inesperadamente, no encontramos diferencias significativas en ninguna de las regiones estudiadas (Figura 29B).

Estos resultados nos indicaban que existía un aumento de autofagosomas en el estriado de nuestros modelos a los 6 meses de edad, y sugerían que podía deberse a una inducción del proceso autofágico, especialmente en individuos *SNCA-OVX*, donde había una tendencia a mayores niveles de Beclina1. Sin embargo, era necesario corroborarlo mediante ensayos adicionales.

A

6 meses



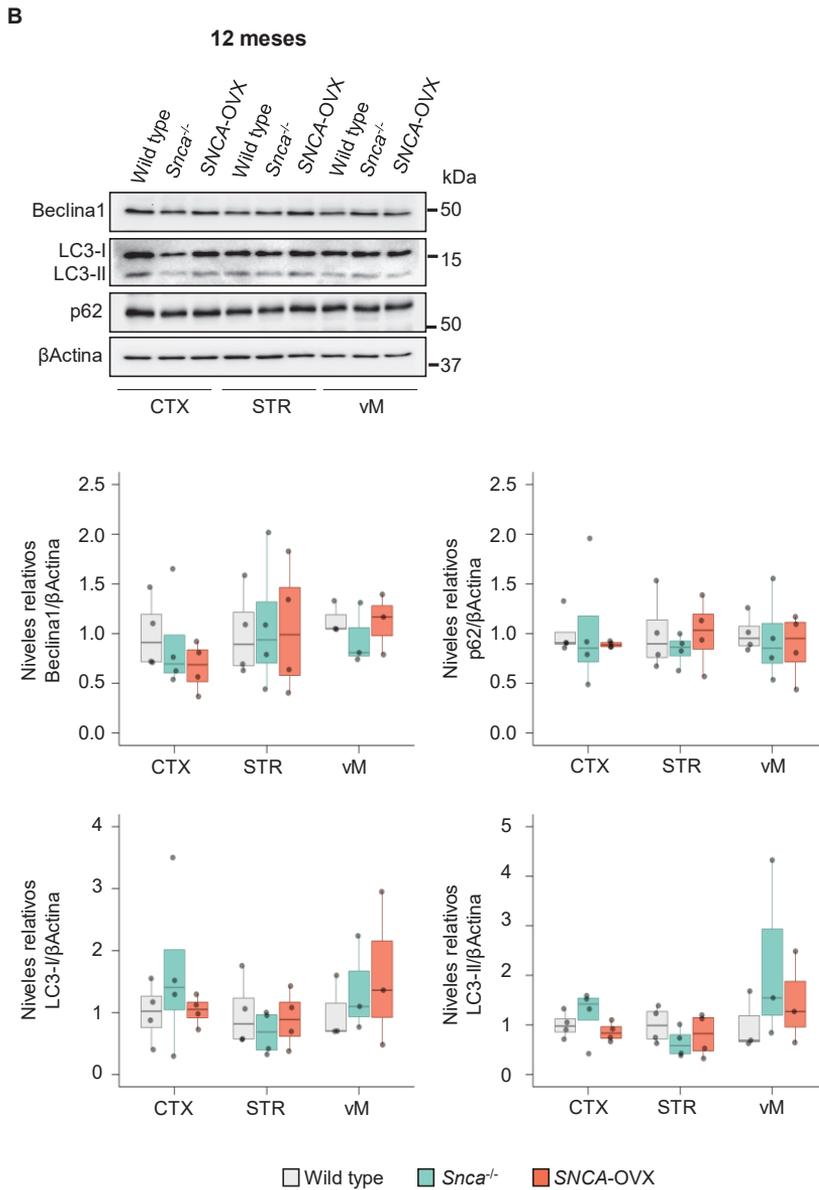
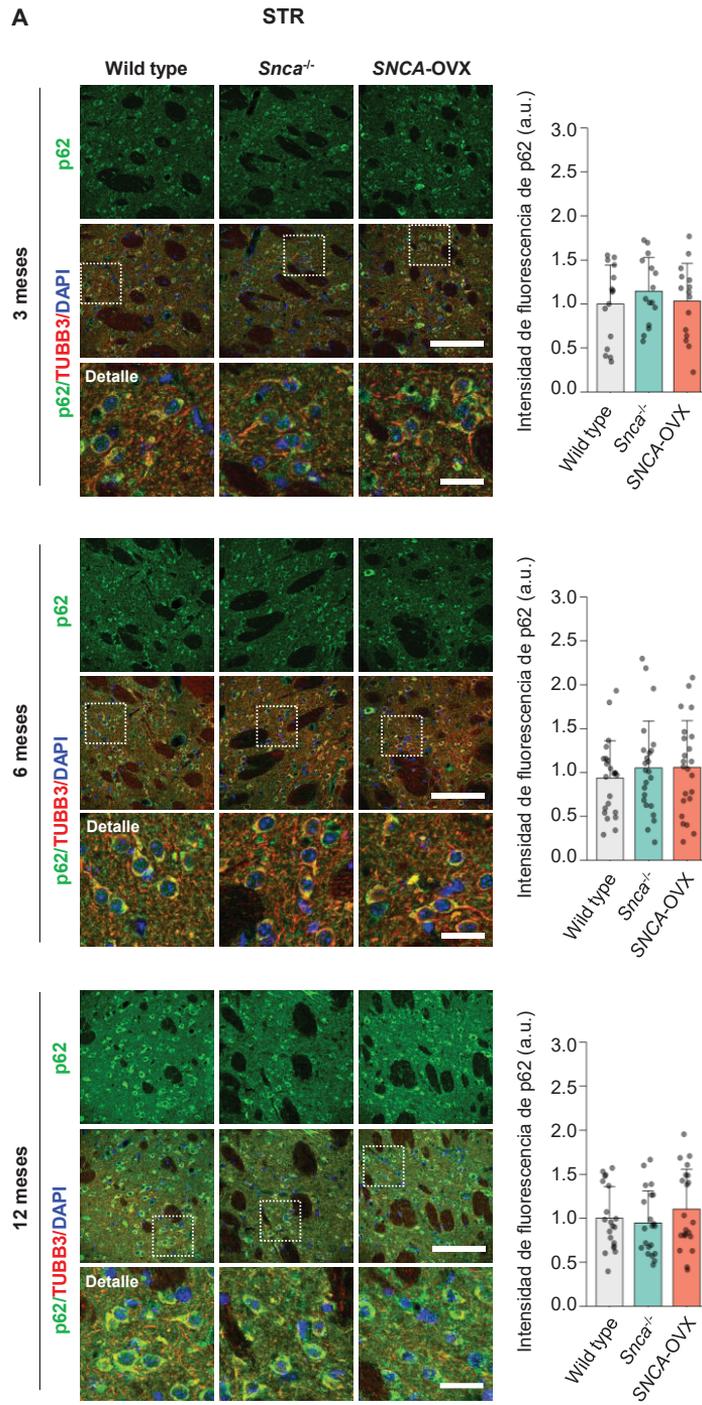
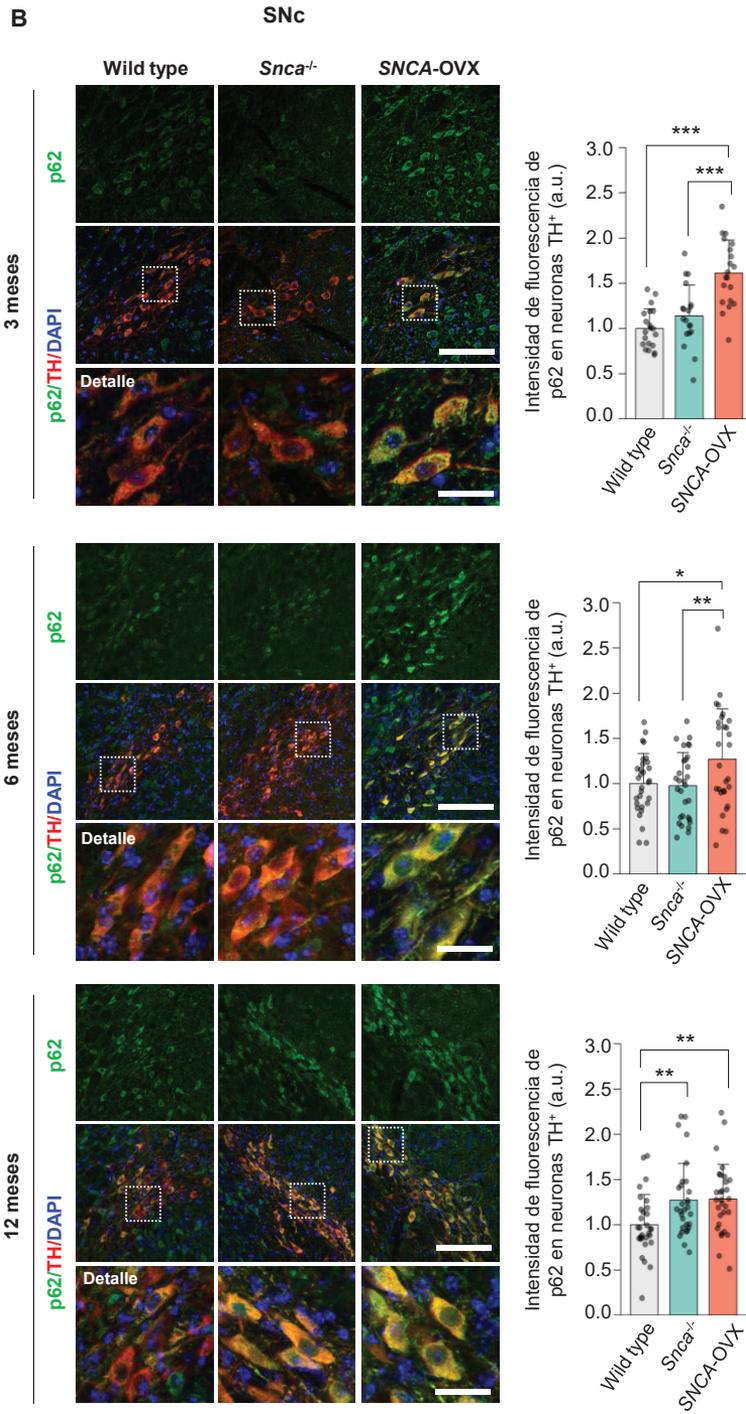


Figura 29. Estudio de marcadores autofágicos en muestras cerebrales de los modelos de  $\alpha$ Syn a los 6 y 12 meses de edad. (A) Inmuno blot representativo de los niveles de expresión proteínica de Beclina1, LC3-I, LC3-II, p62 y  $\beta$ Actina en muestras de corteza (CTX), estriado (STR) y mesencéfalo ventral (vM) de los tres genotipos a los 6 meses de edad, con su cuantificación correspondiente (n = 5). (B) Inmuno blot representativo de los niveles de expresión proteínica de Beclina1, LC3-I, LC3-II, p62 y  $\beta$ Actina en muestras de CTX, STR y vM de los tres genotipos a los 12 meses de edad, con su cuantificación correspondiente (n = 4). Los datos están representados en diagramas de cajas y los puntos representan valores de animales individuales.

2.2.2. *Los individuos SNCA-OVX presentan un incremento temprano y específico de p62/SQSTM1 en las neuronas dopaminérgicas de la SNc*

Quisimos entonces valorar los niveles proteínicos de p62 por inmunofluorescencias de secciones estriatales y de SNc, ya que este marcador puede formar agregados al unirse al material a degradar, lo cual lo convierte en un candidato muy visual para detectar defectos de flujo autofágico en cortes de tejido. Añadimos, además, muestras de 3 meses de edad por si pudieran proporcionarnos información acerca del inicio de los cambios observados. En línea con los resultados de *Western blot*, no encontramos diferencias significativas en el p62 estriatal a los 3, 6 o 12 meses de edad en nuestros modelos de  $\alpha$ Syn (Figura 30A). Sin embargo, sí encontramos un ligero incremento en la intensidad de p62 en la SNc de animales SNCA-OVX que no habíamos detectado por *Western blot*. Este incremento se daba desde los 3 meses y se extendía hasta los 12 meses, edad a la cual también se veía afectado el modelo *Snca*<sup>-/-</sup> en esta región (Figura 30B). Observamos, por tanto, un aumento de la intensidad de p62 en la SNc de individuos transgénicos que no alcanzábamos a detectar por *Western blot*, lo cual podría deberse a las limitaciones que presenta la disección de la SNc, ya que no podemos analizar específicamente las neuronas dopaminérgicas, sino el vM en su totalidad, en los ensayos de *Western blot*.





**Figura 30. Análisis por inmunofluorescencia del marcador p62 en estriado y SNc de los modelos de  $\alpha$ Syn a los 3, 6 y 12 meses de edad.** (A) Imágenes representativas de inmunofluorescencia mostrando p62 (verde), TUBB3 (rojo) y DAPI (azul) en secciones estriatales (STR) de los modelos a los 3, 6 y 12 meses de edad, con sus respectivos detalles y cuantificaciones (8 campos por animal; n = 2 animales de 3 meses; n = 3 animales de 6 y 12 meses). Los datos están expresados como media  $\pm$  SD y los puntos representan valores de campos. Escala: 100  $\mu$ m. Escala de detalle: 25  $\mu$ m. (B) Imágenes representativas de inmunofluorescencia mostrando p62 (verde), TH (rojo) y DAPI (azul) en secciones de *substantia nigra pars compacta* (SNc) de los modelos a los 3, 6 y 12 meses de edad, con sus respectivos detalles y cuantificaciones (10 neuronas TH<sup>+</sup> por animal; n = 2 animales de 3 meses; n = 3 animales de 6 y 12 meses). Los datos están expresados como media  $\pm$  SD y los puntos representan valores de células. Escala: 100  $\mu$ m. Escala de detalle: 25  $\mu$ m.

Para comprobar si, efectivamente, podía deberse a un efecto dilutorio de zona, realizamos un análisis de la presencia de p62 en las poblaciones no dopaminérgicas adyacentes a la SNc, por inmunofluorescencia, en imágenes a menores aumentos (Figura 31). Mientras que la mayoría de las neuronas dopaminérgicas eran p62<sup>+</sup>, independientemente del genotipo, en las poblaciones adyacentes no ocurría lo mismo, por lo que optamos por evaluar el área p62<sup>+</sup> de poblaciones no dopaminérgicas relativizada al total del área no dopaminérgica, en lugar de la intensidad de marcaje. Detectamos que los animales *SNCA-OVX* de 6 meses presentaban una tendencia a mostrar niveles reducidos del área p62<sup>+</sup> en poblaciones no dopaminérgicas, la cual no se producía en el modelo *Snc $\alpha$ <sup>-/-</sup>* en comparación a individuos silvestres (Figura 31A). Esta reducción tampoco se observó en ningún modelo a los 12 meses de edad (Figura 31B). Este hecho podría explicar que, a pesar de detectar incrementos de intensidad de p62 en las neuronas dopaminérgicas de la SNc, no detectásemos estos incrementos por *Western blot* al abarcar una región mayor (vM).

De estos resultados concluimos que existía un incremento en la cantidad de autofagosomas en el estriado de los dos modelos a los 6 meses de edad, que podía deberse a un proceso de inducción autofágica. Estos defectos, sin embargo, no iban acompañados de cambios en el receptor autofágico p62 en

el estriado de nuestros modelos. A nivel de SNc, aunque no alcanzábamos a detectarlo por *Western blot*, sí encontramos un incremento en la proteína p62 en individuos transgénicos desde edades tempranas (3 meses), que podrían estar relacionadas con la presencia de oligómeros de  $\alpha$ Syn en estos animales en las neuronas dopaminérgicas (Janezic et al., 2013; Bengoa-Vergniory et al., 2020).

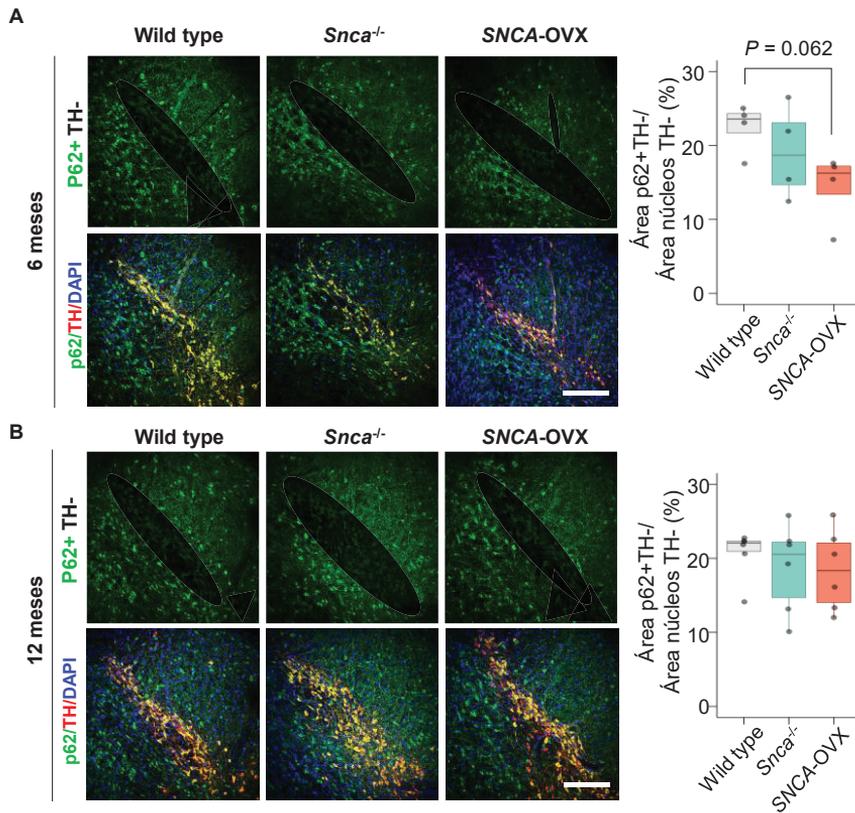


Figura 31. Análisis por inmunofluorescencia del marcador p62 en regiones no dopaminérgicas adyacentes a la SNc, en los modelos de  $\alpha$ Syn a los 6 y 12 meses de edad. Imágenes representativas de inmunofluorescencia mostrando p62 (verde) en áreas TH- (no dopaminérgicas), y las imágenes correspondientes de la mezcla de p62 (verde), TH (rojo) y DAPI (azul), en secciones de *substantia nigra pars compacta* (SNc) de animales de 6 (A) y de 12 meses (B). Se muestran también las respectivas cuantificaciones a los 6 y 12 meses (2 campos de SNc por animal; n = 2 animales de 6 meses; n = 3 animales de 12 meses). Los datos están expresados en diagramas de cajas y los puntos representan valores de cada SNc. Escala: 200  $\mu$ m.

### 2.2.3. *Los modelos de déficit y sobreexpresión de $\alpha$ Syn muestran una inducción autofágica en neuronas estriatales embrionarias*

Si bien un aumento en el marcador de autofagosomas LC3-II nos indicaría mayor presencia de estas vesículas autofágicas, este incremento puede proceder tanto de una inducción autofágica y mayor producción de vesículas como de una inhibición y enlentecimiento autofágicos, que generarían acúmulos de autofagosomas sin fusionar y degradar. Para determinar el origen es necesario evaluar los marcadores LC3-I y LC3-II y el marcador de flujo p62 en presencia y ausencia de un tratamiento de inhibición autofágica (Mizushima and Murphy, 2020).

La bafilomicina A1 (Baf.A1) actúa inhibiendo la ATPasa de protones vacuolar del lisosoma impidiendo así su acidificación. Este tratamiento afecta directamente al correcto funcionamiento del lisosoma, ya que la actividad de las enzimas hidrolíticas contenidas en él es dependiente de pH ácido. También puede actuar inhibiendo la fusión del autofosoma con el lisosoma y, por tanto, la degradación (Mauvezin and Neufeld, 2015). Ante una inhibición autofágica con Baf.A1, un modelo con un enlentecimiento autofágico apenas mostraría diferencias entre su estado basal y el tratamiento; un modelo con la autofagia inducida en basal, en cambio, mostraría mayor respuesta tras el tratamiento con Baf.A1, ya que se exacerbarían sus acúmulos de vesículas y sustratos (reflejados por aumentos en LC3-II y p62 respectivamente) al impedirse la degradación final.

Analizamos los niveles de los marcadores LC3 y p62 en las neuronas estriatales en cultivo, en su estado basal y en respuesta a Baf.A1 (Figura 32). En este caso sí pudimos evaluar los marcadores LC3-I y LC3-II de forma conjunta, y calcular su conversión con la ratio LC3-II/LC3-I. Esta ratio nos permitió

visualizar y confirmar de forma más precisa la respuesta a la Baf.A1 en las neuronas. Quisimos evaluar también los niveles individuales de cada uno de los marcadores frente a TUBB3, y así comparar estos resultados con los obtenidos en los tejidos de animales de 6 meses. Las neuronas estriatales *Snca*<sup>-/-</sup> mostraban una tendencia a mayores niveles de LC3-I ( $P = 0.0691$ ) de forma basal, aunque este aumento no se observó en el LC3-II, como sí ocurría en estriados de animales *Snca*<sup>-/-</sup> de 6 meses. Al analizar este marcador, de hecho, no encontramos diferencias significativas entre genotipos, ni en el estado basal ni en respuesta a Baf.A1. Sí pudimos comprobar que el tratamiento generaba, según lo esperado, un incremento de LC3-II en todos los genotipos, al impedir la degradación lisosomal de los autofosomas (Figura 32). En cuanto a la evaluación de la ratio LC3-II/LC3-I, parecía reflejar mejor la respuesta al tratamiento, ya que generaba aumentos más sólidos respecto al estado basal en todos los genotipos. En este caso sí encontramos una diferencia entre modelos, y tanto las neuronas *Snca*<sup>-/-</sup> como las neuronas *SNCA-OVX* mostraban una respuesta superior a la Baf.A1 en comparación a las neuronas silvestres (Figura 32). Por otro lado, la proteína p62 no mostró cambios significativos en ninguno de los genotipos observados de forma basal. Curiosamente, tampoco pudimos observar incrementos de p62 en respuesta al tratamiento con Baf.A1 en ninguno de los genotipos, como cabría esperar. Sí observamos, en cambio, que las neuronas *Snca*<sup>-/-</sup> y *SNCA-OVX* parecían responder de forma opuesta al tratamiento (Figura 32).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en tejidos y neuronas estriatales, los aumentos y tendencias observados en los niveles de LC3-I y/o LC3-II parecían estar asociados a una inducción autofágica y no a un entretimiento de esta vía degradativa. En ambos modelos de  $\alpha$ Syn encontramos una respuesta superior a Baf.A1 respecto a las neuronas

silvestres, reflejada por los aumentos en la conversión de LC3 con la ratio LC3-II/LC3-I. El marcador p62, por su parte, mostraba un comportamiento inesperado, al no generar ninguna respuesta al tratamiento en las neuronas, por lo que no resultaba útil para valorar defectos autofágicos en este cultivo celular.

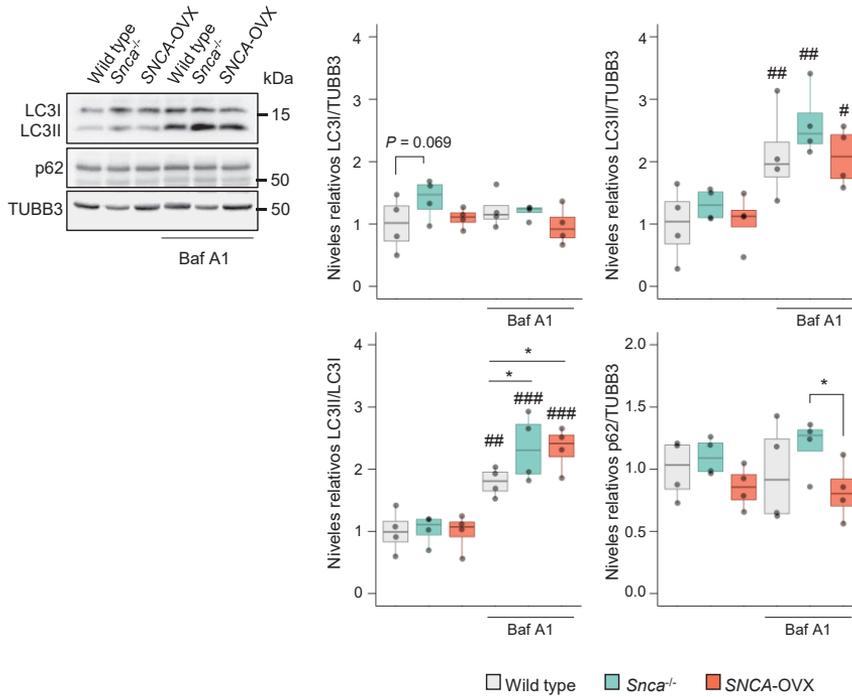


Figura 32. Estudio de marcadores autofágicos en cultivo primario de neuronas estriatales. Immunoblot representativo de los niveles de expresión proteínica de LC3-I, LC3-II, p62 y TUBB3 en neuronas estriatales sin tratamiento o tratadas con bafilomicina A1 (Baf.A1), y su cuantificación correspondiente (n = 4) [LC3-II, efecto tratamiento:  $F_{(1, 18)} = 28.25$ ,  $P < 0.0001$ ; LC-II/LC3-I, efecto tratamiento:  $F_{(1, 18)} = 66.02$ ,  $P < 0.0001$ ]. Los datos están expresados en diagramas de cajas y los puntos representan valores de cultivos individuales. El análisis estadístico se llevó a cabo con el test ANOVA de dos vías, con la variable "tratamiento" como factor intra-grupo (significación en comparaciones múltiples indicada por #) y "genotipo" como factor entre grupos (significación en comparaciones múltiples indicada por \*).

### 2.3. Evaluación lisosomal

Los cambios de flujo y las inducciones de la ruta autofágica tienen su origen o derivan en muchos casos en cambios cuantitativos, morfológicos o funcionales de los lisosomas. Además, los defectos lisosomales, como hemos comentado en la introducción, son una pieza clave en la EP, ya que pueden contribuir a la acumulación de  $\alpha$ Syn y esta, a su vez, inducir más defectos lisosomales. Por esta razón nos preguntamos si la inducción autofágica que habíamos observado podría estar acompañada de alguna alteración lisosomal.

#### 2.3.1. *Los modelos Snca<sup>-/-</sup> y SNCA-OVX presentan un incremento lisosomal en el estriado y la SNc a los 6 meses de edad*

En primer lugar, estudiamos los niveles de la glicoproteína de membrana lisosomal LAMP1 (*Lysosomal associated membrane protein 1*) en la corteza, el estriado y el vM de nuestros modelos a los 6 y 12 meses de edad (Figura 33). Coincidiendo con el análisis de la vía autofágica, encontramos una tendencia a mayores niveles de LAMP1 específicamente en el estriado de individuos *Snca<sup>-/-</sup>* de 6 meses de edad, pero no a los 12; los animales *SNCA-OVX*, por su parte, parecían seguir el mismo patrón. Inesperadamente, en comparación a las otras regiones, observamos que la detección de LAMP1 en el vM era mucho menor, pudiendo ello reflejar una reducción en la cantidad de proteína o algún tipo de dificultad en la extracción proteínica de LAMP1 en esta zona específicamente. A los 12 meses, de hecho, resultaba casi imposible visualizar la banda correspondiente a LAMP1 en el vM en comparación a la corteza o el estriado (Figura 33).

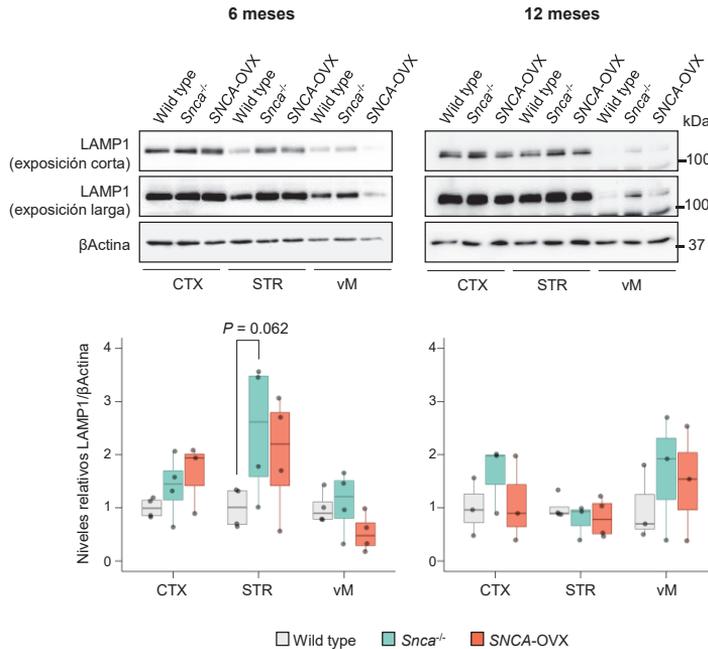
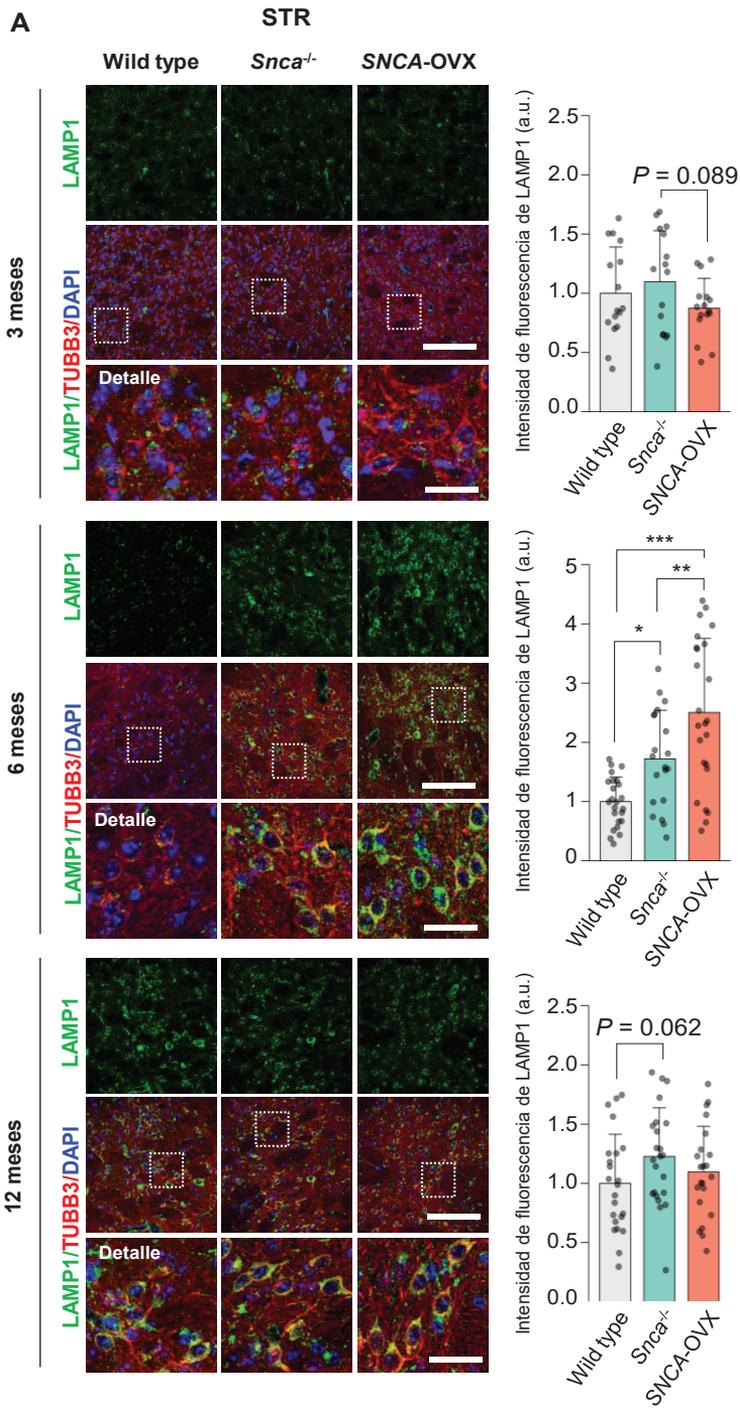
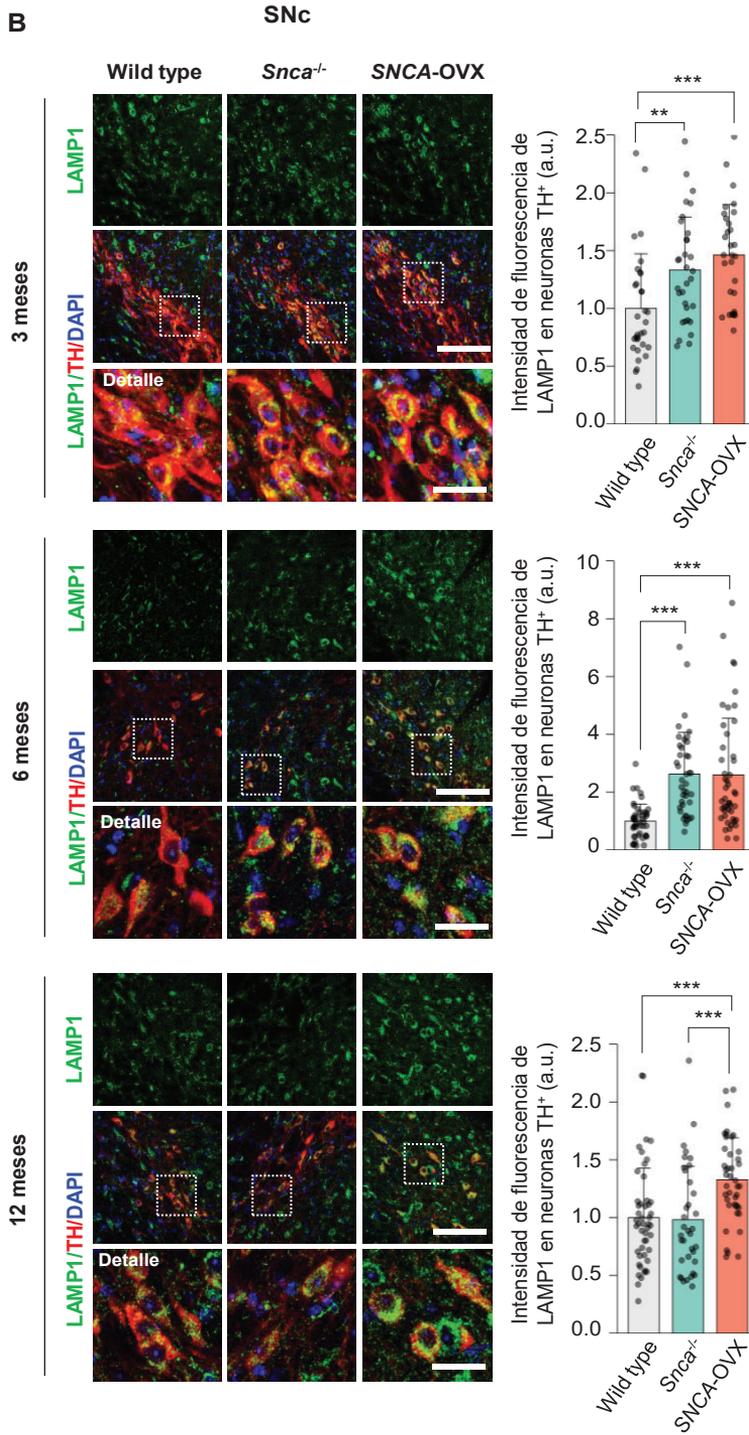


Figura 33. Niveles proteínicos del marcador lisosomal LAMP1 en muestras cerebrales de los modelos de  $\alpha$ Syn a los 6 y 12 meses de edad. Inmunoblot representativo de los niveles de expresión proteínica de LAMP1 y  $\beta$ Actina en muestras de corteza (CTX), estriado (STR) y mesencéfalo ventral (vM) de los tres genotipos a los 6 y 12 meses de edad, con su cuantificación correspondiente (n = 4). Los datos están representados en diagramas de cajas y los puntos representan valores de animales individuales.

Detectamos LAMP1 mediante inmunofluorescencia en secciones de estriado y SNc a los 3, 6 y 12 meses de edad. Los resultados obtenidos en el estriado coincidían con la tendencia del *Western blot*, ya que encontramos un incremento significativo de la intensidad de fluorescencia de LAMP1 a los 6 meses en esta región (Figura 34A); sin embargo, en la SNc, observamos un aumento en la intensidad de fluorescencia (Figura 34B) que no habíamos detectado al analizar los niveles de expresión proteínica por *Western blot*, de forma similar a lo que ocurría en el análisis de la proteína p62, por lo que probablemente se debieran al efecto de zona. Por otro lado, al añadir animales más jóvenes al estudio por inmunofluorescencia, encontramos que el aumento de LAMP1 en la SNc parecía comenzar a los 3 meses (Figura 34B).





**Figura 34. Análisis por inmunofluorescencia de lisosomas en estriado y SNc de los modelos de  $\alpha$ Syn a los 3, 6 y 12 meses de edad. (A)** Imágenes representativas de inmunofluorescencia mostrando LAMP1 (verde), TUBB3 (rojo) y DAPI (azul) en secciones estriatales (STR) de los modelos a los 3, 6 y 12 meses de edad, con sus respectivos detalles y cuantificaciones (8 campos por animal; n = 2 animales de 3 meses; n = 3 animales de 6 y 12 meses). Los datos están expresados como media  $\pm$  SD y los puntos representan valores de campos. Escala: 100  $\mu$ m. Escala de detalle: 25  $\mu$ m. **(B)** Imágenes representativas de inmunofluorescencia mostrando LAMP1 (verde), TH (rojo) y DAPI (azul) en secciones de *substantia nigra pars compacta* (SNc) de los modelos a los 3, 6 y 12 meses de edad, con sus respectivos detalles y cuantificaciones (12-16 neuronas TH<sup>+</sup> por animal; n = 2 animales de 3 meses; n = 3 animales de 6 y 12 meses). Los datos están expresados como media  $\pm$  SD y los puntos representan valores de células. Escala: 100  $\mu$ m. Escala de detalle: 25  $\mu$ m.

### 2.3.2. *El déficit de $\alpha$ Syn incrementa la señal lisosomal en neuronas estriatales embrionarias*

Evaluamos la cantidad de lisosomas en neuronas embrionarias en cultivo primario. Cuando detectamos la proteína LAMP1 por *Western blot* e inmunofluorescencia en neuronas estriatales *Snca*<sup>-/-</sup> y *SNCA-OVX* en cultivo, los resultados obtenidos fueron similares a los del tejido estriatal de 6 meses en el caso del déficit de  $\alpha$ Syn: las neuronas *Snca*<sup>-/-</sup> también mostraban un aumento de los niveles proteínicos de LAMP1 en comparación a las neuronas silvestres (Figura 35). En las neuronas con sobreexpresión de  $\alpha$ Syn no encontramos cambios en los niveles de LAMP1 por *Western blot* (Figura 35A), pero sí en las inmunofluorescencias, donde detectamos un incremento en el área de soma ocupada por lisosomas (Figura 35B). También analizamos cualitativamente la morfología lisosomal de estos cultivos tomando imágenes de microscopía confocal con la tecnología de superresolución HyVolution, que nos permitía resolver mejor estas estructuras. Observamos que, tanto las neuronas *Snca*<sup>-/-</sup> como las *SNCA-OVX* parecían presentar más lisosomas de tipo vacuolar en comparación a las neuronas silvestres (Figura 35C), por lo que los incrementos en la señal lisosomal podían deberse no solo a una mayor cantidad de lisosomas, sino también a un aumento en su tamaño.

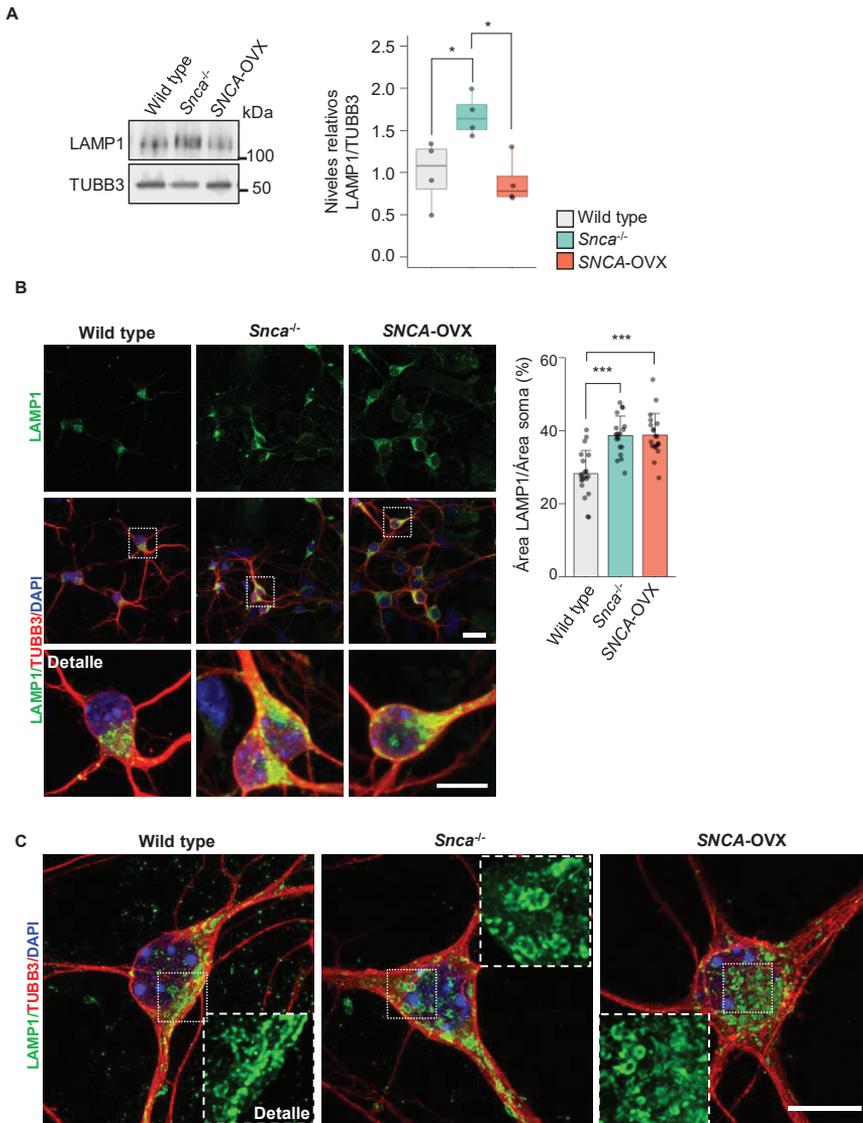
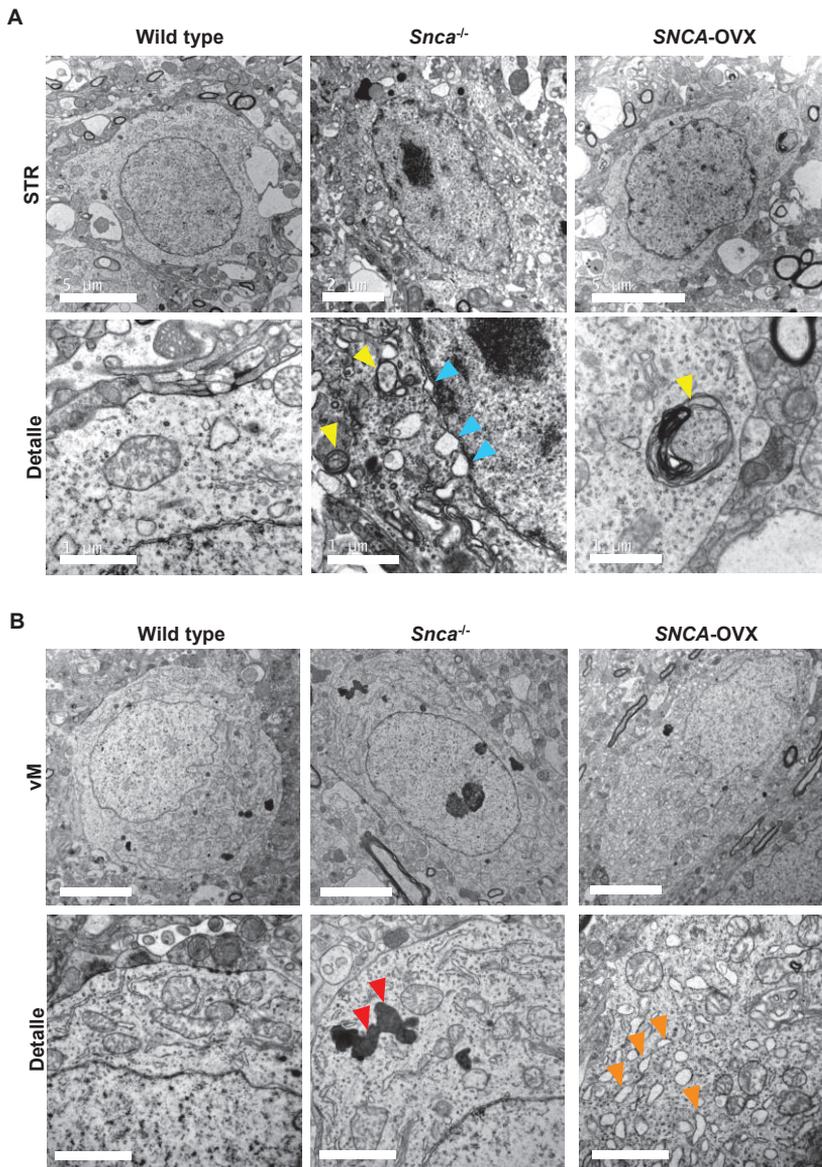


Figura 35. Estudio lisosomal en cultivos primarios de neuronas estriatales. (A) Inmunoblot representativo de los niveles proteínicos de LAMP1 en cultivos embrionarios estriatales de los modelos de  $\alpha$ Syn, con su respectiva cuantificación (n = 4). Los datos están representados en diagramas de cajas y los puntos representan valores de cultivos independientes. (B) Imágenes representativas de inmunofluorescencia de LAMP1 (verde), TUBB3 (rojo) y DAPI (azul) en neuronas estriatales, con su respectiva cuantificación (5 campos por cultivo; n = 4 cultivos independientes). Los datos están expresados como media  $\pm$  SD y los puntos representan valores medios de un campo. Escala: 25  $\mu$ m. Escala de detalle: 10  $\mu$ m. (C) Imágenes de microscopía confocal obtenidas con la tecnología de superresolución HyVolution, mostrando LAMP1 (verde), TUBB3 (rojo) y DAPI (azul) en neuronas estriatales. Se muestran también los detalles lisosomales correspondientes. Escala: 10  $\mu$ m.

## 2.4. Estudio preliminar de microscopía electrónica de transmisión

Para seguir profundizando en los defectos observados en las vesículas autofágicas, especialmente en aquellas LAMP1 positivas, realizamos un estudio de microscopía electrónica de transmisión (TEM, del inglés *transmission electron microscopy*) de las neuronas del estriado y del mesencéfalo ventral (vM) de nuestros modelos a los 6 meses de edad.

En términos generales, observamos ciertas alteraciones recurrentes en nuestros modelos (Figura 36) que sería necesario confirmar ampliando el estudio. En el estriado, las neuronas *Snca*<sup>-/-</sup> mostraban un aspecto más diferenciado del resto de genotipos, con un citoplasma visiblemente alterado en comparación a las neuronas silvestres y transgénicas. Estas neuronas presentaban bastantes vesículas (Figura 36A, flechas amarillas) y anomalías nucleares, incluyendo dilataciones de la envuelta nuclear (Figura 36A, flechas azules). En la mayoría de las neuronas *Snca*<sup>-/-</sup> fotografiadas, además, se podía observar un nucleolo mucho más condensado en comparación a las silvestres y a las transgénicas (Figura 36 y Figura 37). Por su parte, las neuronas estriatales *SNCA-OVX* mostraban un citoplasma y un núcleo más similar al de las neuronas silvestres, aunque detectamos la presencia de cuerpos multivesiculares en estas neuronas, identificados por la presencia de múltiples capas membranosas en el interior de una vesícula (Figura 36A, flecha amarilla). Por otro lado, las neuronas *Snca*<sup>-/-</sup> mesencefálicas también presentaban una mayor condensación nucleolar, y estructuras lisosomales de gran tamaño (Figura 36B, flechas rojas). En el mesencéfalo ventral el modelo *SNCA-OVX* sí parecía presentar sus propias alteraciones, distintas del modelo *knockout*, ya que mostraban cisternas de RE dilatadas por el citoplasma que podrían asociarse a una situación de estrés de RE (Figura 36B, flechas naranjas).



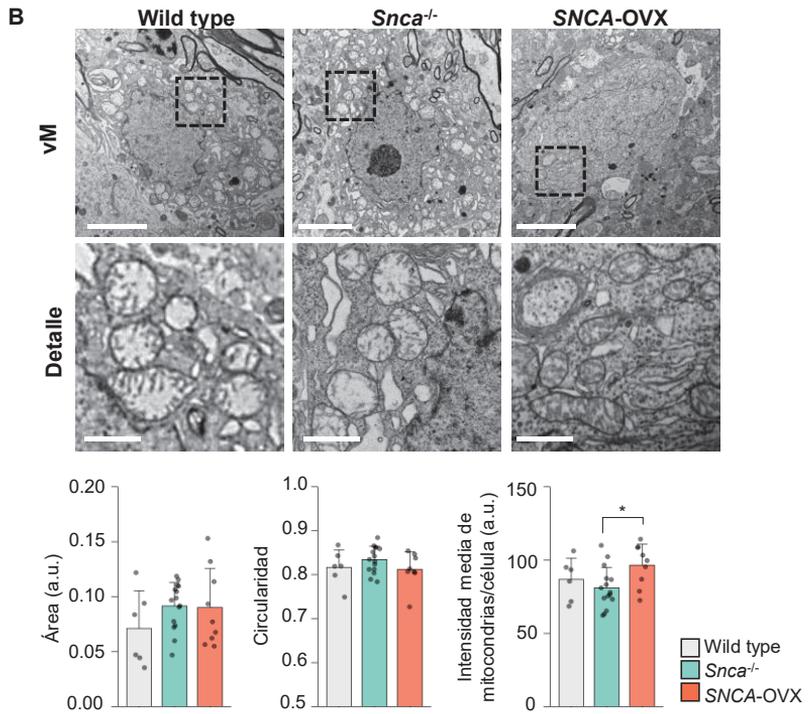
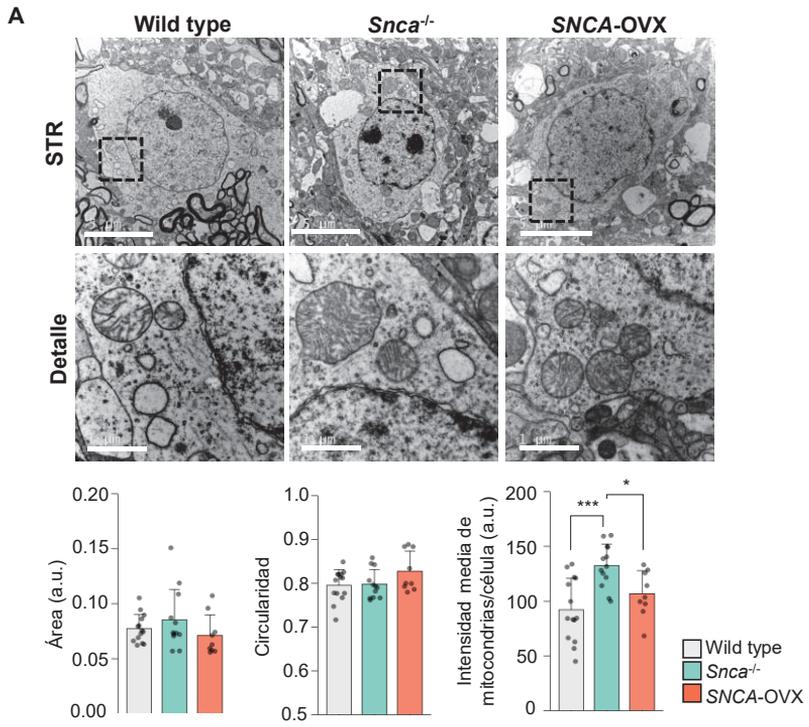
**Figura 36. Resultados preliminares del estudio por TEM. (A)** Imágenes representativas de TEM de las alteraciones observadas en los modelos de  $\alpha$ Syn en el estriado (STR). Se destacan las vesículas o cuerpos multivesiculares (flechas amarillas) y las alteraciones de la envuelta nuclear (flechas azules). Escala: 5  $\mu$ m. Escala de detalle: 1  $\mu$ m. **(B)** Imágenes representativas de TEM de las alteraciones observadas en los modelos de  $\alpha$ Syn en el mesencéfalo ventral (vM). Se destacan los lisosomas (flechas rojas) y las dilataciones de RE (flechas naranjas). Escala: 5  $\mu$ m. Escala de detalle: 1  $\mu$ m.

2.4.1. *La ausencia de  $\alpha$ Syn provoca cambios morfológicos en las mitocondrias estriatales*

Si bien en el estriado detectamos la presencia de vesículas y cuerpos multivesiculares, las alteraciones más visibles, inesperadamente, las encontramos en las mitocondrias de las neuronas *Snca*<sup>-/-</sup>. Estas mitocondrias mostraban un aspecto más oscuro en comparación a las silvestres y las transgénicas, debido a un incremento en la cantidad de crestas en su interior, que ocupaban toda la superficie de matriz mitocondrial disponible. Realizamos por ello un análisis morfológico mitocondrial, incluyendo el área, la circularidad, y la intensidad media de gris de cada mitocondria, como medida indirecta de la cantidad de crestas en su interior. No encontramos diferencias significativas ni en el área ni en la circularidad de ninguno de los modelos de  $\alpha$ Syn en el estriado, pero corroboramos que las mitocondrias deficientes en  $\alpha$ Syn presentaban un incremento significativo de la cantidad de crestas (Figura 37A).

A nivel de vM no detectamos diferencias significativas en el modelo *Snca*<sup>-/-</sup> en comparación al silvestre; sin embargo, sí exhibían una reducción significativa de crestas respecto a las mitocondrias SNCA-OVX (Figura 37B). El modelo de sobreexpresión, por su parte, no mostraba diferencias en sus crestas respecto a individuos silvestres, ni en las mitocondrias estriatales ni en el vM (Figura 37).

Por tanto, detectamos que las mayores anomalías morfológicas se encontraban en las mitocondrias estriatales sin  $\alpha$ Syn, mientras que el modelo SNCA-OVX no presentaba cambios de este tipo en ninguna de las regiones estudiadas.

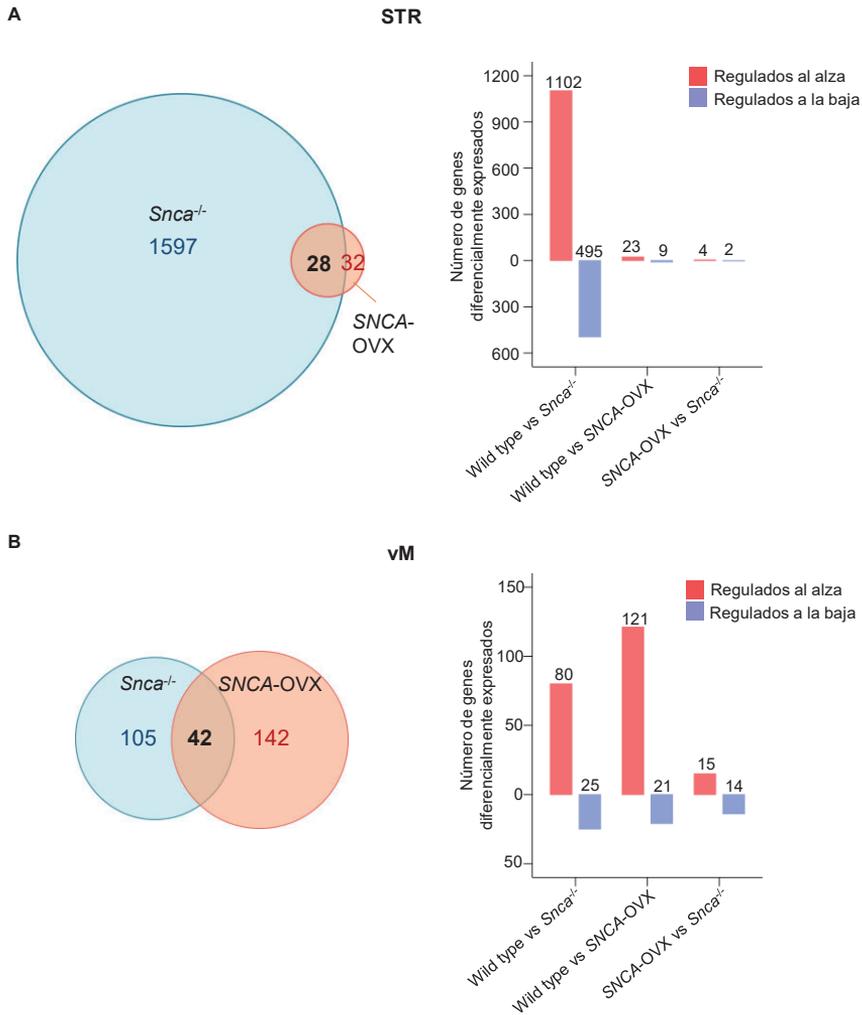


**Figura 37. Estudio preliminar por TEM de morfología mitocondrial en los modelos de  $\alpha$ Syn, en estriado (STR) y mesencéfalo ventral (vM), a los 6 meses de edad. (A)** Imágenes representativas de TEM de neuronas estriatales de individuos silvestres (*wild type*), *Snca*<sup>-/-</sup> y *SNCA-OVX*, con sus respectivos detalles. En la parte inferior se muestra el análisis cuantitativo del área, circularidad e intensidad media de mitocondrias por célula (14 células *wild type*, 13 células *Snca*<sup>-/-</sup> y 9 células *SNCA-OVX*; n = 1 animal por genotipo). Los datos están expresados como media  $\pm$  SD y los puntos representan valores de células. Escala: 5  $\mu$ m. Escala de detalle: 1  $\mu$ m. **(B)** Imágenes representativas de TEM de neuronas mesencefálicas de individuos silvestres (*wild type*), *Snca*<sup>-/-</sup> y *SNCA-OVX*, con sus respectivos detalles. En la parte inferior se muestra el análisis cuantitativo del área, circularidad e intensidad media de mitocondrias por célula (6 células *wild type*, 15 células *Snca*<sup>-/-</sup> y 9 células *SNCA-OVX*; n = 1 animal por genotipo). Los datos están expresados como media  $\pm$  SD y los puntos representan valores de células. Escala: 5  $\mu$ m. Escala de detalle: 1  $\mu$ m.

## 2.5. Análisis transcriptómico

Para profundizar e identificar vías bioquímicas específicas que pudiésemos relacionar con nuestros hallazgos, realizamos un estudio del transcriptoma (*RNAseq*) de muestras de estriado y de mesencéfalo ventral (vM) de animales de 6 meses, edad a la cual habíamos detectado la mayoría de las alteraciones.

Se determinaron como genes diferencialmente expresados (DE) aquellos con un Log<sub>2</sub>FoldChange absoluto > 0.5 y un *P* valor ajustado < 0.05. A nivel estriatal, en el modelo *Snca*<sup>-/-</sup> encontramos 1597 genes DE (1102 regulados al alza y 495 a la baja), mientras que en el modelo *SNCA-OVX* sólo detectamos 32 genes DE (23 regulados al alza y 9 a la baja), en comparación a animales silvestres (Figura 38A). En el análisis de vM encontramos 105 genes DE en los animales *Snca*<sup>-/-</sup> (80 genes regulados al alza y 25 a la baja) y 142 genes DE en el modelo *SNCA-OVX* (121 genes regulados al alza y 21 a la baja), también respecto a los animales silvestres (Figura 38B). La comparativa entre ambos modelos (*SNCA-OVX* vs *Snca*<sup>-/-</sup>), por su parte, era la categoría con menor número de genes DE tanto en el vM como a nivel estriatal (6 genes DE en estriado y 29 genes DE en el vM) (Figura 38A y B).



**Figura 38. Representación de resultados globales del análisis transcriptómico. (A)** Diagrama de Euler (izquierda) de genes diferencialmente expresados en el estriado (STR) en los modelos *Snca*<sup>-/-</sup> y SNCA-OVX, en comparación a los animales silvestres (*wild type*), y el solapamiento entre ambos. Se muestra también la distribución de genes regulados al alza y a la baja en cada comparativa con gráficos de barras (derecha). **(B)** Diagrama de Euler (izquierda) de genes diferencialmente expresados en el mesencéfalo ventral (vM) en los modelos *Snca*<sup>-/-</sup> y SNCA-OVX, en comparación a los animales silvestres (*wild type*), y el solapamiento entre ambos. Se muestra también la distribución de genes regulados al alza y a la baja en cada comparativa con gráficos de barras (derecha).

Comenzamos explorando los 10 primeros genes DE (ordenados en base al *P* valor ajustado) en cada comparativa y región. Observamos que *Rb1cc1/Fip200* se encontraba entre ellos en el estriado, con una expresión incrementada

tanto en el modelo de déficit como en el de sobreexpresión de  $\alpha$ Syn en esta región (Tablas 6 y 7). Este gen forma parte de uno de los complejos clave de inducción autofágica y regula la formación de autofagosomas mediante su interacción con Atg16L1, lo que podría indicarnos de nuevo que, más que ante un flujo defectuoso o enlentecido, nos encontramos ante una inducción autofágica en el estriado de nuestros modelos. También detectamos que algunos de los genes que se encontraban entre los primeros eran genes próximos al gen *Snca*, como es el caso de *Mmrn1* o *Dnah6*, por lo que los cambios en su expresión se deberían a las propias modificaciones del locus de *Snca* que comparten tanto el modelo *Snca*<sup>-/-</sup> como el modelo *SNCA*-OVX (Chaprov et al., 2020).

Tabla 6. Primeros diez genes diferencialmente expresados en el estriado del modelo *Snca*<sup>-/-</sup>, en comparación a los animales silvestres.

ENSG	Símbolo	Log <sub>2</sub> FoldChange	P valor ajustado
ENSMUSG00000025889	<i>Snca</i>	-8.6279171	3.567420e-223
ENSMUSG00000054641	<i>Mmrn1</i>	10.3049884	6.393956e-12
ENSMUSG00000025907	<i>Rb1cc1</i>	1.3101809	2.101507e-10
ENSMUSG00000057894	<i>Zfp329</i>	1.0578172	3.143989e-09
ENSMUSG00000027737	<i>Slc7a11</i>	1.1982216	3.546953e-09
ENSMUSG00000046229	<i>Scand1</i>	-1.0493171	3.546953e-09
ENSMUSG00000052861	<i>Dnah6</i>	3.2431997	1.508075e-08
ENSMUSG00000059824	<i>Dbp</i>	-1.0595880	1.917605e-08
ENSMUSG00000062627	<i>Mysm1</i>	1.1281355	1.917605e-08
ENSMUSG00000027677	<i>Ttc14</i>	2.3266207	3.518854e-08

ENSG: identificador de ENSEMBL.

Tabla 7. Primeros diez genes diferencialmente expresados en el estriado del modelo SNCA-OVX, en comparación a los animales silvestres.

ENSG	Símbolo	Log <sub>2</sub> FoldChange	P valor ajustado
ENSMUSG00000054641	<i>Mmrn1</i>	9.5884331	1.213191e-09
ENSMUSG00000074733	<i>Zfp950</i>	1.2646520	1.015276e-05
ENSMUSG00000079084	<i>Ccdc82</i>	1.4029556	6.089774e-05
ENSMUSG00000052861	<i>Dnah6</i>	2.5875594	1.992095e-04
ENSMUSG00000036459	<i>Wtip</i>	-0.8721898	2.379512e-04
ENSMUSG00000022364	<i>Tbc1d31</i>	1.0073835	2.813226e-04
ENSMUSG00000046229	<i>Scand1</i>	-0.7492251	8.346925e-04
ENSMUSG00000025907	<i>Rb1cc1</i>	0.8612437	1.457349e-03
ENSMUSG00000032555	<i>Topbp1</i>	0.6234978	9.355695e-03
ENSMUSG00000071076	<i>Jund</i>	-0.5050805	9.355695e-03

ENSG: identificador de ENSEMBL.

Tabla 8. Primeros diez genes diferencialmente expresados en el mesencéfalo ventral del modelo *Snca*<sup>-/-</sup>, en comparación a los animales silvestres.

ENSG	Símbolo	Log <sub>2</sub> FoldChange	P valor ajustado
ENSMUSG00000025889	<i>Snca</i>	-7.8054965	6.967099e-176
ENSMUSG00000020420	<i>Zfp607a</i>	24.3930176	2.021044e-08
ENSMUSG00000074865	<i>Zfp934</i>	23.8086954	4.401383e-07
ENSMUSG00000096265	<i>4930467E23Rik</i>	-21.8434591	6.699016e-07
ENSMUSG00000054641	<i>Mmrn1</i>	7.8990465	8.189757e-07
ENSMUSG00000100254	<i>Trpc2</i>	-22.9745966	1.658180e-05
ENSMUSG00000035842	<i>Ddx11</i>	17.5362252	1.802088e-05
ENSMUSG00000078899	<i>Gm14434</i>	1.0828978	1.802088e-05
ENSMUSG00000069609	<i>Cd3001d4</i>	-22.3930499	2.836821e-05
ENSMUSG00000064140	<i>Trim38</i>	-21.8487220	5.319173e-05

ENSG: identificador de ENSEMBL.

Tabla 9. Primeros diez genes diferencialmente expresados en el mesencéfalo ventral del modelo SNCA-OVX, en comparación a los animales silvestres.

ENSG	Símbolo	Log <sub>2</sub> FoldChange	P valor ajustado
ENSMUSG00000035842	<i>Ddx11</i>	21.8607470	1.317847e-09
ENSMUSG00000020420	<i>Zfp607a</i>	25.1662864	2.712155e-09
ENSMUSG000000054641	<i>Mmrn1</i>	8.4476049	7.694433e-08
ENSMUSG000000078878	<i>Gm14432</i>	1.0122796	1.729827e-07
ENSMUSG000000078886	<i>Gm2026</i>	1.3994534	9.351831e-07
ENSMUSG000000040189	<i>Ccdc114</i>	24.4849752	1.344739e-06
ENSMUSG000000078899	<i>Gm14434</i>	1.1634287	2.015687e-06
ENSMUSG000000021720	<i>Rnf180</i>	-16.6148692	3.872571e-06
ENSMUSG000000009281	<i>Rarres2</i>	-16.4928417	4.507328e-06
ENSMUSG000000044501	<i>Zfp758</i>	1.2449705	2.102458e-05

ENSG: identificador de ENSEMBL.

2.5.1. *El déficit de  $\alpha$ Syn causa una desregulación bioenergética nigroestriatal en animales de 6 meses de edad, la cual es parcialmente compartida por los individuos transgénicos*

A continuación, evaluamos las categorías ontológicas en las cuales se enmarcaban los genes DE de cada región y comparativa. El análisis de los términos de la base de datos *Gene Ontology* (*GO terms*) permite conocer en qué procesos biológicos, componentes celulares, funciones moleculares o rutas están enriquecidos nuestros genes DE. Como nos interesaba determinar de qué forma se estaban afectando dichos procesos o componentes, llevamos a cabo el análisis de *GO terms* diferenciando entre genes con un incremento (regulados al alza) o con una reducción (regulados a la baja) de su expresión.

Cuando analizamos los *GO terms* de componentes celulares, categoría que resultó más informativa, encontramos varios resultados congruentes con el

estudio de TEM. El modelo *Snca*<sup>-/-</sup> presentaba un enriquecimiento en términos nucleares (p.ej.: “agregado nuclear”, “membrana nuclear”, “nucleolo”) procedente de genes regulados al alza en el estriado. Además, encontramos un enriquecimiento estadísticamente significativo en genes relacionados con funciones mitocondriales en los animales *Snca*<sup>-/-</sup> respecto a los animales silvestres, tanto a nivel de vM como a nivel estriatal (Figura 39). Curiosamente, el déficit de  $\alpha$ Syn generaba una regulación opuesta de los genes mitocondriales en las dos regiones cerebrales estudiadas: mientras en el vM, los genes mitocondriales aparecían entre aquellos con expresión incrementada (20/80 genes DE), en el estriado los encontrábamos en el grupo de genes con expresión reducida (119/495 genes DE). Muchos de estos genes alterados codifican componentes o proteínas accesorias de complejos de la cadena de transporte de electrones (CTE), tanto en vM como en el estriado (Figura 40), lo cual también queda reflejado en el análisis de los *GO terms* (p.ej.: “mitocondria”, “membrana mitocondrial interna”, “complejo I de la cadena respiratoria”) (Figura 39).

Analizamos también el enriquecimiento en rutas metabólicas de la base de datos *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG). Encontramos un enriquecimiento en rutas relacionadas con las principales enfermedades neurodegenerativas y, en línea con los hallazgos mitocondriales, este enriquecimiento procedía de los genes regulados a la baja a nivel estriatal y de los genes regulados al alza a nivel de vM en individuos *Snca*<sup>-/-</sup> (Figura 41).

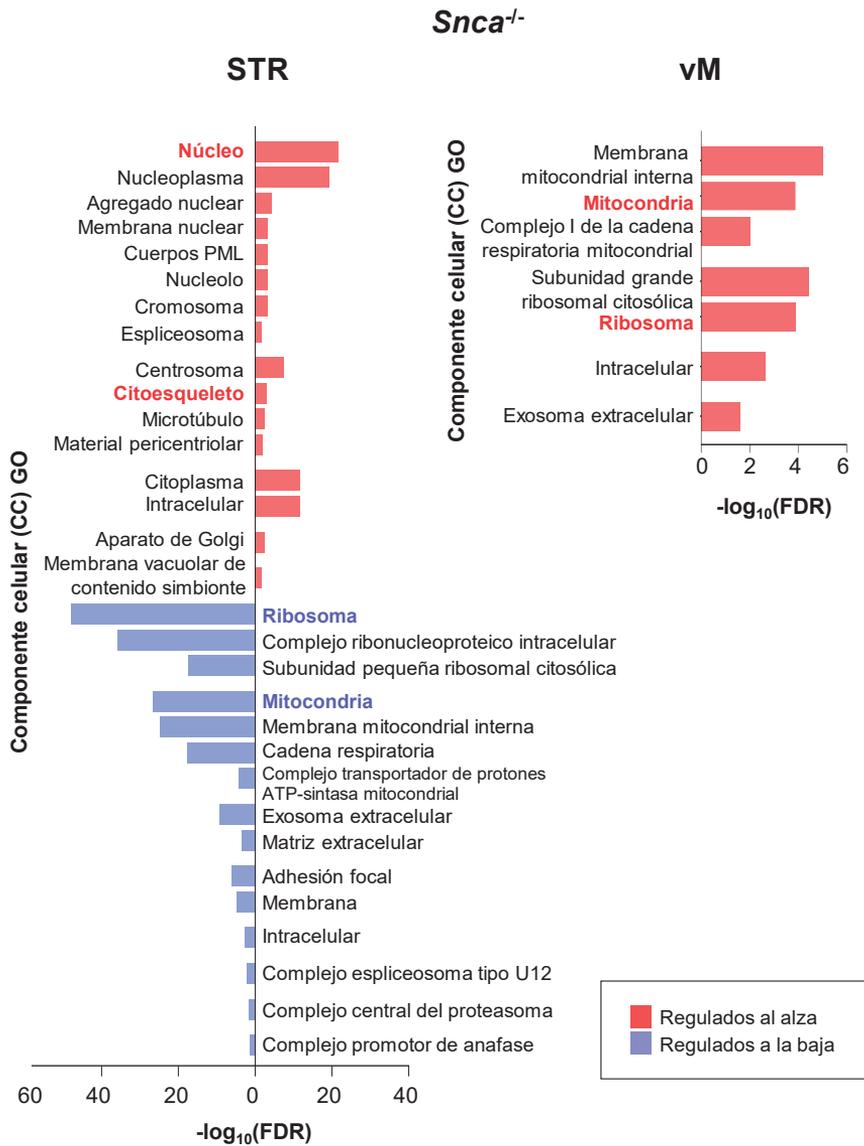


Figura 39. Análisis de enriquecimiento en *GO terms* de componentes celulares en animales *Snca*<sup>-/-</sup> de 6 meses, respecto a individuos silvestres. Se muestran los componentes celulares enriquecidos en los genes diferencialmente expresados al alza (rojo) y a la baja (azul), en el estriado (panel izquierdo) y en el mesencéfalo ventral (vM) (panel derecho). Están representadas las categorías estadísticamente significativas en base al FDR (*False Discovery Rate*), y se muestra el  $-\log_{10}(\text{FDR})$  como valor de enriquecimiento. Los componentes celulares con más términos relacionados se muestran en letras coloreadas. PML: *promyelocytic leukaemia*.

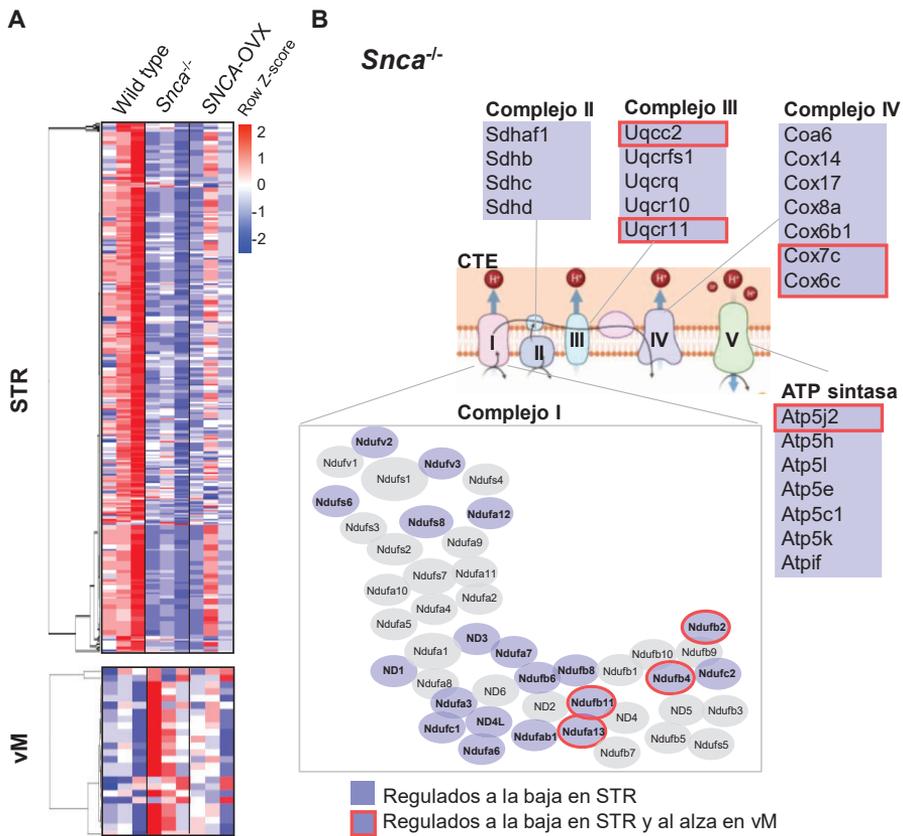


Figura 40. Genes mitocondriales diferencialmente expresados en individuos *Snca*<sup>-/-</sup> de 6 meses de edad. (A) Heatmap de genes diferencialmente expresados al alza (rojo) y a la baja (azul) en animales *Snca*<sup>-/-</sup>, en comparación animales silvestres, a nivel de estriado (STR) y mesencéfalo ventral (vM). Se muestra también la expresión de estos mismos genes en animales SNCA-OVX en comparación a los silvestres. Cada línea horizontal representa un gen; cada columna, un animal (n = 3). (B) Representación de genes diferencialmente expresados de la cadena de transporte de electrones ante el déficit de  $\alpha$ Syn, regulados a la baja en el estriado (azul) y, a la vez, al alza en el vM (azul con contorno rojo).

Concluimos que la falta de  $\alpha$ Syn estaba propiciando una situación de desregulación bioenergética de la vía nigroestriada, en la que el estriado parecía estar hipoactivado en este sentido, mientras que el vM mostraba una mayor expresión de genes de la CTE.

***Snca*<sup>-/-</sup>**

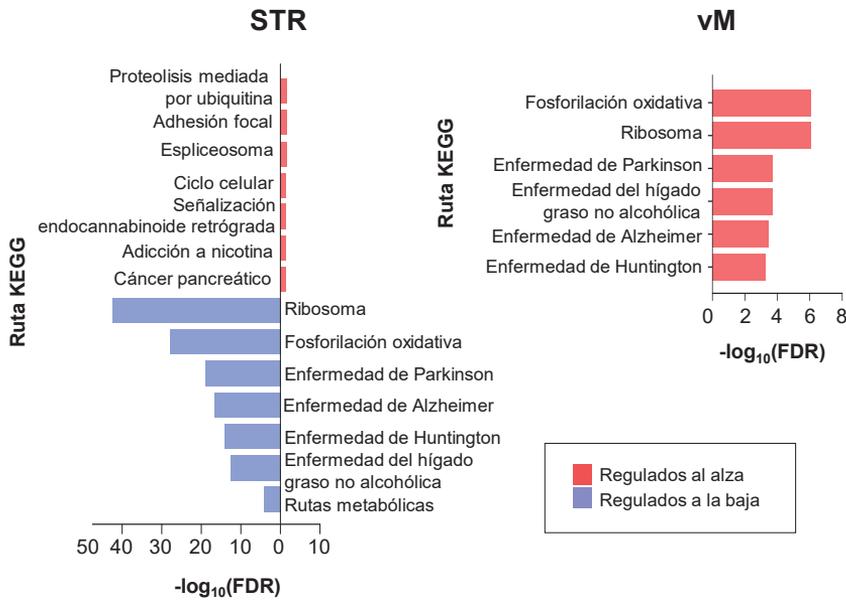


Figura 41. Análisis de enriquecimiento en *GO terms* de rutas KEGG de individuos *Snca*<sup>-/-</sup> de 6 meses, respecto a individuos silvestres. Se muestran las rutas enriquecidas en los genes diferencialmente expresados al alza (rojo) y a la baja (azul), en el estriado (panel izquierdo) y en el mesencéfalo ventral (vM) (panel derecho). Están representadas las categorías estadísticamente significativas en base al FDR (*False Discovery Rate*), y se muestra el -log<sub>10</sub>(FDR) como valor de enriquecimiento.

Al llevar a cabo el análisis de enriquecimiento funcional de *GO terms* en los genes DE del modelo *SNCA-OVX* respecto a animales silvestres, solo obtuvimos un enriquecimiento en genes regulados al alza en las categorías celulares "intracelular", "ribosoma", "subunidad grande ribosomal citosólica" y "nucleolo", específicamente a nivel de vM. No encontramos ningún enriquecimiento a nivel estriatal, lo cual sería esperable ya que el volumen de genes DE era muy inferior al que encontramos en el modelo *Snca*<sup>-/-</sup> (32 vs. 1597). Cuando representamos los genes mitocondriales DE en animales *Snca*<sup>-/-</sup> quisimos valorar su estado de expresión en los animales transgénicos también, añadiéndolos en el *heatmap* tanto en el estriado como en el vM (Figura 40A).

Al evaluar estos mapas observamos que la tendencia del modelo *SNCA*-OVX en el estriado era la misma que en el modelo de déficit, excepto en el caso de un individuo, lo cual explicaría por qué estos animales presentaban menor número de genes DE y ausencia enriquecimientos mitocondriales. Por otro lado, en el vM la introducción del transgén *SNCA* sobre el fondo *knockout*, en los ratones *SNCA*-OVX, sí parecía haber eliminado prácticamente por completo el efecto de incremento de expresión de genes mitocondriales, respecto al modelo *Snca*<sup>-/-</sup>, y no se observaba un comportamiento similar entre modelos.

2.5.2. *Los modelos de  $\alpha$ Syn muestran una alteración de la expresión de genes relacionados con exosomas, en paralelo a los cambios en la expresión de genes mitocondriales*

Cuando analizamos los enriquecimientos en *GO terms* de categorías celulares (Figura 39), observamos que había varias categorías, además de las mitocondriales, con una regulación opuesta en el estriado y en el vM de animales *Snca*<sup>-/-</sup>: las ribosomales y la categoría "exosoma extracelular". Evaluamos la categoría de exosomas al ser estos una forma potencial de transmisión de  $\alpha$ Syn que, según estos resultados, podría regularse a su vez por la propia  $\alpha$ Syn. Estos genes estaban regulados a la baja en el estriado de animales *Snca*<sup>-/-</sup> y, al igual que ocurría en las categorías mitocondriales, el modelo *SNCA*-OVX tenía este mismo patrón de expresión a la baja exceptuando un animal. En cuanto al vM detectamos un incremento en la expresión de genes de la categoría de exosomas en individuos *Snca*<sup>-/-</sup>, en línea con los hallazgos mitocondriales, pero no en los *SNCA*-OVX (Figura 42).

2.5.3. *El déficit de  $\alpha$ Syn genera un incremento en la expresión de genes axonales en el estriado*

Aunque no alcanzaban la significación estadística para considerarse categorías celulares enriquecidas, en el análisis de componentes celulares también encontramos algunos términos axonales y sinápticos. Dada la relación entre  $\alpha$ Syn y la dinámica vesicular sináptica en los axones, exploramos cómo se estaba alterando la expresión de los genes DE englobados en estas categorías celulares. Encontramos que, en este caso, el déficit de  $\alpha$ Syn incrementaba la expresión de genes axonales/sinápticos a nivel estriatal (Figura 42). En cuanto a los individuos transgénicos, no observamos ninguna tendencia clara hacia una regulación al alza o a la baja, ya que cada individuo mostraba una expresión distinta de estos genes. La falta de  $\alpha$ Syn, por tanto, estaba generando una desregulación sináptica a nivel estriatal, con un incremento de la expresión de genes axonales y sinápticos.

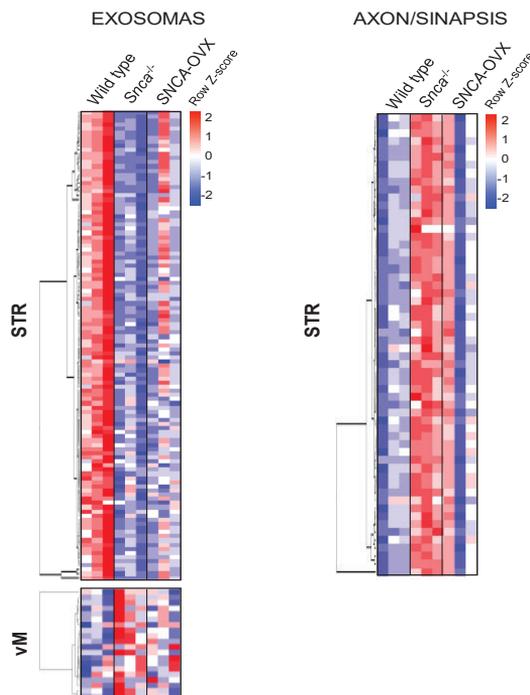


Figura 42. Genes de las categorías celulares "exosoma extracelular", "axón" y "sinapsis" diferencialmente expresados en individuos *Snca*<sup>-/-</sup> de 6 meses de edad. Heatmaps de genes diferencialmente expresados al alza (rojo) y a la baja (azul) en animales *Snca*<sup>-/-</sup>, en comparación animales silvestres, a nivel de estriado (STR) y mesencéfalo ventral (vM). Se muestra también la expresión de estos mismos genes en animales *SNCA*-OVX en comparación a los silvestres. Cada línea horizontal representa un gen; cada columna, un animal (n = 3).

## 2.6. Estudio de los contactos entre mitocondrias y lisosomas

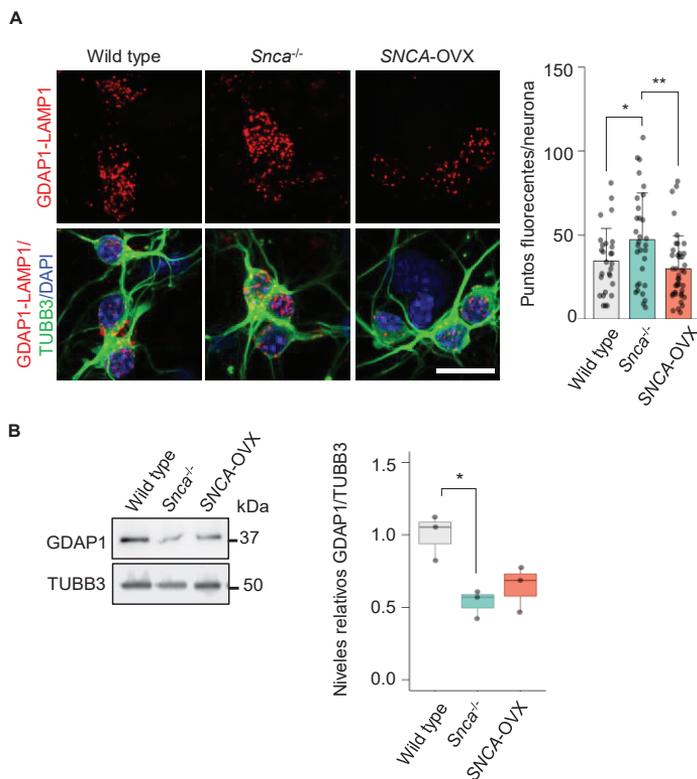
Tanto las mitocondrias como los lisosomas desempeñan papeles principales en las enfermedades neurodegenerativas y, recientemente, se ha demostrado que los contactos entre ellos son cruciales para el correcto funcionamiento de dichos orgánulos, ya que regulan su dinámica, morfología e identidad (Wong et al., 2018; Cantarero et al., 2020). Las profundas alteraciones que habíamos detectado en la expresión de genes mitocondriales y los incrementos en la señal lisosomal nos hicieron preguntarnos cuál era el estado de la relación entre ambos orgánulos ante la falta y la sobreexpresión de  $\alpha$ Syn ya que, como se ha comentado en la introducción, ya se ha reportado que  $\alpha$ Syn afecta a otros contactos mitocondriales como las MAM (mitocondria-RE). En nuestro grupo hemos descrito el primer par de proteínas de anclaje entre la mitocondria y el lisosoma, estableciendo así una vía de estudio de sus contactos, y cómo la falta de una de las proteínas implicadas en este anclaje, GDAP1, genera defectos en la red mitocondrial y en la morfología lisosomal (ANEXO). GDAP1 es una proteína de fisión mitocondrial con profundas implicaciones en la homeostasis de las mitocondrias a múltiples niveles (contactos, dinámica y estrés oxidativo), así como en el proceso de autofagia; mutaciones en el gen *GDAP1* causan la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, una neuropatía periférica hereditaria en la que se ven afectados los axones de las motoneuronas (Cantarero et al., 2020). Quisimos por todo ello evaluar la interacción de este par de anclaje, GDAP1-LAMP1, en cultivos neuronales estriatales de nuestros modelos.

El ensayo de ligación por proximidad (PLA) permite identificar interacciones entre proteínas endógenas *in situ*, mediante la amplificación de sondas fluorescentes que detectan los anticuerpos específicos contra nuestras proteínas de interés. Esta amplificación sólo se da cuando ambas proteínas están a una distancia menor de 40 nm, y puede visualizarse gracias a la señal fluorescente que genera, de forma que, a más interacciones, más puntos fluorescentes obtendremos (Alam, 2018). Esta técnica, por ello, se ha utilizado ampliamente en el estudio de los contactos entre orgánulos, debido a su simplicidad y especificidad (Huang et al., 2020).

#### 2.6.1. *El déficit de $\alpha$ Syn incrementa los contactos entre las mitocondrias y los lisosomas*

Para evaluar los contactos entre la mitocondria y el lisosoma en neuronas estriatales de los modelos de  $\alpha$ Syn llevamos a cabo experimentos de PLA en cultivos primarios para detectar la interacción del par de anclaje GDAP1-LAMP1. Detectamos un incremento significativo de esta interacción en las neuronas *Snca*<sup>-/-</sup>, mientras que el modelo de sobreexpresión no mostró cambios respecto a las neuronas silvestres (Figura 43A). Este incremento podría ser esperable ya que, de acuerdo con los resultados anteriores, las neuronas deficientes en  $\alpha$ Syn muestran mayor cantidad del marcador LAMP1, por lo que el aumento de contactos podía ser a consecuencia de ello. Por esta razón, evaluamos los niveles proteínicos de la pareja de anclaje de LAMP1, GDAP1, y detectamos que se encontraba reducida en neuronas *Snca*<sup>-/-</sup>; aunque no alcanzaba la significación estadística, la reducción en los niveles de GDAP1 parecía compartirse también por el modelo de sobreexpresión (Figura 43B).

Por tanto, ante la falta de  $\alpha$ Syn encontrábamos un incremento de los contactos entre la mitocondria y los lisosomas, reflejado por un incremento de las interacciones GDAP1-LAMP1. Este incremento no podía explicarse únicamente por mayores niveles de LAMP1, puesto que había una reducción significativa de los niveles de GDAP1, una proteína crucial para estos contactos y para el mantenimiento de la homeostasis mitocondrial cuya falta de función, además, está implicada en la neuropatía de Charcot-Marie-Tooth.



**Figura 43.** Estudio de los contactos mitocondria-lisomas y de la proteína de anclaje GDAP1 en neuronas estriatales embrionarias. **(A)** Imágenes representativas del ensayo de ligación por proximidad (PLA) de las proteínas GDAP1 y LAMP1 (rojo), e inmunofluorescencia de TUBB3 (verde) y DAPI (azul), en neuronas estriatales embrionarias. Se muestra la cuantificación correspondiente de puntos de interacción/neurona (28 células *wild type*, 31 células *Snca*<sup>-/-</sup>, 41 células SNCA-OVX, n = 4 cultivos independientes). Los datos están representados como medias  $\pm$  SD y los puntos representan neuronas. Escala: 25  $\mu$ m. **(B)** Inmunoblot representativo de los niveles de expresión proteínica de GDAP1 y TUBB3 en neuronas estriatales embrionarias, y su cuantificación correspondiente (n = 3 cultivos independientes). Los datos están representados en diagramas de cajas y los puntos representan valores de cultivos independientes.

## CAPÍTULO III.

### PROCESOS NEUROINFLAMATORIOS EN MODELOS DE $\alpha$ SYN

Como se ha expuesto en la introducción, uno de los eventos celulares que puede estar condicionando la muerte neuronal en enfermedades como la EP es la neuroinflamación, es decir, las respuestas inflamatorias que se generan a nivel del sistema nervioso central y que se traducen en la activación de ciertos tipos de células inmunes para resolver el daño o infección desencadenante de la respuesta. Con el fin de conocer si las alteraciones asociadas a la falta y/o al exceso de  $\alpha$ Syn, eran capaces de infligir un daño neuronal e iniciar o modificar las respuestas neuroinflamatorias en nuestros modelos, estudiamos células efectoras, así como rutas de señalización claves que podrían estar implicadas en estas respuestas. Este estudio neuroinflamatorio nos permitía, además, identificar diferencias en estas respuestas a nivel estriatal y de SNc, en línea con lo observado en los resultados previos, que pudieran dar pistas sobre la vulnerabilidad neuronal en la EP.

#### 3.1. Análisis transcriptómico y de rutas neuroinflamatorias

##### 3.1.1. *El déficit de $\alpha$ Syn produce cambios en la respuesta inmune*

Llevamos a cabo un *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA) para explorar más profundamente enriquecimientos funcionales en nuestro set de datos transcriptómicos de animales de 6 meses. El GSEA utiliza información de todos los genes analizados para calcular el enriquecimiento en listas predefinidas de genes asociados a términos GO, a diferencia del análisis anterior de enriquecimiento que utiliza específicamente la información de los genes DE. En este análisis utilizamos un umbral de FDR < 25 % para la selección de sets de genes candidatos para su posterior estudio.

Encontramos enriquecimientos estadísticamente significativos en el estriado de animales *Snca*<sup>-/-</sup> en comparación a los animales silvestres; en concreto, hallamos dos términos relacionados con neuroinflamación entre los 20 sets de genes más enriquecidos en esta comparativa y región (Figura 44A), y otros tres entre los 50 más enriquecidos (Figura 44B).

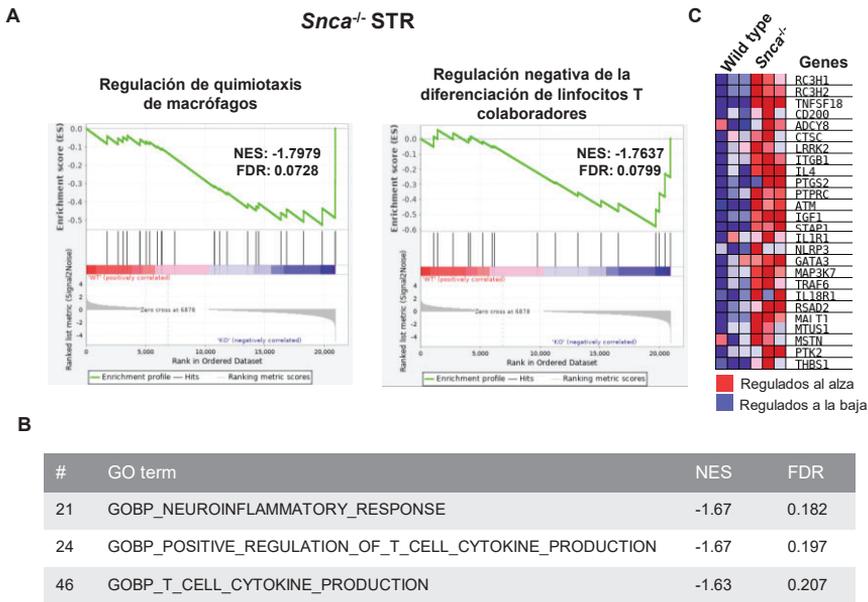


Figura 44. *Gene Set Enrichment Analysis* del estriado de individuos *Snca*<sup>-/-</sup> a los 6 meses de edad. (A) Gráficas de GSEA correspondientes a los sets de genes inmunitarios entre el top 20 de sets más enriquecidos. Se muestra su valor de enriquecimiento (NES) y su *False Discovery Rate* (FDR). (B) Términos de sets de genes inmunitarios entre el top 50 de sets más enriquecidos. Se muestra su valor de enriquecimiento (NES) y su *False Discovery Rate* (FDR). (C) Genes que contribuyen a los enriquecimientos inmunitarios en el top 50 (n = 3 animales por genotipo).

Estos enriquecimientos procedían de genes con una expresión incrementada (Figura 44C) que, según reflejaban los resultados del GSEA, estaban relacionados con la diferenciación y funciones de los linfocitos T colaboradores, así como con quimiotaxis de macrófagos. Investigando estos genes, detectamos que dos de ellos eran clave, concretamente, para la maduración específica a linfocitos T colaboradores de tipo Th2: GATA-3, el factor de transcripción responsable de dicha maduración, y la IL-4, la principal

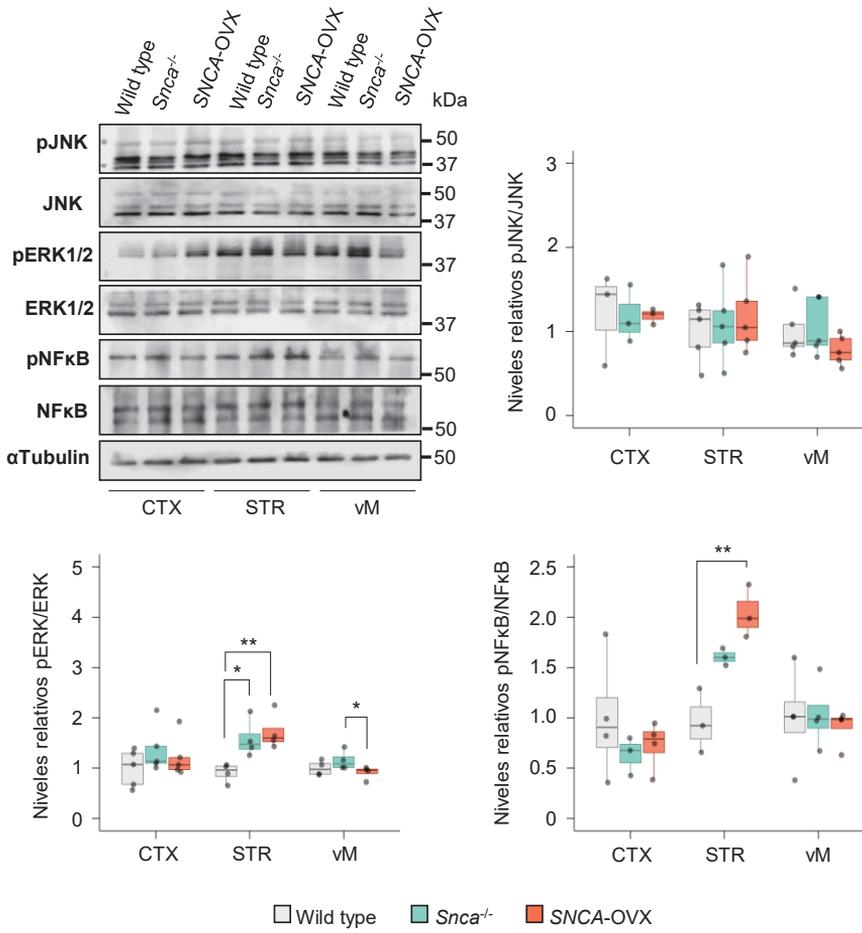
citoquina asociada a linfocitos Th2 (Zheng and Flavell, 1997; Seki et al., 2004). Muchos de ellos también estaban relacionados con la activación de la ruta de NF- $\kappa$ B (RC3H1/2, TNFSF18, IL1R1, MAP3K7, TRAF6, RSAD2, MALT1), una de las principales vías de señalización implicada en regulación de respuestas inflamatorias (Liu et al., 2017) que, además, es clave en la activación del factor GATA-3 (Das et al., 2001; Oh and Ghosh, 2013).

3.1.2. *Los animales  $Snca^{-/-}$  y SNCA-OVX de 6 meses muestran una activación estriatal de rutas de señalización relevantes para las respuestas inmunes*

Para corroborar los resultados del GSEA evaluamos varias rutas de señalización implicadas en respuestas inflamatorias, incluyendo la ruta de NF- $\kappa$ B, pero también otras vías relevantes como las rutas de quinasas MAP (MAPK) ERK1/2 y JNK. Para ello determinamos la presencia de fosforilaciones asociadas a la activación de estas rutas mediante *Western blot* en nuestros tejidos de interés, a los 6 y a los 12 meses de edad (Figura 45). Encontramos una activación de la ruta MAPK de ERK en el estriado tanto del modelo de déficit como de sobreexpresión de  $\alpha$ Syn a los 6 meses de edad. En cuanto a la ruta de NF- $\kappa$ B, únicamente detectamos su activación de forma significativa en el modelo SNCA-OVX; en cambio, el modelo  $Snca^{-/-}$  mostraba la misma tendencia sin alcanzar la significación estadística ( $P = 0.1797$ ) (Figura 45A). A los 12 meses no detectamos ninguna activación de estas rutas en los modelos, ni a nivel estriatal ni de vM (Figura 45B).

A

6 meses



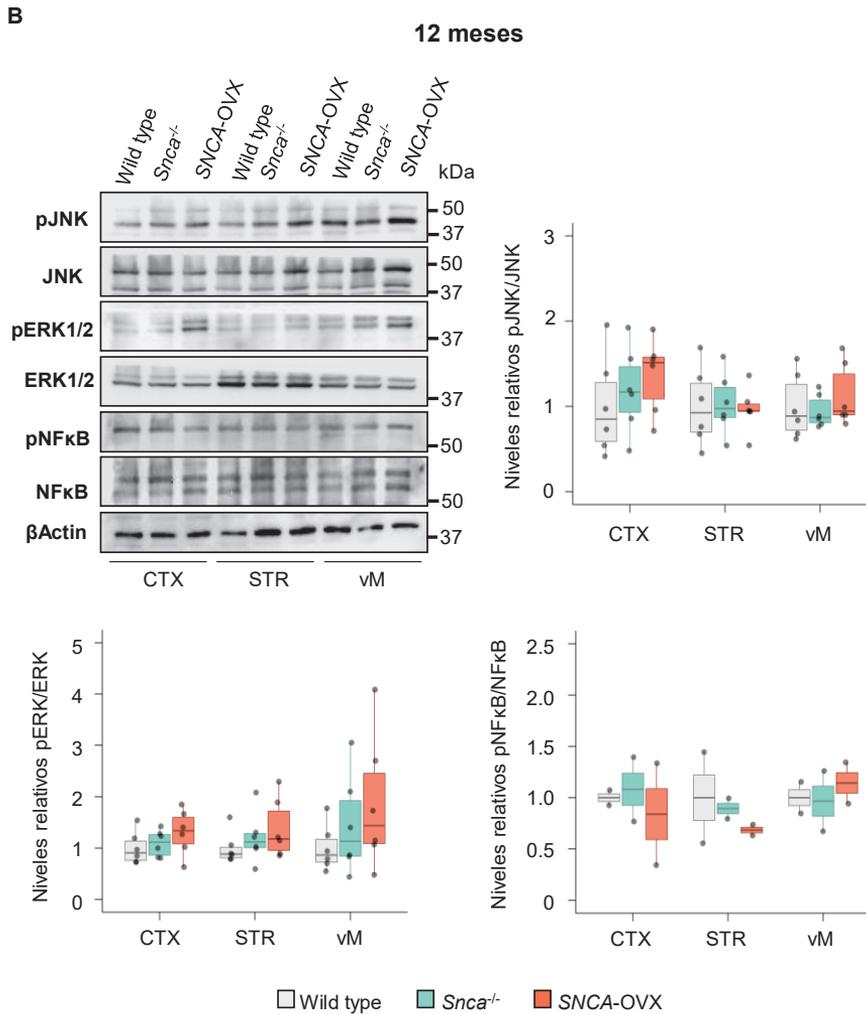


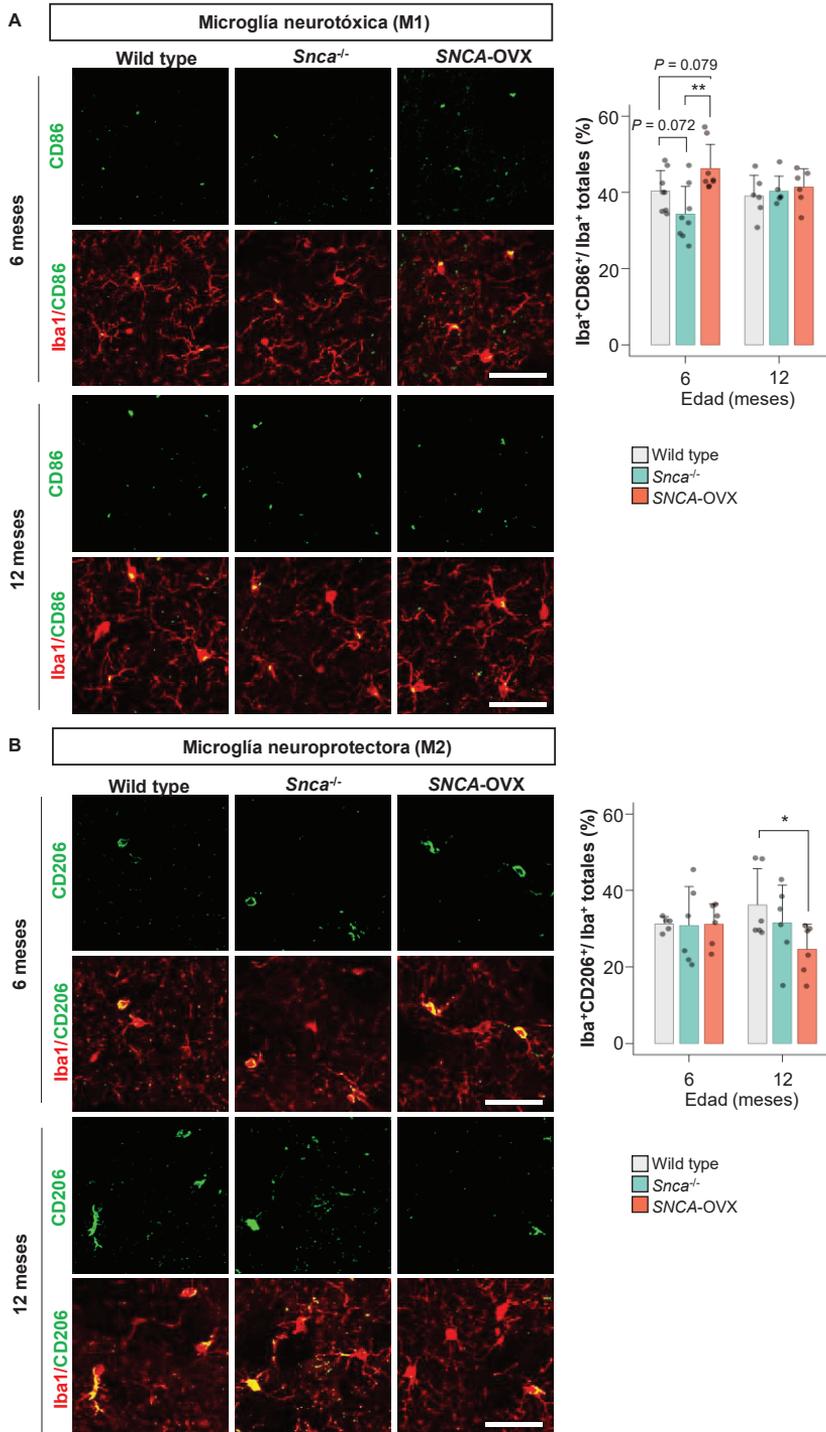
Figura 45. Estudio de las vías MAPK JNK y ERK y de la vía de NF-κB en muestras cerebrales de los modelos de  $\alpha$ Syn a los 6 y 12 meses de edad. (A) Inmunoblot representativo de los niveles de expresión proteínica de JNK, ERK1/2 y NF-κB, con sus respectivas fosforilaciones, y  $\alpha$ Tubulina, en muestras de corteza (CTX), estriado (STR) y mesencéfalo ventral (vM) de los tres genotipos a los 6 meses de edad, con su cuantificación correspondiente ( $n = 4-5$ ). (B) Inmunoblot representativo de los niveles de expresión proteínica de JNK, ERK1/2 y NF-κB, con sus respectivas fosforilaciones, y  $\beta$ Actina, en muestras de CTX, STR y vM de los tres genotipos a los 12 meses de edad, con su cuantificación correspondiente ( $n = 6$  JNK y ERK;  $n = 2$  NF-κB). Los datos están representados en diagramas de cajas y los puntos representan valores de animales individuales.

## 3.2. Estudio de fenotipos microgliales

3.2.1. *La falta de  $\alpha$ Syn reduce la microglía neurotóxica M1 en el estriado y la SNc de animales de 6 meses de edad, mientras que el transgén en individuos SNCA-OVX la incrementa respecto al modelo knockout*

En el GSEA detectamos como set de genes enriquecido el correspondiente a “regulación de quimiotaxis de macrófagos” (Figura 44A). La microglía, los macrófagos residentes del cerebro, son uno de los principales efectores celulares de las respuestas inmunes innatas, con profundas implicaciones en neurodegeneración, al ser las principales células presentadoras de antígenos. Además, recientemente se ha reportado que los linfocitos Th2 y la IL-4 que secretan promueven la activación alternativa de la microglía e inhiben la activación clásica a microglía neurotóxica (He et al., 2020), por lo que quisimos evaluar cómo afectaba la falta y el exceso de  $\alpha$ Syn a los fenotipos microgliales en nuestros modelos. Diferenciamos la microglía neurotóxica (M1) de la neuroprotectora (M2) en base a la detección conjunta del marcador microglial Iba1 con marcadores específicos de los tipos M1 (CD86) y M2 (CD206), en el estriado y en la SNc a los 6 y 12 meses de edad (Figuras 46 y 47).

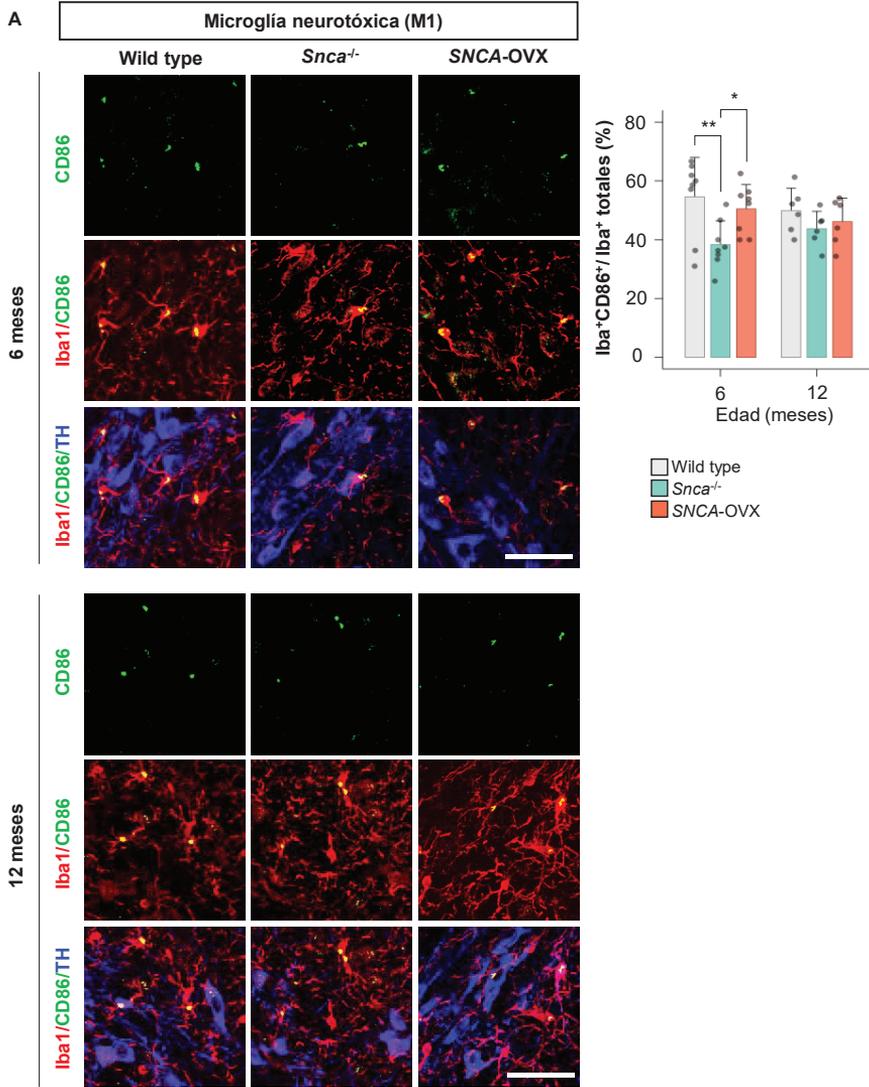
A nivel estriatal, la falta de  $\alpha$ Syn generaba una tendencia a niveles reducidos de microglía neurotóxica M1 (Iba1<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup>) respecto a individuos silvestres a los 6 meses de edad, pero no a los 12 meses (Figura 46A). En los animales SNCA-OVX, en cambio, detectamos que existía un incremento significativo de microglía M1 respecto al modelo *Snca*<sup>-/-</sup>, y una tendencia a mayores niveles respecto a los animales silvestres ( $P = 0.079$ ) (Figura 46A). Cuando analizamos la microglía neuroprotectora M2 (Iba1<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>) en esta misma región, no detectamos diferencias significativas en ninguno de los modelos a los 6 meses de edad, mientras que a los 12 meses los individuos SNCA-OVX mostraban una reducción de esta microglía (Figura 46B).



**Figura 46. Análisis de microglía neurotóxica y neuroprotectora en el estriado de los modelos de  $\alpha$ Syn a los 6 y 12 meses.** (A) Imágenes representativas de inmunofluorescencia mostrando el marcador de microglía neurotóxica CD86 (verde) y el marcador microglial Iba1 (rojo), en secciones estriatales de los modelos a los 6 y 12 meses de edad. Se muestra a la derecha la cuantificación correspondiente de porcentajes de microglía neurotóxica (2 campos por animal;  $n = 4$  animales de 6 meses;  $n = 3$  animales de 12 meses). Los datos están expresados como media  $\pm$  SD y los puntos representan valores de campo de cada estriado. Escala: 50  $\mu$ m. (B) Imágenes representativas de inmunofluorescencia mostrando el marcador de microglía neuroprotectora CD206 (verde) y el marcador microglial Iba1 (rojo), en secciones estriatales de los modelos a los 6 y 12 meses de edad. Se muestra a la derecha la cuantificación correspondiente de porcentajes de microglía neuroprotectora (2 campos por animal;  $n = 3$  animales). Los datos están expresados como media  $\pm$  SD y los puntos representan valores de campo de cada estriado. Escala: 50  $\mu$ m.

En la SNc también detectamos niveles reducidos de microglía neurotóxica a los 6 meses de edad en animales *Snca*<sup>-/-</sup>, mientras que el modelo SNCA-OVX mostraba niveles equivalentes a los de individuos silvestres (Figura 47A). No detectamos cambios en la microglía M1 a los 12 meses de edad (Figura 47A), como ocurría en el estriado, ni en la microglía M2 en ninguna de las edades estudiadas (Figura 47B).

Analizamos la cantidad total de células microgliales (Iba1<sup>+</sup>) en el estriado y la SNc, para descartar que los cambios observados estuvieran asociados a cambios globales en el número de células microgliales, y no detectamos diferencias en ninguno de los modelos estudiados, ni a los 6 ni a los 12 meses de edad, respecto a los animales silvestres (Figura 48).



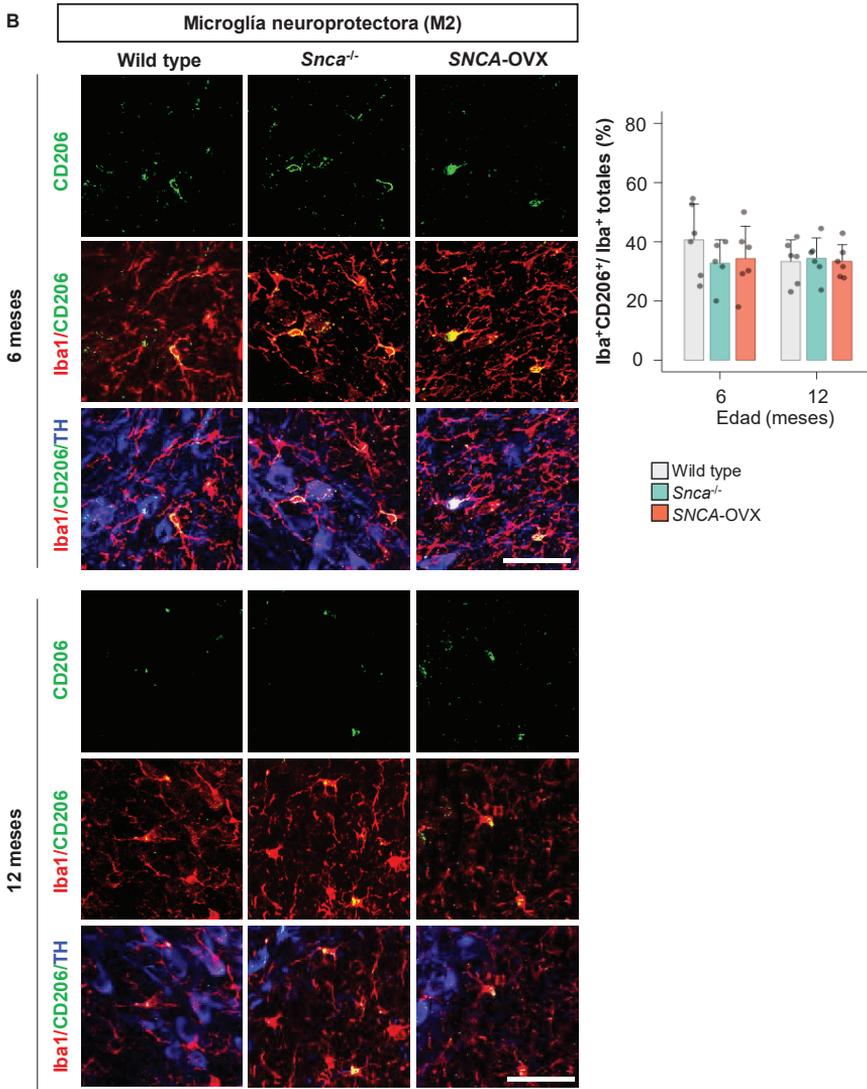


Figura 47. Análisis de microglía neurotóxica y neuroprotectora en la SNc de los modelos de  $\alpha$ Syn a los 6 y 12 meses. (A) Imágenes representativas de inmunofluorescencia mostrando el marcador de microglía neurotóxica CD86 (verde), el marcador microglial Iba1 (rojo) y el marcador dopaminérgico TH (azul), en secciones de SNc de los modelos a los 6 y 12 meses de edad. Se muestra a la derecha la cuantificación correspondiente de porcentajes de microglía neurotóxica (2 campos por animal;  $n = 4$  animales de 6 meses;  $n = 3$  animales de 12 meses). Los datos están expresados como media  $\pm$  SD y los puntos representan valores de campo de cada estriado. Escala: 50  $\mu$ m. (B) Imágenes representativas de inmunofluorescencia mostrando el marcador de microglía neuroprotectora CD206 (verde), el marcador microglial Iba1 (rojo) y el marcador dopaminérgico TH (azul) en secciones de SNc de los modelos a los 6 y 12 meses de edad. Se muestra a la derecha la cuantificación correspondiente de porcentajes de microglía neuroprotectora (2 campos por animal;  $n = 3$  animales). Los datos están expresados como media  $\pm$  SD y los puntos representan valores de campo de cada estriado. Escala: 50  $\mu$ m.

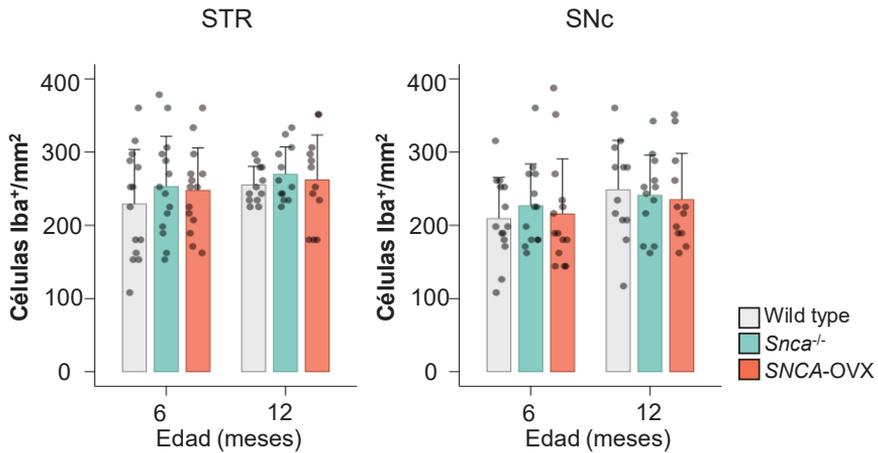
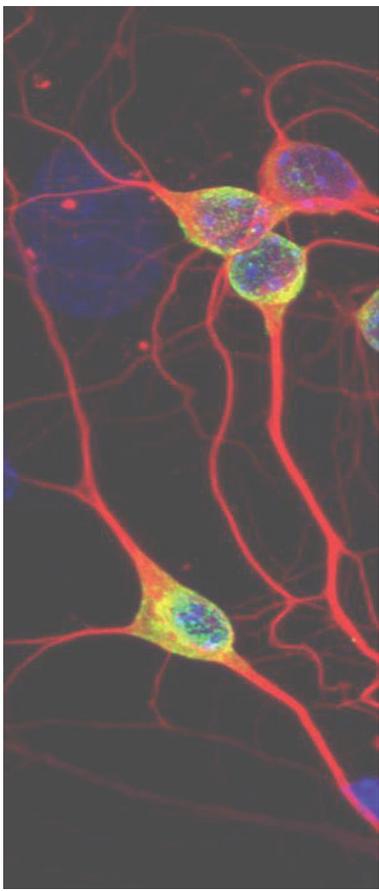


Figura 48. Microglía total en el estriado y la SNc de los modelos de  $\alpha$ Syn. Microglía (células Iba1<sup>+</sup>) por mm<sup>2</sup> en el estriado (STR) y la SNc de individuos silvestres (*wild type*), *Snca*<sup>-/-</sup> y SNCA-OVX a los 6 y 12 meses de edad (4 campos por animal; *n* = 3-4 animales). Los datos están expresados como media  $\pm$  SD y los puntos representan valores de campo.

Estos resultados indicaban que el déficit de  $\alpha$ Syn estaba inhibiendo el fenotipo neurotóxico en el estriado y la SNc, y aunque no era suficiente para propiciar la aparición de microglía neuroprotectora, sí podía reducir la ratio M1/M2. Por otra parte, la introducción del transgén de  $\alpha$ Syn incrementaba los niveles de microglía neurotóxica sobre el fondo *Snca*<sup>-/-</sup> sin alcanzar niveles patológicos. De nuevo, como ocurría en el resto de los análisis, detectamos las diferencias específicamente a los 6 meses de edad y, en este caso, el estriado y la SNc tenían una respuesta inmune muy similar, tanto ante la falta como ante la sobreexpresión de  $\alpha$ Syn. Por otra parte, los resultados indicaban que la presencia de  $\alpha$ Syn era necesaria para respuestas inmunes innatas dependientes de microglía, puesto que su ausencia inhibía la aparición de microglía neurotóxica.



# DISCUSIÓN



La siguiente discusión se vertebrará, siempre en línea con los resultados obtenidos, sobre cuatro debates fundamentales en la investigación de la EP: el uso de modelos animales, la vulnerabilidad neuronal selectiva, la axonopatía y el debate sobre la ganancia de función tóxica o pérdida de función de  $\alpha$ Syn en la EP.

## CAPÍTULO I.

### MODELOS MURINOS DE ENFERMEDAD DE PARKINSON

Los modelos murinos han constituido una herramienta de estudio de la EP, pero en la actualidad todavía existen profundos debates sobre la idoneidad del uso de estos modelos y su aplicabilidad a la patología humana (Barker and Björklund, 2020). Se han desarrollado modelos transgénicos, modelos basados en la administración de toxinas (MPTP, hidroxidopamina), y modelos basados en la inoculación de fibras pre-formadas de  $\alpha$ Syn. Si bien es cierto que no existe un modelo que recapitule todos los aspectos deseables para el estudio de la EP (presencia de agregados proteínicos, muerte neuronal selectiva y progresiva, alteraciones fenotípicas tempranas y disfunción motora más tardía), muchos de ellos han aportado conocimientos valiosos a sus áreas de estudio. En este trabajo hemos empleado dos modelos, obtenidos a partir de la cepa B6.Cg-Tg(SNCA)OVX37Rwm *Snca*<sup>tm1Rosl</sup>/J desarrollada por el grupo de Richard Wade-Martins en la Universidad de Oxford en el año 2013: el propio modelo SNCA-OVX y el modelo *Snca*<sup>-/-</sup> derivado del fondo sin  $\alpha$ Syn murina de esta cepa (Janezic et al., 2013). El modelo SNCA-OVX de sobreexpresión de  $\alpha$ Syn humana presenta alteraciones tempranas, previas a la muerte neuronal dopaminérgica y a la disfunción motora, que incluyen déficits en la liberación de dopamina en el estriado dorsal, una distribución alterada de vesículas sinápticas e, incluso, cambios en la actividad intestinal. Posteriormente, estos

animales muestran una reducción de la latencia de caída en la prueba del rotarod acelerado, concretamente a los 18 meses de edad, y una reducción de la longitud de zancada de las patas delanteras. La pérdida neuronal (30 %) también se produce a los 18 meses de edad, pero en ausencia de agregación proteínica de tipo cuerpos de Lewy, microgliosis o astrogliosis generalizada. Sin embargo, detectan la presencia de especies de alto peso molecular de  $\alpha$ Syn, correspondientes a oligómeros, en el mesencéfalo de animales tanto de 3 como de 18 meses de edad (Janezic et al., 2013). En una publicación posterior de rescate fenotípico sí observan, a nivel de SNc, astrogliosis a los 12 meses de edad, y microglía ameboide (activada) a los 6 y 9 meses de edad. También confirman la presencia de oligómeros de  $\alpha$ Syn, específicamente en el mesencéfalo, mediante ensayos de PLA de  $\alpha$ Syn, a partir de los 6 meses (Bengoa-Vergniory et al., 2020). Por su parte, el fondo *knockout* de  $\alpha$ Syn, murina del modelo SNCA-OVX se obtuvo mediante cruces con animales de la cepa B6;129X1-*Snca*<sup>tm1Rosl</sup>/J (Abeliovich et al., 2000), siendo por ello la cepa equivalente a nuestro modelo *Snca*<sup>-/-</sup> y de la cual se hablará en este apartado más adelante.

Inicialmente planteamos la caracterización fenotípica de los modelos SNCA-OVX y *Snca*<sup>-/-</sup> como una forma de corroborar lo reportado en la literatura, pero también de establecer correlaciones con los experimentos posteriores, realizados en animales de 3, 6 y 12 meses de edad. Como pretendíamos profundizar en los mecanismos fisiopatológicos responsables de la neurodegeneración selectiva y la axonopatía, descartamos hacer estudios a los 18 meses, momento en que ya era evidente la pérdida neuronal en la SNc según la publicación que describía el modelo. Encontramos una diferencia respecto a esta publicación al llevar a cabo la caracterización motora: a los 3 meses de edad detectamos diferencias entre los animales *Snca*<sup>-/-</sup> y SNCA-OVX

en la prueba del rotarod acelerado, puesto que, inesperadamente, el modelo *Snca*<sup>-/-</sup> mostró una reducción de la coordinación motora desde los 3 hasta los 12 meses de edad. En el caso de los animales *SNCA-OVX* no encontramos esta reducción a ninguna de las edades estudiadas, aunque no corroboramos si a los 18 meses observábamos el mismo fenotipo que ellos puesto que no incluimos esta edad en el estudio. Sin embargo, en el estudio de rescate (Bengoa-Vergniory et al., 2020) sí reportan una reducción de la coordinación motora a los 12 meses en individuos *SNCA-OVX* vs. individuos silvestres que nosotros no detectamos en nuestro estudio. En cuanto al análisis de huellas, confirmamos la reducción de la longitud de zancada en el modelo *SNCA-OVX* respecto a animales *Snca*<sup>-/-</sup> y silvestres.

Recientemente se ha publicado que la eliminación del componente *Ndufs2* del complejo I de la cadena respiratoria causa un fenotipo de EP progresivo en el tiempo en ratones. El modelo *Ndufs2*<sup>-/-</sup> presenta alteraciones motoras leves que son dependientes de una disfunción axonal dopaminérgica a nivel estriatal; en cambio, las alteraciones motoras más graves estarían asociadas a una disfunción dopaminérgica a nivel de la SNc (González-Rodríguez et al., 2021), lo cual sería congruente con nuestros resultados y los de Janezic y colaboradores. Los déficits de dopamina reportados en el modelo *SNCA-OVX* en el estriado dorsal serían suficientes para generar una alteración en su marcha, pero no para causarles una afectación general de la coordinación motora en el rotarod, que aparecería a los 18 meses en paralelo a la muerte neuronal en la SNc.

En cuanto al modelo *Snca*<sup>-/-</sup>, como se ha comentado, sería equivalente a la cepa B6;129X1-*Snca*<sup>tm1Rosl</sup>/J, ya que de ella se derivó el fondo *knockout* del modelo *SNCA-OVX*. Esta cepa fue publicada en el año 2000 y presenta una

reducción del contenido de dopamina estriatal como consecuencia de un incremento en la liberación de este neurotransmisor en ausencia de alteraciones vesiculares sinápticas o fenotípicas generales (Abeliovich et al., 2000). Este modelo, en concreto, se ha evaluado en otros estudios a nivel motor encontrándose, en uno de ellos, una ligera tendencia a menores latencias de caída en el rotarod acelerado, además de corroborarse la reducción de dopamina estriatal (Connor-Robson et al., 2016). En otro estudio, en cambio, sí encontraron una reducción significativa del desempeño en esta prueba motora, a causa de una patología neuromuscular hallada en estos animales (Pelkonen and Yavich, 2011). Estos estudios apoyarían, por tanto, nuestros resultados en la prueba del rotarod acelerado ante la falta de  $\alpha$ Syn.

Teniendo en cuenta todo esto, aparte de argumentar que debe existir una afectación a nivel de SNc para generar un fallo de coordinación motora, también pensamos que podría existir algún tipo de compensación en el modelo *SNCA-OVX* a raíz de la introducción del transgén de  $\alpha$ Syn humana, que estaría atenuando en cierto modo la disfunción neuromuscular a consecuencia del fondo *Snc $\alpha$ <sup>-/-</sup>*. Por ello no encontraríamos cambios en la prueba del rotarod en el modelo de sobreexpresión. Además, estos hallazgos reafirmaban la necesidad del uso del modelo *Snc $\alpha$ <sup>-/-</sup>* no solo para investigar las funciones de  $\alpha$ Syn, sino también para controlar qué cambios eran puramente asociados a la sobreexpresión de  $\alpha$ Syn (como era el caso de la reducción de longitud de zancada, por ejemplo) y qué cambios podían representar, en realidad, alteraciones patológicas derivadas de la falta de  $\alpha$ Syn murina. De hecho, el mismo grupo de Richard-Wade Martins publicó, en este modelo animal, un análisis proteómico en el que detectaban un incremento de proteínas mitocondriales en el mesencéfalo de animales *SNCA-OVX* respecto a individuos silvestres, sin comparar con animales *Snc $\alpha$ <sup>-/-</sup>* (Ryan et al.,

2021). Como hemos visto en nuestros resultados, el incremento en la expresión de genes mitocondriales ya está presente ante la falta de  $\alpha$ Syn endógena, por lo que no se podría afirmar que es a consecuencia de la sobreexpresión de  $\alpha$ Syn. El hecho de excluir a los individuos *Snca*<sup>-/-</sup> en trabajos posteriores a la descripción del modelo (Bengoa-Vergniory et al., 2020; Ryan et al., 2021) puede limitar la interpretación de resultados.

Los modelos animales son necesarios todavía para comprender muchos procesos fisiopatológicos, pero hay que tener muy presente en qué contexto se están desarrollando y qué factores los pueden condicionar. En nuestro caso concreto, la interpretación de los resultados compartidos entre el modelo *Snca*<sup>-/-</sup> y *SNCA-OVX* puede tener dos vertientes a considerar: i) son debidos al fondo sin  $\alpha$ Syn endógena (que no está tan exento de alteraciones como se ha reportado en estudios previos) o ii) ambos modelos, mediante mecanismos fisiopatológicos distintos, llegan a las mismas disfunciones. De este modo, los únicos cambios que hemos asociado inequívocamente a la sobreexpresión y presencia de oligómeros de  $\alpha$ Syn son aquellos específicos del modelo *SNCA-OVX* que no son compartidos con animales *Snca*<sup>-/-</sup>.

## CAPÍTULO II.

### FISIOPATOLOGÍA CELULAR ASOCIADA CON $\alpha$ SYN

#### $\alpha$ Syn en la vía autofágica-lisosomal

Como se ha comentado en la sección de resultados, hemos detectado una inducción del proceso de autofagia en el estriado tanto del modelo de ausencia (*Snca*<sup>-/-</sup>) como del modelo de sobreexpresión (*SNCA-OVX*) de  $\alpha$ Syn (Figura 49). Esta inducción quedaba reflejada por: i) los incrementos en marcadores de autofagosomas y de inducción autofágica (LC3, Beclina1) en

tejido de ratones de 6 meses; ii) la mayor respuesta al tratamiento con Baf.A1 de las neuronas estriatales en cultivo; y iii) la regulación al alza de un gen clave de inducción autofágica (*Rb1cc1/Fip200*) entre los genes con una regulación diferencial más significativa en el estriado de ambos modelos.

La posible función de  $\alpha$ Syn en el proceso de autofagia no ha sido investigada en profundidad, ya que se han hecho estudios enfocados al proceso fisiopatológico. En 2010, Winslow y colaboradores publicaron que la sobreexpresión de  $\alpha$ Syn impedía el proceso de autofagia, inhibiendo la proteína Rab1a, deslocalizando a Atg9 y evitando la formación del omegasoma (membrana precursora del fagóforo). En el material suplementario de este mismo artículo reportan que la reducción de niveles de  $\alpha$ Syn con RNA de interferencia genera un aumento del marcador de autofagosomas LC3-II en presencia y ausencia de Baf.A1, es decir, incrementaba el proceso de autofagia. Sugerían, por tanto, que  $\alpha$ Syn tendría un papel regulador en la síntesis de autofagosomas, ya que tanto un incremento como una disminución de sus niveles fisiológicos afectaba a dicho proceso (Winslow et al., 2010). Posteriormente, en otra publicación que investigaba el papel de  $\alpha$ Syn en la autofagia de linfocitos T humanos detectaban los mismos resultados: el silenciamiento del gen *SNCA* aumentaba los niveles de LC3-II de forma basal y tras los tratamientos de inhibición lisosomal con pepstatina A y E64d y, además, reducía los niveles del receptor de autofagia p62, congruente con un incremento autofágico y mayor degradación de dicho sustrato (Colasanti et al., 2014). En nuestros modelos no observamos que se produjera, en el estriado, ninguna reducción en el marcador de flujo autofágico p62, como cabría esperar de un aumento en la vía autofágica. Además, tras el tratamiento con Baf.A1 esperaríamos un incremento de p62 en neuronas silvestres (derivado de prevenir su

degradación lisosomal) que tampoco alcanzamos a detectar. Sin embargo, los cambios en LC3-II y en la ratio LC3-II/LC3-I sí mostraban en cultivos primarios estriatales que el tratamiento funcionaba en todos los genotipos. Este hecho nos hizo pensar que quizás las neuronas estriatales tenían una mayor dependencia de otros receptores de autofagia, lo que explicaría que p62 no fuera lo suficientemente resolutivo o sensible a cambios en el proceso de autofagia en el estriado, ni siquiera en neuronas silvestres. Únicamente detectamos un sutil cambio en la expresión de p62 entre los modelos de  $\alpha$ Syn ya que, en cultivo estriatal tras el tratamiento con Baf.A1, las neuronas parecían mostrar respuestas opuestas, y la diferencia entre modelos alcanzaba la significación estadística, pero no con respecto a neuronas silvestres. Cuando exploramos nuestros resultados transcriptómicos más allá de los enriquecimientos funcionales, en busca de cambios que explicaran o corroboraran esta inducción autofágica, detectamos que en el estriado la expresión de dos receptores de autofagia, NBR1 (Log2FoldChange: 0.555118086; P-valor ajustado: 0.04001495) y TAX1BP1 (Log2FolgChange: 0.680085443; P-valor ajustado: 0.00128243), estaba regulada al alza en el modelo *Snca*<sup>-/-</sup>, pero no la expresión de p62. Esto podría indicarnos que, a nivel transcriptómico, la inducción autofágica resultaba en o iba acompañada de un incremento en la expresión de estos receptores de autofagia. Según estos resultados, por tanto, para comprobar si la inducción se traducía en un incremento del flujo autofágico y una mayor degradación de sustratos, hubiera sido más resolutivo detectar los niveles proteínicos de NBR1 y TAX1BP1, en lugar de p62, ya que el proceso parecía ser más dependiente de dichos receptores. Cabe resaltar que, recientemente, se ha publicado un mecanismo por el cual TAX1BP1 es capaz de reclutar a Rb1cc1/FIP200, cuya expresión también encontramos incrementada, alrededor de sustratos autofágicos con NBR1, y promover así la formación local de autofagosomas en

un proceso independiente de LC3 (Ohnstad et al., 2020). Todo ello podría apuntar a que  $\alpha$ Syn es necesaria para que el proceso de autofagia ocurra correctamente, puesto que su ausencia promueve una inducción de esta vía. Esta inducción podría darse como respuesta a una necesidad de degradación, bien por la presencia de componentes celulares dañados, bien porque el proceso autofágico sea subóptimo ante la falta de  $\alpha$ Syn o ambos. En cualquier caso, esto explicaría que, a nivel transcriptómico, encontrásemos una regulación al alza de mecanismos alternativos del proceso autofágico, como el mencionado anteriormente para la formación de autofagosomas, de forma que se cumpla con las necesidades degradativas de la célula.

Según lo expuesto al inicio de este apartado, el modelo *SNCA-OVX* también mostraba evidencias de inducción autofágica, incluyendo la regulación transcriptómica de *Rb1cc1*, pero no mostraba cambios en la expresión de los receptores NBR1 o TAX1BP1. Sin embargo, esta inducción podía ser el efecto, de nuevo, del fondo sin  $\alpha$ Syn, atenuándose parcialmente al introducir el transgén *SNCA*.

En cuanto a la respuesta autofágica de los modelos de  $\alpha$ Syn en la *substantia nigra pars compacta* (SNc) o mesencéfalo ventral (vM), no detectamos ningún indicio de inducción autofágica, quizás debido a que las neuronas dopaminérgicas no mostraban esta respuesta a nivel de soma o a que no pudimos detectarla debido a los efectos dilutorios de zona en experimentos de *Western blot* de tejidos. Aunque no era estadísticamente significativo, sí nos llamó la atención que LC3-I y LC3-II, que no mostraban ningún cambio en el *Western blot* de vM a los 6 meses, parecían aumentados a los 12 meses en los dos modelos de  $\alpha$ Syn, lo que podría indicar que la respuesta autofágica en vM era posterior a la estriatal. Por otro lado, cuando analizamos la presencia de

agregados de p62 en neuronas dopaminérgicas, el modelo *SNCA-OVX* presentaba un ligero incremento en este marcador, lo cual sería esperable puesto que Janezic y colaboradores reportan la presencia de oligómeros de  $\alpha$ Syn (aunque no de agregados de tipo cuerpos de Lewy) desde edades muy tempranas en este animal (Janezic et al., 2013), los cuales serían detectados por el receptor de autofagia p62. Estos oligómeros no estarían presentes en individuos *Snca*<sup>-/-</sup>, por lo que esta diferencia entre modelos en el marcador p62 sería coherente con ello (Figura 49). Además, los acúmulos de p62 se encontraban a nivel del soma de las neuronas dopaminérgicas en la SNc específicamente, región en la que se habían reportado los oligómeros de  $\alpha$ Syn (Bengoa-Vergniory et al., 2020). La falta de  $\alpha$ Syn, por su parte, sólo generaba mayores niveles de fluorescencia de p62 a los 12 meses de edad, por lo que podría estar asociada al propio envejecimiento en estos animales. Por tanto, los incrementos tempranos de p62 en la SNc sí serían una alteración específica causada por la sobreexpresión de  $\alpha$ Syn.

Si bien el estriado y la SNc podían no tener la misma respuesta autofágica, sí detectamos que los cambios lisosomales a los 6 meses eran compartidos por ambas regiones, tanto ante la falta como ante la sobreexpresión de  $\alpha$ Syn (Figura 49). Existen, como hemos visto en la introducción, pruebas de disfunción lisosomal ante mutaciones o exceso de  $\alpha$ Syn, que llevan, a su vez, a más deposición de esta proteína. Sin embargo, en nuestro conocimiento, es la primera vez que se reporta un incremento de señal lisosomal ante la falta de  $\alpha$ Syn. Detectamos este incremento tanto a nivel tisular, en el estriado y la SNc de animales de 6 meses, como en neuronas estriatales en cultivo embrionario. Nos planteamos que  $\alpha$ Syn podía tener una relación directa con la homeostasis lisosomal, a nivel de biogénesis o dinámica. *A priori*, descartaríamos un fallo en la actividad lisosomal, puesto que en este caso el tratamiento de inhibición

lisosomal con Baf.A1 en las neuronas *Snca*<sup>-/-</sup> no hubiera tenido ningún efecto añadido sobre la cantidad de autofagosomas. Teniendo en cuenta la función descrita para  $\alpha$ Syn en la dinámica vesicular y las membranas en el terminal presináptico, estas alteraciones podrían responder a un fallo en la regulación vesicular, quizás asociado a la pérdida de interacciones clave de  $\alpha$ Syn con reguladores de membranas, como las GTPasas Rab o las proteínas del complejo SNARE. En línea con esto, hemos observado que la falta de  $\alpha$ Syn genera cambios transcripcionales en genes relacionados con exosomas, tanto en el estriado como en el vM. Por otra parte, como veremos a continuación, los contactos mitocondriales también podrían estar jugando un papel en la respuesta autofágica y dinámica lisosomal.

### **$\alpha$ Syn en la homeostasis y bioenergética mitocondriales**

El análisis del transcriptoma reveló una desregulación bioenergética de la vía nigroestriada en animales *Snca*<sup>-/-</sup> y, aunque en los análisis de enriquecimiento en *GO terms* no obtuvimos los mismos resultados en el modelo SNCA-OVX, los *heatmaps* parecían indicar que este modelo compartía las alteraciones mitocondriales de los animales *Snca*<sup>-/-</sup>, quizás a consecuencia del fondo sin  $\alpha$ Syn (Figura 49).

Ante una disfunción bioenergética como la que encontrábamos en el estriado de los animales *Snca*<sup>-/-</sup> a nivel transcripcional, cabría esperar una situación de crestas desestructuradas o reducidas (Baker et al., 2019); sin embargo, encontramos una situación completamente opuesta, y estas mitocondrias mostraban un incremento en la superficie de sus crestas (Figura 49). Por su parte, en el vM había un incremento de la expresión de genes de la CTE y, en este caso, no detectamos cambios en la morfología mitocondrial. Sí detectamos en términos cualitativos que, con independencia del genotipo, en

el vM se observaban más mitocondrias desestructuradas y con menos crestas que en el estriado. Estos hallazgos mitocondriales son de gran relevancia puesto que, como se ha comentado, se ha publicado que la disfunción del complejo I de la CTE es suficiente para generar una neurodegeneración progresiva similar a la observada en pacientes de EP, por lo que se ha vuelto a poner el foco en la disfunción bioenergética como mecanismo patológico central de esta enfermedad neurodegenerativa (González-Rodríguez et al., 2021). En el caso de nuestros modelos, esta reducción se hallaba en el estriado, mientras que en el vM encontrábamos una activación transcripcional de componentes bioenergéticos.

Se ha publicado que la falta de  $\alpha$ Syn puede generar una disfunción bioenergética y cambios lipídicos mitocondriales (Ellis et al., 2005), y está descrito que confiere resistencia a la neurotoxina MPTP (Dauer et al., 2002), por lo que ya se han establecido vínculos directos entre la función fisiológica de  $\alpha$ Syn y la CTE. De hecho, como se ha mencionado en la introducción, Ludtmann y colaboradores publicaron que  $\alpha$ Syn ejerce un papel regulador sobre la ATP sintasa, y el déficit de las sinucleínas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  causa un desacoplamiento mitocondrial, con mayores niveles de respiración, pero menor potencial de membrana (Ludtmann et al., 2016). Por el contrario, posteriormente otro estudio afirmaba que el déficit de  $\alpha$ Syn no produce ninguna alteración bioenergética en neuronas hipocampales o sinaptosomas murinos (Pathak et al., 2017). Los modelos y técnicas empleadas podrían estar jugando un papel en las diferencias entre estas publicaciones, así como con nuestros resultados. En nuestra experiencia, hemos observado que la falta de  $\alpha$ Syn genera una desregulación en la expresión génica de complejos de la CTE y, por primera vez, detectamos que esta desregulación es dependiente de la región de estudio, pudiendo ello aportar información sobre mecanismos de

vulnerabilidad neuronal selectiva. Por otro lado, el incremento de crestas mitocondriales en el estriado podría ser un mecanismo compensatorio o el origen de esta regulación transcripcional ante el déficit de  $\alpha$ Syn. Entre los genes mitocondriales diferencialmente expresados en el modelo *Snca*<sup>-/-</sup> encontramos algunos de los factores que gobiernan la morfología de las crestas: la ATP sintasa y MICOS13 (Baker et al., 2019). Estos, al igual que los componentes de la CTE, se encontraban regulados a la baja en el estriado y al alza en vM, lo cual nos llevó a pensar que la respuesta transcriptómica era a consecuencia de las anomalías morfológicas mitocondriales, y no a la inversa, de forma que la célula detecta este exceso de crestas y reduce la expresión de genes de la CTE para compensarlo. Sin embargo, no se podía determinar el orden de eventos con total certeza, y sería necesario ampliar el estudio de morfología mitocondrial para determinar si las mitocondrias mostraban, por ejemplo, alteraciones en procesos fusión o fisión.

La regulación bioenergética es clave en la biología dopaminérgica, debido a sus elevados niveles de actividad y de estrés oxidativo. Como hemos visto, uno de los puntos de mayor demanda energética es el axón, y las neuronas dopaminérgicas presentan axones de gran longitud, altamente arborizados (existen estimaciones que sitúan la longitud total promedio de estos axones en humanos en 4.5 m), lo que añade otra capa de complejidad al cumplimiento de las necesidades bioenergéticas en estas neuronas (Bolam and Pissadaki, 2012; Surmeier et al., 2017). Según la publicación de Abeliovich y colaboradores, en la que describían el modelo *Snca*<sup>-/-</sup>, estos animales muestran un aumento de la liberación de dopamina estriatal (Abeliovich et al., 2000), lo cual sería congruente con nuestro incremento en la expresión de genes axonales y sinápticos en el estriado. Este nivel de actividad podría estar desencadenando, además, la regulación al alza de genes de la CTE que

observamos en el vM, para aumentar la producción de energía y mantener los niveles de neurotransmisión en los axones dopaminérgicos estriatales (Figura 49). Por su parte, los eventos a nivel estriatal previamente mencionados podrían originarse bien por las propias alteraciones generadas por la ausencia de  $\alpha$ Syn en las neuronas estriatales (como el incremento de contactos mitocondriales con lisosomas, como veremos a continuación), pero también condicionarse por las alteraciones axonales que incrementan la entrada dopaminérgica. Aunque no quedaban esclarecidas las relaciones causales entre los defectos mitocondriales encontrados, la falta de  $\alpha$ Syn generaba cambios bioenergéticos en regiones clave de la EP que podrían poner en riesgo a las neuronas dopaminérgicas, debido a su dependencia energética y vulnerabilidad intrínsecas, y a las neuronas estriatales, que estaban sufriendo adaptaciones para lidiar con los defectos celulares, ya fueran transcriptómicas o morfológicas.

### **$\alpha$ Syn en los contactos mitocondriales**

Las funciones mitocondriales y lisosomales están íntimamente ligadas: una disfunción mitocondrial es capaz de generar defectos lisosomales, incluyendo fallos de actividad y una morfología vacuolar (Demers-Lamarche et al., 2016; Fernandez-Mosquera et al., 2019). Las funciones de estos orgánulos son altamente dependientes de su morfología y dinámica, y los MCS entre ellos tienen un profundo impacto sobre esta dinámica. Hemos observado que las neuronas estriatales en cultivo sin  $\alpha$ Syn, pero no las transgénicas, ven incrementados estos contactos, estableciendo de este modo el primer vínculo entre  $\alpha$ Syn y los contactos entre la mitocondria y los lisosomas (Figura 49). Del mismo modo, Kim y colaboradores reportan, en neuronas derivadas de un paciente de EP con mutaciones en el gen *GBA*, que codifica la glucocerebrosidasa (GCasa), que la reducción de la actividad de esta enzima

lisosomal genera fallos en el desacoplamiento entre la mitocondria y el lisosoma, por lo que, al igual que ante el déficit de  $\alpha$ Syn, estos contactos se ven incrementados, así como su duración. Observan que esto se traduce, además, en una reducción de la distribución axonal de las mitocondrias, de su consumo de oxígeno y de la producción de ATP (Kim et al., 2021). Existen evidencias de cambios en estos MCS como causa subyacente de otras patologías, donde la mitocondria y los lisosomas también tienen un protagonismo fisiopatológico, como es la neuropatía de Charcot-Marie-Tooth. En este caso, la pérdida de función de la proteína mitocondrial de anclaje de estos contactos, GDAP1, es capaz de generar defectos en la red mitocondrial y en la morfología lisosomal y, además, ralentizar el proceso de autofagia, al perderse interacciones necesarias para la biogénesis de autofagosomas desde las MAM, donde también reside GDAP1 (Cantarero et al., 2020) (ANEXO). Curiosamente,  $\alpha$ Syn ha sido localizada, al igual que GDAP1, en los contactos mitocondria-RE o MAM (Guardia-Laguarta et al., 2014), y hemos observado que la falta de  $\alpha$ Syn reduce significativamente los niveles proteínicos de esta proteína mitocondrial de anclaje. En un análisis exhaustivo de la relación entre  $\alpha$ Syn y las MAM, Calì y colaboradores determinaron que el efecto sobre los propios contactos y la transferencia de calcio que se da en ellos era dependiente, no solo de la dosis de  $\alpha$ Syn, sino también de su distribución. Al superar cierta cantidad de  $\alpha$ Syn, esta se agregaba generando focos celulares, y su efecto era equivalente al silenciamiento de  $\alpha$ Syn: se reducían la transferencia de calcio y los contactos entre la mitocondria y el RE. Además, los fallos en la liberación de calcio iban acompañados de una inducción del proceso de autofagia, incrementándose la ratio LC3II/LC3I y reduciéndose el p62 cuando los niveles de  $\alpha$ Syn generaban más focos o cuando se silenciaba (Calì et al., 2012). Por otro lado, también se ha publicado que la actividad del complejo I de la CTE es necesaria para la autofagia máxima, ya que su

inhibición limita esta vía al impedir un incremento de lípidos específicos de las MAM (Thomas et al., 2018), lugar de formación de autofagosomas (Hamasaki et al., 2013). Contextualizando nuestros resultados en estos estudios existiría, por tanto, la posibilidad de que el incremento autofágico que detectamos a nivel estriatal tuviera su origen en una disfunción de las MAM ante la falta de  $\alpha$ Syn, como ya se ha reportado en otros modelos, mientras que las propias alteraciones mitocondriales y lisosomales podrían proceder, al menos en parte, de cambios en los contactos entre ellos que condicionaran su dinámica y funcionamiento.

Los MCS mitocondriales son un área de estudio relativamente nueva pero central en las enfermedades neurodegenerativas, ya que constituyen plataformas donde confluyen muchas de las alteraciones celulares reportadas en estas patologías. Aunque no hemos determinado si  $\alpha$ Syn se encuentra directamente en los contactos entre mitocondrias y lisosomas, sí sabemos que su ausencia los altera, así como la biología de ambos orgánulos. Por otra parte, aunque tradicionalmente no se asocia la falta de  $\alpha$ Syn con la EP, tal como demostró el estudio de Calì y colaboradores, un cierto nivel de agregación de  $\alpha$ Syn puede tener un solapamiento patológico con el déficit de  $\alpha$ Syn, por secuestrar a la proteína en estructuras insolubles, idea que se desarrollará en el último apartado de esta discusión.

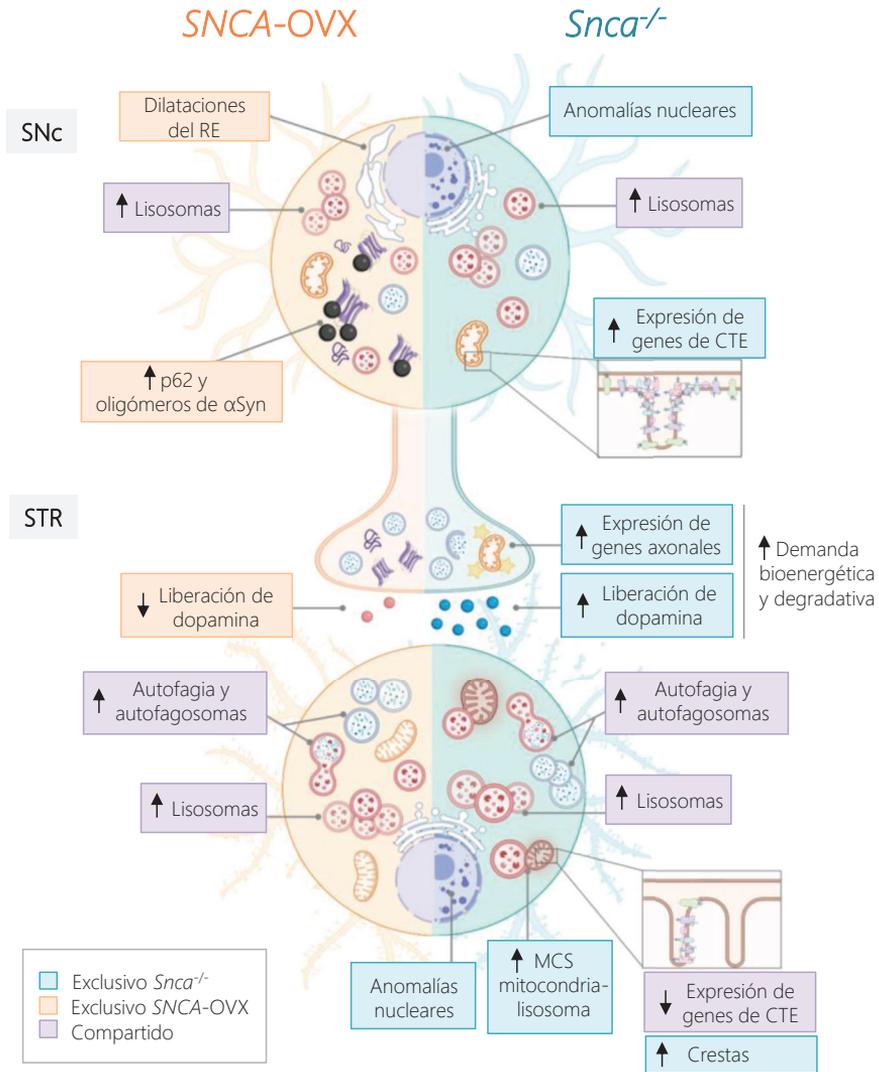


Figura 49. Alteraciones fisiopatológicas tempranas en el estriado y la SNc de los modelos de  $\alpha$ Syn a los 6 meses de edad. Ambos modelos comparten total o parcialmente alteraciones en el proceso de autofagia, defectos lisosomales y defectos mitocondriales. También presentan alteraciones específicas, especialmente en la neurotransmisión, y asociadas a la presencia de oligómeros de  $\alpha$ Syn en el caso del modelo SNCA-OVX. CTE: cadena de transporte de electrones. MCS: sitios de contacto de membranas. RE: retículo endoplasmático. SNc: *substantia nigra pars compacta*. STR: estriado. Imagen creada con BioRender.

### CAPÍTULO III.

#### $\alpha$ SYN EN LAS RESPUESTAS INMUNES

Cuando quisimos evaluar alteraciones neuroinflamatorias en nuestros modelos, lo hicimos con el fin de determinar en qué grado los defectos observados podían causar daños neuronales o activación de células del sistema inmune. También como forma indirecta de determinar si existía alguna respuesta iniciada en el estriado que, posteriormente, se extendiera a la SNc en modelo *SNCA-OVX*. De nuevo, en el *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA), nos encontramos inesperadamente con que la ausencia de  $\alpha$ Syn generaba, en el estriado de animales de 6 meses, respuestas inmunes innatas, concretamente de la microglía, pero también respuestas inmunes adquiridas, con incrementos en la expresión de genes clave para la diferenciación de linfocitos T colaboradores ( $CD4^+$ ). Detectamos, además, genes regulados al alza relacionados con la ruta de NF- $\kappa$ B y, aunque no alcanzaba la significación estadística en individuos *Snca*<sup>-/-</sup>, los resultados del análisis de fosforilaciones por *Western blot* parecían mostrar una tendencia hacia dicha activación. Curiosamente, en individuos *SNCA-OVX* sí detectamos la activación significativa de la ruta de NF- $\kappa$ B y, en ambos modelos, la activación de la ruta MAPK de ERK1/2. Sin embargo, estas activaciones de rutas de señalización, en el caso de la ausencia de  $\alpha$ Syn, no procedían de una respuesta proinflamatoria, puesto que los datos transcriptómicos apoyaban la presencia de linfocitos  $CD4^+$  de tipo Th2 y la producción de IL-4 que, según lo descrito en la literatura y tal como comprobamos, reducían los fenotipos microgliales proinflamatorios (M1), tanto en el estriado como en la SNc. Argumentamos, por ello, que la activación de la ruta de NF- $\kappa$ B estaría relacionada con la inducción de genes de diferenciación de linfocitos Th2, como el factor de transcripción GATA-3. En el caso del modelo *SNCA-OVX*, aunque no

encontramos enriquecimientos significativos relacionados con neuroinflamación en el GSEA, quizás por la mayor variabilidad entre animales, sí detectamos activaciones de NF- $\kappa$ B y ERK1/2 en el análisis de sus rutas por *Western blot*. Estas activaciones podrían estar relacionadas con la respuesta microglial ante oligómeros de  $\alpha$ Syn, ya que encontramos un incremento de la microglía M1 con respecto a individuos *Snc $\alpha$ <sup>-/-</sup>*. Sin embargo, estos incrementos no alcanzaban niveles patológicos de microglía neurotóxica; únicamente en el estriado detectamos una tendencia a niveles superiores en comparación a los animales silvestres.

El papel fisiológico de  $\alpha$ Syn en la inmunidad es un campo de investigación todavía en expansión y, aunque con resultados contradictorios, se ha demostrado que  $\alpha$ Syn es importante para modular las respuestas inmunes. La relevancia del papel de  $\alpha$ Syn en inmunidad radica en que podría estar mediando una respuesta inmune en el tracto gastrointestinal, ya que se han observado incrementos de expresión y acúmulos de  $\alpha$ Syn en el sistema nervioso entérico de pacientes con infección por norovirus, donde actuaría como activadora y quimioatrayente de células inmunes (Stolzenberg et al., 2017; Barbut et al., 2019); en línea con estos resultados, se ha visto que la falta de  $\alpha$ Syn causa susceptibilidad a las infecciones de ciertos virus, al perderse estas activaciones (Beatman et al., 2015; Tomlinson et al., 2017). Estos mecanismos podrían tener un impacto sobre la etiología de la EP, ya que el incremento de la expresión de  $\alpha$ Syn ante infecciones intestinales podría desencadenar su agregación secuencial y alcanzar el sistema nervioso central. Coincidiendo con los estudios mencionados, Alam y colaboradores asignan a  $\alpha$ Syn una función de alarmina (DAMP) necesaria para el reclutamiento de macrófagos o células dendríticas y la aparición de fenotipos proinflamatorios, como linfocitos CD4<sup>+</sup> Th1 y microglía M1, mientras que su ausencia reducía las

respuestas inflamatorias (Oppenheim, 2020; Alam et al., 2022). Estos estudios explicarían el incremento de microglía M1 que observábamos en animales SNCA-OVX respecto a animales *Snca*<sup>-/-</sup>, puesto que la introducción del transgén de  $\alpha$ Syn humana promovería la aparición de fenotipos neurotóxicos, mientras la ausencia de  $\alpha$ Syn los reduciría. Sin embargo, también existen estudios que afirman lo contrario, y defienden que el déficit de  $\alpha$ Syn promueve la aparición de fenotipos microgliales reactivos, citoquinas proinflamatorias, como TNF- $\alpha$ , y prostaglandinas (Austin et al., 2006, 2011).

Teniendo todo esto en cuenta, nuestros resultados apoyarían que  $\alpha$ Syn es necesaria para la activación de ciertas respuestas neuroinflamatorias, puesto que su ausencia modula dichas respuestas, promoviendo la aparición de linfocitos colaboradores de tipo Th2 y reduciendo la aparición de microglía neurotóxica. Por su parte, la introducción de  $\alpha$ Syn humana a través del transgén que contiene el modelo SNCA-OVX es suficiente para incrementar la microglía M1 sobre los niveles del modelo *knockout*, aunque no alcanza niveles patológicos.

## IMPLICACIONES FINALES

### **$\alpha$ Syn en la vulnerabilidad neuronal selectiva y la axonopatía**

La proteína  $\alpha$ Syn surgió en vertebrados, por lo que sabemos que su aparición evolutiva y su elevada expresión a nivel de sistema nervioso podrían responder a necesidades o funciones superiores de las neuronas.  $\alpha$ Syn tiene un papel íntimamente ligado a la dinámica vesicular y de membranas, ya que puede asociarse con membranas de gran curvatura (es decir, vesículas de pequeño tamaño) y con MCS como las MAM (gracias a su afinidad por las balsas lipídicas); además, es capaz de interactuar con proteínas clave en

estos procesos, como las proteínas SNARE y las GTPasas Rab. Como hemos visto en los resultados de esta tesis,  $\alpha$ Syn juega un papel esencial en la homeostasis mitocondrial, lisosomal y en el proceso de autofagia, quizás a través de su papel en los contactos mitocondriales, o a través de interacciones clave de dinámica de membranas (ya sea con las propias vesículas o con proteínas reguladoras). La única función descrita para esta proteína es la regulación de los reservorios vesiculares durante la exocitosis de neurotransmisores. No sería descartable que  $\alpha$ Syn modulara otras funciones celulares que implicaran la formación de vesículas y que incluso sirviera, quizás, como vínculo entre la neurotransmisión y las necesidades degradativas o energéticas de la neurona. Existen, por ejemplo, muchas proteínas implicadas en neurotransmisión que también participan en el inicio del proceso autofágico en el axón: la endofilina A, relacionada con endocitosis y exocitosis de vesículas sinápticas, también regula la formación del autofagosoma al reclutar a la proteína de autofagia ATG3; la proteína Bassoon, localizada en la zona activa del terminal sináptico, puede secuestrar a ATG5 y regular la autofagia en el axón; y la sinaptojanina, implicada en EP (Tabla 1), se ha relacionado con el proceso de autofagia en la unión neuromuscular en *Drosophila melanogaster* (Hill and Colón-Ramos, 2020). Al igual que la ausencia de  $\alpha$ Syn genera en el modelo *Snca*<sup>-/-</sup> un incremento en la liberación de dopamina (Abeliovich et al., 2000), podría causar el mismo efecto a nivel autofágico, incrementando la formación de autofagosomas por la falta de su regulación, o bien desencadenarse como respuesta a un incremento de la actividad sináptica, que genere más desechos que necesiten eliminarse.

Sabemos que la ausencia de  $\alpha$ Syn no causa grandes defectos fenotípicos ni reduce la viabilidad de los modelos animales; tampoco es necesaria para el

correcto desarrollo del terminal presináptico. Argumentamos, por ello, que sería necesaria para estas funciones superiores de optimización en la regulación vesicular y en los contactos membranosos, de forma que su ausencia hace que estos procesos se entorpezcan o no estén lo suficientemente coordinados.

Las neuronas estriatales no mueren en la EP, sino que sufren cambios adaptativos derivados de la pérdida de entrada dopaminérgica, reduciendo sus espinas dendríticas y remodelando sus conexiones corticoestriatales (Villalba and Smith, 2018). En nuestros resultados, hemos visto también que son capaces de desencadenar respuestas para adaptarse a los defectos bioenergéticos causados por el déficit de  $\alpha$ Syn, por ejemplo. En el caso de las neuronas dopaminérgicas, la pérdida de función o la agregación de  $\alpha$ Syn puede suponer un desafío en la regulación de membranas, hasta el punto de suponer una amenaza real a su homeostasis y actividad, ya que son mucho más dependientes del correcto funcionamiento y distribución mitocondriales, tienen mucho más estrés oxidativo a nivel basal, y cualquier vesícula u orgánulo debe viajar largas distancias desde el axón hasta el soma para degradarse, por ejemplo. Por estas particularidades, su margen de adaptación ante fallos de este tipo puede ser menor, ya que sus mecanismos bioenergéticos y degradativos están ya tensionados *per se*. Si  $\alpha$ Syn estuviera ejerciendo este tipo de funciones superiores, sería fácil pensar que las neuronas dopaminérgicas estarían entre los tipos neuronales más vulnerables del sistema nervioso central y dependientes de la acción de  $\alpha$ Syn.

Por otro lado, hemos visto que la mayoría de los cambios que hemos encontrado ante la falta o la sobreexpresión de  $\alpha$ Syn han sido a los 6 meses de edad, mientras que a los 12 meses encontrábamos menos alteraciones. Sin

embargo, en el análisis por *Western blot* de marcadores autofágicos en tejidos, LC3-I y LC3-II parecían incrementarse a los 12 meses en el vM, en un comportamiento similar al observado para estos mismos marcadores en los estriados de 6 meses. Lo mismo ocurría en el análisis por *Western blot* del marcador lisosomal LAMP1: si a los 6 meses el estriado era el tejido que mostraba un patrón de incremento en los modelos, a los 12 meses parecía ser el vM. Aunque sería necesario corroborarlas más en profundidad, ya que no alcanzaban la significación estadística, estas observaciones podrían indicarnos que los primeros cambios ante la falta o el exceso de  $\alpha$ Syn ocurrirían en el estriado, en los terminales presinápticos, donde se encuentra esta proteína mayoritariamente, y se traducirían en respuestas a nivel local tanto axonales como de las neuronas receptoras estriatales. A los 12 meses, en cambio, podríamos estar viendo las consecuencias ante la falta o exceso de  $\alpha$ Syn en el soma de la neurona dopaminérgica.

### **Enfermedad de Parkinson asociada a $\alpha$ Syn: ¿ganancia de función tóxica, pérdida de función o ambas?**

Clásicamente, cuando se habla del papel de  $\alpha$ Syn en la EP se aborda desde un punto de vista fisiopatológico, asignándole una ganancia de función tóxica cuando el gen está multiplicado o presenta mutaciones patológicas. Los modelos de déficit de  $\alpha$ Syn, por el contrario, siempre han estado asociados a fenotipos leves y a la ausencia de grandes defectos celulares, atrayendo poco o nada de atención en la investigación de la EP. Sin embargo, desde hace unos años está comenzando a debatirse la posibilidad de que la EP tenga un componente de pérdida de función de  $\alpha$ Syn, ya que la agregación de  $\alpha$ Syn supondría una reducción de la disponibilidad de la proteína en su estado nativo y soluble. También puede suponer, además, una modificación de sus interacciones con membranas y otras proteínas, por lo que, en realidad,

además de una ganancia de función tóxica por agregación, estaríamos atendiendo a una situación de pérdida de función. Para abordar esta cuestión, Burré y colaboradores ya publicaron un estudio de mutagénesis en el que clasificaban distintas formas de  $\alpha$ Syn (formas truncadas, con mutaciones patológicas y con sustituciones de prolinas) según su efecto sobre la función fisiológica y patogenicidad (Burré et al., 2012). Aunque concluyen que las secuencias requeridas para la función y para los efectos patológicos son independientes, y que la agregación de  $\alpha$ Syn correlaciona con su neurotoxicidad, observan que una reducción de >75 % de la unión a membranas de  $\alpha$ Syn se traduce en una pérdida de su función como chaperona de los complejos SNARE (umbral que podría alcanzarse con ciertos niveles de agregación, por ejemplo). De hecho, en este mismo artículo debaten las dos posibilidades: que los agregados en sí mismos sean neurotóxicos o que la agregación desprovea a la neurona de sinucleínas causando una pérdida de función indirecta. Descartan esta posibilidad argumentando la falta de patología y de muerte neuronal en los modelos sin las sinucleínas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ; sin embargo, sí reportan que estos animales presentan alteraciones motoras y un incremento de muerte prematura respecto a individuos control (Burré et al., 2010). En nuestros resultados, la ausencia simple de  $\alpha$ Syn ya es suficiente para causar una reducción en la coordinación motora desde edades tempranas, la cual se ha reportado en otros estudios (Pelkonen and Yavich, 2011).

Entre 2012 y 2018, el grupo de Fredric Manfredsson publicó varios trabajos en los que debatía la posibilidad de que la pérdida de función de  $\alpha$ Syn fuera un contribuyente a la muerte neuronal en la EP (Kanaan and Manfredsson, 2012; Benskey et al., 2016; Collier et al., 2016); incluso, reportó una pérdida de neuronas dopaminérgicas y neuroinflamación ante el silenciamiento de  $\alpha$ Syn

en neuronas de la SNc de ratas (Benskey et al., 2018), aunque otros estudios no han obtenido los mismos resultados (Zharikov et al., 2019). En otro trabajo realizado con dos modelos murinos sin  $\alpha$ Syn concluyen que  $\alpha$ Syn influye en el número de neuronas dopaminérgicas de la SNc, ya que ambos modelos presentan una reducción de estas neuronas desde estadios embrionarios (García-Reitboeck et al., 2013). Estos resultados ponen más de manifiesto la importancia de  $\alpha$ Syn a nivel fisiológico en la biología de las neuronas dopaminérgicas.

La idea de que en realidad hay un componente de pérdida de función también se sostiene en ciertos hallazgos en pacientes: se ha publicado que existe una reducción de biomarcadores de alzhéimer, como A $\beta$ 1-42, Tau total o Tau fosforilada, y la propia  $\alpha$ Syn en el líquido cefalorraquídeo de pacientes de EP (Kang et al., 2013; Irwin et al., 2020) y, además, muchos ensayos clínicos de tratamientos dirigidos a eliminar o reducir los niveles de  $\alpha$ Syn han fallado o incluso empeorado las funciones motoras de los pacientes (Espay, 2022), lo cual está llevando a que surjan nuevas teorías y se revise la proteinopatía como dogma en la EP (Espay et al., 2019) (Figura 50).

Como hemos visto en este trabajo, el déficit de  $\alpha$ Syn genera defectos en muchas de las rutas fisiopatológicas clave de la EP (Figura 49), por lo que su falta no resulta tan inocua como se había reportado. De hecho, cuando analizamos los enriquecimientos de los datos transcriptómicos obtuvimos, tanto en el estriado como en el vM *Snc $\alpha$ <sup>-/-</sup>*, un enriquecimiento en rutas KEGG de las principales enfermedades neurodegenerativas, como EP, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Huntington.

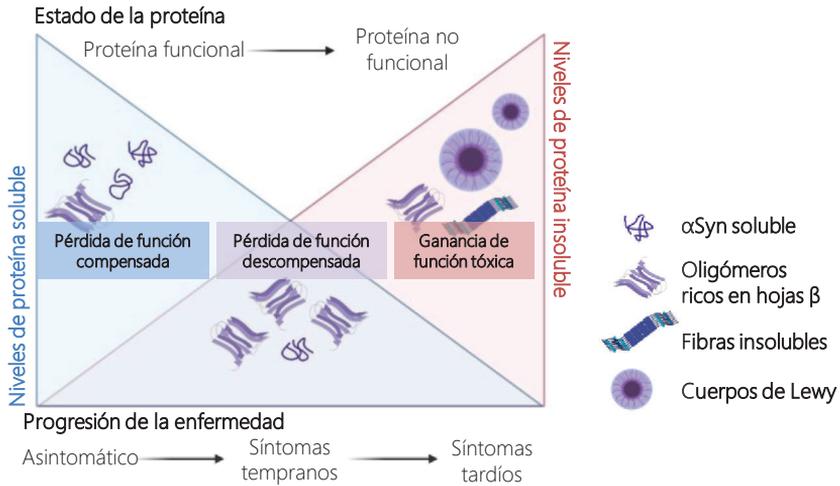
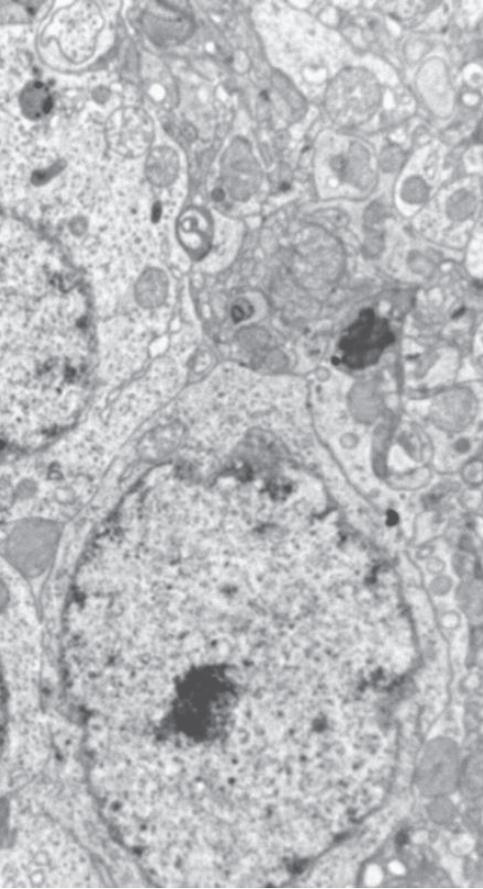


Figura 50. Esquema simplificado del modelo de proteinopenia propuesto por Espay y colaboradores. La progresión de la enfermedad avanzaría en paralelo a una pérdida de función de la proteína, al secuestrarse en formas insolubles. En estadios avanzados, la función de la proteína se perdería por completo y la presencia de agregados de gran magnitud causaría, además, la ganancia de función tóxica. Imagen creada con BioRender.

Teniendo en cuenta nuestros resultados y la bibliografía anteriormente expuesta, argumentamos que el déficit de  $\alpha$ Syn, derivado de su secuestro en formas insolubles, sería necesario, pero no suficiente, para causar la muerte de las neuronas dopaminérgicas en la EP. A los defectos descritos en este trabajo, asociados a la falta de  $\alpha$ Syn, se les sumaría la presencia de agregados de  $\alpha$ Syn, los cuales colapsarían en mayor medida los procesos que ya estarían desplazados de su estado homeostático. Como se ha expuesto en la introducción, aparte de  $\alpha$ Syn, los cuerpos de Lewy están formados por orgánulos, como mitocondrias y lisosomas, vesículas y proteínas sinápticas, por lo que nos podrían estar informando de todo aquello que “arrastra”  $\alpha$ Syn quizás al dejar de ser funcional y agregarse. En vista de los resultados obtenidos, proponemos que existe un componente de pérdida de función, que se ve agravado al superar cierto nivel de agregación de la proteína. Estos resultados tendrían un impacto en las estrategias terapéuticas puesto que, para restablecer completamente la homeostasis en las neuronas

dopaminérgicas, sería necesario evitar la agregación de  $\alpha$ Syn en lugar de simplemente eliminarla o “limpiarla”, de forma que se restaurara la disponibilidad de  $\alpha$ Syn soluble.

En esta tesis se ha pretendido abordar la problemática celular de la EP desde otros puntos de vista, que han ido desde la posibilidad de una contribución patológica originada por una depleción de  $\alpha$ Syn funcional, hasta la evaluación de las neuronas estriatales como forma indirecta de valorar disfunciones axonales dopaminérgicas en el estriado. Muchos de los resultados obtenidos en este trabajo han abierto nuevas cuestiones, pero, sobre todo, ponen de manifiesto que es necesario seguir sumando esfuerzos en la investigación sobre la función de  $\alpha$ Syn, ya que comprender dicha función es crucial para entender la fisiopatología de la EP. Por nuestra parte, hemos iniciado un estudio completo de microscopía electrónica de los modelos empleados en este trabajo, en el cual se analicen en mayor profundidad los resultados preliminares descritos aquí, así como un estudio lipídómico que concrete las consecuencias en la configuración de membranas y vesículas ante la falta de  $\alpha$ Syn. Por otra parte, en este trabajo hemos observado diferencias en las respuestas celulares en el estriado y la SNc, llegando a ser opuestas a nivel bioenergético, ante la ausencia de  $\alpha$ Syn. Estos resultados también abren nuevas vías de estudio de la EP, ya que las respuestas estriatales pueden aportar pistas acerca de mecanismos de adaptación neuronal de los que quizás carecen las neuronas dopaminérgicas, ya sea ante la falta como ante el exceso de  $\alpha$ Syn. A través de sus respuestas, además, el estriado puede actuar como región de alarma ante cambios sinápticos dopaminérgicos, por lo que resultaría útil para identificar la disfunción dopaminérgica antes de que sea irreversible y, por tanto, para prevenir la neurodegeneración.



# CONCLUSIONES



1. Los modelos murinos de ausencia y sobreexpresión de  $\alpha$ Syn presentan defectos motores específicos: mientras el déficit afecta a la coordinación motora desde los tres meses de edad, la sobreexpresión provoca una reducción de la longitud de zancada, causando cambios en la marcha.
  
2. Se ha identificado un efecto de dosis de  $\alpha$ Syn sobre el funcionamiento de la vía autofágica-lisosomal en tejido cerebral:
  - 2.1. Los modelos de déficit y sobreexpresión de  $\alpha$ Syn presentan una inducción autofágica en tejido y neuronas primarias derivados del estriado.
  - 2.2. Los animales *SNCA-OVX* exhiben un aumento específico del receptor de autofagia p62 en las neuronas dopaminérgicas de la SNc, pero no en las poblaciones neuronales adyacentes, congruente con una mayor sensibilidad dopaminérgica ante desajustes en el proceso autofágico.
  - 2.3. La ausencia de  $\alpha$ Syn genera un incremento de la señal lisosomal en tejidos y cultivos estriatales, así como en la SNc; la sobreexpresión genera este incremento de forma condicionada experimentalmente.
  
3. La dosis correcta de  $\alpha$ Syn es necesaria para el mantenimiento de la homeostasis mitocondrial y de su relación con los lisosomas:
  - 3.1. La ausencia de  $\alpha$ Syn causa alteraciones morfológicas en las mitocondrias del estriado, generando un incremento de crestas mitocondriales. Estas alteraciones van acompañadas de cambios transcripcionales en genes mitocondriales de la vía nigroestriada, con una regulación a la baja de componentes bioenergéticos en el estriado y una regulación al alza en el tejido mesencefálico. El modelo

de sobreexpresión muestra un fenotipo transcripcional atenuado en comparación al modelo *Snca*<sup>-/-</sup> y ausencia de cambios morfológicos mitocondriales.

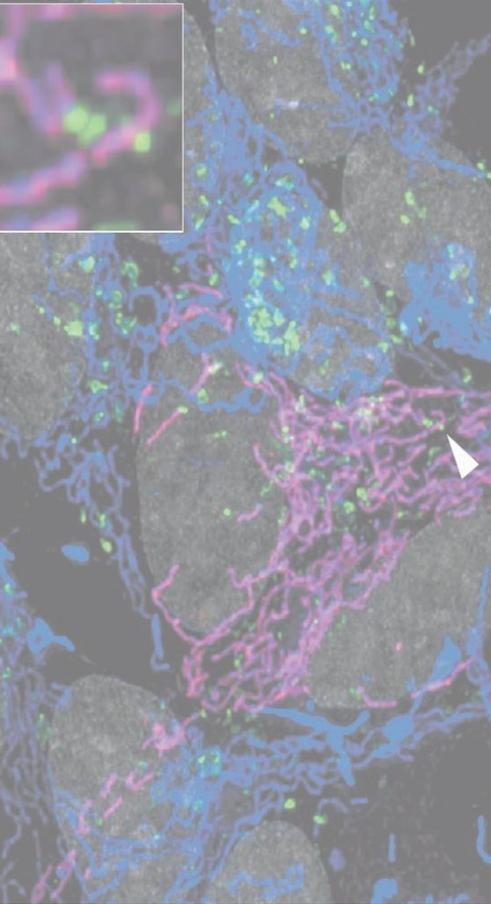
3.2. Las neuronas estriatales en cultivo deficientes en  $\alpha$ Syn presentan más contactos entre las mitocondrias y los lisosomas. Este incremento podría afectar a funciones específicas de estos contactos y de su estructura molecular, como sugiere la reducción de los niveles de la proteína de anclaje de estos contactos, GDAP1.

4. La proteína  $\alpha$ Syn modula respuestas inmunes a nivel cerebral:

4.1. Los modelos de ausencia y sobreexpresión activan, en el estriado, rutas de señalización relevantes para las respuestas inmunes, como la ruta de MAPK ERK y la ruta de NF- $\kappa$ B. El déficit de  $\alpha$ Syn, además, genera cambios transcripcionales asociados con estas respuestas.

4.2.  $\alpha$ Syn es necesaria para la inducción de microglía neurotóxica, ya que su ausencia reduce la aparición de este fenotipo, mientras que la sobreexpresión del transgén humano incrementa sus niveles sobre el fondo *knockout*.

5. Las respuestas estriatales pueden aportar información sobre los mecanismos de vulnerabilidad neuronal selectiva y sobre las respuestas tempranas ante cambios axonales dopaminérgicos.



ANEXO



## GENERAL ARTICLE

# Mitochondria–lysosome membrane contacts are defective in GDAP1-related Charcot–Marie–Tooth disease

Lara Cantarero<sup>1,2</sup>, Elena Juárez-Escoto<sup>1,2</sup>, Azahara Civera-Tregón<sup>1,2</sup>, María Rodríguez-Sanz<sup>1</sup>, Mónica Roldán<sup>3</sup>, Raúl Benítez<sup>4,5</sup>, Janet Hoenicka<sup>1,2,†</sup> and Francesc Palau<sup>1,2,6,7,8,†\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Neurogenetics and Molecular Medicine—IPER, Institut de Recerca Sant Joan de Déu (IRSJD), Barcelona 08950, Spain, <sup>2</sup>Department of Neurogenetics and Molecular Medicine, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Barcelona 08950, Spain, <sup>3</sup>Confocal Microscopy Unit, IPER, Department of Genetic and Molecular Medicine, and Department of Pathology, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona 08950, Spain, <sup>4</sup>Biomedical Engineering Research Center (CREB), Institut de Recerca Sant Joan de Déu (IRSJD), Barcelona 08950, Spain, <sup>5</sup>Automatic Control Department and Biomedical Engineering Research Center, Universitat Politècnica de Catalunya, Barcelona 08028, Spain, <sup>6</sup>Department of Genetic and Molecular Medicine—IPER, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona 08950, Spain, <sup>7</sup>Department of General Internal Medicine, Clinic Institute of Medicine and Dermatology (ICMiD), Hospital Clínic, Barcelona 08036, Spain and <sup>8</sup>Division of Pediatrics, Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Barcelona, Barcelona 08036, Spain

\*To whom correspondence should be addressed at: Department of Genetic and Molecular Medicine, Hospital Sant Joan de Déu, Passeig Sant Joan de Déu, 2, Esplugues de Llobregat, Barcelona 08950, Spain. Tel: +34 932532100 ext. 71080; Email: fpalau@sjdhospitalbarcelona.org

## Abstract

Mutations in the *GDAP1* gene cause Charcot–Marie–Tooth (CMT) neuropathy. *GDAP1* is an atypical glutathione S-transferase (GST) of the outer mitochondrial membrane and the mitochondrial membrane contacts with the endoplasmic reticulum (MAMs). Here, we investigate the role of this GST in the autophagic flux and the membrane contact sites (MCSs) between mitochondria and lysosomes in the cellular pathophysiology of *GDAP1* deficiency. We demonstrate that *GDAP1* participates in basal autophagy and that its depletion affects LC3 and PI3P biology in autophagosome biogenesis and membrane trafficking from MAMs. *GDAP1* also contributes to the maturation of lysosome by interacting with PYKfyve kinase, a pH-dependent master lysosomal regulator. *GDAP1* deficiency causes giant lysosomes with hydrolytic activity, a delay in the autophagic lysosome reformation, and TFEB activation. Notably, we found that *GDAP1* interacts with LAMP-1, which supports that *GDAP1*–LAMP-1 is a new tethering pair of mitochondria and lysosome membrane contacts. We observed mitochondria–lysosome MCSs in soma and axons of cultured mouse embryonic motor neurons and human neuroblastoma cells. *GDAP1* deficiency reduces the MCSs between these organelles, causes mitochondrial network abnormalities, and decreases levels of cellular glutathione (GSH). The supply of GSH-MEE suffices to rescue the lysosome membranes and the defects of the mitochondrial network, but not the interorganelle MCSs nor early autophagic events. Overall, we show

<sup>†</sup>Senior authors that contribute equally

Received: July 29, 2020. Revised: October 13, 2020. Accepted: October 28, 2020

© The Author(s) 2020. Published by Oxford University Press. All rights reserved. For Permissions, please email: journals.permissions@oup.com

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com

that GDAP1 enables the proper function of mitochondrial MCSs in both degradative and nondegradative pathways, which could explain primary insults in GDAP1-related CMT pathophysiology, and highlights new redox-sensitive targets in axonopathies where mitochondria and lysosomes are involved.

## Introduction

Charcot-Marie-Tooth disease (CMT) and related disorders are a heterogeneous group of genetic neuropathies with a complex pathophysiology involving both myelin and axons, and the Schwann cell axonal interactions. The discovery of pathogenic mechanisms underlying the different types of CMT is a crucial point to define molecular targets and design therapeutic approaches (1).

Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 (GDAP1) is an atypical glutathione S-transferase (GST) (2) with glutathione-conjugating and membrane-remodeling activities (3). Mutations in the GDAP1 gene cause Charcot-Marie-Tooth disease, which can be expressed as an autosomal recessive demyelinating neuropathy (4) or as an axonopathy, either recessive (5) or dominant (6–8). Autosomal recessive mutations are associated with an early-onset and severe neuropathy, with most patients being wheelchair-bound by the second decade and having vocal cord paresis (9), while dominant mutations used to be associated with a milder course (10).

GDAP1 is an integral protein of the outer mitochondrial membrane (OMM) (11–13). Our previous studies in embryonic motor neurons (eMNs) of the *Gdap1* knockout mouse (*Gdap1*<sup>-/-</sup>) and GDAP1 knockdown neuroblastoma cells showed structural defects in mitochondria, mitochondrial network and endoplasmic reticulum (ER) cisternae, associated with abnormal autophagic vesicles (14,15). Additionally, the lack of GDAP1 causes oxidative stress in the peripheral nervous system (16) and fibroblasts (17) and decreases the levels of cellular glutathione (GSH) (18), which is the major redox buffer of the cell (19). Recently, we have also reported an inflammatory response in both spinal cord and sciatic nerve associated with axonal damage in the *Gdap1*<sup>-/-</sup> mouse (20).

GDAP1 is also located in the mitochondria-associated membranes (MAMs), the membrane contact sites (MCSs) between mitochondria and ER, and its deficiency reduces the contact between these two organelles (15). Mitochondria come into contact with other organelles not only regulating their own function but also impacting larger inter-organelle networks, which are essential for cell function and tissue homeostasis (21,22). Recently, mitochondria-lysosome MCSs have been identified as regulators of mitochondrial fission via the lysosomal GTPase Ras-related protein Rab-7 (RAB7) (23). Interestingly, GDAP1 also regulates mitochondrial fission and mitochondrial network dynamics (3,11–13). Nevertheless, the scenario of primary pathophysiological insult caused by GDAP1 deficiency remains unclear. In this work, we demonstrate that GDAP1 depletion causes membrane defects in early autophagic vesicles as well as in lysosomes and their contacts with mitochondria. Moreover, GDAP1 interacts with the lysosomal marker LAMP-1, tethering the membranes of these organelles. Glutathione supply suffices to rescue the lysosomal morphology and the mitochondrial network dynamics but not autophagic defects. Overall, our results indicate that GDAP1 enables the proper function of mitochondria and their MCSs in both degradative and nondegradative pathways whose deficiencies are early events in the pathophysiology of CMT.

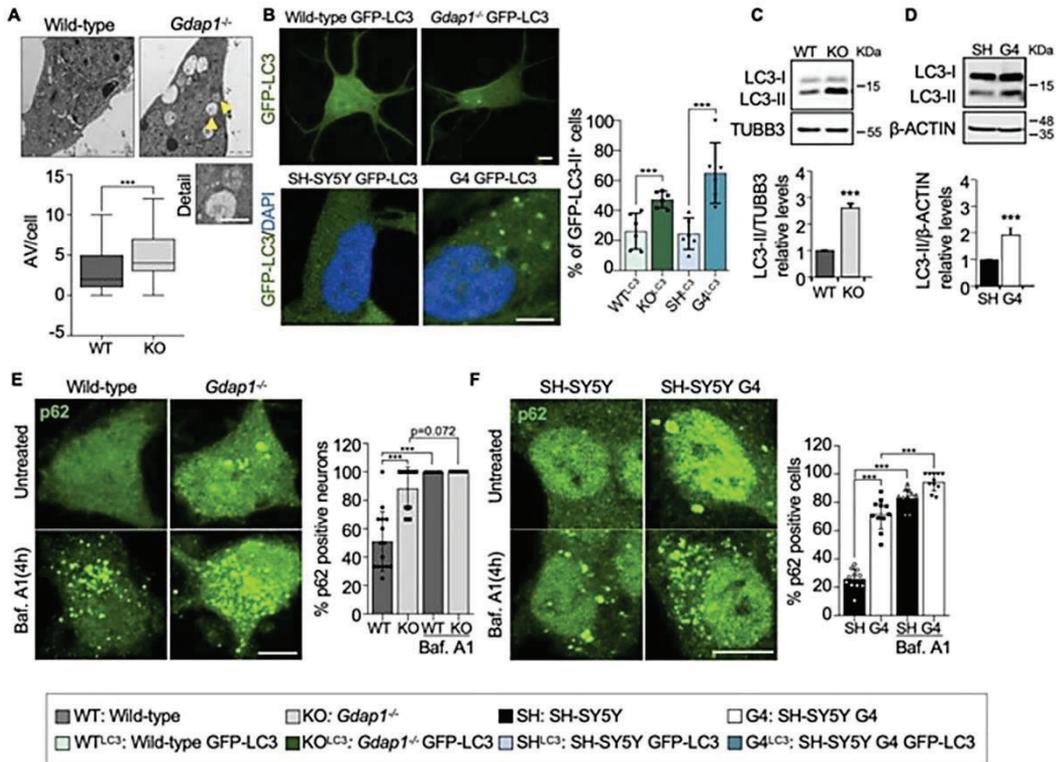
## Results

### GDAP1 deficiency impairs basal autophagy

We first investigated the occurrence of basal autophagy. We found by electron microscopy a significant accumulation of autophagic vesicles in eMNs from *Gdap1*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 1A). This phenotype was confirmed using the GFP-labeled autophagosome marker LC3. Punctate GFP-LC3 was increased in transfected *Gdap1*<sup>-/-</sup> eMNs and GDAP1-silenced human neuroblastoma SH-SY5Y cells (hereinafter referred to as G4 cells) (15) stably expressing GFP-LC3 (Fig. 1B). Western blotting analysis showed an increase of lipidated LC3 (LC3-II) levels in both *Gdap1*<sup>-/-</sup> eMNs and G4 cells (Fig. 1C and D). To examine the autophagic flux, we analyzed the aggregates forming of p62, whose levels negatively correlate with this flux (24). We found accumulation of p62 aggregates in *Gdap1*<sup>-/-</sup> eMNs (Fig. 1E), G4 cells (Fig. 1F) and postnatal spinal cord MNs from *Gdap1*<sup>-/-</sup> mice (Supplementary Material, Fig. S1). We did not observe the accumulation of p62 in *Gdap1*<sup>-/-</sup> mice brain (Supplementary Material, Fig. S1B), which may be related to the selective neuronal vulnerability to GDAP1 deficiency. To further investigate the autophagic flux we used bafilomycin A1 (BafA1), which prevents late phases of autophagy. BafA1 caused accumulation of p62 aggregates in *Gdap1*<sup>-/-</sup> eMNs (Fig. 1E) and G4 cells (Fig. 1F) although to a lesser degree than in controls, suggesting that the fusion of autophagosomes with lysosomes is affected. Western blotting analyses and GFP quantification by flow cytometry after BafA1 treatment also showed reduced LC3-II accumulation in GDAP1-deficient cells (Supplementary Material, Fig. S2A and B) and G4 cells stably expressing GFP-LC3 (Supplementary Material, Fig. S2C). These results indicate that basal autophagy occurs despite GDAP1 depletion, although its efficiency is suboptimal.

### GDAP1 participates in membrane biogenesis of early autophagic vesicles

GDAP1 function in basal autophagy was further assessed by studying its interaction with autophagy- and MAM-related proteins in SH-SY5Y cells. We performed a series of co-immunoprecipitation (co-IP) experiments of GDAP1 with Acyl-CoA synthetase long-chain family member 1 (ACSL1), Autophagy-related 4 cysteine peptidase (ATG4), coiled-coil myosin-like BCL2-interacting protein (BECLIN-1), Dynamin-related protein 1 (DRP1), LC3-I, LC3-II, RAB7 and SYNTAXIN 17 (STX17) (Fig. 2A–E). We found constitutive interaction of GDAP1 with STX17, LC3-I and LC3-II that were confirmed by proximity ligation assay (PLA) (Fig. 2D and E). These proteins are involved in autophagosome biogenesis and membrane trafficking (25–27). BafA1 or autophagy induction by starvation in Earle's balanced salt solution (EBSS) treatments did not affect these interactions. In addition, western blotting of subcellular fractions showed GDAP1, STX17 (28), LC3-I and LC3-II bands in MAMs (Fig. 2F), suggesting mitochondria-ER contacts as a platform for their interaction. We found significantly lower levels of LC3-I and LC3-II in MAMs fraction of G4 cells, probably caused by impaired recruitment. Notably, we also found ATG4 in MAMs (Fig. 2F), a redox-regulated cysteine protease that processes cytosolic

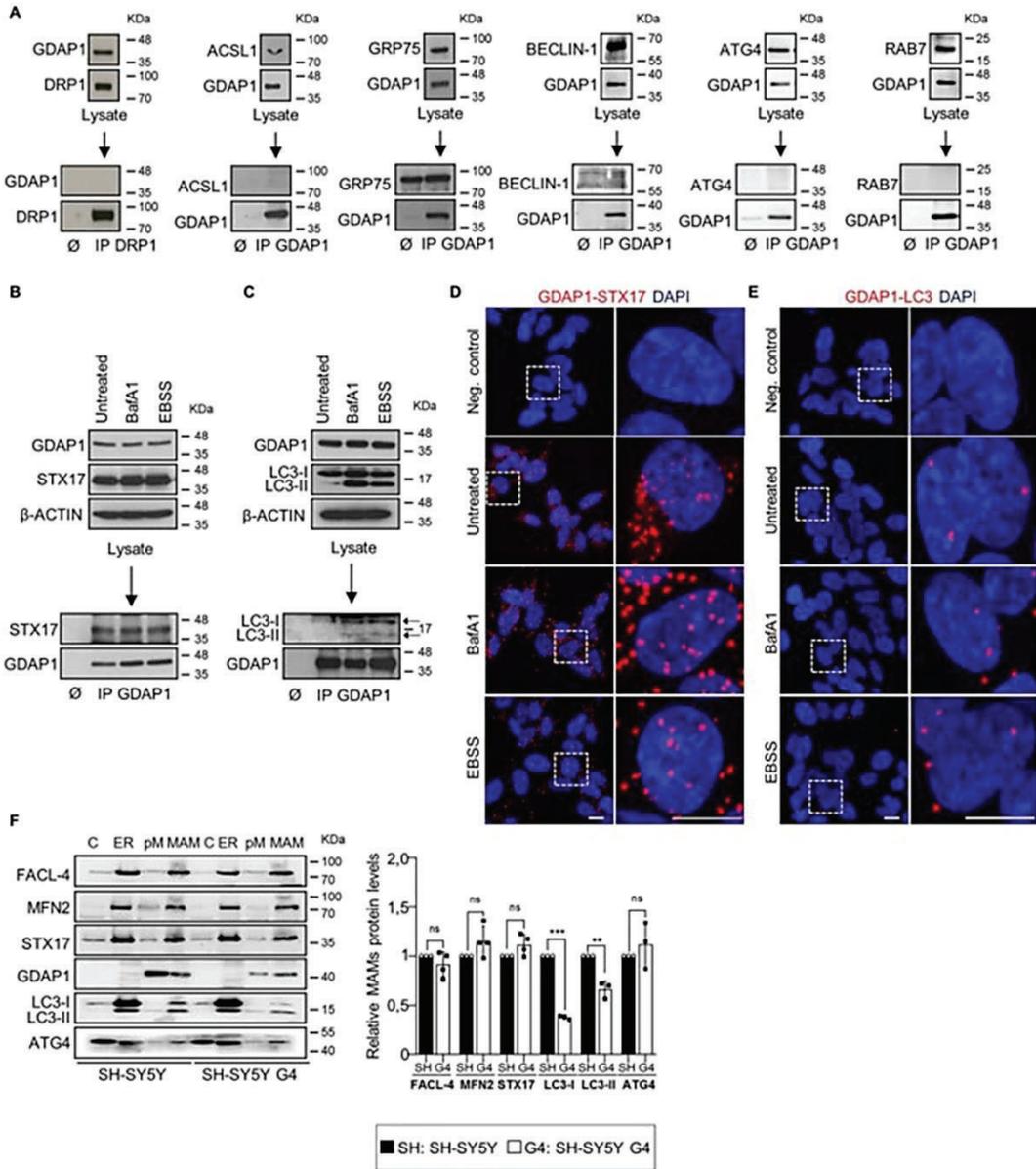


pro-LC3 for lipidation and binding to autophagosome membranes (29). ATG4 also delipidates LC3-II for autophagosome maturation and LC3 recycling (30,31). Furthermore, since early events of autophagosome formation also include the local synthesis of phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P) in MAMs (28), we visualized PI3P-positive vesicles when GDAP1 is depleted. We transfected into SH-SY5Y and G4 cells the GFP-2xFYVE plasmid, which is a domain that mostly binds PI3P (32). Super-resolution confocal imaging revealed enlarged abnormal PI3P-positive vesicles in G4 cells (Fig. 3A). Altogether, these findings demonstrate that GDAP1 participates in early autophagic events and membrane trafficking initiated in MAMs.

#### GDAP1 deficiency causes enlarged lysosomes that maintain the hydrolytic capacity

Next, we investigated whether GDAP1 contributes to autophagosome maturation by studying its interaction with PIKfyve. This kinase is a master regulator of lysosomes that phosphorylates PI3P to PI(3,5)P<sub>2</sub> for vesicle maturation, identity and

trafficking (33,34). PLA and co-IP experiments revealed the interaction between GDAP1 and PIKfyve (Fig. 3B and C), which increases after starvation-induced autophagy (EBSS). Either LysoTracker or α-LAMP-1 (lysosomal-associated membrane protein 1) staining of GDAP1-depleted models showed enlarged perinuclear lysosomes and abnormal distribution of this organelle in G4 cells (Fig. 3D and E), *Gdap1*<sup>-/-</sup> eMNs (Fig. 3F) and spinal cord MNs from *Gdap1*<sup>-/-</sup> mice (Supplementary Material, Fig. S3). As this lysosomal phenotype is associated with decreased PIKfyve kinase activity (38), we treated SH-SY5Y and G4 cells with Apilimod, a specific PIKfyve inhibitor (Fig. 3G). After treatment, we observed a significant increase in the lysosomal area in SH-SY5Y cells and not in G4, suggesting that PIKfyve was already inhibited in G4 cells. This finding indicates that there is a loss of PIKfyve activity when GDAP1 is depleted. We also quantified the nuclear translocation of the transcription factor EB (TFEB), which is a crucial regulator of autophagy by promoting autophagosome formation, lysosomal biogenesis and function (35–37). TFEB nuclear levels were significantly increased in G4 cells (Fig. 3H) and *Gdap1*<sup>-/-</sup> eMNs (Fig. 3I),

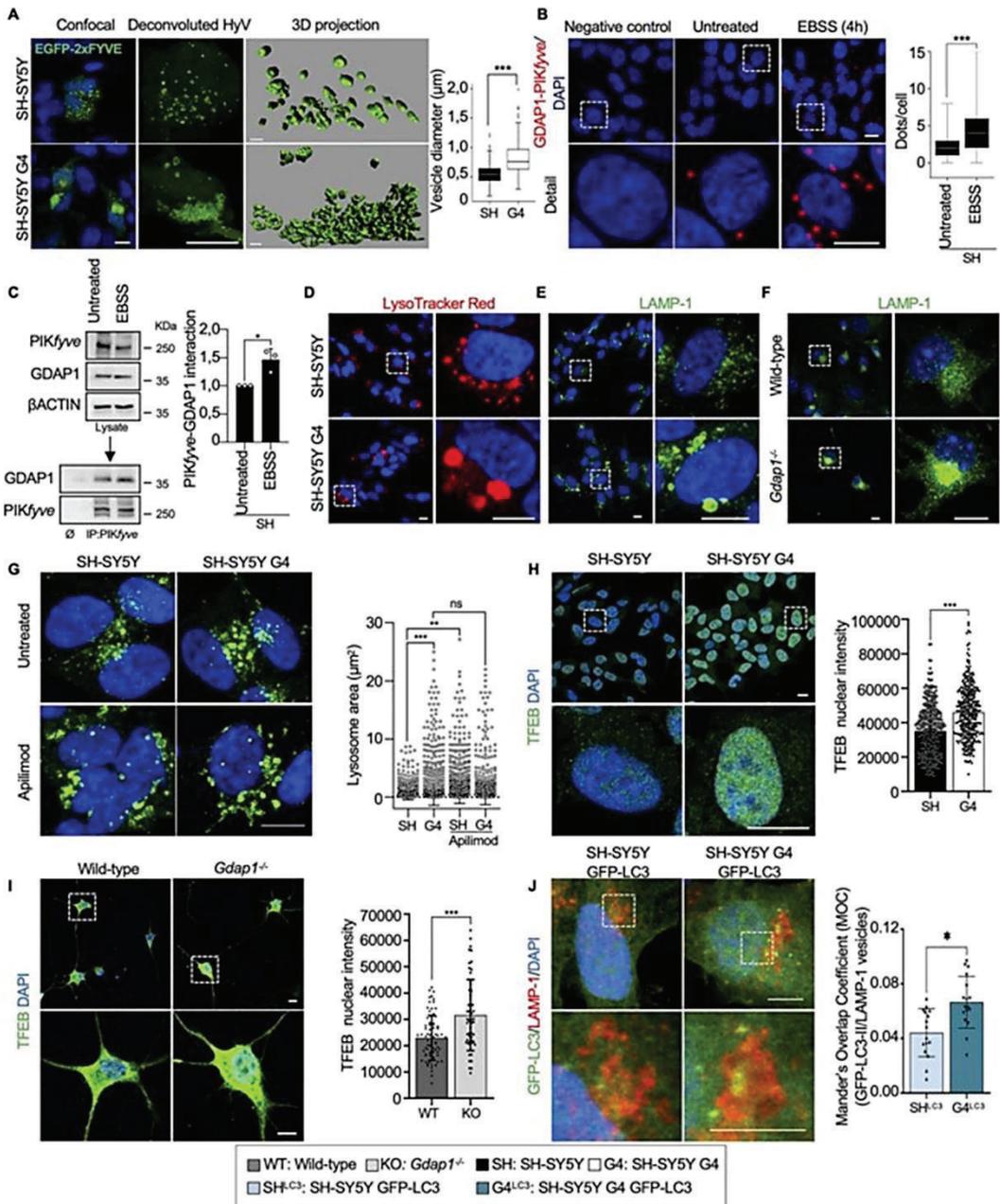


**Figure 2.** GDAP1 interacts with SYNTAXIN 17 (STX17) and LC3 in MAMs. (A) Negative interactions by co-IP assays of GDAP1 with DRP1 (mitochondrial fission in MAMs), ACSL1 (fatty acid metabolism in MAMs), GRP75 (Ca<sup>2+</sup> channel in MAMs), BECLIN-1 (ER-mitochondria tethering and autophagosome formation), ATG4 (unique redox sensor essential for maturation of autophagosomes) and RAB7 (trafficking, maturation, and fusion of endocytic and autophagic vesicles). (B and C) Co-IP assay of endogenous GDAP1 and STX17 (B) or LC3 (C) in SH-SY5Y cells. (D and E) Representative images of the interaction between GDAP1 and STX17 (D) or LC3 (E) in SH-SY5Y cells by PLA from 3 independent experiments. Scale bar: 10 μm. (F) Western blot of subcellular fractions from SH-SY5Y and G4 cells and quantification of relative protein levels in MAMs fraction (three or four independent experiments). C, cytosol; ER, endoplasmic reticulum; pM, pure mitochondria; MAM, mitochondria associated membranes. Data information: In (F), data represent mean ± SD and individual values are displayed as dots. ANOVA followed by Sidak's post hoc test.

supporting the inhibitory effect on PIKfyve (38) and suggesting an impaired lysosomal function when GDAP1 is depleted. To know if autophagosome defects also contribute to lysosomal defects, we immunostained with α-LAMP-1 both SH-SY5Y and G4 cells

of the vesicles were LAMP-1+/LC3-II- that confirmed their lysosomal nature in both SH-SY5Y and G4 cells.

Then, we wondered if the enlargement of lysosomes affected their enzymatic activity. We found no changes either in



**Figure 3.** GDAP1 regulates membrane biogenesis in MAMs and the activity of PYKfyve. (A) Representative images of GFP-FYVE positive vesicles in transfected SH-SY5Y and G4 cells. Box-plot shows vesicle diameter ( $\mu\text{m}$ ). Scale bar: 10  $\mu\text{m}$ , 3D scale bar: 1  $\mu\text{m}$ . (B) PLA of GDAP1 and PIKfyve in untreated SH-SY5Y cells and after autophagy induction (EBSS). Quantification of the number of dots per cell is shown in the right panel ( $n = 261$  untreated SH-SY5Y cells and  $n = 229$  SH-SY5Y EBSS cells; three independent experiments). (C) Co-IP assay of endogenous GDAP1 and PIKfyve in SH-SY5Y cells. Quantification is shown in the right panel (three independent experiments). (D-F) Representative images of lysosomes stained with LysoTracker Red (D) or  $\alpha$ -LAMP-1 (E) in SH-SY5Y and G4 cells and with  $\alpha$ -LAMP-1 in eMNs (F). (G) Representative images of  $\alpha$ -LAMP-1 staining in untreated neuroblastoma cells and after Apilimod treatment (left panel) and lysosomal area distribution (right panel) ( $n = 2339$  SH-SY5Y lysosomes,  $n = 3128$  G4 lysosomes,  $n = 4487$  SH-SY5Y Apilimod lysosomes and  $n = 2338$  G4 Apilimod lysosomes; two independent experiments). Scale bar: 10  $\mu\text{m}$ . (H and I) Representative images of TFEB staining and quantification of nuclear TFEB intensity in neuroblastoma cells (H) ( $n = 459$  SH-SY5Y cells,  $n = 399$  G4

lysosomal pH (LysoSensor Green) or in CATHEPSIN B activity (Magic Red) in G4 cells (Supplementary Material, Fig. S4). On the other hand, after BafA1 treatment, we observed morphological differences in G4 cells, suggestive of a delay in the autophagic lysosome reformation (ALR) (39) (Supplementary Material, Fig. S4A, detail). This finding would further support that PYKfyve, which regulates ALR (40), needs GDAP1 for proper activity. These results argue that GDAP1 regulates the activity of PYKfyve for the maturation of lysosomal membranes regardless of their hydrolytic capacity.

### GDAP1-LAMP-1 is a tethering couple of mitochondria-lysosome MCSs

We analyzed how GDAP1 is related to lysosomes. We found by western blotting a GDAP1 band in lysosome-enriched fractions from SH-SY5Y cells (Fig. 4A). These fractions were negative for other mitochondrial and peroxisomal markers. To further investigate whether GDAP1 is located in lysosomes, we transiently overexpressed GDAP1 in SH-SY5Y cells and stained with  $\alpha$ -GDAP1,  $\alpha$ -LAMP-1 and MitoTracker Deep Red. Super-resolution confocal imaging revealed that GDAP1 is exclusively located at mitochondria (Fig. 4B). We then hypothesized that GDAP1, located in the OMM could be resident of the MCSs between these organelles. Co-IP assays in untransfected SH-SY5Y cells detected the constitutive interaction of GDAP1 with the lysosomal membrane protein LAMP-1 in untreated cells and after BafA1 or EBSS treatments (Fig. 4C). Consistent with co-IP data, PLA experiments confirmed the GDAP1-LAMP-1 interaction. We used two different  $\alpha$ -LAMP-1 antibodies that recognize either the carboxy-terminus ( $\alpha$ -LAMP-1-Ct) or a luminal epitope of the protein. We found a larger number of PLA spots using  $\alpha$ -GDAP1 and  $\alpha$ -LAMP-1-Ct antibodies, which recognize exposed epitopes on the outer surface of mitochondria and lysosomes, respectively. The number of PLA spots was significantly lower when GDAP1 is depleted (G4 cells) or the  $\alpha$ -LAMP-1 epitope is located in the lysosome lumen (Fig. 4D). Hence, GDAP1 is not located at the lysosome membrane but rather it associates with lysosomes by its interaction with LAMP-1 in mitochondria-lysosome MCSs. We also examined mitochondria-lysosome MCSs in cultured WT and *Gdap1*<sup>-/-</sup> eMNs. We found PLA spots in both soma and axons of WT eMNs whilst they were absent in *Gdap1*<sup>-/-</sup> eMNs (Fig. 4E). The location of mitochondria-lysosome MCSs along the eMNs axons (Fig. 4E, detail) is intriguing, and therefore, we seek to visualize these contacts in SH-SY5Y *in vivo* by intensity-based image segmentation of time-lapse images (Supplementary Material, Fig. S5). We identified mitochondria-lysosome colocalization signal in SH-SY5Y soma and neurites as well (Fig. 4F), thus, indicating a role for mitochondria-lysosome MCSs along axons.

We next examined how GDAP1 knockdown might be affecting mitochondria-lysosome MCSs by using super-resolution confocal imaging. GDAP1 depletion markedly increased the distance between mitochondria and lysosomes (Fig. 5A-C) as well as the distribution of the four contact event categories (see Methods) according to the distance between these organelles

(Fig. 5D). G4 cells showed a decrease of contacts ( $\leq 80$  nm) and possible contacts (80–150 nm) whereas the vicinity (150–300 nm) and far populations ( $> 300$  nm) were increased (Fig. 5D and E). We also observed a significant presence of engulfment events (lysosome enveloping mitochondria) in G4 cells (Fig. 5F). Besides, time-lapse cell imaging (Supplementary Material, Fig. S5) of mitochondria-lysosome MCSs in G4 cells showed a reduction of mitochondria-lysosome MCSs surface (Fig. 5G and Supplementary Material, Movies S1, S2, S4 and S5) and contact duration (Fig. 5H and Supplementary Material, Movies S3 and S6). Collectively, these data demonstrated that GDAP1-LAMP-1 is a new tethering pair of mitochondria-lysosome MCSs, which is altered by GDAP1 depletion.

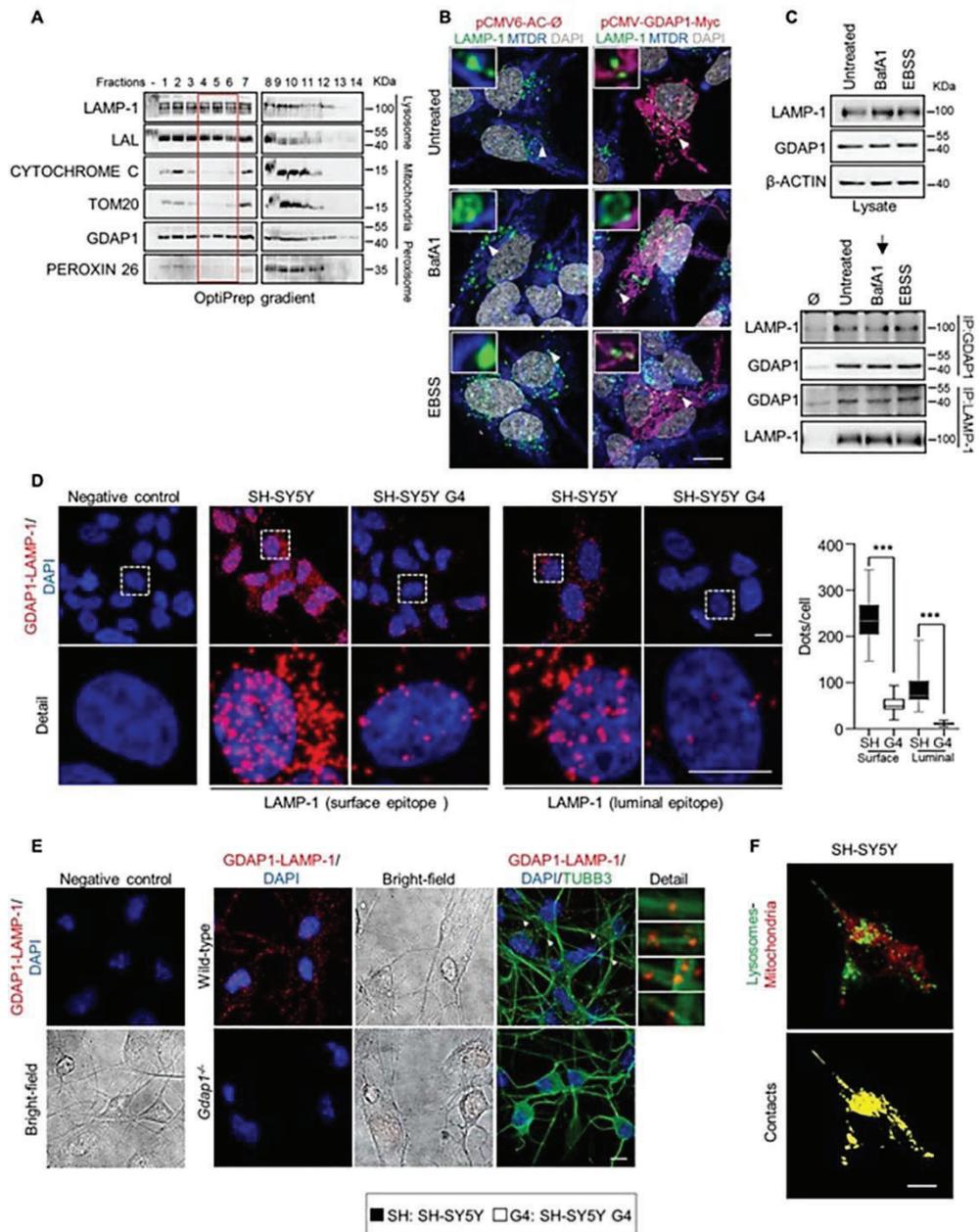
### Glutathione supply rescues lysosome and mitochondrial network abnormalities caused by GDAP1 depletion

As GDAP1 has been proposed to be a sensor for cellular redox status (3,16), we investigate whether the effects observed by the depletion of GDAP1 are related to changes in redox homeostasis of the cell. We detected significantly lower levels of GSH in G4 cells and *Gdap1*<sup>-/-</sup> eMNs (Fig. 6A and B), which led us to perform rescue experiments with GSH-reduced ethyl ester (GSH-MEE). The supply of GSH-MEE did not rescue autophagosome accumulation linked to basal autophagy slow-down (Fig. 6C). In contrast, GSH-MEE did rescue the aberrant lysosomal morphology in G4 cells (Fig. 6D) and *Gdap1*<sup>-/-</sup> eMNs (Fig. 6E). As lysosomes and mitochondria-lysosome MCSs regulate mitochondrial network dynamics (23), we performed rescue experiments to analyze GSH-MEE effect on 3D volume models of mitochondrial network (Fig. 7A-P and Supplementary Material, Fig. S6). In untreated G4 cells, the mitochondrial network showed a significant increase in volume, length and number of branch-points and endpoints, as well as a reduction in the number of substructures (individual mitochondria and subnetworks). GSH-MEE supply rescued all these mitochondrial network abnormalities (Fig. 7), while the number of mitochondria-lysosome contacts was further decreased; however, the supply of GSH-MEE caused these organelles to come closer (Fig. 7Q) and a reduction of mitochondria engulfment events in G4 cells (Fig. 7R), suggesting a reduction of dysfunctional mitochondria and lysosomes. Therefore, the antioxidant environment after GSH-MEE supply rescued the lysosome membranes and mitochondrial network dynamics, but not the defects in the autophagic degradative pathway.

### Discussion

Here, we report novel functions of GDAP1 linked to its localization in the OMM (12) and to its potential GST-like activity (2), which could explain primary insults in GDAP1-related CMT pathophysiology. We previously described that GDAP1 is part of the mitochondrial MCSs with the ER (MAMs), and of the mitochondria-ER-plasmatic membrane contacts (Ca<sup>2+</sup> microdomains), and that MCSs are affected by GDAP1 depletion

cells; three independent experiments) and eMNs (I) (n=95 Wild-type cells, n=66 *Gdap1*<sup>-/-</sup> cells; three independent primary cultures). Scale bars: 10  $\mu$ m. (J) Colocalization of GFP-LC3 vesicles with LAMP-1 staining in SH-SY5Y and G4 cells. Analysis of Mander's Overlapping Coefficient (MOC) of the vesicles is shown in the graphic below (n=278 SH-SY5Y cells, n=260 G4 cells; three independent experiments). Scale bars: 10  $\mu$ m. Data information: In (A, B), the box plot lines correspond from the bottom of the box to top: 25th percentile, median percentile, 75th percentile. The whiskers extend to the minimum and maximum values. Outliers are represented as dots. In (C, G, H, I and J) data represent mean  $\pm$  SD and individual values are displayed as dots. Mann-Whitney U test (A, B), Student's t-test (C, H-I) and Kolmogorov-Smirnov test (G). \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001.



**Figure 4.** GDAP1 interacts with the lysosomal-associated membrane protein LAMP-1. (A) Western blotting of enriched lysosome fractions isolated from SH-SY5Y cells. The red box marks the pure lysosome fractions. (B) SH-SY5Y cells transfected with pCMV-GDAP1-Myc and stained with  $\alpha$ -LAMP-1 and MitoTracker Deep Red after different treatments. Deconvoluted images and magnification are shown (insets). Scale bar: 10  $\mu$ m. (C) Co-IP assay of endogenous GDAP1 and LAMP-1 in SH-SY5Y cells. (D) PLA assay of endogenous GDAP1 and LAMP-1 interaction in SH-SY5Y and G4 cells with two specific epitope-LAMP-1 antibodies. Quantification of the number of dots per cell is shown in the right panel ( $n = 54$  SH-SY5Y cells,  $n = 29$  G4 cells,  $n = 22$  SH-SY5Y cells,  $n = 42$  G4 cells). Scale bar 10  $\mu$ m. (E) PLA assay of endogenous GDAP1 and LAMP-1 interaction in wild-type and *Gdap1*<sup>-/-</sup> eMNs. The bright field, a complementary image with TUBB3 staining and magnification details of axonal interactions are shown. Scale bars: 10  $\mu$ m. (F) A sample frame (up) of the confocal live imaging of SH-SY5Y cells overexpressing LAMP1-GFP and stained with MitoTracker Deep Red. Intensity-based image segmentation (identification of lysosomes and mitochondria) was applied to each video frame and the colocalization structures were then

(14,15). Additionally, GDAP1 reduction affects mitochondrial movement, which would cause defects in the structure and function of mitochondrial membrane contacts, as we found in the mitochondria-ER-plasmatic membrane contacts that regulate the store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry (SOCE) activity (15,41,42).

In this study, we found that GDAP1 function is relevant in cellular pathways where mitochondria and lysosomes act in a coordinated manner (Fig. 8). In first place, GDAP1 participates in early autophagic events by interacting with STX17, LC3-I and LC3-II; all of which are involved in autophagosome biogenesis and membrane trafficking (25–27,29,30). As GDAP1 and these interactors have been found in MAMs, it is tempting to propose the direct participation of GDAP1 in early events of membrane biogenesis in MAMs. The depletion of GDAP1 causes abnormal autophagosomes contributing to the slow-down of autophagic pathways. Moreover, our GDAP1-deficient models also showed membrane defects of lysosomes thus supporting that mitochondrial dysfunction affects lysosomes structure, as previously reported (43). We observed enlarged lysosomes, whose mobility and fusion with autophagosomes may be compromised, affecting both basal and induced autophagy by defective autophagic flux (Fig. 8). However, the lysosomal defects related to GDAP1 depletion were only structural since the lysosomes did not lose their hydrolytic capacity. Importantly, lysosome morphology but not the autophagosome phenotype was rescued by restoring cellular GSH levels in GDAP1-deficient cells, indicating that membrane defects of these vesicles have a different origin. Regarding lysosomes rescue, it has been reported that PIKfyve inhibition activates TFEB (44) and causes lysosome coalescence (38) as we found here. Given that FYVE-PI3P binding is pH dependent (45) and consequently sensitive to redox state (19), we propose that GDAP1 interacts with PYKfyve to maintain the redox state for proper PYKfyve binding to PI3P in membranes. Of note, GDAP1-PYKfyve interaction increases with the induction of autophagy when the activity of PYKfyve for vesicle maturation is more necessary.

Notably, we also found that GDAP1 is located in mitochondria-lysosome MCSs, another mitochondrial membrane contact, that links this protein with lysosomal biology (Fig. 8). Indeed, we show that GDAP1-LAMP-1 is a new tethering pair of mitochondria-lysosome MCSs, where GDAP1 increases the affinity of one organelle for the other. In our models, GDAP1 reduction affects both the structure and function of these MCSs, causing lysosomes to coalesce and mitochondrial network defects. Since mitochondria-lysosome MCSs regulate mitochondrial fission via RAB7 (23), defective MCSs between these organelles could explain mitochondrial network abnormalities related to GDAP1 deficiency (12,13,15,44). The supply of GSH in GDAP1-depleted cells rescue all mitochondrial network abnormalities including the number of substructures suggesting a link between mitochondrial fission and the redox state (18). The relevance of GST activity in the regulation of mitochondrial function has been recently reported for the role of the cytosolic glutathione S-transferase Gzf upon mitochondrial network in axons (46). Previous studies on GDAP1 relation with cellular redox state showed that overexpression of this protein increases GSH in neuronal cells whereas its knockdown causes sensitivity to oxidative stress (18), which would support GDAP1 GST activity. However, the canonical GST activity of GDAP1 is still

controversial (3,11,47,48) and recent structural data showed that GDAP1 is not capable of binding GSH in the G-domain but retains binding of the substrate in the H-domain (47). These findings are consistent with a putative role of GDAP1 as a sensor of cellular oxidative stress (3,16,18,47), which would also explain the cellular oxidative state caused by GDAP1 depletion.

GSH rescue of lysosome membranes and mitochondrial network dynamics but not of their contacts further support the GDAP1 tethering function of mitochondrial MCSs. Given that very few proteins have now been found to be pure tethers (49), we propose that GDAP1 is a tether that also regulates or senses the redox state in mitochondrial MCSs and, perhaps also, through its remodeling membrane activity (3). The uniqueness of mitochondrial MCSs functions in terms of its redox state regulation has not been studied. Mitochondria-organelle contacts constitute membrane domains that integrate organelle communication and function with cellular metabolism and homeostasis (22). Our findings place GDAP1 as part of this network regulating both mitochondria-lysosome MCSs and mitochondria-lysosome degradative and nondegradative pathways. Neurons are particularly sensitive to disruption of both mitochondria and lysosome function and combined defects of these organelles are observed in many neurodegenerative diseases, also in hereditary neuropathies (50). The absence of GDAP1 especially affects neurons and long axons of the peripheral nerves and now it seems that the abnormal changes of the redox state in ER-mitochondria-lysosome membrane axis can be a primary insult that causes Charcot-Marie-Tooth disease: the contacts between mitochondria and lysosomes may play a relevant role not only in the neuronal soma but also within axons. Finally, our results open new target pathways in the axonal pathophysiology in peripheral neuropathies like CMT disease, but also in the axonopathy associated with neurodegenerative diseases, where mitochondria and lysosomes are involved.

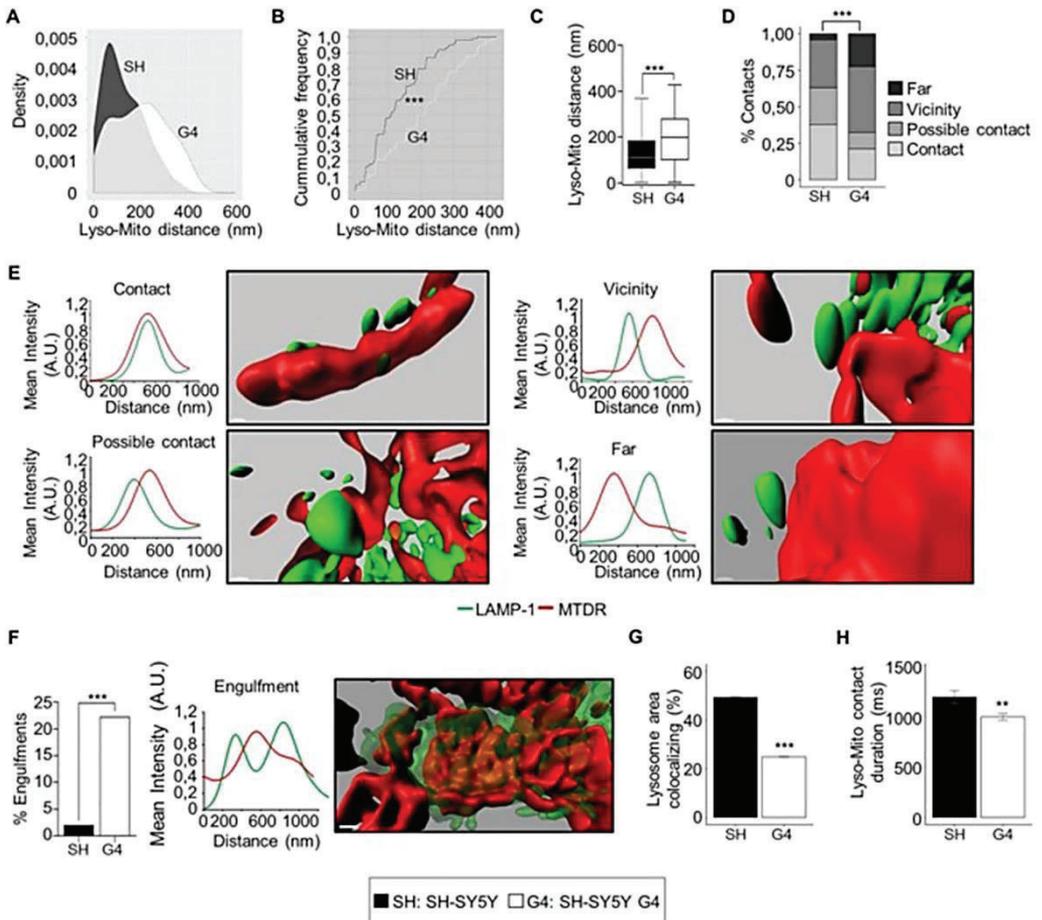
## Materials and Methods

### Reagents

**Plasmids.** The following plasmids were used: mGFP-LAMP (Addgene plasmid #34831), eGFP-LC3 was a gift from Dr Erwin Knecht (Addgene #21073), pEGFP-2xFYVE was a gift from Dr Pascual Sanz, pCMV6-AC-Ø and pCMV-GDAP1-Myc plasmid (15).

**Antibodies and probes.** The following antibodies were used: ACSL1 rabbit antibody (Cell Signaling, #4047), ATG4B mouse antibody (MBL, M134-3), ATG4B rabbit antibody (Abcam, ab154843), BECLIN-1 rabbit antibody (Cell Signaling #3738),  $\beta$ -ACTIN mouse antibody (Sigma-Aldrich, A5316), TUBB3 rabbit antibody (Sigma-Aldrich, T2200), TUBB3 mouse antibody (Promega, G7121), DRP1 mouse antibody (BD Biosciences, 611113), FACL-4 mouse antibody (Santa Cruz, sc-365230), GDAP1 rabbit antibody (Sigma-Aldrich, HPA024334), GDAP1 mouse antibody (Abcam, ab194493), GRP75 rabbit antibody (Santa Cruz, sc-13967), HA-probe mouse antibody (Santa Cruz, sc-7392), LAMP-1 rabbit antibody (Sigma-Aldrich, L1418 and Abcam ab24170), LAMP-1 mouse antibody (DSHB, H4A3), LC3 mouse antibody (LifeSpan Biosciences, LS-C165694), LC3B rabbit antibody (Sigma-Aldrich, L7543), MITOFUSIN-2 rabbit antibody (Sigma-Aldrich, M6319), PIKfyve

isolated. Maximum projection of the 2D + t volume generated from the colocalization at each video frame is shown (down). Scale bar: 10  $\mu\text{m}$ . Data information: In (D) the box plot lines correspond from the bottom of the box to top: 25th percentile, median percentile, 75th percentile. The whiskers extend to the minimum and maximum values. Mann-Whitney U test \*\*\* $P < 0.001$ .

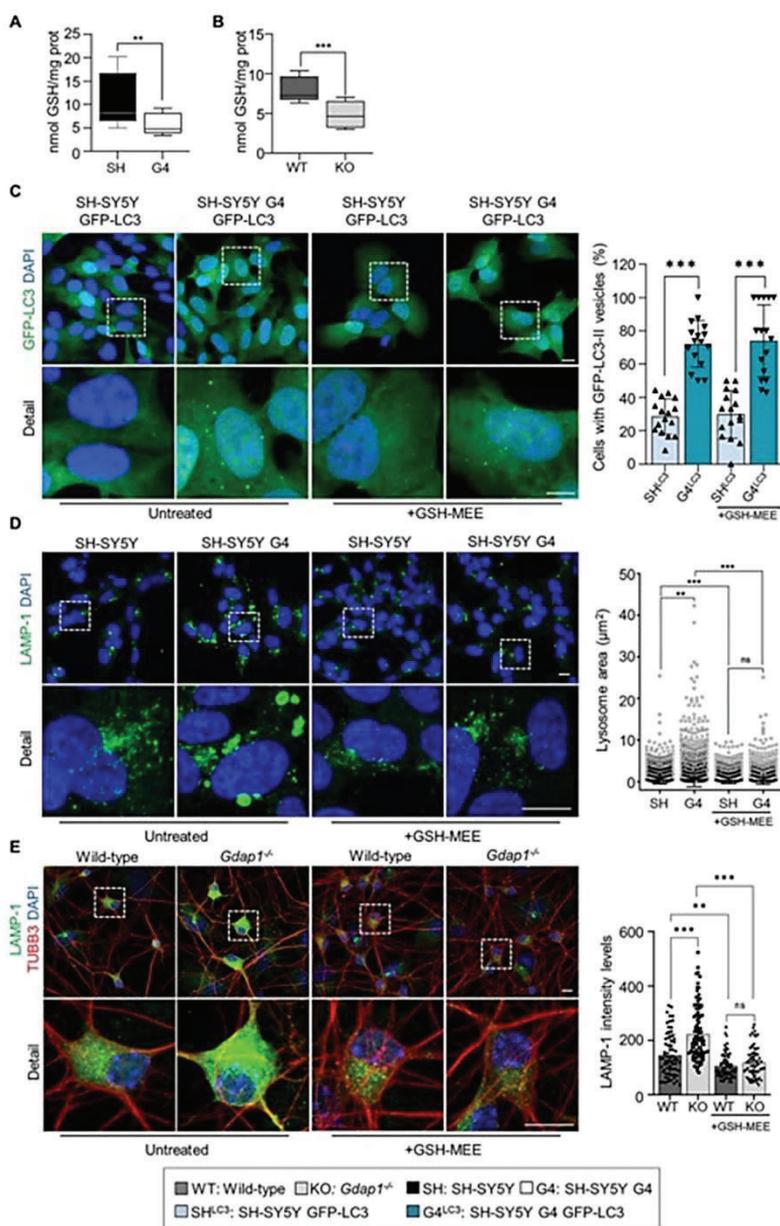


**Figure 5.** GDAP1 and LAMP-1 is a new tethering pair of mitochondria-lysosomes MCSs. (A) Comparative Kernel density plots of lysosome-mitochondria distance in SH-SY5Y and G4 cells. (B) Cumulative distribution plot of lysosome-mitochondria distance in SH-SY5Y and G4 cells. (C) Distance between lysosomes and mitochondria in SH-SY5Y ( $n = 100$  total events) and G4 ( $n = 104$  total events) cells. (D) Percentage of events in the four categories (contact, possible contact, vicinity and far) in SH-SY5Y ( $n = 100$  total events) and G4 ( $n = 104$  total events) cells. (E) Representative 3D images of the four mitochondria-lysosome event categories and the corresponding intensity profiles of MTDR (red channel) and LAMP-1 (green channel) along an ideal straight line crossing the event. Scale bar: 500 nm. (A.U.: arbitrary units). (F) Percentage of engulfment events in SH-SY5Y ( $n = 100$  total events) and G4 ( $n = 104$  total events) cells. A representative 3D images of an engulfment event and the corresponding intensity profile of MTDR (red channel) and LAMP-1 (green channel) along an ideal straight line (white) crossing the event. Scale bar: 500 nm. (A.U.: arbitrary units). (G) Percentage of total lysosome area colocalizing with mitochondria ( $n = 3600$  video frames from 8 SH-SY5Y cells),  $n = 3150$  video frames from 7 G4 cells). (H) Duration (ms) of lysosome-mitochondria contacts ( $n = 10658$  contacts from 8 SH-SY5Y cells),  $n = 19661$  contacts from 7 G4 cells. Data information: In (C), the box plot lines correspond from the bottom of the box to top: 25th percentile, median percentile, 75th percentile. The whiskers extend to the minimum and maximum values. In (F, G and H) data represent mean  $\pm$  SD. Kolmogorov-Smirnov test (B), Mann-Whitney U test (C), Pearson's Chi-squared test (D), Fisher's exact test (F) and Student's t-test (G and H). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

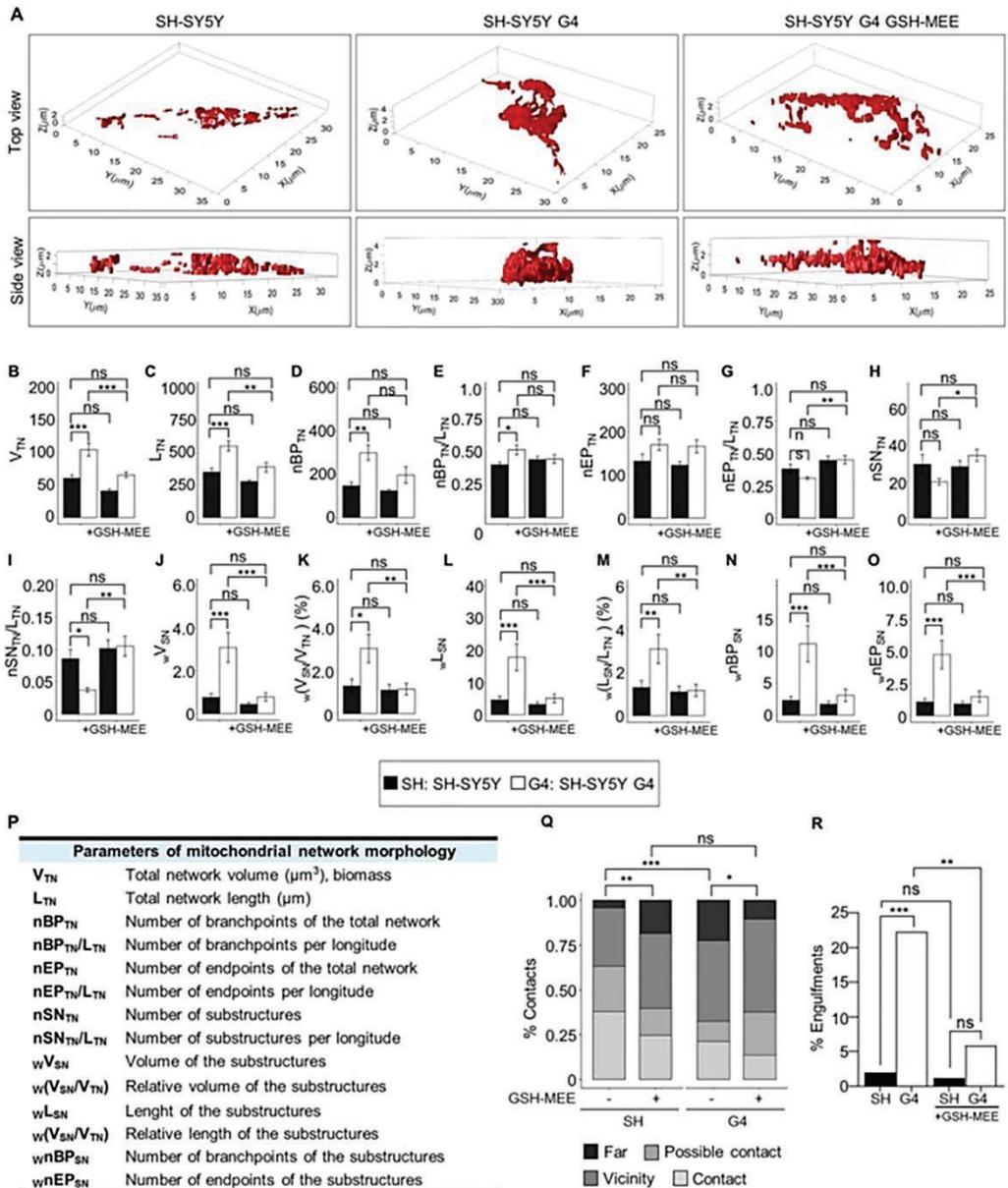
mouse antibody (Santa Cruz, sc-100408), p62/SQSTM1 rabbit antibody (Sigma-Aldrich, P0067), RAB7 mouse antibody (Sigma-Aldrich, R8779), SYNTAXIN 17 rabbit antibody (Sigma-Aldrich, HPA001204), TFEB rabbit antibody (LifeSpan Biosciences, LS-C353036), TOM20 mouse antibody (BD Biosciences, 612278), V5 rabbit antibody (Sigma-Aldrich, V8137) and Alexa fluorophore-conjugated secondary antibodies from Molecular Probes (Invitrogen). MitoTracker Deep Red, LysoTracker Red DND-99 and LysoSensor Green DND-189 were from Molecular Probes and

Magic Red™ cathepsin B reagent was from Immunochemistry Technologies.

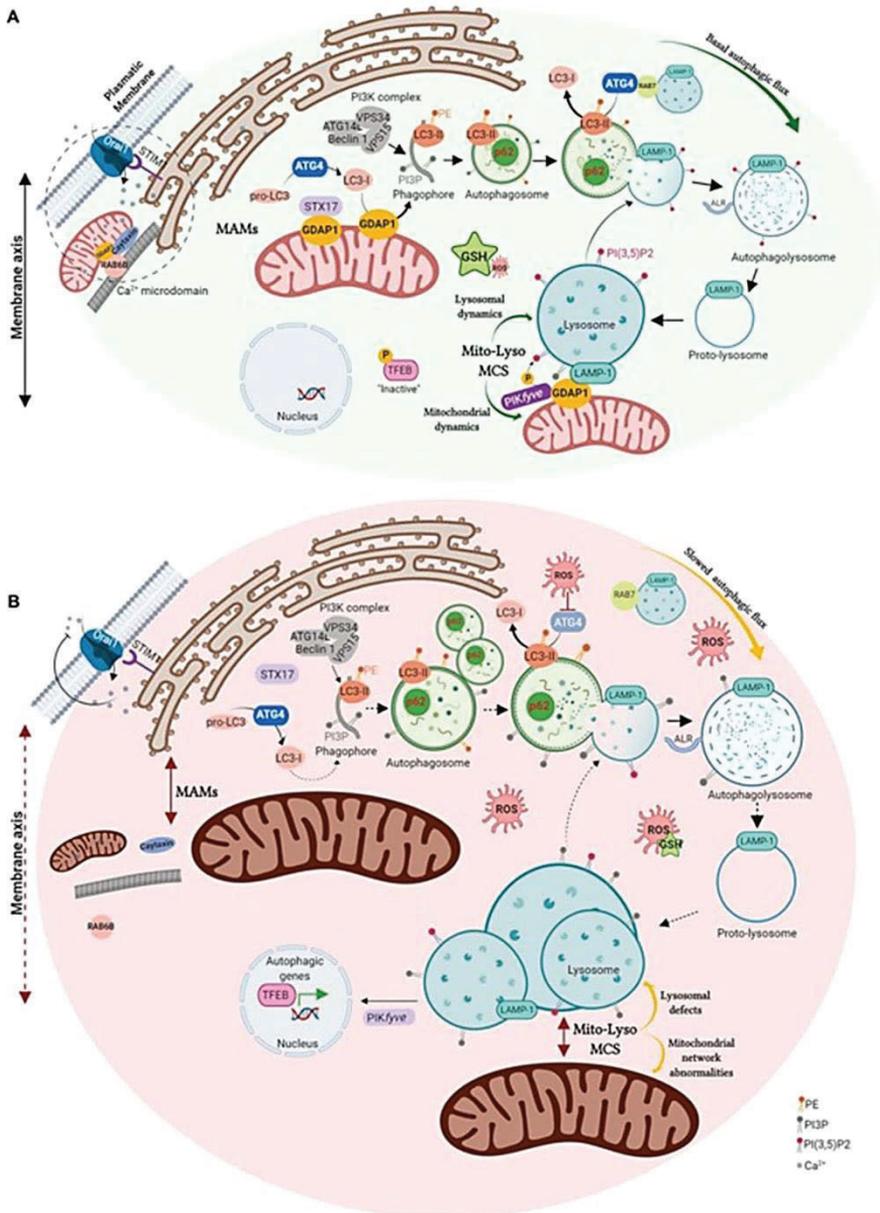
**Drugs and treatments.** For the induction of autophagy by amino acid starvation cells were washed three times with PBS and cultured in Earle's Balanced Salt Solution (EBSS, Thermo Fisher) for 4 or 24 h at 37°C. The PIKfyve kinase inhibitor Apilimod (Selleckchem) was used at 20 nM for 60 min at 37°C. The specific inhibitor of vacuolar-type  $H^+$ -ATPase Bafilomycin A1 (Merck)



**Figure 6.** Restoration of cellular GSH levels rescues lysosomal morphology in GDAP1 depleted cells. (A and B) GSH levels (nmol/mg protein) in SH-SY5Y and G4 cells ( $n = 6$  independent experiments) (A) and in *Gdap1*<sup>-/-</sup> eMNs ( $n = 3$  independent experiments) (B). (C) Percentage of GFP-LC3 vesicles in untreated neuroblastoma cells stably expressing GFP-LC3 and after GSH-MEE treatment ( $n = 278$  SH-SY5Y cells,  $n = 260$  G4 cells,  $n = 181$  SH-SY5Y GSH cells and  $n = 111$  G4 GSH cells; three independent experiments). (D) Representative images of  $\alpha$ -LAMP-1 staining in untreated neuroblastoma cells and after GSH-MEE treatment (left panel) and lysosomal area distribution (right panel) ( $n = 7653$  SH-SY5Y lysosomes,  $n = 9404$  G4 lysosomes,  $n = 6181$  SH-SY5Y GSH-MEE lysosomes and  $n = 6504$  G4 GSH-MEE lysosomes; three independent experiments). Scale bars: 10  $\mu\text{m}$ . (E) Representative images of  $\alpha$ -LAMP-1 staining in untreated MNs and after GSH-MEE treatment (left panel) and quantification of LAMP-1 intensity levels (right panel) ( $n = 71$  Wild-type cells,  $n = 92$  *Gdap1*<sup>-/-</sup> cells,  $n = 83$  Wild-type GSH-MEE cells, and  $n = 70$  *Gdap1*<sup>-/-</sup> GSH-MEE cells; two independent primary cultures). Scale bars: 10  $\mu\text{m}$ . Data information: In (A and B), the box plot lines correspond from the bottom of the box to top: 25th percentile, median percentile, 75th percentile. The whiskers extend to the minimum and maximum values. In (C-E) data represent mean  $\pm$  SD and individual values are displayed as dots. Mann-Whitney U test (A and B), ANOVA followed by Sidak's post hoc test (C and E) and Kolmogorov-Smirnov test (D). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .



**Figure 7.** Restoration of cellular GSH levels rescues mitochondrial network dynamics in G4 cells. (A) Representative 3D volume models of the mitochondrial network in SH-SY5Y, G4 and GSH-MEE-treated G4 cells. (B–O) Assessment of morphological mitochondrial parameters for the total network (B–I) ( $n = 20$  SH-SY5Y cells,  $n = 22$  G4 cells,  $n = 21$  SH-SY5Y GSH-MEE cells, and  $n = 24$  G4 GSH-MEE cells) and network sub-structures (J–O) ( $n = 582$  structures from 20 SH-SY5Y cells,  $n = 432$  structures from 22 G4 cells,  $n = 584$  structures from SH-SY5Y GSH-MEE 21 cells and  $n = 815$  structures from 24 cells). (P) Table summarizing measured mitochondrial parameters. (Q and R) Percentage of contacts in the four categories (Q) and engulfment events (R) in untreated SH-SY5Y and G4 cells or after GSH-MEE treatment ( $n = 100$  SH-SY5Y cells,  $n = 104$  G4 cells,  $n = 82$  SH-SY5Y GSH-MEE cells and  $n = 102$  G4 GSH-MEE cells). Data information: In (B–O) data represent mean  $\pm$  SEM. ANOVA followed by Tukey's post hoc test (A–O), Pearson's Chi-squared (Q) and Fisher's exact tests (R). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , ns, non-significant.



**Figure 8.** GDAP1 function in mitochondrial MCSs and proposed pathophysiological mechanisms in deficient cells. **(A)** GDAP1 is located in both the outer mitochondrial membrane and the mitochondria-associated membranes (MAMs), the membrane contact sites (MCSs) between mitochondria and ER. GDAP1 participates in membrane biogenesis of early autophagic vesicles, interacting with STX17 and LC3-I/II, allowing proper basal autophagic flux. GDAP1 through its interaction with the lysosomal protein LAMP-1, constitutes a new tether of mitochondria-lysosome MCSs, regulating mitochondrial and lysosomal dynamics. GDAP1 also interacts with the kinase PIKfyve, involved in lysosomal identity, maturation, and transport. The figure also includes the known participation of GDAP1 in both retrograde and anterograde movements mediated by RAB6 and caxytain, respectively, which locates mitochondria at Ca<sup>2+</sup> microdomains. **(B)** Cells lacking GDAP1 present an oxidative microenvironment due to a decrease in GSH levels. The depletion of GDAP1 causes defects in vesicle biogenesis from MAMs, leading to autophagosome accumulation and slowing down the autophagic flux. The lack of GDAP1 also affects mitochondria-lysosome MCSs inducing (1) enlarged lysosomes and the activation of TFEB, which is recruited to the nucleus activating the expression of autophagic genes and (2) mitochondrial network abnormalities. In Ca<sup>2+</sup> microdomains, mitochondrial localization is also altered affecting SOCE activity. Illustration created with BioRender (<https://biorender.com/>).

was used at 200 nm for 30 min or 4 h at 37°C. The antioxidant glutathione reduced ethyl ester (GSH-MEE, Sigma-Aldrich) was used at 1 mM for 24 h at 37°C.

### Animals and embryonic motor neuron (eMN) primary culture

*Gdap1* knockout (*Gdap1*<sup>-/-</sup>) mice were previously generated and characterized in our laboratory (14). All the animals were kept under controlled temperature (23°C) and humidity (60%) on a 12 h light/dark cycle with access to food and water *ad libitum*. eMN cultures were prepared from 13.5 embryonic day (E13.5) mouse spinal cord as previously described with some modifications (14). Briefly, mouse embryo spinal cords were dissected, and the dorsal half removed. Ventral spinal cords were dissociated mechanically after trypsin treatment (0.025% trypsin in HBSS) and collected under a 4% bovine serum albumin (BSA) cushion. The largest cells were isolated by centrifugation (10 min at 520g) using iodixanol density gradient purification. The collected cells were finally suspended in a tube containing: Neurobasal (Life technologies) supplemented with B27 (Life technologies), 2% horse serum (Life technologies), 1× glutamax (Life technologies), and a cocktail of recombinant neurotrophins: 1 ng/ml BDNF, 10 ng/ml GDNF, 10 ng/ml CNTF, and 10 ng/ml HGF (PreProtech). Isolated eMNs were plated on poly-DL-ornithine/laminin-coated surfaces and grown in a 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C. Media was changed every 2–3 days and 2 μM AraC (Sigma-Aldrich) was added to the culture medium to limit the growth of non-neuronal cells. eMNs were transfected with Lipofectamine™ 2000 reagent (Invitrogen) according to manufacturer's instructions.

### Neuroblastoma cell culture

SH-SY5Y and SH-SY5Y G4 (15) neuroblastoma cell lines were cultured in Dulbecco's Modified Eagles's Medium/Nutrient mixture F-12 (DMEM-F12, Sigma-Aldrich) supplemented with 10% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich), 2 mM L-glutamine (Sigma-Aldrich) and 100 mg/ml penicillin-streptomycin (Sigma-Aldrich), at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator. SH-SY5Y G4 cell line was additionally supplemented with 2 cg/ml puromycin (Sigma-Aldrich) to maintain the selection and GFP-LC3 stable cell lines were selected in the presence of 500 μg/ml geneticin (G418 Sigma-Aldrich). Neuroblastoma cells were transfected with FuGENE Transfection Reagent (Promega) according to the manufacturer's instructions.

### Transmission electron microscopy

Isolated eMNs were seeded onto poly-D-lysine/laminin-coated Lab-Tek chamber slides of 2 wells (Nalge Nunc International), fixed after 24 h of culture in 2.5% glutaraldehyde for 1 h at 37°C and processed for TEM as previously reported (51).

### Western blot and co-immunoprecipitation assays (co-IP)

Cells were homogenized in lysis buffer (50 mM Tris HCl pH 7.4, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 50 mM NaF and 1 mM Na<sub>2</sub>VO<sub>3</sub>) containing a protease inhibitor cocktail (Complete Mini-Protease Inhibitor Cocktail, Roche). Homogenates were centrifuged at 13200 rpm (FA-45-30-11 Rotor) for 15 min at 4°C and the protein concentration of the supernatant was quantified by BCA method (Thermo Fisher Scientific), resolved in sodium

dodecyl sulfate-polyacrylamide gels (SDS-Page) and transferred onto Amersham Hybond PVDF membranes (GE Healthcare). The membranes were blocked with 5% defatted-milk or bovine serum albumin in TBS-0.1% Tween 20 buffer (25 mM Tris, 50 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 0.1% Tween-20). Afterward the membranes were blotted with the specific primary antibodies, which were detected using secondary antibodies coupled to horseradish peroxidase. Proteins were processed for chemiluminescence with Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent and visualized by iBright™ CL1000 Imaging System (Thermo Fisher Scientific). Bands intensity was measured using ImageJ (NIH, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

For immunoprecipitation assays, 1 mg of total lysate was incubated with the specific antibody for 6–8 h at 4°C followed by incubation with Protein G Sepharose™ 4 Fast Flow (GE, Healthcare) overnight at 4°C. Beads were softly washed with lysis buffer, resuspended in Laemmli Buffer, heated at 95°C and analyzed by SDS-Page and western blot.

### Immunofluorescence

Cells were seeded onto glass coverslips, washed with PBS and fixed in pre-warmed 4% paraformaldehyde for 20 min at room temperature. Cells were permeabilized with 0.2% Triton in PBS for 30 min and they were blocked with 1% BSA and 4% serum in PBS. The specific primary antibodies were incubated overnight at 4°C and the secondary conjugated antibodies were incubated for 1.5 h at room temperature. The coverslips were mounted with Fluoromount-G with DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole). To visualize mitochondria or lysosomes, cells were loaded with 200 nm MitoTracker Deep Red for 30 min at 37°C or with 75 nm LysoTracker Red DND-99 for 45 min at 37°C, respectively.

eMNs were washed with PB 0.1 M and fixed in pre-warmed 4% paraformaldehyde for 20 min at room temperature. Cells were permeabilized and blocked with BSA 4%—Triton 0.5% in PB 0.1 M for 1.5 h. The following steps are explained above.

For immunostaining of autophagic markers in tissues, sections of brains and spinal cords were dewaxed, and antigenic unmasking was carried out. The tissues were blocked with 4% BSA 0.1% Triton and 5% goat serum for 2 h at room temperature. After several wash steps, the sections were incubated with the corresponding primary antibodies overnight at 4°C in a humidity chamber. The secondary antibody was added after washed with PBS, and the sections were mounted with Fluoromount-G with DAPI.

### Proximity ligation assay

Cells were seeded onto glass coverslips, washed with PBS, fixed in pre-warmed 4% paraformaldehyde for 20 min at room temperature and permeabilized with ice-cold methanol at -20°C for 20 min. In MNs, the permeabilization was performed with PBS 0.4% Triton X-100 for 10 min. After 1 h of incubation at 37°C with the blocking solution in a pre-heated humidity chamber, cells were incubated overnight at 4°C with the specific primary antibodies. Afterward, we performed the PLA assay according to the manufacturer's instructions (Duolink In Situ-Fluorescence, Sigma-Aldrich) and the coverslips were mounted with Duolink In Situ Mounting Medium with DAPI.

### GFP-LC3 flow cytometry

SH-SY5Y and SH-SY5Y G4 GFP-LC3 stable cell lines were seeded on 35-mm plates and treated with Bafilomycin A1 for 4 h at 37°C.

Cells were harvested by trypsinization and washed with PBS. 10 000 cells were counted by sample, and GFP intensity levels were analyzed with a Novocyte 3000 flow cytometer (ACEA).

### Lysosomal pH analysis

To observe lysosomal alkalization cells were seeded onto 25-mm glass coverslips, washed with PBS and loaded with 1  $\mu$ M LysoSensor Green DND-189 for 30 min at 37°C. Cells were washed with PBS and immediately visualized with a confocal microscope.

### CATHEPSIN B activity

Lysosomal function was analyzed by the CATHEPSIN B enzymatic activity. Cells were loaded with Magic Red™ CATHEPSIN B reagent for 45 min at 37°C and the fluorescence intensity of 10 000 cells per sample was measured by flow cytometry.

### Subcellular fractionation (MAMs)

Subcellular fractions were obtained according to Annunziata and collaborators (52) with little modifications. Briefly, cells were resuspended in hypotonic buffer (250 mM sucrose, 20 mM HEPES pH 7.4, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, protease and phosphatase inhibitors) for 30 min on ice and then homogenized with a pestle and disrupted by passing through a 25 G and 30 G needles. Lysed cells were centrifuged at 750g for 10 min at 4°C to remove cell debris and nuclei. The supernatant was centrifuged at 10 000g for 20 min at 4°C: the pellet contained the mitochondrial fraction. The supernatant was again centrifuged at 100 000g for 1 h at 4°C in a Hitachi Ultracentrifuge CP80NX, rotor P40ST. This third supernatant was the cytosolic fraction, while the pellet contained the endoplasmic reticulum fraction. The mitochondrial pellet was resuspended in isolation medium (250 mM mannitol, 5 mM HEPES pH 7.4, 0.5 mM EGTA, 0.10% BSA), layered on top of a 30% Percoll gradient and centrifuged at 95 000g for 30 min at 4°C (P40ST Rotor). Two white bands were obtained: the upper band was collected, diluted with isolation medium and centrifuged at 6300g for 10 min at 4°C. The resulting supernatant was centrifuged at 100 000g for 1 h at 4°C. The pellet contained the MAMs fraction. The lower band was diluted with isolation medium and centrifuged at 6300g for 10 min at 4°C twice to remove the Percoll. The resulting pellet was collected as the pure mitochondrial fraction.

### Lysosomal enriched fractions

Lysosomes were isolated using a lysosomal enrichment kit (Thermo Fisher Scientific). SH-SY5Y cells were seeded on 150-mm plates and lysed following the manufacturer's instructions. The lysates were combined with OptiPrep to a final concentration of 15% and layered on top of a discontinuous density gradient with the following concentrations from top to bottom: 17, 20, 23, 27 and 30%. The tube was centrifuged for 2 h at 145 000g and the whole volume collected to determine the lysosome-containing fraction. The fractions were diluted with PBS, pelleted by centrifugation for 30 min at 18 000g and washed with the kit solution. The fractions were analyzed by SDS-Page and western blot.

### Glutathione quantification (GSH assay)

Cells were seeded onto a 96-well plate and the measure of GSH cellular levels was performed with the GSH-Glo Glutathione

Assay (Promega) following the manufacturer's instructions. The total protein concentration of equitable wells was analyzed by BCA method to normalize the results of each well and eliminate the variations due to differences in the number of cells.

### Image acquisition and processing

Super-resolution images were acquired with a Leica TCS SP8 X White Light Laser confocal microscope with Hybrid spectral detectors and HyVolution (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) using the Leica LAS X software (version 3.1.5). Image deconvolution was performed with Huygens Essential software v 4.4 Op6 (SVI, Leiden, The Netherlands). Image processing and analysis were implemented and performed using the software MATLAB R\_2018a (The MathWorks Inc., Natick, MA, USA) and the Leica Application Suite X (LAS-X) software (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

**Mitochondria-lysosome contact sites in fixed cells.** Coverslips were mounted in ProLong Antifade Kit (Life Technologies). Images were acquired using a HC x PL APO 100 $\times$ /1.4 oil immersion objective, the HyD detector and HyVolution. Optimized emission detectors bandwidths were configured to avoid inter-channel crosstalk. The confocal pinhole was set to 0.5 Airy units. To study and detect contacts in three dimensions, Z stacks were acquired every 0.12  $\mu$ m along with the cell thickness ( $n=10$  independent experiments). Appropriate negative controls were used to adjust confocal settings to avoid non-specific fluorescence artifacts. To compare the data, identical settings were used for image acquisition of different experiments. The distances between mitochondria-lysosome in each cell were measured by LAS-X and quantified as the distance of mass center mitochondria-lysosome. We analyzed the MCS-visual field (contact region/area) which is the visual field defined by the presence of 1 or more membrane contact sites. Organelle membrane contacts sites in confocal images are defined as an overlap of 3 or more contiguous pixels, in our case 1 pixel is equivalent to 29 nm (3 pixels are 87 nm). This definition may lead to an overestimation of contacts, as the distance between membranes at membrane contact sites studied by electron microscopy has generally been reported in the range of 15–30 nm. However, the maximum distance between membranes that allows for a functional interaction is unclear and maybe even greater than 100 nm owing to the long lengths of tethering proteins (53,54). Moreover, if physical links exist between two organelles, they might be transient and/or localized to limited membrane areas, so that vicinities might in part represent contacts undetected by electron microscopy (55). For these reasons, we defined four categories to obtain the maximum information: contact ( $\leq 80$  nm), possible contact (80–150 nm), vicinity (150–300 nm) and far ( $> 300$  nm).

**Mitochondria-lysosome contact sites in live cells.** Time-lapsed multichannel (red and green) fluorescence microscopy was used to image living cells in a temperature-controlled chamber (37°C) at 5% CO<sub>2</sub>. The confocal pinhole was set to 1.5 Airy units. Images were captured using a HC x PL APO 100 $\times$ /1.4 oil immersion objective with an acquisition period of 261 ms for 2 min. This resulted in a sequence of images stored as 16-bit grey scale images with a spatial resolution of 496  $\times$  496 pixels and with a physical pixel size of 0.117  $\times$  0.117  $\mu$ m (Supplementary Material, Fig. S5, Supplementary Material, Movies S1 and S4).

A custom automatic image analysis method was developed to identify both mitochondria and lysosome vesicles and

characterize their spatio-temporal colocalization patterns (Supplementary Material, Fig. S5). To enhance the structures before segmentation an image pre-processing routine was implemented including the following stages: (1) individual cells of interest were manually masked from the fields, (2) the contrast of mitochondrial and lysosome objects was enhanced using an intensity-based linear transformation saturating the bottom and the top 10% of all pixel values at each frame, (3) median filtering with a  $3 \times 3$  pixels window provided a convenient way to further increase image quality by reducing noise while preserving edges. Subsequently, a segmentation algorithm based on Otsu's method (which chooses the threshold to minimize the intraclass variance of the black and white pixels) was selected for the autonomous discrimination of the organelles from the background (Supplementary Material, Fig. S5A–G). Mitochondria-lysosome contacts were defined as an overlap of 3 or more pixels (consistent with the analysis in fixed cells) between segmented organelles. Contact area was defined as the mean percentage of the overlapping area of each colocalizing lysosome at each frame (Supplementary Material, Fig. S5H–J; Supplementary Material, Movies S2 and S5). The percentage of lysosomes in contacts was quantified as the mean percentage of lysosome vesicles that formed contacts with mitochondria divided by the total number of lysosome vesicles at each frame. For contact duration assessment, we generated a  $2D + t$  structure from the colocalization segmentation at each frame. Duration time was then calculated as the average number of frames (each frame representing 261 ms) that an individual contact spans in time (Supplementary Material, Fig. S5K–M; Supplementary Material, Movies S3 and S6).

**Mitochondrial network morphology.** Images were captured using a HC × PL APO 100×/1.4 oil immersion objective. The confocal pinhole was set to 0.5 Airy units. The original data was stored as 16-bit grey scale images with a spatial resolution of  $1024 \times 1024$  pixels. Pixel sizes ranged from  $0.035 \times 0.035$  to  $0.057 \times 0.057 \mu\text{m}$ . Z-stacks were acquired in  $0.16 \mu\text{m}$  z-increments from each cell.

Image pre-processing to assess mitochondrial network morphology involved: (1) manually masking of individual cells of interest from the fields, (2) contrast enhancement using an intensity-based linear transformation saturating the bottom 25% of all pixel values, (3) median filtering with a  $5 \times 5$  pixels neighborhood. To accurately identify the mitochondrial structures, we applied a 2D segmentation algorithm at each layer of the Z-stack involving a Laplacian of Gaussian edge detector followed by a Moore-Neighbor algorithm. An iso-surface 3D (volumetric) model was generated by stacking the contiguous set of segmented slices. The segmentation technique was validated using a ground truth of the 3D mitochondrial network generated by an expert. Overall, this segmentation approach avoided erroneous fusions and provided better segmentation results than standard algorithms (Otsu's segmentation, for instance, tripled false positive rate). A labeling algorithm was applied to identify each substructure (objects smaller than 100 pixels were excluded) (Supplementary Material, Fig. S6A–F). Furthermore, the resulting mitochondrial network volume was subsequently skeletonized using the standard process operations. This approach allowed 3D quantification of shape and topology biomarkers, namely, the number of mitochondrial structures (individuals/subnetworks) as well as volume, length (rods + branches) and the number of branchpoints both for total network and single structures (Supplementary Material, Fig. S6G and H).

**Colocalization analysis of GFP-LC3 and LAMP-1 vesicles.** Images were captured using a HC × PL APO 63×/1.75 oil immersion objective. The confocal pinhole was set to 1.0 Airy units. The original data was stored as 8-bit grayscale images with a spatial resolution of  $1024 \times 1024$  pixels and a pixel size of  $0.103 \times 0.103 \mu\text{m}$ . Z-stacks were acquired in  $0.5 \mu\text{m}$  z-increments. Maximum-intensity projections of 3D image stacks of lysosomes (red channel—LAMP-1), GFP-LC3 (green channel—GFP) and nuclei (blue channel—DAPI) were calculated. A multi-stage approach was implemented to correct for spectral bleed-through artifacts (caused by the emission of DAPI fluorophore being detected in the through the filter combination reserved for the GFP). First, image segmentation (Otsu's method) of the blue channel rendered a binary mask delimitating nuclei regions. The resulting mask was applied to the GFP channel to exclude those pixels outside the nuclei regions. Next, morphological opening (disk-shaped structuring element with a radius of 10) followed by 2D-gaussian filtering ( $\sigma = 5$ ) returned a background approximation image. Intensity values were then adjusted by saturating the bottom 10%-pixel values. The result obtained (inflated nuclei illumination) was finally subtracted from the original image. The automatic identification of cell regions was achieved by applying an Otsu segmentation algorithm to the green channel. Background artifacts were subsequently filtered by a morphological opening operator that removed small objects with an area  $< 10.6 \mu\text{m}^2$ . The resulting binary mask (delimiting cells) was applied both to the red and green channels to exclude from the analysis the unsuccessfully co-transfected cells. A segmentation algorithm based on Otsu's method was selected for the autonomous delimitation of vesicles (lysosomes and GFP-LC3 vesicles). Artifacts were removed if they had an area  $< 0.0027 \mu\text{m}^2$ . Mander's overlapping coefficient (MOC) was used to assess the degree of colocalization (pixel co-occurrence) between the vesicle regions of the two channels. This index is more robust to background noise fluctuations than area overlap measures since it gives more relevance to pixels with higher intensities.

## Statistics

Statistical analysis was performed using Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA), GraphPad Prism or R (3.5.1 version) with a minimum of three independent experiments. The specific test applied in each case is indicated in the figure legend. *P* values less than 0.05 were considered significant.

## Study approval

Experimental procedures were performed following the European Union Council guidelines (2010/63/EU) and Spanish regulations (RD 1201/2005). Research protocols with experimental mouse models are reported in detail to the local Ethical Committee of Animal Experimentation (CEEA) of the University of Barcelona before experiments start, and further approval has been provided by the Government of Catalonia. The registration number is C-133/18 (10071) for *Gdap1*<sup>-/-</sup> mouse model. All efforts were made to minimize pain and distress.

## Supplementary Material

Supplementary Material is available at HMG online.

## Acknowledgements

All imaging acquirement was performed at the confocal microscopy unit of Sant Joan de Déu Children's Hospital, as part of 'Centre Daniel Bravo de Diagnòstic i Recerca en Malalties Minoritàries (CDB)' and the Pediatric Institute of Rare Diseases (IPER). We thank the Pathology Department at Sant Joan de Déu Hospital for the preparation of tissue slices. We thank Dr Erwin Knecht for the GFP-LC3 plasmid and Dr Pascual Sanz for the EGFP-FYVEx2 plasmid.

Conflict of Interest Statement: None declared.

## Funding

Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities (SAF2015-66625-R); the Generalitat de Catalunya (2015 FEDER/S-21, 2017/SGR1308); and the Instituto de Salud Carlos III (CIBERER, ACCI 2019-16). L.C. is the recipient of a postdoctoral research contract from CIBERER; E.J.-E. is the recipient of a FPI PhD scholarship.

## References

- Rossor, A.M., Tomaselli, P.J. and Reilly, M.M. (2016) Recent advances in the genetic neuropathies. *Curr. Opin. Neurol.*, **29**, 537-548.
- Marco, A., Cuesta, A., Pedrola, L., Palau, F. and Marin, I. (2004) Evolutionary and structural analyses of GDAP1, involved in Charcot-Marie-Tooth disease, characterize a novel class of glutathione transferase-related genes. *Mol. Biol. Evol.*, **21**, 176-187.
- Huber, N., Bieniossek, C., Wagner, K.M., Elsasser, H.P., Suter, U., Berger, I. and Niemann, A. (2016) Glutathione-conjugating and membrane-remodeling activity of GDAP1 relies on amphipathic C-terminal domain. *Sci. Rep.*, **6**, 36930.
- Baxter, R.V., Ben Othmane, K., Rochelle, J.M., Stajich, J.E., Hulette, C., Dew-Knight, S., Hentati, F., Ben Hamida, M., Bel, S., Stenger, J.E. et al. (2002) Ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 is mutant in Charcot-Marie-Tooth disease type 4A/8q21. *Nat. Genet.*, **30**, 21-22.
- Cuesta, A., Pedrola, L., Sevilla, T., Garcia-Planells, J., Chumillas, M.J., Mayordomo, F., LeGuern, E., Marin, I., Vilchez, J.J. and Palau, F. (2002) The gene encoding ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 is mutated in axonal Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. *Nat. Genet.*, **30**, 22-25.
- Claramunt, R., Pedrola, L., Sevilla, T., Lopez de Munain, A., Berciano, J., Cuesta, A., Sanchez-Navarro, B., Millan, J.M., Saifi, G.M., Lupski, J.R. et al. (2005) Genetics of Charcot-Marie-Tooth disease type 4A: mutations, inheritance, phenotypic variability, and founder effect. *J. Med. Genet.*, **42**, 358-365.
- Sivera, R., Espinos, C., Vilchez, J.J., Mas, F., Martinez-Rubio, D., Chumillas, M.J., Mayordomo, F., Muelas, N., Bataller, L., Palau, F. and Sevilla, T. (2010) Phenotypical features of the p.R120W mutation in the GDAP1 gene causing autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease. *J. Peripher. Nerv. Syst.*, **15**, 334-344.
- Zimon, M., Baets, J., Fabrizi, G.M., Jaakkola, E., Kabzinska, D., Pilch, J., Schindler, A.B., Cornblath, D.R., Fischbeck, K.H., Auer-Grumbach, M. et al. (2011) Dominant GDAP1 mutations cause predominantly mild CMT phenotypes. *Neurology*, **77**, 540-548.
- Sevilla, T., Jaijo, T., Nauffal, D., Collado, D., Chumillas, M.J., Vilchez, J.J., Muelas, N., Bataller, L., Domenech, R., Espinos, C. and Palau, F. (2008) Vocal cord paresis and diaphragmatic dysfunction are severe and frequent symptoms of GDAP1-associated neuropathy. *Brain*, **131**, 3051-3061.
- Sivera, R., Frassetto, M., Lupo, V., Garcia-Sobrinho, T., Blanco-Arias, P., Pardo, J., Fernandez-Torron, R., de Munain, A.L., Marquez-Infante, C., Villarreal, L. et al. (2017) Distribution and genotype-phenotype correlation of GDAP1 mutations in Spain. *Sci. Rep.*, **7**, 6677.
- Pedrola, L., Espert, A., Wu, X., Claramunt, R., Shy, M.E. and Palau, F. (2005) GDAP1, the protein causing Charcot-Marie-Tooth disease type 4A, is expressed in neurons and is associated with mitochondria. *Hum. Mol. Genet.*, **14**, 1087-1094.
- Niemann, A., Rugg, M., La Padula, V., Schenone, A. and Suter, U. (2005) Ganglioside-induced differentiation associated protein 1 is a regulator of the mitochondrial network: new implications for Charcot-Marie-Tooth disease. *J. Cell Biol.*, **170**, 1067-1078.
- Pedrola, L., Espert, A., Valdes-Sanchez, T., Sanchez-Piris, M., Sirkowski, E.E., Scherer, S.S., Farinas, I. and Palau, F. (2008) Cell expression of GDAP1 in the nervous system and pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. *J. Cell. Mol. Med.*, **12**, 679-689.
- Barneo-Muñoz, M., Juárez, P., Civera-Tregón, A., Yndriago, L., Pla-Martin, D., Zenker, J., Cuevas-Martín, C., Estela, A., Sánchez-Aragó, M., Forteza-Vila, J. et al. (2015) Lack of GDAP1 induces neuronal calcium and mitochondrial defects in a knockout mouse model of Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *PLoS Genet.*, **11**, e1005115.
- Pla-Martin, D., Rueda, C.B., Estela, A., Sanchez-Piris, M., Gonzalez-Sanchez, P., Traba, J., de la Fuente, S., Scorrano, L., Renau-Piqueras, J., Alvarez, J. et al. (2013) Silencing of the Charcot-Marie-Tooth disease-associated gene GDAP1 induces abnormal mitochondrial distribution and affects Ca<sup>2+</sup> homeostasis by reducing store-operated Ca<sup>2+</sup> entry. *Neurobiol. Dis.*, **55**, 140-151.
- Niemann, A., Huber, N., Wagner, K.M., Somandin, C., Horn, M., Lebrun-Julien, F., Angst, B., Pereira, J.A., Halfter, H., Welzl, H. et al. (2014) The Gdap1 knockout mouse mechanistically links redox control to Charcot-Marie-Tooth disease. *Brain*, **137**, 668-682.
- Cassereau, J., Chevrollier, A., Codron, P., Goizet, C., Gueguen, N., Verry, C., Reynier, P., Bonneau, D., Lenaers, G. and Proccaccio, V. (2020) Oxidative stress contributes differentially to the pathophysiology of Charcot-Marie-Tooth disease type 2K. *Exp. Neurol.*, **323**, 113069.
- Noack, R., Frede, S., Albrecht, P., Henke, N., Pfeiffer, A., Knoll, K., Dehmel, T., Meyer Zu Horste, G., Stettner, M., Kieseier, B.C. et al. (2012) Charcot-Marie-Tooth disease CMT4A: GDAP1 increases cellular glutathione and the mitochondrial membrane potential. *Hum. Mol. Genet.*, **21**, 150-162.
- Schafer, F.Q. and Buettner, G.R. (2001) Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic. Biol. Med.*, **30**, 1191-1212.
- Fernandez-Lizarbe, S., Civera-Tregon, A., Cantarero, L., Herter, I., Juarez, P., Hoenicka, J. and Palau, F. (2019) Neuroinflammation in the pathogenesis of axonal Charcot-Marie-Tooth disease caused by lack of GDAP1. *Exp. Neurol.*, **320**, 113004.
- Prinz, W.A., Toulmay, A. and Balla, T. (2020) The functional universe of membrane contact sites. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **21**, 7-24.
- Lackner, L.L. (2019) The expanding and unexpected functions of mitochondria contact sites. *Trends Cell Biol.*, **29**, 580-590.

23. Wong, Y.C., Ysselstein, D. and Krainc, D. (2018) Mitochondria-lysosome contacts regulate mitochondrial fission via RAB7 GTP hydrolysis. *Nature*, **554**, 382–386.
24. Klionsky, D.J. (2016) Stepping back from the guidelines: where do we stand? *Autophagy*, **12**, 223–224.
25. Itakura, E. and Mizushima, N. (2013) Syntaxin 17: the autophagosomal SNARE. *Autophagy*, **9**, 917–919.
26. Schaaf, M.B., Keulers, T.G., Vooijs, M.A. and Rouschop, K.M. (2016) LC3/GABARAP family proteins: autophagy-(un)related functions. *FASEB J.*, **30**, 3961–3978.
27. Zhao, Y.G. and Zhang, H. (2018) Autophagosome maturation: an epic journey from the ER to lysosomes. *J. Cell Biol.*, **218**, 757–770.
28. Hamasaki, M., Furuta, N., Matsuda, A., Nezu, A., Yamamoto, A., Fujita, N., Oomori, H., Noda, T., Haraguchi, T., Hiraoka, Y. et al. (2013) Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature*, **495**, 389–393.
29. Maruyama, T. and Noda, N.N. (2018) Autophagy-regulating protease Atg4: structure, function, regulation and inhibition. *J. Antibiot.*, **71**, 72–78.
30. Kjos, I., Borg Distefano, M., Saetre, F., Repnik, U., Holland, P., Jones, A.T., Engedal, N., Simonsen, A., Bakke, O. and Progid, C. (2017) Rab7b modulates autophagic flux by interacting with Atg4B. *EMBO Rep.*, **18**, 1727–1739.
31. Scherz-Shouval, R., Shvets, E., Fass, E., Shorer, H., Gil, L. and Elazar, Z. (2007) Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J.*, **26**, 1749–1760.
32. Burman, C. and Ktistakis, N.T. (2010) Regulation of autophagy by phosphatidylinositol 3-phosphate. *FEBS Lett.*, **584**, 1302–1312.
33. Sbrissa, D., Ikononov, O.C. and Shisheva, A. (1999) PIKfyve, a mammalian ortholog of yeast Fab1p lipid kinase, synthesizes 5-phosphoinositides. Effect of insulin. *J. Biol. Chem.*, **274**, 21589–21597.
34. Tsuruta, F. and Dolmetsch, R.E. (2015) PIKfyve mediates the motility of late endosomes and lysosomes in neuronal dendrites. *Neurosci. Lett.*, **605**, 18–23.
35. Cortes, C.J. and La Spada, A.R. (2019) TFEB dysregulation as a driver of autophagy dysfunction in neurodegenerative disease: molecular mechanisms, cellular processes, and emerging therapeutic opportunities. *Neurobiology*, **122**, 83–93.
36. Martini-Stoica, H., Xu, Y., Ballabio, A. and Zheng, H. (2016) The autophagy-lysosomal pathway in neurodegeneration: a TFEB perspective. *Trends Neurosci.*, **39**, 221–234.
37. Napolitano, G. and Ballabio, A. (2016) TFEB at a glance. *J. Cell Sci.*, **129**, 2475–2481.
38. Choy, C.H., Saffi, G., Gray, M.A., Wallace, C., Dayam, R.M., Ou, Z.A., Lenk, G., Puertollano, R., Watkins, S.C. and Botelho, R.J. (2018) Lysosome enlargement during inhibition of the lipid kinase PIKfyve proceeds through lysosome coalescence. *J. Cell Sci.*, **131**, jcs213587.
39. Chen, Y. and Yu, L. (2018) Recent progress in autophagic lysosome reformation. *Traffic*, **18**, 358–361.
40. Bissig, C., Hurbain, I., Raposo, G. and van Niel, G. (2017) PIKfyve activity regulates reformation of terminal storage lysosomes from endolysosomes. *Traffic*, **18**, 747–757.
41. Gonzalez-Sanchez, P., Pla-Martin, D., Martinez-Valero, P., Rueda, C.B., Calpena, E., Del Arco, A., Palau, F. and Satrustegui, J. (2017) CMT-linked loss-of-function mutations in GDAP1 impair store-operated Ca<sup>2+</sup> entry-stimulated respiration. *Sci. Rep.*, **7**, 42993.
42. Gonzalez-Sanchez, P., Satrustegui, J., Palau, F. and Del Arco, A. (2019) Calcium deregulation and mitochondrial bioenergetics in GDAP1-related CMT disease. *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 403.
43. Demers-Lamarche, J., Guillebaud, G., Tlili, M., Todkar, K., Belanger, N., Grondin, M., Nguyen, A.P., Michel, J. and Germain, M. (2016) Loss of mitochondrial function impairs lysosomes. *J. Mol. Biol.*, **291**, 10263–10276.
44. Gayle, S., Landrette, S., Beeharry, N., Conrad, C., Hernandez, M., Beckett, P., Ferguson, S.M., Mandelkern, T., Zheng, M., Xu, T. et al. (2017) Identification of apilimod as a first-in-class PIKfyve kinase inhibitor for treatment of B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood*, **129**, 1768–1778.
45. Ballatori, N., Krance, S.M., Notenboom, S., Shi, S., Tieu, K. and Hammond, C.L. (2009) Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol. Chem.*, **390**, 191–214.
46. Smith, G.A., Lin, T.H., Sheehan, A.E., Van der Goes van Naters, W., Neukomm, L.J., Graves, H.K., Bis-Brewer, D.M., Zuchner, S. and Freeman, M.R. (2019) Glutathione S-transferase regulates mitochondrial populations in axons through increased glutathione oxidation. *Neuron*, **103**, 52–65 e56.
47. Googins, M.R., Woghiren-Afegbua, A.O., Calderon, M., St Croix, C.M., Kiselyov, K.I. and VanDemark, A.P. (2020) Structural and functional divergence of GDAP1 from the glutathione S-transferase superfamily. *FASEB J.*, **34**, 7192–7207.
48. Shield, A.J., Murray, T.P. and Board, P.G. (2006) Functional characterisation of ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 as a glutathione transferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **347**, 859–866.
49. Scorrano, L., De Matteis, M.A., Emr, S., Giordano, F., Hajnoczky, G., Kornmann, B., Lackner, L.L., Levine, T.P., Pellegrini, L., Reinisch, K. et al. (2019) Coming together to define membrane contact sites. *Nat. Commun.*, **10**, 1287.
50. Haidar, M. and Timmerman, V. (2017) Autophagy as an emerging common pathomechanism in inherited peripheral neuropathies. *Front. Mol. Neurosci.*, **10**, 143.
51. Voliani, V., Gonzalez-Bejar, M., Herranz-Perez, V., Duran-Moreno, M., Signore, G., Garcia-Verdugo, J.M. and Perez-Prieto, J. (2013) Orthogonal functionalisation of upconverting NaYF<sub>4</sub> nanocrystals. *Chemistry*, **19**, 13538–13546.
52. Annunziata, I., Patterson, A. and d'Azzo, A. (2013) Mitochondria-associated ER membranes (MAMs) and glycosphingolipid enriched microdomains (GEMs): isolation from mouse brain. *J. Vis. Exp.*, **73**, e50215.
53. Gatta, A.T. and Levine, T.P. (2016) Piecing together the patchwork of contact sites. *Trends Cell Biol.*, **27**, 214–229.
54. Valm, A.M., Cohen, S., Legant, W.R., Melunis, J., Hershberg, U., Wait, E., Cohen, A.R., Davidson, M.W., Betzig, E. and Lippincott-Schwartz, J. (2017) Applying systems-level spectral imaging and analysis to reveal the organelle interactome. *Nature*, **546**, 162–167.
55. Daniele, T., Hurbain, I., Vago, R., Casari, G., Raposo, G., Tacchetti, C. and Schiaffino, M.V. (2014) Mitochondria and melanosomes establish physical contacts modulated by Mfn2 and involved in organelle biogenesis. *Curr. Biol.*, **24**, 393–403.



## BIBLIOGRAFÍA

- Abeliovich, A., Schmitz, Y., Fariñas, I., Choi-Lundberg, D., Ho, W.H., Castillo, P.E., Shinsky, N., Verdugo, J.M., Armanini, M., Ryan, A., et al. (2000). Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron* 25, 239–252.
- Aboutit, S., Bousset, L., Loria, F., Zhu, S., de Chaumont, F., Pieri, L., Olivo-Marin, J.-C., Melki, R., and Zurzolo, C. (2016). Tunneling nanotubes spread fibrillar  $\alpha$ -synuclein by intercellular trafficking of lysosomes. *EMBO J.* 35, 2120–2138.
- Alabi, A.A., and Tsien, R.W. (2012). Synaptic vesicle pools and dynamics. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, a013680.
- Alam, M.S. (2018). Proximity ligation assay (PLA). *Curr. Protoc. Immunol.* 123, e58.
- Alam, M.M., Yang, D., Li, X.-Q., Liu, J., Back, T.C., Trivett, A., Karim, B., Barbut, D., Zasloff, M., and Oppenheim, J.J. (2022). Alpha synuclein, the culprit in Parkinson disease, is required for normal immune function. *Cell Rep.* 38, 110090.
- Alegre-Abarreguei, J., Brimblecombe, K.R., Roberts, R.F., Velentza-Almpani, E., Tilley, B.S., Bengoa-Vergniory, N., and Proukakis, C. (2019). Selective vulnerability in  $\alpha$ -synucleinopathies. *Acta Neuropathol.* 138, 681–704.
- Alvarez-Erviti, L., Rodriguez-Oroz, M.C., Cooper, J.M., Caballero, C., Ferrer, I., Obeso, J.A., and Schapira, A.H.V. (2010). Chaperone-mediated autophagy markers in Parkinson disease brains. *Arch. Neurol.* 67, 1464–1472.
- Alvarez-Erviti, L., Seow, Y., Schapira, A.H., Gardiner, C., Sargent, I.L., Wood, M.J.A., and Cooper, J.M. (2011). Lysosomal dysfunction increases exosome-mediated alpha-synuclein release and transmission. *Neurobiol. Dis.* 42, 360–367.
- Aman, Y., Schmauck-Medina, T., Hansen, M., Morimoto, R.I., Simon, A.K., Bjedov, I., Palikaras, K., Simonsen, A., Johansen, T., Tavernarakis, N., et al. (2021). Autophagy in healthy aging and disease. *Nat. Aging* 1, 634–650.
- Anden, N.E., Dahlstroem, A., Fuxe, K., and Larsson, K. (1965). Further evidence for the presence of nigro-neostriatal dopamine neurons in the rat. *Am J. Anat.* 116, 329–333.
- Anglade, P., Vyas, S., Javoy-Agid, F., Herrero, M.T., Michel, P.P., Marquez, J., Mouatt-Prigent, A., Ruberg, M., Hirsch, E.C., and Agid, Y. (1997). Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histol Histopathol* 12, 25–31.
- Anwar, S., Peters, O., Millership, S., Ninkina, N., Doig, N., Connor-Robson, N., Threlfell, S., Kooner, G., Deacon, R.M., Bannerman, D.M., et al. (2011). Functional alterations to

the nigrostriatal system in mice lacking all three members of the synuclein family. *J. Neurosci.* *31*, 7264–7274.

Arenas, E., Denham, M., and Villaescusa, J.C. (2015). How to make a midbrain dopaminergic neuron. *Development* *142*, 1918–1936.

Auluck, P.K., Caraveo, G., and Lindquist, S. (2010).  $\alpha$ -Synuclein: membrane interactions and toxicity in Parkinson's disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *26*, 211–233.

Austin, S.A., Floden, A.M., Murphy, E.J., and Combs, C.K. (2006). Alpha-synuclein expression modulates microglial activation phenotype. *J. Neurosci.* *26*, 10558–10563.

Austin, S.A., Rojanathammanee, L., Golovko, M.Y., Murphy, E.J., and Combs, C.K. (2011). Lack of alpha-synuclein modulates microglial phenotype in vitro. *Neurochem. Res.* *36*, 994–1004.

Axe, E.L., Walker, S.A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H.L., Habermann, A., Griffiths, G., and Ktistakis, N.T. (2008). Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* *182*, 685–701.

Baba, M., Nakajo, S., Tu, P.H., Tomita, T., Nakaya, K., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., and Iwatsubo, T. (1998). Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Am. J. Pathol.* *152*, 879–884.

Baker, N., Patel, J., and Khacho, M. (2019). Linking mitochondrial dynamics, cristae remodeling and supercomplex formation: How mitochondrial structure can regulate bioenergetics. *Mitochondrion* *49*, 259–268.

Barbut, D., Stolzenberg, E., and Zasloff, M. (2019). Gastrointestinal Immunity and Alpha-Synuclein. *J. Parkinsons. Dis.* *9*, S313–S322.

Barker, R.A., and Björklund, A. (2020). Animal models of parkinson's disease: are they useful or not? *J. Parkinsons. Dis.* *10*, 1335–1342.

Bartels, T., Choi, J.G., and Selkoe, D.J. (2011).  $\alpha$ -Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. *Nature* *477*, 107–110.

Bayer, T.A., Jäkälä, P., Hartmann, T., Egensperger, R., Buslei, R., Falkai, P., and Beyreuther, K. (1999). Neural expression profile of alpha-synuclein in developing human cortex. *Neuroreport* *10*, 2799–2803.

Beatman, E.L., Massey, A., Shives, K.D., Burrack, K.S., Chamanian, M., Morrison, T.E., and Beckham, J.D. (2015). Alpha-Synuclein Expression Restricts RNA Viral Infections in the Brain. *J. Virol.* *90*, 2767–2782.

Bendor, J.T., Logan, T.P., and Edwards, R.H. (2013). The function of  $\alpha$ -synuclein. *Neuron* *79*, 1044–1066.

- Bengoa-Vergniory, N., Faggiani, E., Ramos-Gonzalez, P., Kirkiz, E., Connor-Robson, N., Brown, L.V., Siddique, I., Li, Z., Vingill, S., Cioroch, M., et al. (2020). CLR01 protects dopaminergic neurons in vitro and in mouse models of Parkinson's disease. *Nat. Commun.* *11*, 4885.
- Benskey, M.J., Perez, R.G., and Manfredsson, F.P. (2016). The contribution of alpha synuclein to neuronal survival and function - Implications for Parkinson's disease. *J. Neurochem.* *137*, 331–359.
- Benskey, M.J., Sellnow, R.C., Sandoval, I.M., Sortwell, C.E., Lipton, J.W., and Manfredsson, F.P. (2018). Silencing alpha synuclein in mature nigral neurons results in rapid neuroinflammation and subsequent toxicity. *Front. Mol. Neurosci.* *11*, 36.
- Bernal-Conde, L.D., Ramos-Acevedo, R., Reyes-Hernández, M.A., Balbuena-Olvera, A.J., Morales-Moreno, I.D., Argüero-Sánchez, R., Schüle, B., and Guerra-Crespo, M. (2019). Alpha-Synuclein Physiology and Pathology: A Perspective on Cellular Structures and Organelles. *Front. Neurosci.* *13*, 1399.
- Biere, A.L., Wood, S.J., Wypych, J., Steavenson, S., Jiang, Y., Anafi, D., Jacobsen, F.W., Jarosinski, M.A., Wu, G.M., Louis, J.C., et al. (2000). Parkinson's disease-associated alpha-synuclein is more fibrillogenic than beta- and gamma-synuclein and cannot cross-seed its homologs. *J. Biol. Chem.* *275*, 34574–34579.
- Blauwendraat, C., Nalls, M.A., and Singleton, A.B. (2020). The genetic architecture of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* *19*, 170–178.
- Blocq, P., and Marinesco, G. (1893). Sur un cas de tremblement parkinsonien hémiplégique symptomatique d'une tumeur du pédoncule cérébral. *C. R. Cos. Biol.* *45*, 105-111
- Bloem, B.R., Okun, M.S., and Klein, C. (2021). Parkinson's disease. *Lancet* *397*, 2284–2303.
- Blum-Degen, D., Müller, T., Kuhn, W., Gerlach, M., Przuntek, H., and Riederer, P. (1995). Interleukin-1 beta and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and de novo Parkinson's disease patients. *Neurosci. Lett.* *202*, 17–20.
- Bolam, J.P., and Pissadaki, E.K. (2012). Living on the edge with too many mouths to feed: why dopamine neurons die. *Mov. Disord.* *27*, 1478–1483.
- Bonifacino, J.S., and Glick, B.S. (2004). The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* *116*, 153–166.
- Braak, H., Del Tredici, K., Rüb, U., de Vos, R.A.I., Jansen Steur, E.N.H., and Braak, E. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* *24*, 197–211.

Bray, N.L., Pimentel, H., Melsted, P., and Pachter, L. (2016). Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat. Biotechnol.* *34*, 525–527.

Breda, C., Nugent, M.L., Estranero, J.G., Kyriacou, C.P., Outeiro, T.F., Steinert, J.R., and Giorgini, F. (2015). Rab11 modulates  $\alpha$ -synuclein-mediated defects in synaptic transmission and behaviour. *Hum. Mol. Genet.* *24*, 1077–1091.

Brochard, V., Combadière, B., Prigent, A., Laouar, Y., Perrin, A., Beray-Berthet, V., Bonduelle, O., Alvarez-Fischer, D., Callebert, J., Launay, J.-M., et al. (2009). Infiltration of CD4+ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease. *J. Clin. Invest.* *119*, 182–192.

Brooks, S.P., and Dunnett, S.B. (2009). Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. *Nat. Rev. Neurosci.* *10*, 519–529.

Burré, J. (2015). The Synaptic Function of  $\alpha$ -Synuclein. *J. Parkinsons. Dis.* *5*, 699–713.

Burré, J., Sharma, M., Tsetsenis, T., Buchman, V., Etherton, M.R., and Südhof, T.C. (2010). Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science* *329*, 1663–1667.

Burré, J., Sharma, M., and Südhof, T.C. (2012). Systematic mutagenesis of  $\alpha$ -synuclein reveals distinct sequence requirements for physiological and pathological activities. *J. Neurosci.* *32*, 15227–15242.

Burré, J., Sharma, M., and Südhof, T.C. (2014).  $\alpha$ -Synuclein assembles into higher-order multimers upon membrane binding to promote SNARE complex formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *111*, E4274–83.

Burré, J., Sharma, M., and Südhof, T.C. (2015). Definition of a molecular pathway mediating  $\alpha$ -synuclein neurotoxicity. *J. Neurosci.* *35*, 5221–5232.

Cabin, D.E., Shimazu, K., Murphy, D., Cole, N.B., Gottschalk, W., Mclwain, K.L., Orrison, B., Chen, A., Ellis, C.E., Paylor, R., et al. (2002). Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking alpha-synuclein. *J. Neurosci.* *22*, 8797–8807.

Calì, T., Ottolini, D., Negro, A., and Brini, M. (2012).  $\alpha$ -Synuclein controls mitochondrial calcium homeostasis by enhancing endoplasmic reticulum-mitochondria interactions. *J. Biol. Chem.* *287*, 17914–17929.

Cantarero, L., Juárez-Escoto, E., Civera-Tregón, A., Rodríguez-Sanz, M., Roldán, M., Benítez, R., Hoenicka, J., and Palau, F. (2020). Mitochondria–Lysosome Membrane Contacts are Defective in Gdap1-Related Charcot–Marie–Tooth Disease. *Hum. Mol. Genet.*

Carlsson, A., Lindqvist, M., and Magnusson, T. (1957). 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature* *180*, 1200.

Carlsson, A., Lindqvist, M., Magnusson, T., and Waldeck, B. (1958). On the presence of 3-hydroxytyramine in brain. *Science* 127, 471.

Chandra, S., Chen, X., Rizo, J., Jahn, R., and Südhof, T.C. (2003). A broken alpha-helix in folded alpha-synuclein. *J. Biol. Chem.* 278, 15313–15318.

Chandra, S., Fornai, F., Kwon, H.-B., Yazdani, U., Atasoy, D., Liu, X., Hammer, R.E., Battaglia, G., German, D.C., Castillo, P.E., et al. (2004). Double-knockout mice for alpha- and beta-synucleins: effect on synaptic functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 14966–14971.

Chandra, S., Gallardo, G., Fernández-Chacón, R., Schlüter, O.M., and Südhof, T.C. (2005). Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration. *Cell* 123, 383–396.

Chaprov, K.D., Goloborshcheva, V.V., Tarasova, T.V., Teterina, E.V., Korokin, M.V., Soldatov, V.O., Pokrovskiy, M.V., Kucheryanu, V.G., Morozov, S.G., and Ovchinnikov, R.K. (2020). Increased Expression of the Multimerin-1 Gene in  $\alpha$ -Synuclein Knockout Mice. *Dokl Biol Sci* 494, 260–263.

Charcot, J.-M. (1875). *Leçons sur les Maladies du Système Nerveux faites à la Salpêtrière par J.-M. Charcot. Recueillies et publiées par Bourneville [French] Vol. 1, 2<sup>nd</sup> edn.* Delahaye & Co.

Chartier-Harlin, M.-C., Kachergus, J., Roumier, C., Mouroux, V., Douay, X., Lincoln, S., Levecque, C., Larvor, L., Andrieux, J., Hulihan, M., et al. (2004). Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet* 364, 1167–1169.

Chiasserini, D., Paciotti, S., Eusebi, P., Persichetti, E., Tasegian, A., Kurzawa-Akanbi, M., Chinnery, P.F., Morris, C.M., Calabresi, P., Parnetti, L., et al. (2015). Selective loss of glucocerebrosidase activity in sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Mol. Neurodegener.* 10, 15.

Chinta, S.J., Mallajosyula, J.K., Rane, A., and Andersen, J.K. (2010). Mitochondrial  $\alpha$ -synuclein accumulation impairs complex I function in dopaminergic neurons and results in increased mitophagy in vivo. *Neurosci. Lett.* 486, 235–239.

Choi, I., Zhang, Y., Seegobin, S.P., Pruvost, M., Wang, Q., Purtell, K., Zhang, B., and Yue, Z. (2020). Microglia clear neuron-released  $\alpha$ -synuclein via selective autophagy and prevent neurodegeneration. *Nat. Commun.* 11, 1386.

Choubey, V., Safiulina, D., Vaarmann, A., Cagalinec, M., Wareski, P., Kuem, M., Zharkovsky, A., and Kaasik, A. (2011). Mutant A53T alpha-synuclein induces neuronal death by increasing mitochondrial autophagy. *J. Biol. Chem.* 286, 10814–10824.

Chu, Y., Dodiya, H., Aebischer, P., Olanow, C.W., and Kordower, J.H. (2009). Alterations in lysosomal and proteasomal markers in Parkinson's disease: relationship to alpha-synuclein inclusions. *Neurobiol. Dis.* 35, 385–398.

Chutna, O., Gonçalves, S., Villar-Piqué, A., Guerreiro, P., Marijanovic, Z., Mendes, T., Ramalho, J., Emmanouilidou, E., Ventura, S., Klucken, J., et al. (2014). The small GTPase Rab11 co-localizes with  $\alpha$ -synuclein in intracellular inclusions and modulates its aggregation, secretion and toxicity. *Hum. Mol. Genet.* *23*, 6732–6745.

Colasanti, T., Vomero, M., Alessandri, C., Barbati, C., Maselli, A., Camperio, C., Conti, F., Tinari, A., Carlo-Stella, C., Tuosto, L., et al. (2014). Role of alpha-synuclein in autophagy modulation of primary human T lymphocytes. *Cell Death Dis.* *5*, e1265.

Cole, N.B., Dieuliis, D., Leo, P., Mitchell, D.C., and Nussbaum, R.L. (2008). Mitochondrial translocation of alpha-synuclein is promoted by intracellular acidification. *Exp. Cell Res.* *314*, 2076–2089.

Collier, T.J., Redmond, D.E., Steece-Collier, K., Lipton, J.W., and Manfredsson, F.P. (2016). Is Alpha-Synuclein Loss-of-Function a Contributor to Parkinsonian Pathology? Evidence from Non-human Primates. *Front. Neurosci.* *10*, 12.

Connor-Robson, N., Peters, O.M., Millership, S., Ninkina, N., and Buchman, V.L. (2016). Combinational losses of synucleins reveal their differential requirements for compensating age-dependent alterations in motor behavior and dopamine metabolism. *Neurobiol. Aging* *46*, 107–112.

Conway, K.A., Harper, J.D., and Lansbury, P.T. (1998). Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease. *Nat. Med.* *4*, 1318–1320.

Cooper, A.A., Gitler, A.D., Cashikar, A., Haynes, C.M., Hill, K.J., Bhullar, B., Liu, K., Xu, K., Strathearn, K.E., Liu, F., et al. (2006). Alpha-synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models. *Science* *313*, 324–328.

Crews, L., Spencer, B., Desplats, P., Patrick, C., Paulino, A., Rockenstein, E., Hansen, L., Adame, A., Galasko, D., and Masliah, E. (2010). Selective molecular alterations in the autophagy pathway in patients with Lewy body disease and in models of alpha-synucleinopathy. *PLoS One* *5*, e9313.

Cuervo, A.M., Stefanis, L., Fredenburg, R., Lansbury, P.T., and Sulzer, D. (2004). Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science* *305*, 1292–1295.

Dahlstroem, A., and Fuxe, K. (1964). Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. i. demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol Scand Suppl* SUPPL 232:1–55.

Dalfó, E., Gómez-Isla, T., Rosa, J.L., Nieto Bodelón, M., Cuadrado Tejedor, M., Barrachina, M., Ambrosio, S., and Ferrer, I. (2004). Abnormal alpha-synuclein interactions with Rab proteins in alpha-synuclein A30P transgenic mice. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *63*, 302–313.

- Das, J., Chen, C.H., Yang, L., Cohn, L., Ray, P., and Ray, A. (2001). A critical role for NF- $\kappa$ B in GATA3 expression and TH2 differentiation in allergic airway inflammation. *Nat. Immunol.* *2*, 45–50.
- Dauer, W., Kholodilov, N., Vila, M., Trillat, A.-C., Goodchild, R., Larsen, K.E., Staal, R., Tieu, K., Schmitz, Y., Yuan, C.A., et al. (2002). Resistance of alpha -synuclein null mice to the parkinsonian neurotoxin MPTP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *99*, 14524–14529.
- Davidson, W.S., Jonas, A., Clayton, D.F., and George, J.M. (1998). Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *J. Biol. Chem.* *273*, 9443–9449.
- Decressac, M., Mattsson, B., Weikop, P., Lundblad, M., Jakobsson, J., and Björklund, A. (2013). TFEB-mediated autophagy rescues midbrain dopamine neurons from  $\alpha$ -synuclein toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *110*, E1817–26.
- Dehay, B., Bové, J., Rodríguez-Muela, N., Perier, C., Recasens, A., Boya, P., and Vila, M. (2010). Pathogenic lysosomal depletion in Parkinson's disease. *J. Neurosci.* *30*, 12535–12544.
- Demers-Lamarche, J., Guillebaud, G., Tlili, M., Todkar, K., Bélanger, N., Grondin, M., Nguyen, A.P., Michel, J., and Germain, M. (2016). Loss of mitochondrial function impairs lysosomes. *J. Biol. Chem.* *291*, 10263–10276.
- Devi, L., Raghavendran, V., Prabhu, B.M., Avadhani, N.G., and Anandatheerthavarada, H.K. (2008). Mitochondrial import and accumulation of alpha-synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *J. Biol. Chem.* *283*, 9089–9100.
- Diao, J., Burré, J., Vivona, S., Cipriano, D.J., Sharma, M., Kyoung, M., Südhof, T.C., and Brunger, A.T. (2013). Native  $\alpha$ -synuclein induces clustering of synaptic-vesicle mimics via binding to phospholipids and synaptobrevin-2/VAMP2. *Elife* *2*, e00592.
- Dilsizoglu Senol, A., Samarani, M., Syan, S., Guardia, C.M., Nonaka, T., Liv, N., Latour-Lambert, P., Hasegawa, M., Klumperman, J., Bonifacino, J.S., et al. (2021).  $\alpha$ -Synuclein fibrils subvert lysosome structure and function for the propagation of protein misfolding between cells through tunneling nanotubes. *PLoS Biol.* *19*, e3001287.
- Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., and Gingeras, T.R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* *29*, 15–21.
- Dorsey, E.R., and Bloem, B.R. (2018). The Parkinson Pandemic-A Call to Action. *JAMA Neurol.* *75*, 9–10.
- Dunham, N.W., and Miya, T.S. (1957). A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *Journal of the American Pharmaceutical Association (Scientific ed.)* *46*, 208–209.

- El-Agnaf, O.M., Jakes, R., Curran, M.D., Middleton, D., Ingenito, R., Bianchi, E., Pessi, A., Neill, D., and Wallace, A. (1998). Aggregates from mutant and wild-type alpha-synuclein proteins and NAC peptide induce apoptotic cell death in human neuroblastoma cells by formation of beta-sheet and amyloid-like filaments. *FEBS Lett.* *440*, 71–75.
- Eliezer, D., Kutluay, E., Bussell, R., and Browne, G. (2001). Conformational properties of alpha-synuclein in its free and lipid-associated states. *J. Mol. Biol.* *307*, 1061–1073.
- Ellis, C.E., Murphy, E.J., Mitchell, D.C., Golovko, M.Y., Scaglia, F., Barceló-Coblijn, G.C., and Nussbaum, R.L. (2005). Mitochondrial lipid abnormality and electron transport chain impairment in mice lacking alpha-synuclein. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 10190–10201.
- Erskine, D., Koss, D., Korolchuk, V.I., Outeiro, T.F., Attems, J., and McKeith, I. (2021). Lipids, lysosomes and mitochondria: insights into Lewy body formation from rare monogenic disorders. *Acta Neuropathol.*
- Espay, A.J. (2022). Movement disorders research in 2021: cracking the paradigm. *Lancet Neurol.* *21*, 10–11.
- Espay, A.J., Vizcarra, J.A., Marsili, L., Lang, A.E., Simon, D.K., Merola, A., Josephs, K.A., Fasano, A., Morgante, F., Savica, R., et al. (2019). Revisiting protein aggregation as pathogenic in sporadic Parkinson and Alzheimer diseases. *Neurology* *92*, 329–337.
- Fares, M.B., Jagannath, S., and Lashuel, H.A. (2021). Reverse engineering Lewy bodies: how far have we come and how far can we go? *Nat. Rev. Neurosci.* *22*, 111–131.
- Farfel-Becker, T., Roney, J.C., Cheng, X.-T., Li, S., Cuddy, S.R., and Sheng, Z.-H. (2019). Neuronal Soma-Derived Degradative Lysosomes Are Continuously Delivered to Distal Axons to Maintain Local Degradation Capacity. *Cell Rep.* *28*, 51–64.e4.
- Farina, C., Aloisi, F., and Meinel, E. (2007). Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol.* *28*, 138–145.
- Fernández-Chacón, R., Wölfel, M., Nishimune, H., Tabares, L., Schmitz, F., Castellano-Muñoz, M., Rosenmund, C., Montesinos, M.L., Sanes, J.R., Schneggenburger, R., et al. (2004). The synaptic vesicle protein csp $\alpha$  prevents presynaptic degeneration. *Neuron* *42*, 237–251.
- Fernandez-Lizarbe, S., Civera-Tregón, A., Cantarero, L., Herrero, I., Juarez, P., Hoenicka, J., and Palau, F. (2019). Neuroinflammation in the pathogenesis of axonal Charcot-Marie-Tooth disease caused by lack of GDAP1. *Exp. Neurol.* *320*, 113004.
- Fernandez-Mosquera, L., Yambire, K.F., Couto, R., Pereyra, L., Pabis, K., Ponsford, A.H., Diogo, C.V., Stagi, M., Milosevic, I., and Raimundo, N. (2019). Mitochondrial respiratory chain deficiency inhibits lysosomal hydrolysis. *Autophagy* *15*, 1572–1591.
- Friedman, J.R., Lackner, L.L., West, M., DiBenedetto, J.R., Nunnari, J., and Voeltz, G.K. (2011). ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science* *334*, 358–362.

Fuchs, J., Nilsson, C., Kachergus, J., Munz, M., Larsson, E.M., Schüle, B., Langston, J.W., Middleton, F.A., Ross, O.A., Hulihan, M., et al. (2007). Phenotypic variation in a large Swedish pedigree due to SNCA duplication and triplication. *Neurology* 68, 916–922.

Fussi, N., Höllerhage, M., Chakroun, T., Nykänen, N.-P., Rösler, T.W., Koeglsperger, T., Wurst, W., Behrends, C., and Höglinger, G.U. (2018). Exosomal secretion of  $\alpha$ -synuclein as protective mechanism after upstream blockage of macroautophagy. *Cell Death Dis.* 9, 757.

Garcia-Reitboeck, P., Anichtchik, O., Dalley, J.W., Ninkina, N., Tofaris, G.K., Buchman, V.L., and Spillantini, M.G. (2013). Endogenous alpha-synuclein influences the number of dopaminergic neurons in mouse substantia nigra. *Exp. Neurol.* 248, 541–545.

GBD 2016 Parkinson's Disease Collaborators (2018). Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* 17, 939–953.

George, J.M., Jin, H., Woods, W.S., and Clayton, D.F. (1995). Characterization of a novel protein regulated during the critical period for song learning in the zebra finch. *Neuron* 15, 361–372.

Georgieva, E.R., Ramlall, T.F., Borbat, P.P., Freed, J.H., and Eliezer, D. (2008). Membrane-bound alpha-synuclein forms an extended helix: long-distance pulsed ESR measurements using vesicles, bicelles, and rodlike micelles. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 12856–12857.

Ghio, S., Camilleri, A., Caruana, M., Ruf, V.C., Schmidt, F., Leonov, A., Ryazanov, S., Griesinger, C., Cauchi, R.J., Kamp, F., et al. (2019). Cardiolipin Promotes Pore-Forming Activity of Alpha-Synuclein Oligomers in Mitochondrial Membranes. *ACS Chem. Neurosci.* 10, 3815–3829.

Giacomello, M., Pyakurel, A., Glytsou, C., and Scorrano, L. (2020). The cell biology of mitochondrial membrane dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21, 204–224.

Giasson, B.I., Uryu, K., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (1999). Mutant and wild type human alpha-synucleins assemble into elongated filaments with distinct morphologies in vitro. *J. Biol. Chem.* 274, 7619–7622.

Giasson, B.I., Murray, I.V., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (2001). A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is essential for filament assembly. *J. Biol. Chem.* 276, 2380–2386.

Giorgi, C., Marchi, S., and Pinton, P. (2018). The machineries, regulation and cellular functions of mitochondrial calcium. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 713–730.

Gitler, A.D., Bevis, B.J., Shorter, J., Strathearn, K.E., Hamamichi, S., Su, L.J., Caldwell, K.A., Caldwell, G.A., Rochet, J.-C., McCaffery, J.M., et al. (2008). The Parkinson's disease

protein alpha-synuclein disrupts cellular Rab homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 145–150.

Goedert, M., and Compston, A. (2018). Parkinson's disease - the story of an eponym. *Nat. Rev. Neurol.* 14, 57–62.

Goker-Alpan, O., Schiffmann, R., LaMarca, M.E., Nussbaum, R.L., McInerney-Leo, A., and Sidransky, E. (2004). Parkinsonism among Gaucher disease carriers. *J. Med. Genet.* 41, 937–940.

Gomez-Isla, T., Irizarry, M.C., Mariash, A., Cheung, B., Soto, O., Schrupp, S., Sondel, J., Kotilinek, L., Day, J., Schwarzschild, M.A., et al. (2003). Motor dysfunction and gliosis with preserved dopaminergic markers in human alpha-synuclein A30P transgenic mice. *Neurobiol. Aging* 24, 245–258.

Gonzalez-Rodriguez, P., Zampese, E., and Surmeier, D.J. (2020). Selective neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Prog. Brain Res.* 252, 61–89.

González-Rodríguez, P., Zampese, E., Stout, K.A., Guzman, J.N., Ilijic, E., Yang, B., Tkatch, T., Stavarache, M.A., Wokosin, D.L., Gao, L., et al. (2021). Disruption of mitochondrial complex I induces progressive parkinsonism. *Nature* 599, 650–656.

Guardia-Laguarta, C., Area-Gomez, E., Rüb, C., Liu, Y., Magrané, J., Becker, D., Voos, W., Schon, E.A., and Przedborski, S. (2014).  $\alpha$ -Synuclein is localized to mitochondria-associated ER membranes. *J. Neurosci.* 34, 249–259.

Gurnev, P.A., Rostovtseva, T.K., Hoogerheide, D.P., Protchenko, O., Yap, T.L., Lee, J.C., and Bezrukov, S.M. (2015). Alpha-Synuclein Blocks VDAC Suggesting Mechanism of Mitochondrial Regulation and Toxicity in Parkinson Disease. *Biophys. J.* 108, 607a.

Guzman, J.N., Sánchez-Padilla, J., Chan, C.S., and Surmeier, D.J. (2009). Robust pacemaking in substantia nigra dopaminergic neurons. *J. Neurosci.* 29, 11011–11019.

Guzman, J.N., Sanchez-Padilla, J., Wokosin, D., Kondapalli, J., Ilijic, E., Schumacker, P.T., and Surmeier, D.J. (2010). Oxidant stress evoked by pacemaking in dopaminergic neurons is attenuated by DJ-1. *Nature* 468, 696–700.

Hailey, D.W., Rambold, A.S., Satpute-Krishnan, P., Mitra, K., Sougrat, R., Kim, P.K., and Lippincott-Schwartz, J. (2010). Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell* 141, 656–667.

Hamasaki, M., Furuta, N., Matsuda, A., Nezu, A., Yamamoto, A., Fujita, N., Oomori, H., Noda, T., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., et al. (2013). Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature* 495, 389–393.

Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H., et al. (2006). Suppression of basal

autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 441, 885–889.

Hasegawa, T., Sugeno, N., Kikuchi, A., Baba, T., and Aoki, M. (2017). Membrane trafficking illuminates a path to parkinson's disease. *Tohoku J Exp Med* 242, 63–76.

He, Y., Gao, Y., Zhang, Q., Zhou, G., Cao, F., and Yao, S. (2020). IL-4 Switches Microglia/macrophage M1/M2 Polarization and Alleviates Neurological Damage by Modulating the JAK1/STAT6 Pathway Following ICH. *Neuroscience* 437, 161–171.

Hickman, S., Izzy, S., Sen, P., Morsett, L., and El Khoury, J. (2018). Microglia in neurodegeneration. *Nat. Neurosci.* 21, 1359–1369.

Hill, S.E., and Colón-Ramos, D.A. (2020). The journey of the synaptic autophagosome: A cell biological perspective. *Neuron* 105, 961–973.

Hoenen, C., Gustin, A., Birck, C., Kirchmeyer, M., Beaume, N., Felten, P., Grandbarbe, L., Heuschling, P., and Heurtaux, T. (2016). Alpha-Synuclein Proteins Promote Pro-Inflammatory Cascades in Microglia: Stronger Effects of the A53T Mutant. *PLoS One* 11, e0162717.

Horsager, J., Andersen, K.B., Knudsen, K., Skjærbæk, C., Fedorova, T.D., Okkels, N., Schaeffer, E., Bonkat, S.K., Geday, J., Otto, M., et al. (2020). Brain-first versus body-first Parkinson's disease: a multimodal imaging case-control study. *Brain*.

Huang, D.W., Sherman, B.T., and Lempicki, R.A. (2009a). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* 4, 44–57.

Huang, D.W., Sherman, B.T., and Lempicki, R.A. (2009b). Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.* 37, 1–13.

Huang, X., Jiang, C., Yu, L., and Yang, A. (2020). Current and Emerging Approaches for Studying Inter-Organellar Membrane Contact Sites. *Front. Cell Dev. Biol.* 8, 195.

Hunn, B.H.M., Cragg, S.J., Bolam, J.P., Spillantini, M.-G., and Wade-Martins, R. (2015). Impaired intracellular trafficking defines early Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 38, 178–188.

Huotari, J., and Helenius, A. (2011). Endosome maturation. *EMBO J.* 30, 3481–3500.

Ibáñez, P., Bonnet, A.M., Débarges, B., Lohmann, E., Tison, F., Pollak, P., Agid, Y., Dürr, A., and Brice, A. (2004). Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. *Lancet* 364, 1169–1171.

Irwin, D.J., Fedler, J., Coffey, C.S., Caspell-Garcia, C., Kang, J.H., Simuni, T., Foroud, T., Toga, A.W., Tanner, C.M., Kiebertz, K., et al. (2020). Evolution of alzheimer's disease cerebrospinal fluid biomarkers in early parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 88, 574–587.

Issa, A.-R., Sun, J., Petitgas, C., Mesquita, A., Dulac, A., Robin, M., Mollereau, B., Jenny, A., Chérif-Zahar, B., and Birman, S. (2018). The lysosomal membrane protein LAMP2A promotes autophagic flux and prevents SNCA-induced Parkinson disease-like symptoms in the *Drosophila* brain. *Autophagy* 14, 1898–1910.

Itakura, E., Kishi-Itakura, C., and Mizushima, N. (2012). The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell* 151, 1256–1269.

Iwai, A., Masliah, E., Yoshimoto, M., Ge, N., Flanagan, L., de Silva, H.A., Kittel, A., and Saitoh, T. (1995). The precursor protein of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system. *Neuron* 14, 467–475.

Jacobs, D., Hoogerheide, D.P., Rovini, A., Jiang, Z., Lee, J.C., Rostovtseva, T.K., and Bezrukov, S.M. (2019). Probing Membrane Association of  $\alpha$ -Synuclein Domains with VDAC Nanopore Reveals Unexpected Binding Pattern. *Sci. Rep.* 9, 4580.

Janezic, S., Threlfell, S., Dodson, P.D., Dowie, M.J., Taylor, T.N., Potgieter, D., Parkkinen, L., Senior, S.L., Anwar, S., Ryan, B., et al. (2013). Deficits in dopaminergic transmission precede neuron loss and dysfunction in a new Parkinson model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, E4016–25.

Jiang, P., Nishimura, T., Sakamaki, Y., Itakura, E., Hatta, T., Natsume, T., and Mizushima, N. (2014). The HOPS complex mediates autophagosome-lysosome fusion through interaction with syntaxin 17. *Mol. Biol. Cell* 25, 1327–1337.

Joo, J.H., Wang, B., Frankel, E., Ge, L., Xu, L., Iyengar, R., Li-Harms, X., Wright, C., Shaw, T.I., Lindsten, T., et al. (2016). The Noncanonical Role of ULK/ATG1 in ER-to-Golgi Trafficking Is Essential for Cellular Homeostasis. *Mol. Cell* 62, 491–506.

Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 19, 5720–5728.

Kalia, L.V., and Lang, A.E. (2015). Parkinson's disease. *Lancet* 386, 896–912.

Kam, T.-I., Hinkle, J.T., Dawson, T.M., and Dawson, V.L. (2020). Microglia and astrocyte dysfunction in parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 144, 105028.

Kamp, F., Exner, N., Lutz, A.K., Wender, N., Hegemann, J., Brunner, B., Nuscher, B., Bartels, T., Giese, A., Beyer, K., et al. (2010). Inhibition of mitochondrial fusion by  $\alpha$ -synuclein is rescued by PINK1, Parkin and DJ-1. *EMBO J.* 29, 3571–3589.

Kanaan, N.M., and Manfredsson, F.P. (2012). Loss of functional alpha-synuclein: a toxic event in Parkinson's disease? *J. Parkinsons. Dis.* 2, 249–267.

- Kang, J.-H., Irwin, D.J., Chen-Plotkin, A.S., Siderowf, A., Caspell, C., Coffey, C.S., Waligórska, T., Taylor, P., Pan, S., Frasier, M., et al. (2013). Association of cerebrospinal fluid  $\beta$ -amyloid 1-42, T-tau, P-tau181, and  $\alpha$ -synuclein levels with clinical features of drug-naive patients with early Parkinson disease. *JAMA Neurol.* *70*, 1277–1287.
- Kaushik, S., and Cuervo, A.M. (2018). The coming of age of chaperone-mediated autophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *19*, 365–381.
- Kim, C., Ho, D.-H., Suk, J.-E., You, S., Michael, S., Kang, J., Joong Lee, S., Masliah, E., Hwang, D., Lee, H.-J., et al. (2013). Neuron-released oligomeric  $\alpha$ -synuclein is an endogenous agonist of TLR2 for paracrine activation of microglia. *Nat. Commun.* *4*, 1562.
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., and Guan, K.-L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. Cell Biol.* *13*, 132–141.
- Kim, S., Wong, Y.C., Gao, F., and Krainc, D. (2021). Dysregulation of mitochondria-lysosome contacts by GBA1 dysfunction in dopaminergic neuronal models of Parkinson's disease. *Nat. Commun.* *12*, 1807.
- Klegeris, A., Pelech, S., Giasson, B.I., Maguire, J., Zhang, H., McGeer, E.G., and McGeer, P.L. (2008). Alpha-synuclein activates stress signaling protein kinases in THP-1 cells and microglia. *Neurobiol. Aging* *29*, 739–752.
- Klionsky, D.J., Abdel-Aziz, A.K., Abdelfatah, S., Abdellatif, M., Abdoli, A., Abel, S., Abeliovich, H., Abildgaard, M.H., Abudu, Y.P., Acevedo-Arozena, A., et al. (2021). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)1. *Autophagy* *17*, 1–382.
- Klucken, J., Poehler, A.-M., Ebrahimi-Fakhari, D., Schneider, J., Nuber, S., Rockenstein, E., Schlötzer-Schrehardt, U., Hyman, B.T., McLean, P.J., Masliah, E., et al. (2012). Alpha-synuclein aggregation involves a bafilomycin A 1-sensitive autophagy pathway. *Autophagy* *8*, 754–766.
- Knott, A.B., Perkins, G., Schwarzenbacher, R., and Bossy-Wetzell, E. (2008). Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* *9*, 505–518.
- Koch, J.C., Bitow, F., Haack, J., d Hedouville, Z., Zhang, J.N., Tönges, L., Michel, U., Oliveira, L.M.A., Jovin, T.M., Liman, J., et al. (2015). Alpha-Synuclein affects neurite morphology, autophagy, vesicle transport and axonal degeneration in CNS neurons. *Cell Death Dis.* *6*, e1811.
- Komatsu, M., Wang, Q.J., Holstein, G.R., Friedrich, V.L., Iwata, J., Kominami, E., Chait, B.T., Tanaka, K., and Yue, Z. (2007). Essential role for autophagy protein Atg7 in the maintenance of axonal homeostasis and the prevention of axonal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *104*, 14489–14494.

- Kordower, J.H., Chu, Y., Hauser, R.A., Freeman, T.B., and Olanow, C.W. (2008). Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nat. Med.* *14*, 504–506.
- Krüger, R., Kuhn, W., Müller, T., Voitalla, D., Graeber, M., Kösel, S., Przuntek, H., Epplen, J.T., Schöls, L., and Riess, O. (1998). Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat. Genet.* *18*, 106–108.
- Kühlbrandt, W. (2015). Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC Biol.* *13*, 89.
- Kurowska, Z., Kordower, J.H., Stoessl, A.J., Burke, R.E., Brundin, P., Yue, Z., Brady, S.T., Milbrandt, J., Trapp, B.D., Sherer, T.B., et al. (2016). Is axonal degeneration a key early event in parkinson's disease? *J. Parkinsons. Dis.* *6*, 703–707.
- Kwon, H.S., and Koh, S.-H. (2020). Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. *Transl Neurodegener* *9*, 1–12.
- Van Laar, V.S., and Berman, S.B. (2013). The interplay of neuronal mitochondrial dynamics and bioenergetics: implications for Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* *57*, 43–55.
- Lafora, G.R. (1913). Nuevas investigaciones sobre los cuerpos amiláceos del interior de las células nerviosas. *Trab. Lab. Invest. Biol. Univers. Madrid.* 11:29-42.
- Lanciego, J.L., Luquin, N., and Obeso, J.A. (2012). Functional neuroanatomy of the basal ganglia. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* *2*, a009621.
- Langston, J.W., Ballard, P., Tetrud, J.W., and Irwin, I. (1983). Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* *219*, 979–980.
- Lautenschläger, J., Stephens, A.D., Fusco, G., Ströhl, F., Curry, N., Zacharopoulou, M., Michel, C.H., Laine, R., Nespovitaya, N., Fantham, M., et al. (2018a). C-terminal calcium binding of  $\alpha$ -synuclein modulates synaptic vesicle interaction. *Nat. Commun.* *9*, 712.
- Lautenschläger, J., Mosharov, E.V., Kanter, E., Sulzer, D., and Kaminski Schierle, G.S. (2018b). An Easy-to-Implement Protocol for Preparing Postnatal Ventral Mesencephalic Cultures. *Front. Cell Neurosci.* *12*, 44.
- Lavedan, C. (1998). The synuclein family. *Genome Res.* *8*, 871–880.
- Lee, H.-J., Choi, C., and Lee, S.-J. (2002). Membrane-bound alpha-synuclein has a high aggregation propensity and the ability to seed the aggregation of the cytosolic form. *J. Biol. Chem.* *277*, 671–678.
- Lee, H.-J., Khoshaghideh, F., Patel, S., and Lee, S.-J. (2004). Clearance of alpha-synuclein oligomeric intermediates via the lysosomal degradation pathway. *J. Neurosci.* *24*, 1888–1896.

- Lee, H.-J., Suk, J.-E., Patrick, C., Bae, E.-J., Cho, J.-H., Rho, S., Hwang, D., Masliah, E., and Lee, S.-J. (2010). Direct transfer of alpha-synuclein from neuron to astroglia causes inflammatory responses in synucleinopathies. *J. Biol. Chem.* *285*, 9262–9272.
- Lei, Z., Cao, G., and Wei, G. (2019). A30P mutant  $\alpha$ -synuclein impairs autophagic flux by inactivating JNK signaling to enhance ZKSCAN3 activity in midbrain dopaminergic neurons. *Cell Death Dis.* *10*, 133.
- Lewy, F. (1913). Zur pathologischen Anatomie der Paralysis agitans. *Dtsch. Z. Nervenheilk* *50*, 50-55.
- Li, J.-Y., Englund, E., Holton, J.L., Soulet, D., Hagell, P., Lees, A.J., Lashley, T., Quinn, N.P., Rehncrona, S., Björklund, A., et al. (2008). Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat. Med.* *14*, 501–503.
- Li, L., Nadanaciva, S., Berger, Z., Shen, W., Paumier, K., Schwartz, J., Mou, K., Loos, P., Milici, A.J., Dunlop, J., et al. (2013). Human A53T  $\alpha$ -synuclein causes reversible deficits in mitochondrial function and dynamics in primary mouse cortical neurons. *PLoS One* *8*, e85815.
- Liang, C.-C., Wang, C., Peng, X., Gan, B., and Guan, J.-L. (2010). Neural-specific deletion of FIP200 leads to cerebellar degeneration caused by increased neuronal death and axon degeneration. *J. Biol. Chem.* *285*, 3499–3509.
- Liddel, S.A., Guttenplan, K.A., Clarke, L.E., Bennett, F.C., Bohlen, C.J., Schirmer, L., Bennett, M.L., Münch, A.E., Chung, W.-S., Peterson, T.C., et al. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* *541*, 481–487.
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., and Sun, S.-C. (2017). NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Signal Transduct. Target. Ther.* *2*.
- Loeb, V., Yakunin, E., Saada, A., and Sharon, R. (2010). The transgenic overexpression of alpha-synuclein and not its related pathology associates with complex I inhibition. *J. Biol. Chem.* *285*, 7334–7343.
- Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* *15*, 550.
- Ludtmann, M.H.R., Angelova, P.R., Ninkina, N.N., Gandhi, S., Buchman, V.L., and Abramov, A.Y. (2016). Monomeric Alpha-Synuclein Exerts a Physiological Role on Brain ATP Synthase. *J. Neurosci.* *36*, 10510–10521.
- Ludtmann, M.H.R., Angelova, P.R., Horrocks, M.H., Choi, M.L., Rodrigues, M., Baev, A.Y., Berezhnov, A.V., Yao, Z., Little, D., Banushi, B., et al. (2018).  $\alpha$ -synuclein oligomers interact with ATP synthase and open the permeability transition pore in Parkinson's disease. *Nat. Commun.* *9*, 2293.

- Lwin, A., Orvisky, E., Goker-Alpan, O., LaMarca, M.E., and Sidransky, E. (2004). Glucocerebrosidase mutations in subjects with parkinsonism. *Mol. Genet. Metab.* *81*, 70–73.
- Di Maio, R., Barrett, P.J., Hoffman, E.K., Barrett, C.W., Zharikov, A., Borah, A., Hu, X., McCoy, J., Chu, C.T., Burton, E.A., et al. (2016).  $\alpha$ -Synuclein binds to TOM20 and inhibits mitochondrial protein import in Parkinson's disease. *Sci. Transl. Med.* *8*, 342ra78.
- Mak, S.K., McCormack, A.L., Manning-Bog, A.B., Cuervo, A.M., and Di Monte, D.A. (2010). Lysosomal degradation of alpha-synuclein in vivo. *J. Biol. Chem.* *285*, 13621–13629.
- Maroteaux, L., Campanelli, J.T., and Scheller, R.H. (1988). Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J. Neurosci.* *8*, 2804–2815.
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet j.* *17*, 10.
- Martinez-Vicente, M., Talloczy, Z., Kaushik, S., Massey, A.C., Mazzulli, J., Mosharov, E.V., Hodara, R., Fredenburg, R., Wu, D.-C., Follenzi, A., et al. (2008). Dopamine-modified alpha-synuclein blocks chaperone-mediated autophagy. *J. Clin. Invest.* *118*, 777–788.
- Matsuda, N., Sato, S., Shiba, K., Okatsu, K., Saisho, K., Gautier, C.A., Sou, Y.-S., Saiki, S., Kawajiri, S., Sato, F., et al. (2010). PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *J. Cell Biol.* *189*, 211–221.
- Mauvezin, C., and Neufeld, T.P. (2015). Bafilomycin A1 disrupts autophagic flux by inhibiting both V-ATPase-dependent acidification and Ca-P60A/SERCA-dependent autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy* *11*, 1437–1438.
- McBride, H.M., Neuspiel, M., and Wasiak, S. (2006). Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr. Biol.* *16*, R551–60.
- McFadyen, M.P., Kusek, G., Bolivar, V.J., and Flaherty, L. (2003). Differences among eight inbred strains of mice in motor ability and motor learning on a rotorod. *Genes Brain Behav.* *2*, 214–219.
- McGeer, P.L., Itagaki, S., Boyes, B.E., and McGeer, E.G. (1988). Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* *38*, 1285–1291.
- McGregor, M.M., and Nelson, A.B. (2019). Circuit mechanisms of parkinson's disease. *Neuron* *101*, 1042–1056.
- Melo, T.Q., van Zomeren, K.C., Ferrari, M.F.R., Boddeke, H.W.G.M., and Copray, J.C.V.M. (2017). Impairment of mitochondria dynamics by human A53T  $\alpha$ -synuclein and rescue

by NAP (davunetide) in a cell model for Parkinson's disease. *Exp. Brain Res.* 235, 731–742.

Menzies, F.M., Fleming, A., Caricasole, A., Bento, C.F., Andrews, S.P., Ashkenazi, A., Füllgrabe, J., Jackson, A., Jimenez Sanchez, M., Karabiyik, C., et al. (2017). Autophagy and neurodegeneration: pathogenic mechanisms and therapeutic opportunities. *Neuron* 93, 1015–1034.

Minakaki, G., Menges, S., Kittel, A., Emmanouilidou, E., Schaeffner, I., Barkovits, K., Bergmann, A., Rockenstein, E., Adame, A., Marxreiter, F., et al. (2018). Autophagy inhibition promotes SNCA/alpha-synuclein release and transfer via extracellular vesicles with a hybrid autophagosome-exosome-like phenotype. *Autophagy* 14, 98–119.

Mizushima, N., and Murphy, L.O. (2020). Autophagy assays for biological discovery and therapeutic development. *Trends Biochem. Sci.* 45, 1080–1093.

Mogi, M., Harada, M., Kondo, T., Riederer, P., Inagaki, H., Minami, M., and Nagatsu, T. (1994). Interleukin-1 beta, interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha are elevated in the brain from parkinsonian patients. *Neurosci. Lett.* 180, 147–150.

Montagu, K.A. (1957). Catechol compounds in rat tissues and in brains of different animals. *Nature* 180, 244–245.

Muñoz-Manchado, A.B., Bengtsson Gonzales, C., Zeisel, A., Munguba, H., Bekkouche, B., Skene, N.G., Lönnerberg, P., Ryge, J., Harris, K.D., Linnarsson, S., et al. (2018). Diversity of Interneurons in the Dorsal Striatum Revealed by Single-Cell RNA Sequencing and PatchSeq. *Cell Rep.* 24, 2179–2190.e7.

Murphy, D.D., Rueter, S.M., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (2000). Synucleins are developmentally expressed, and alpha-synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 20, 3214–3220.

Murphy, K.E., Gysbers, A.M., Abbott, S.K., Spiro, A.S., Furuta, A., Cooper, A., Garner, B., Kabuta, T., and Halliday, G.M. (2015). Lysosomal-associated membrane protein 2 isoforms are differentially affected in early Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 30, 1639–1647.

Nakamura, K., Nemani, V.M., Azarbal, F., Skibinski, G., Levy, J.M., Egami, K., Munishkina, L., Zhang, J., Gardner, B., Wakabayashi, J., et al. (2011). Direct membrane association drives mitochondrial fission by the Parkinson disease-associated protein alpha-synuclein. *J. Biol. Chem.* 286, 20710–20726.

Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D.-F., and Youle, R.J. (2008). Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J. Cell Biol.* 183, 795–803.

- Nuber, S., Rajsombath, M., Minakaki, G., Winkler, J., Müller, C.P., Ericsson, M., Caldarone, B., Dettmer, U., and Selkoe, D.J. (2018). Abrogating Native  $\alpha$ -Synuclein Tetramers in Mice Causes a L-DOPA-Responsive Motor Syndrome Closely Resembling Parkinson's Disease. *Neuron* 100, 75–90.e5.
- O'Keeffe, G.W., and Sullivan, A.M. (2018). Evidence for dopaminergic axonal degeneration as an early pathological process in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 56, 9–15.
- Obeso, J.A., Rodriguez-Oroz, M.C., Stamelou, M., Bhatia, K.P., and Burn, D.J. (2014). The expanding universe of disorders of the basal ganglia. *Lancet* 384, 523–531.
- Oh, H., and Ghosh, S. (2013). NF- $\kappa$ B: roles and regulation in different CD4(+) T-cell subsets. *Immunol. Rev.* 252, 41–51.
- Ohnstad, A.E., Delgado, J.M., North, B.J., Nasa, I., Kettenbach, A.N., Schultz, S.W., and Shoemaker, C.J. (2020). Receptor-mediated clustering of FIP200 bypasses the role of LC3 lipidation in autophagy. *EMBO J.* 39, e104948.
- Olanow, C.W., and Prusiner, S.B. (2009). Is Parkinson's disease a prion disorder? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 12571–12572.
- Oppenheim, J.J. (2020). Alpha-synuclein ( $\alpha$ S) functions as an alarmin to promote inflammatory and immune responses by activating dendritic cells and macrophages. *The Journal of Immunology* 204, 160.7–160.7.
- Paillasson, S., Gomez-Suaga, P., Stoica, R., Little, D., Gissen, P., Devine, M.J., Noble, W., Hanger, D.P., and Miller, C.C.J. (2017).  $\alpha$ -Synuclein binds to the ER-mitochondria tethering protein VAPB to disrupt Ca<sup>2+</sup> homeostasis and mitochondrial ATP production. *Acta Neuropathol.* 134, 129–149.
- Pankiv, S., Clausen, T.H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J.-A., Outzen, H., Øvervatn, A., Bjørkøy, G., and Johansen, T. (2007). p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J. Biol. Chem.* 282, 24131–24145.
- Parihar, M.S., Parihar, A., Fujita, M., Hashimoto, M., and Ghafourifar, P. (2008). Mitochondrial association of alpha-synuclein causes oxidative stress. *Cell Mol. Life Sci.* 65, 1272–1284.
- Parkinson, J. (1817). *An Essay on the Shaking Palsy*. Whittingham and Rowland.
- Pathak, D., Berthet, A., Bendor, J.T., Yu, K., Sellnow, R.C., Orr, A.L., Nguyen, M.K., Edwards, R.H., Manfredsson, F.P., and Nakamura, K. (2017). Loss of  $\alpha$ -Synuclein Does Not Affect Mitochondrial Bioenergetics in Rodent Neurons. *eNeuro* 4.
- Pelkonen, A., and Yavich, L. (2011). Neuromuscular pathology in mice lacking alpha-synuclein. *Neurosci. Lett.* 487, 350–353.

- Peng, W., Wong, Y.C., and Krainc, D. (2020). Mitochondria-lysosome contacts regulate mitochondrial Ca<sup>2+</sup> dynamics via lysosomal TRPML1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *117*, 19266–19275.
- Perlmutter, J.D., Braun, A.R., and Sachs, J.N. (2009). Curvature dynamics of alpha-synuclein familial Parkinson disease mutants: molecular simulations of the micelle- and bilayer-bound forms. *J. Biol. Chem.* *284*, 7177–7189.
- Perrone, M., Carocchia, N., Genovese, I., Missiroli, S., Modesti, L., Pedriali, G., Vezzani, B., Vitto, V.A.M., Antenori, M., Lebedzinska-Arciszewska, M., et al. (2020). The role of mitochondria-associated membranes in cellular homeostasis and diseases. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* *350*, 119–196.
- Petersen, K., Olesen, O.F., and Mikkelsen, J.D. (1999). Developmental expression of  $\alpha$ -synuclein in rat hippocampus and cerebral cortex. *Neuroscience* *91*, 651–659.
- Poehler, A.-M., Xiang, W., Spitzer, P., May, V.E.L., Meixner, H., Rockenstein, E., Chutna, O., Outeiro, T.F., Winkler, J., Masliah, E., et al. (2014). Autophagy modulates SNCA/ $\alpha$ -synuclein release, thereby generating a hostile microenvironment. *Autophagy* *10*, 2171–2192.
- Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C.M., Halliday, G.M., Brundin, P., Volkman, J., Schrag, A.-E., and Lang, A.E. (2017). Parkinson disease. *Nat. Rev. Dis. Primers* *3*, 17013.
- Polymeropoulos, M.H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S.E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., et al. (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* *276*, 2045–2047.
- Pozo Devoto, V.M., Dimopoulos, N., Alloatti, M., Pardi, M.B., Saez, T.M., Otero, M.G., Cromberg, L.E., Marín-Burgin, A., Scassa, M.E., Stokin, G.B., et al. (2017).  $\alpha$ Synuclein control of mitochondrial homeostasis in human-derived neurons is disrupted by mutations associated with Parkinson's disease. *Sci. Rep.* *7*, 5042.
- Prinz, W.A., Toulmay, A., and Balla, T. (2020). The functional universe of membrane contact sites. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *21*, 7–24.
- Przedborski, S. (2017). The two-century journey of Parkinson disease research. *Nat. Rev. Neurosci.* *18*, 251–259.
- Ravikumar, B., Moreau, K., Jahreiss, L., Puri, C., and Rubinsztein, D.C. (2010). Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nat. Cell Biol.* *12*, 747–757.
- Redenšek, S., Trošt, M., and Dolžan, V. (2017). Genetic determinants of parkinson's disease: can they help to stratify the patients based on the underlying molecular defect? *Front. Aging Neurosci.* *9*, 20.

Reeve, A.K., Grady, J.P., Cosgrave, E.M., Bennison, E., Chen, C., Hepplewhite, P.D., and Morris, C.M. (2018). Mitochondrial dysfunction within the synapses of substantia nigra neurons in Parkinson's disease. *npj Parkinsons Disease* 4, 9.

Reich, M., Liefeld, T., Gould, J., Lerner, J., Tamayo, P., and Mesirov, J.P. (2006). GenePattern 2.0. *Nat. Genet.* 38, 500–501.

Del Rey, N.L.-G., Quiroga-Varela, A., Garbayo, E., Carballo-Carbajal, I., Fernández-Santiago, R., Monje, M.H.G., Trigo-Damas, I., Blanco-Prieto, M.J., and Blesa, J. (2018). Advances in parkinson's disease: 200 years later. *Front. Neuroanat.* 12, 113.

Rizzuto, R., Brini, M., Murgia, M., and Pozzan, T. (1993). Microdomains with high Ca<sup>2+</sup> close to IP<sub>3</sub>-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science* 262, 744–747.

Rospigliosi, C.C., McClendon, S., Schmid, A.W., Ramlall, T.F., Barré, P., Lashuel, H.A., and Eliezer, D. (2009). E46K Parkinson's-linked mutation enhances C-terminal-to-N-terminal contacts in alpha-synuclein. *J. Mol. Biol.* 388, 1022–1032.

Rostovtseva, T.K., Gurnev, P.A., Protchenko, O., Hoogerheide, D.P., Yap, T.L., Philpott, C.C., Lee, J.C., and Bezrukov, S.M. (2015).  $\alpha$ -Synuclein Shows High Affinity Interaction with Voltage-dependent Anion Channel, Suggesting Mechanisms of Mitochondrial Regulation and Toxicity in Parkinson Disease. *J. Biol. Chem.* 290, 18467–18477.

Ryan, B.J., Bengoa-Vergniory, N., Williamson, M., Kirkiz, E., Roberts, R., Corda, G., Sloan, M., Saqlain, S., Cherubini, M., Poppinga, J., et al. (2021). REST Protects Dopaminergic Neurons from Mitochondrial and  $\alpha$ -Synuclein Oligomer Pathology in an Alpha Synuclein Overexpressing BAC-Transgenic Mouse Model. *J. Neurosci.* 41, 3731–3746.

Ryan, T., Bamm, V.V., Stykel, M.G., Coackley, C.L., Humphries, K.M., Jamieson-Williams, R., Ambasadhan, R., Mosser, D.D., Lipton, S.A., Harauz, G., et al. (2018). Cardiolipin exposure on the outer mitochondrial membrane modulates  $\alpha$ -synuclein. *Nat. Commun.* 9, 817.

Sanchez-Guajardo, V., Febbraro, F., Kirik, D., and Romero-Ramos, M. (2010). Microglia acquire distinct activation profiles depending on the degree of alpha-synuclein neuropathology in a rAAV based model of Parkinson's disease. *PLoS One* 5, e8784.

Sanders, W.R. (1865). Case of an Unusual Form of Nervous Disease, Dystaxia or Pseudo-Paralysis Agitans, with Remarks. *Edinb. Med. J.* 10, 987–997.

Sarkar, S., Olsen, A.L., Sygnecka, K., Lohr, K.M., and Feany, M.B. (2021).  $\alpha$ -synuclein impairs autophagosome maturation through abnormal actin stabilization. *PLoS Genet.* 17, e1009359.

Scrivo, A., Bourdenx, M., Pampliega, O., and Cuervo, A.M. (2018). Selective autophagy as a potential therapeutic target for neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol.* 17, 802–815.

- Scudamore, O., and Ciossek, T. (2018). Increased Oxidative Stress Exacerbates  $\alpha$ -Synuclein Aggregation In Vivo. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 77, 443–453.
- Schapira, A.H., Cooper, J.M., Dexter, D., Clark, J.B., Jenner, P., and Marsden, C.D. (1990). Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 54, 823–827.
- Schonhoff, A.M., Williams, G.P., Wallen, Z.D., Standaert, D.G., and Harms, A.S. (2020). Innate and adaptive immune responses in Parkinson's disease. *Prog. Brain Res.* 252, 169–216.
- Seki, N., Miyazaki, M., Suzuki, W., Hayashi, K., Arima, K., Myburgh, E., Izuhara, K., Brombacher, F., and Kubo, M. (2004). IL-4-induced GATA-3 expression is a time-restricted instruction switch for Th2 cell differentiation. *J. Immunol.* 172, 6158–6166.
- Senior, S.L., Ninkina, N., Deacon, R., Bannerman, D., Buchman, V.L., Cragg, S.J., and Wade-Martins, R. (2008). Increased striatal dopamine release and hyperdopaminergic-like behaviour in mice lacking both alpha-synuclein and gamma-synuclein. *Eur. J. Neurosci.* 27, 947–957.
- Shahmoradian, S.H., Lewis, A.J., Genoud, C., Hench, J., Moors, T.E., Navarro, P.P., Castaño-Díez, D., Schweighauser, G., Graff-Meyer, A., Goldie, K.N., et al. (2019). Lewy pathology in Parkinson's disease consists of crowded organelles and lipid membranes. *Nat. Neurosci.* 22, 1099–1109.
- Singleton, A.B., Farrer, M., Johnson, J., Singleton, A., Hague, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Peuralinna, T., Dutra, A., Nussbaum, R., et al. (2003). alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 302, 841.
- Smolders, S., and Van Broeckhoven, C. (2020). Genetic perspective on the synergistic connection between vesicular transport, lysosomal and mitochondrial pathways associated with Parkinson's disease pathogenesis. *Acta Neuropathol. Commun.* 8, 63.
- Somayaji, M., Cataldi, S., Choi, S.J., Edwards, R.H., Mosharov, E.V., and Sulzer, D. (2020). A dual role for  $\alpha$ -synuclein in facilitation and depression of dopamine release from substantia nigra neurons in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*
- Song, J.-X., Lu, J.-H., Liu, L.-F., Chen, L.-L., Durairajan, S.S.K., Yue, Z., Zhang, H.-Q., and Li, M. (2014). HMGB1 is involved in autophagy inhibition caused by SNCA/ $\alpha$ -synuclein overexpression: a process modulated by the natural autophagy inducer corynoxine B. *Autophagy* 10, 144–154.
- Spencer, B., Potkar, R., Trejo, M., Rockenstein, E., Patrick, C., Gindi, R., Adame, A., Wyss-Coray, T., and Masliah, E. (2009). Beclin 1 gene transfer activates autophagy and ameliorates the neurodegenerative pathology in alpha-synuclein models of Parkinson's and Lewy body diseases. *J. Neurosci.* 29, 13578–13588.
- Spijker, S. (2011). Dissection of Rodent Brain Regions. In *Neuroproteomics*, K.W. Li, ed. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 13–26.

- Spillantini, M.G., Schmidt, M.L., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., Jakes, R., and Goedert, M. (1997). Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388, 839–840.
- Spillantini, M.G., Crowther, R.A., Jakes, R., Hasegawa, M., and Goedert, M. (1998). alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 6469–6473.
- Stefanis, L. (2012).  $\alpha$ -Synuclein in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a009399.
- Stolzenberg, E., Berry, D., Yang, D., Lee, E.Y., Kroemer, A., Kaufman, S., Wong, G.C.L., Oppenheim, J.J., Sen, S., Fishbein, T., et al. (2017). A Role for Neuronal Alpha-Synuclein in Gastrointestinal Immunity. *J Innate Immun* 9, 456–463.
- Stykel, M.G., Humphries, K.M., Kamski-Hennekam, E., Buchner-Duby, B., Porte-Trachsel, N., Ryan, T., Coackley, C.L., Bamm, V.V., Harauz, G., and Ryan, S.D. (2021).  $\alpha$ -Synuclein mutation impairs processing of endomembrane compartments and promotes exocytosis and seeding of  $\alpha$ -synuclein pathology. *Cell Rep.* 35, 109099.
- Su, X., Maguire-Zeiss, K.A., Giuliano, R., Pifti, L., Venkatesh, K., and Federoff, H.J. (2008). Synuclein activates microglia in a model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* 29, 1690–1701.
- Subramaniam, S.R., Vergnes, L., Franich, N.R., Reue, K., and Chesselet, M.-F. (2014). Region specific mitochondrial impairment in mice with widespread overexpression of alpha-synuclein. *Neurobiol. Dis.* 70, 204–213.
- Südhof, T.C. (2012). The presynaptic active zone. *Neuron* 75, 11–25.
- Südhof, T.C. (2013). Neurotransmitter release: the last millisecond in the life of a synaptic vesicle. *Neuron* 80, 675–690.
- Sulzer, D., Alcalay, R.N., Garretti, F., Cote, L., Kanter, E., Agin-Liebes, J., Liong, C., McMurtrey, C., Hildebrand, W.H., Mao, X., et al. (2017). T cells from patients with Parkinson's disease recognize  $\alpha$ -synuclein peptides. *Nature* 546, 656–661.
- Supek, F., Bošnjak, M., Škunca, N., and Šmuc, T. (2011). REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS One* 6, e21800.
- Surmeier, D.J., Yan, Z., and Song, W.J. (1998). Coordinated expression of dopamine receptors in neostriatal medium spiny neurons. *Adv. Pharmacol.* 42, 1020–1023.
- Surmeier, D.J., Obeso, J.A., and Halliday, G.M. (2017). Selective neuronal vulnerability in Parkinson disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 18, 101–113.
- Taguchi, K., Watanabe, Y., Tsujimura, A., and Tanaka, M. (2016). Brain region-dependent differential expression of alpha-synuclein. *J. Comp. Neurol.* 524, 1236–1258.

- Taguchi, K., Watanabe, Y., Tsujimura, A., and Tanaka, M. (2019). Expression of  $\alpha$ -synuclein is regulated in a neuronal cell type-dependent manner. *Anat Sci Int* 94, 11–22.
- Tang, Y., and Le, W. (2016). Differential roles of M1 and M2 microglia in neurodegenerative diseases. *Mol. Neurobiol.* 53, 1181–1194.
- Tang, Q., Gao, P., Arzberger, T., Höllerhage, M., Herms, J., Höglinger, G., and Koeglsperger, T. (2021). Alpha-Synuclein defects autophagy by impairing SNAP29-mediated autophagosome-lysosome fusion. *Cell Death Dis.* 12, 854.
- Thayanidhi, N., Helm, J.R., Nycz, D.C., Bentley, M., Liang, Y., and Hay, J.C. (2010). Alpha-synuclein delays endoplasmic reticulum (ER)-to-Golgi transport in mammalian cells by antagonizing ER/Golgi SNAREs. *Mol. Biol. Cell* 21, 1850–1863.
- Theodore, S., Cao, S., McLean, P.J., and Standaert, D.G. (2008). Targeted overexpression of human alpha-synuclein triggers microglial activation and an adaptive immune response in a mouse model of Parkinson disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 67, 1149–1158.
- Thomas, H.E., Zhang, Y., Stefely, J.A., Veiga, S.R., Thomas, G., Kozma, S.C., and Mercer, C.A. (2018). Mitochondrial complex I activity is required for maximal autophagy. *Cell Rep.* 24, 2404–2417.e8.
- Tomlinson, J.J., Shutinoski, B., Dong, L., Meng, F., Elleithy, D., Lengacher, N.A., Nguyen, A.P., Cron, G.O., Jiang, Q., Roberson, E.D., et al. (2017). Holocranohistochemistry enables the visualization of  $\alpha$ -synuclein expression in the murine olfactory system and discovery of its systemic anti-microbial effects. *J. Neural Transm.* 124, 721–738.
- Torra, A., Parent, A., Cuadros, T., Rodríguez-Galván, B., Ruiz-Bronchal, E., Ballabio, A., Bortolozzi, A., Vila, M., and Bové, J. (2018). Overexpression of TFEB Drives a Pleiotropic Neurotrophic Effect and Prevents Parkinson's Disease-Related Neurodegeneration. *Mol. Ther.* 26, 1552–1567.
- Trétiakoff, C. (1919). Contribution à l'étude de l'anatomie pathologique du locus niger de Soemmering avec quelques deductions relatives a la pathogenie des troubles du tonus musculaire et de la maladie de Parkinson. Université de Paris.
- Tufekci, K.U., Meuwissen, R., Genc, S., and Genc, K. (2012). Inflammation in Parkinson's disease. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* 88, 69–132.
- Twig, G., Elorza, A., Molina, A.J.A., Mohamed, H., Wikstrom, J.D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S.E., Katz, S., Las, G., et al. (2008). Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J.* 27, 433–446.
- Uéda, K., Fukushima, H., Masliah, E., Xia, Y., Iwai, A., Yoshimoto, M., Otero, D.A., Kondo, J., Ihara, Y., and Saitoh, T. (1993). Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 11282–11286.

- Vila, M. (2019). Neuromelanin, aging, and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* *34*, 1440–1451.
- Villalba, R.M., and Smith, Y. (2018). Loss and remodeling of striatal dendritic spines in Parkinson's disease: from homeostasis to maladaptive plasticity? *J. Neural Transm.* *125*, 431–447.
- Vogiatzi, T., Xilouri, M., Vekrellis, K., and Stefanis, L. (2008). Wild type alpha-synuclein is degraded by chaperone-mediated autophagy and macroautophagy in neuronal cells. *J. Biol. Chem.* *283*, 23542–23556.
- Wakabayashi, K., Tanji, K., Odagiri, S., Miki, Y., Mori, F., and Takahashi, H. (2013). The Lewy body in Parkinson's disease and related neurodegenerative disorders. *Mol. Neurobiol.* *47*, 495–508.
- Wang, W., Perovic, I., Chittuluru, J., Kaganovich, A., Nguyen, L.T.T., Liao, J., Auclair, J.R., Johnson, D., Landeru, A., Simorellis, A.K., et al. (2011). A soluble  $\alpha$ -synuclein construct forms a dynamic tetramer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *108*, 17797–17802.
- Watson, M.B., Richter, F., Lee, S.K., Gabby, L., Wu, J., Masliah, E., Effros, R.B., and Chesselet, M.-F. (2012). Regionally-specific microglial activation in young mice over-expressing human wildtype alpha-synuclein. *Exp. Neurol.* *237*, 318–334.
- Weinert, M., Selvakumar, T., Tierney, T.S., and Alavian, K.N. (2015). Isolation, culture and long-term maintenance of primary mesencephalic dopaminergic neurons from embryonic rodent brains. *J. Vis. Exp.*
- Winslow, A.R., Chen, C.-W., Corrochano, S., Acevedo-Arozena, A., Gordon, D.E., Peden, A.A., Lichtenberg, M., Menzies, F.M., Ravikumar, B., Imarisio, S., et al. (2010).  $\alpha$ -Synuclein impairs macroautophagy: implications for Parkinson's disease. *J. Cell Biol.* *190*, 1023–1037.
- Withers, G.S., George, J.M., Banker, G.A., and Clayton, D.F. (1997). Delayed localization of synelfin (synuclein, NACP) to presynaptic terminals in cultured rat hippocampal neurons. *Brain Res. Dev. Brain Res.* *99*, 87–94.
- Wong, Y.C., Ysselstein, D., and Krainc, D. (2018). Mitochondria-lysosome contacts regulate mitochondrial fission via RAB7 GTP hydrolysis. *Nature* *554*, 382–386.
- Xie, W., and Chung, K.K.K. (2012). Alpha-synuclein impairs normal dynamics of mitochondria in cell and animal models of Parkinson's disease. *J. Neurochem.* *122*, 404–414.
- Xilouri, M., Vogiatzi, T., Vekrellis, K., Park, D., and Stefanis, L. (2009). Abberant alpha-synuclein confers toxicity to neurons in part through inhibition of chaperone-mediated autophagy. *PLoS One* *4*, e5515.

- Xilouri, M., Brekk, O.R., Landeck, N., Pitychoutis, P.M., Papasilekas, T., Papadopoulou-Daifoti, Z., Kirik, D., and Stefanis, L. (2013). Boosting chaperone-mediated autophagy in vivo mitigates  $\alpha$ -synuclein-induced neurodegeneration. *Brain* 136, 2130–2146.
- Yan, J.-Q., Yuan, Y.-H., Gao, Y.-N., Huang, J.-Y., Ma, K.-L., Gao, Y., Zhang, W.-Q., Guo, X.-F., and Chen, N.-H. (2014). Overexpression of human E46K mutant  $\alpha$ -synuclein impairs macroautophagy via inactivation of JNK1-Bcl-2 pathway. *Mol. Neurobiol.* 50, 685–701.
- Yonetani, M., Nonaka, T., Masuda, M., Inukai, Y., Oikawa, T., Hisanaga, S.-I., and Hasegawa, M. (2009). Conversion of wild-type alpha-synuclein into mutant-type fibrils and its propagation in the presence of A30P mutant. *J. Biol. Chem.* 284, 7940–7950.
- Yu, W.H., Dorado, B., Figueroa, H.Y., Wang, L., Planel, E., Cookson, M.R., Clark, L.N., and Duff, K.E. (2009). Metabolic activity determines efficacy of macroautophagic clearance of pathological oligomeric alpha-synuclein. *Am. J. Pathol.* 175, 736–747.
- Zarranz, J.J., Alegre, J., Gómez-Esteban, J.C., Lezcano, E., Ros, R., Ampuero, I., Vidal, L., Hoenicka, J., Rodriguez, O., Atarés, B., et al. (2004). The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann. Neurol.* 55, 164–173.
- Zharikov, A., Bai, Q., De Miranda, B.R., Van Laar, A., Greenamyre, J.T., and Burton, E.A. (2019). Long-term RNAi knockdown of  $\alpha$ -synuclein in the adult rat substantia nigra without neurodegeneration. *Neurobiol. Dis.* 125, 146–153.
- Zheng, W., and Flavell, R.A. (1997). The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 89, 587–596.

Esta tesis se ha llevado a cabo siendo Elena Juárez Escoto beneficiaria de un contrato predoctoral para la formación de doctores del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (BES-2016-078987).

La investigación realizada en este trabajo ha sido financiada por el proyecto SAF2015-66625-R del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad.